



タンパク質の高性能分離法（SDS-PAGE）

タンパク質の研究に欠くことのできない分離法 SDS-PAGE その誕生の地の1つが東工大です

私たちの体には約3万種類ものタンパク質（プロテイン proteins）がある。そのおかげで私たちは動き回れるだけでなく、創作活動などの高度な営みもできる。系統的なタンパク質の研究は18世紀半ばに始まった。身の回りにたくさんある卵白（卵白アルブミン）、肉汁（ゼラチン）、血液（血清アルブミン）や血の塊（フィブリン）、絹（フィブロイン）などの組成が調べられた。今から見れば不十分な結果しか得られていないのだが、それらの物質は基本的な構造を共有しているとの希望的観測と思い込みから、プロテインという総称が提唱された。結果的には正解で、タンパク質研究の歴史では、画期的なこととして次のように記されている：「1838年に、スウェーデンのベルツェリウス（Berzelius, 1779～1848）とオランダの化学者ムルダー（Mulder, 1802～1880）によって、プロテインという用語が考案され使用された」。プロテインはギリシャ語の“プロティオス πρωτειος”（一番大切なもの proteios = first = of primary importance）に由来する命名で、その実体や働きがまだ不明だった時に、生命活動に最も重要な物質に違いないと考えたのだから驚くべき洞察力だ。日本語のタンパク質は卵（＝蛋）白に由来する。その後のタンパク質の研究を支えたのは、分離分析法の進歩だったが、中でも複雑なタンパク質複合体の分離法として1965年前後に開発された界面活性剤 SDS 存在下でのゲル電気泳動（SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis）は、50年以上を経た今も、画期的かつ最強の分離法として君臨している。SDS-PAGE は世界の3か所でほぼ同時に開発されたが、そのうちの1つが本学化学科の生物化学教室だった。（多忙な方は、5頁の「SDS-PAGE 生みの親たち」へお進みください）

1. タンパク質研究の歴史 （注1）

卵白が起源

生卵①の透明な部分は加熱によって変性し、白く凝固する。この現象は古代から人々の興味をひいてきた。ローマ時代（1世紀）には、博物学者プリニウス②（Pliny the Elder = Gaius **Plinius** Secundus, AD 23～79）によって、卵の凝固成分がラテン語の albus ovi（egg white, 卵白）にちなんでアルブメン albumen と命名されている。しかし、長い間それ以上の進展はみられなかった。18世紀末になって、フランスの化学者フルクロア③（Antoine **Fourcroy**, 1755～1809）は血清も熱によって固まることを観察し、その凝固成分を卵白のアルブメンに因んでアルブミン albumin と命名した。この

名称は今日も用いられている。この頃には卵白アルブミン、血清アルブミンのほか、血液凝固のもととなるフィブリン fibrin や肉汁を冷やしたときに固まるゼラチン gelatin などがアルブミン様物質として知られるようになっていた。本題に入る前に、これらの物質にプロテインという総称を付けたのは誰で、その語源は何かを見ておこう。

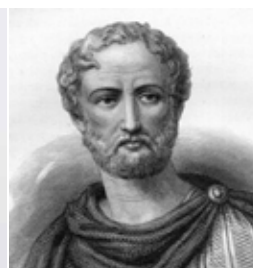


① 鶏卵

プロテイン protein という 名称 発案のいきさつ

（1）背景となった化学の進歩

原子の概念：18世紀は化学にとって飛躍の世紀だった。ラボアジェ④（Antoine Laurent **Lavoisier**, 1743～1794, 近代化学の父）は、物質の最小単位に思いを巡らせたボイル④（Robert **Boyle**, 1627～1691, 近代化学の祖）の考えを発展させ、それ以



② プリニウス Plinius
(AD 23～79, ローマ)



③ フルクロア Fourcroy
(1755～1809, 仏)



④ ボイル Boyle
(1627–1691, Ireland 英)



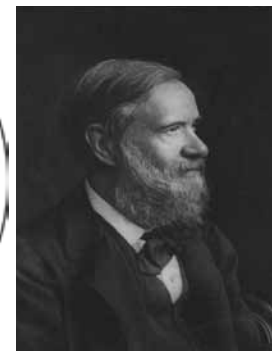
⑤ ラボアジェ Lavoisier
(1743–1794, 仏)



⑥ ダルトン Dalton
(1766–1844, 英)



⑦ アボガドロ Avogadro
(1776–1856, 伊)



⑧ カニッツァロ Cannizzaro
(1826–1910, 伊)

上不可分な物質特有の粒が存在すると考えた。彼はさらに、「化学反応の前と後で物質の総質量は変化しない」という“質量保存則”（化学反応の前と後では、基本単位である粒同士の結び付き方が違うだけで、反応に関わる粒全体の種類と数は不変との考え）にも到達した。実際に多くの元素が発見され、基本単位としての不可分な粒は、ダルトン⑥ (John Dalton, 英, 1766～1844) の“原子論”^(注2)へと発展した。しかし、ダルトンの原子論では、水素 (H) と酸素 (O) の反応が次式のようになり ($O + H \rightarrow OH$)、水素2容量と酸素1容量から水蒸気2容量が生成するという実験結果を定量的に説明できなかった。

分子の概念：アボガドロ⑦ (Amedeo Avogadro, 1776～1856) が分子説（アボガドロの法則：同一体積に含まれる気体分子の数は、その種類を問わず、等しい；ここで分子の概念を導入）を提唱したのは1811年だったが、広く認識されるようになったのは、死後の1860年以降だった。これに先立つ1858年アボガドロと同じイタリア出身のカニッツァロ⑧ (Stanislao Cannizzaro, 1826～1910) がアボガドロの

分子論を支持する論文を発表し、1860年にケクレの呼びかけによって開かれた第1回国際化学会議で「原子量、分子量を決定するにはアボガドロの分子論を適用すべきだ」と訴えて、忘れかけられていたアボガドロの業績がよみがえることになった。分子の概念では、水素 (H_2) と酸素 (O_2) の反応は、 $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$ と定量的に記述できる。

元素 C, H, N の含量分析法：有機化学の発展の原動力となったのは燃焼法による有機元素分析法の開発だった。1831年にドイツのリービッヒ⑨ (Justus Freiherr von Liebig, 1803～1873) が有機物中の炭素と水素の定量法を開発し、つづいて1833年にフランスのデュマ⑩^(注3) (Jean Baptiste André Dumas, 1800～1884) が窒素の分析法を考案した。これらの方法はオーストリアのプレグル⑪ (Fritz Pregl, 1869～1930) によって微量化され、今も使われている。有機化学のみならず初期のタンパク質研究においても威力を発揮した。

原子価（結合の手）の概念：酸素原子

は2個の水素原子と、窒素原子は3個の水素原子と結合するという経験則及び有機金属化合物の研究を通して、1852年にイギリスのフランクランド⑫ (Edward Frankland, 1825～1899) は原子価の概念を提唱した。その後1858年に、炭素の原子価が4だと主張したのがリービッヒの門下生のケクレ⑬ (August Kekulé, 1829～1896) で鎖状有機化合物の構造を記述できるようにし、1865年にはベンゼンの環構造を思いついた。

(2) アーモンドの研究から派生した原子団（基）の概念

19世紀初頭の勢力図を見てみると、ベルセリウス⑭ (Jöns Jacob Berzelius, 1779～1848) のスウェーデン、ダルトン Dalton のイギリス、ゲイ・リュサック⑮ (Joseph Louis Gay-Lussac, 1778～1850) のフランスが化学界をリードしていた。化学では後れを取っていたドイツのリービッヒ Liebig は、博物学者フンボルト⑯ (Alexander von Humboldt, 1769～1859) の取り計らいでゲイ・リュサックのもとに留学する機会を得て、雷酸銀 ($AgCNO$, $AgC \equiv N-O$) に関す



⑨ リービッヒ Liebig
(1803–1873, 独)



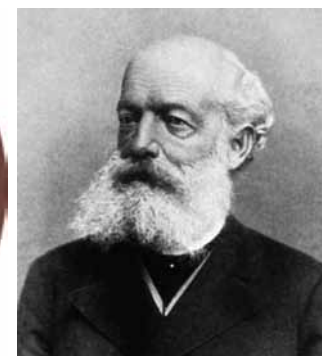
⑩ デュマ Dumas
(1800–1884, 仏)



⑪ プレグル Pregl
(1869–1930, 奥)



⑫ フランクランド Frankland
(1825–1899, 英)



⑬ ケクレ Kekulé
(1829–1896, 独)



14 ベルセリウス Berzelius (1779–1848, Sweden)



15 ゲイ・リュサック Gay-Lussac (1778–1850, 仏)



16 フンボルト Humboldt (1769–1859, 独)



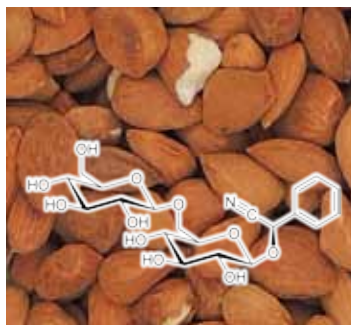
17 ヴェーラー Wöhler (1800–1882, 独)



18 ムルダー Mulder (1802–1880, 蘭)

る研究を仕上げ、帰国後、前述の有機元素分析法を開発してドイツを化学大国へと導くことになる。雷酸銀の研究に関しては、ヴェーラー¹⁷ (Friedrich Wöhler, 1800～1882) が研究していたシアン酸銀 (AgOCN , $\text{AgO-C}\equiv\text{N}$) と組成は同じなのに性質は大きく異なったことから大論争となるが、「構造異性体」であることで決着をみた (1825, 論文は1831年)。一時は対立気味だった両者の仲も不思議なほどうまくいくようになり、親交は生涯続いた。シアン酸を主要な研究テーマとしていたヴェーラーは、その後、シアン酸アンモニウム (NH_4OCN , 組成 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) を合成するつもりで行った実験で、意図せずに、異性体である尿素 (NH_2CONH_2 , 組成 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) を得た (1828)。当時は生体成分を人工的に合成することは不可能と考えられていたから、有機合成化学に道を開いた画期的な業績として今も教科書に載っている。

1828年はヴェーラーにとっては、従妹のフランシスカ Franziska と結婚したという意味でも記念すべき年となったが、4年後に悲劇に見舞われた。第2子の出産後の肥立ちが悪く、妻が22歳の若さで亡くなったのだ。傷心のヴェーラーに、「少しでも気を紛らわせるには体を動かすのが一番だ」といって、一緒に実験をすることを提案したのが親友のリービッヒだった。リービッヒの研究室で2人は、以前から温めていたテーマに無我夢中で取り組んだ。そのテーマはシアン化合物という大きな流れの中の一つで、苦味アーモンド bitter almond¹⁹ から油を搾りだす過程で副産物としてシアン化水素 (青酸 HCN , 猛



19 苦味アーモンド & Amygdalin

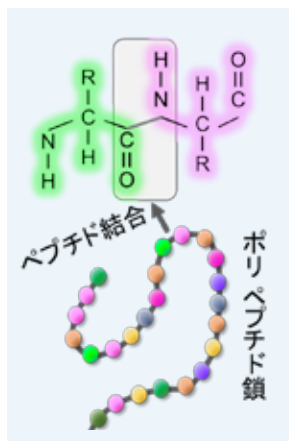
毒) が生成する問題に興味を持ち、苦味アーモンド油の分析を行った。その主成分の1つが青酸配糖体のアミグダリン amygdalin¹⁹ で、加水分解によってシアン化水素とベンズアルデヒド benzaldehyde (独特の芳香を放つ) が生成する。彼らは、このベンズアルデヒドに対して様々な実験 (酸素や塩素の暴露など) を行い、容易に酸 (安息香酸, benzoic acid) や塩化物 (塩化ベンゾイル) やアミド (ベンズアミド) に変換できることを見つけた (1832) (表1)。この時、反応によって変化しない $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}$ という単位 (当時は2倍量で計算) が存在することに気づき、ベンゾイル benzoyl 基と命名した (注4)。反応時にまとまって動く原子団 (基; radical, group) の概念が打ち立てられ、有機化合物の構造に関する理解が飛躍的に進展するきっかけになった。さらに、この原子団 (基) の概念は、アルブミン様物質 (現在のタンパク質) の元素分析を行っていた研究者ムルダーの心をとらえ、次節のように今日のプロテインという用語を生み出すことになる。

化合物	分子式	ベンゾイル基 + α
ベンズアルデヒド	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$	
安息香酸 Benzoic acid	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	
塩化ベンゾイル	$\text{C}_7\text{H}_5\text{OCl}$	
ベンズアミド	$\text{C}_7\text{H}_7\text{ON}$	

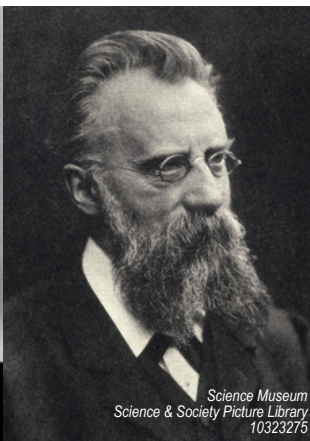
表1. 原子団の概念 (Benzoyl group)

(3) ベンゾイル基に刺激されたアルブミン様物質の研究者

オランダのムルダー¹⁸ (Gerardus Johannes Mulder, 1802～1880) は、医学教育を受け医師になった。医療のかたわら有機化学の研究をしていたが、1832～1833年のコレラ大流行で超多忙となり、両立は難しいと判断して医師をやめ、有機化学に専念することにした。最初は薬として使われる天然有機物の元素分析を主としていたが、1834年に上述のスウェーデンのベルセリウス Berzelius と文通によって情報交換するようになってからは、窒素含有物 (上記のアルブミン様物質) の元素分析を従来の C , H , O , N に加え、リン (P) とイオウ (S) についても行い、驚くほど単純な結果を得た: 例えば、卵白アルブミンは P と S を基準にすると $\text{C}_{400}\text{H}_{620}\text{N}_{100}\text{O}_{120}\text{P}_1\text{S}_1$; 血清アルブミンは $\text{C}_{400}\text{H}_{620}\text{N}_{100}\text{O}_{120}\text{P}_1\text{S}_2$ で、当時話題となっていた原子団 (基) の概念に従えば、 $\text{C}_{400}\text{H}_{620}\text{N}_{100}\text{O}_{120}$ 基を共有するように見えた (注5)。すなわち「 $\text{C}_{400}\text{H}_{620}\text{N}_{100}\text{O}_{120}$ がアルブミン様物質の本体であり、これにリンやイオウが結合して様々なアルブミン様物質ができあがっている」



⑳ ペプチド結合

㉑ フィッシャー Fischer
(1852–1919, 独)㉒ ホフマイスター Hofmeister
(1850–1922, 独)

と解釈できる。これが事実ならば、ベンゾイル基につぐ巨大原子団（基）を発見したことになる。この旨をムルダーは、1838年6月3日にベルセリウスに手紙で知らせた。「でかした!」という賛辞と共に、ベルセリウスは、ムルダーに $C_{400}H_{620}N_{100}O_{120}$ 基をギリシャ語の“プロティオス πρωτειος” (proteios = chief) に因んで「プロテイン protein」と呼ぶように勧めた(7月10日の手紙) ^(注6)。

タンパク質の正体に近づく

こうして歴史的にはプロテインという用語が1839年に初めて論文 ^(注7) に登場することになるが、ムルダーの実験の再現性の問題もあり、今日的な意味でその用語が定着したのは20世紀初頭になってからだった(1907～1908, 英米の命名委員会)。この間の1902年に、ドイツの有機化学者フィッシャー ^㉑ (Hermann Emil Fischer, 1852～1919) と医学生物学者ホフマイスター ^㉒ (Franz Hofmeister, 1850～1922) が、独立に「タンパク質はアミノ酸 ^(注8) がペプチド結合 ^㉓ ^(注9) によって重合したものである」ことを明らかにしている。同じ学会で同じ日の発表であった。強い性格だったフィッシャーがよく知られているのに対し、温和だったホフマイスターはあまり知られていないが、タンパク質の本質的な理解に誰よりも大きく貢献したホフマイスターの肩を持つ歴史家は少なくない。ホフマイスターはタンパク質の溶解度に及ぼす陽イオン及び陰イオンの影響についても研究し、塩

析を起こしやすい順に陰イオンを並べた「ホフマイスター系列」を提唱した。

タンパク質の研究法

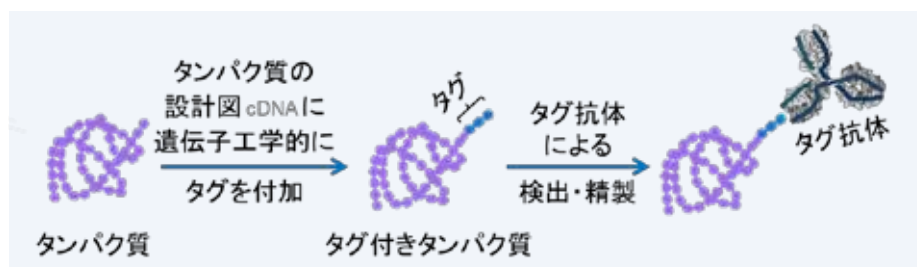
タンパク質の基本構造、すなわち多数のアミノ酸が直鎖状につながった分子 ^㉓ であることが明らかになると、個々のタンパク質を純粋な形で取り出し、その性質やアミノ酸組成、さらにはアミノ酸の並び順(1次構造)やポリペプチド鎖が折りたたまれてできる立体構造(3次構造)を決めようとする試みが盛んになるとともに、そのために必要なタンパク質の精製法や分離分析法が多数開発され、生物化学の全盛期を迎えた。特に、1930年以降は近代的な手法(超遠心分析、電気泳動、免疫化学的分析、及びイオン交換・ゲルろ過・アフィニティークロマトグラフィーなど)が開発されタンパク質科学は目覚ましい進歩をとげた。

しかし、これらの方法は手間と時間がかかる上に、微量タンパク質を扱う場合にはあまり頼りにならず、生物化学者は苦労を強いられた。この状況を一変させたのが遺伝子工学の登場だった。

遺伝子工学の威力

1950年代になると、タンパク質を単離して、その構造と機能を解明するアプローチとは別に、タンパク質が細胞内でどのように作られるかという生合成過程に関する研究も盛んにおこなわれるようになった。その結果、(1) 特定のタンパク質に対応する遺伝子(DNAの塩基配列)によってタンパク質のアミノ酸配列が指定されていること、(2) このDNAの塩基配列情報は先ずメッセンジャーRNA(mRNA)に転写・加工され、(3) このmRNAが鋳型となってタンパク質合成装置ともいべきリボゾーム上でトランスファーRNA(tRNA)によって運ばれてきたアミノ酸が順次結合しペプチド鎖が伸長していくことが明らかになった。 ^(注10)

mRNAがタンパク質の設計図ゆえ、これを上手に使いえば、望むタンパク質を人工的に大量に作ることができることになる。これを可能にしたのが1973年に産声を上げた遺伝子工学で、その後40余年のうちに長足の進歩を遂げ、今ではバイオ系の研究スタイルを一新させるまでになっている。タンパク質の研究に限っても、研究現場は革命的といえるほど技術的に洗練され、かつ省力化されている。一昔前は、組織抽出液を分離用超遠心機で前処理した後、低温室にこもって種々のカラムクロマトグラフィーによって目的とするタンパク質を精製していたが、今はタンパク質の設計図が簡単に手に入るの、それに精製のための短いタグ配列 ^㉔ を付加したものを遺伝子工学的に大腸菌や動物培養細胞等で生産しタグ抗体等を用いて精製すれば済むようになって(図 ^㉔)。防寒着をまもって低温室で苦労した世代には夢のようだろう。



㉔ タグを付けることにより、タンパク質の種類を問わず、検出や精製が可能になった。

研究法の激しい世代交代の中であって、なくてはならないタンパク質の分離分析法として使い続けられているのが本稿の主題である SDS-PAGE である。

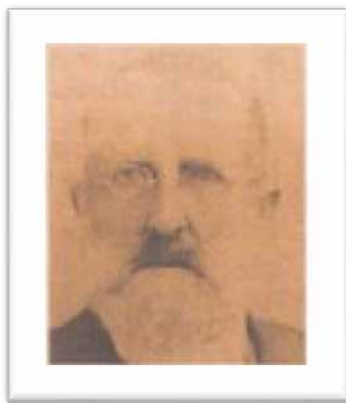
2. SDS-PAGE とは

タンパク質の研究には、タンパク質を分離・同定・定量する手段は欠かせない。この目的のために使われているのが SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動) であるが、それを最初に試みたのはタンパク質科学者ではなかった点に興味深い。遺伝子工学が進歩し、上述のように比較的容易にタンパク質を人工的に生産できるようになっても、その産物の純度を検定し、量を見積もることは不可欠ゆえ、SDS-PAGE はタンパク質研究の基本技術として、今後も長くバイオ系の研究を支えるであろう。以下ではまず (1) 電気泳動の歴史を概観し、(2) SDS-PAGE の生みの親たちにスポットライトを当てた後に、(3) バイオ系の学生向けに SDS-PAGE の原理を図解したい。

電気泳動の歴史 (注11)

マイナスに帯電した粘土微粒子（コロイド）がプラス極に向かって動くことを観察したモスクワ大学のロイス²⁴ (Ferdinand Friedrich von Reuss, 1778 ~ 1852) の実験 (1807 年, 論文は 1809 年) が電気泳動の最初といわれている (ロイスの電池は、東北大学の 2005 年の入試問題にもなった)。水溶性のタンパク質は中心部に疎水的なアミノ酸残基が集まり、水溶液と接する表面には親水性の（電荷を持った）アミノ酸残基がくるようにペプチド鎖が折りたたまれて一定の立体構造をとっているの、電気泳動によって、電荷の状態に応じて分離することが可能である。

タンパク質の電気泳動は、1930 年代にスウェーデンのティセリアス²⁵ (Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, 1902 ~ 1971) によって実用化されたが、彼の方法では水溶液で満たした細いガラス管の中を



²⁴ ロイス Reuss (1778--1852)

ロイスはドイツ生まれだが、才能を見込まれて、若くしてモスクワ大学に招聘され、30 年間 奉職した。出典: <https://www.egmshop.at/wp-content/uploads/2017/08/Ferdinand-Reuss.pdf>

泳動させる方式（無担体電気泳動）だったために、熱対流等による乱れが生じ、冷却が必要だった。この欠点は、ろ紙等の膜やアガロース等のゲルを担体として用いることにより克服され、1959 年にポリアクリルアミドゲルを担体とする電気泳動法 (PAGE) が開発された (Science 130, 711, 1959; Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 & 404, 1964)。

当時の生物化学分野で研究対象となっていたタンパク質は、構造が比較的単純なもの（複雑なものでもヘモグロビンのように少数のサブユニットからなるもの）だった上に、なるべく本来の構造を維持した状態で分離・分析するのが常道だったために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 PAGE はタンパク質科学者には満足すべき先端技術として受け入れられ、広く普及した。現在では、次節で述べる SDS-PAGE に対し、変性剤を使用しない元祖 PAGE はネイティブ Native PAGE と呼ばれている。

SDS-PAGE の生みの親たち

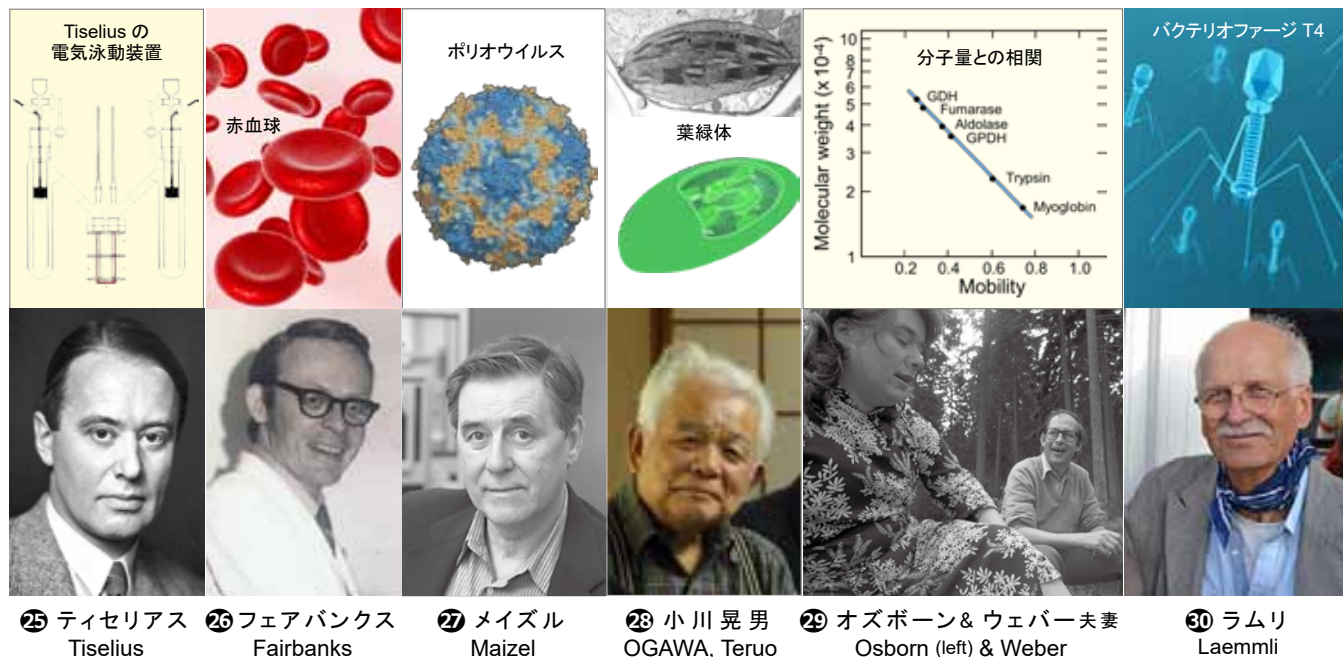
(1) MIT にて

マサチューセッツ工科大学 MIT の大学院生だったフェアバンクス²⁶ (Grant Fairbanks, 1940 ~ 2017) は、分子生物学のレビンソール (Cyrus Levinthal) 研究室で大腸菌を用いて、(i) タンパク質の生合成過程を追跡するための実験法 (Pulse chase 実験, すなわち [¹⁴C]Leucine を取り込ませたタンパク質の Native PAGE による分離とその分離パターンを可視化するため

のオートラジオグラフィー) の開発と (ii) 自分自身の博士論文のテーマである大腸菌の細胞膜を構成するタンパク質に関する研究に取り組んでいた。1964 年のことだ。後者に関しては、SDS で大腸菌の膜を可溶化し、SDS の存在下で電気泳動を行うと非常にきれいな分離パターンが得られ（まさに **SDS-PAGE**）、しかも電気泳動の移動度とタンパク質の分子量が逆相関するらしいことを見つけていたが、分子生物学の研究室としては前者の実験を優先したい、しかも大学院生は彼一人ということで、SDS-PAGE の仕事はしばらく脇に置かざるを得なかった。こうして ¹⁴C- 標識されたタンパク質のオートラジオグラフィーの仕事を論文にまとめている間に、次に述べる米国アルバート アインシュタイン医科大学 (EINSTEIN 医科大) のグループに論文発表では先を越されてしまった。(注12)

(2) EINSTEIN 医科大学にて

MIT で SDS-PAGE が産声を上げようとしていたのと同じ頃、NIH から EINSTEIN 医科大に移ったイーグル (Harry Eagle, 細胞培養液に名を残している) の研究室で助教としてポリオウイルスの研究をしていたメイズル²⁷ (Jacob Maizel) は、ポリオウイルスのキャプシド (Capsid: ウイルスゲノム [ポリオウイルスの場合は RNA] を取り囲むタンパク質の殻²⁷ 上) を変性剤である 8 M 尿素で処理すると複数のタンパク質に分かれることを見つけて驚きの声を上げた。当時は、キャプシドは 1 種類のタンパク質からできていると信じられていたからだ。この時ちょうど、オーストラリアからリクルートされてイーグル研究室に来ていたヨークリク (Bill Joklik, 1926 ~) は、インフルエンザウイルスの構成タンパク質を SDS でバラバラに分離した例があるから、SDS を使ってみるよう示唆してくれた。これがきっかけとなって、イーグル研究室で SDS-PAGE が開発され、それが最終的に、方法論としての論文ではなく、その方法を用いて学術的に大きな成果を上げた論文として発表された。すなわち、ポリオウイルスに感染した HeLa 細胞を材料に、



HeLa 細胞内でキャプシドタンパク質の他にもウイルスに由来するタンパク質がつくられていることを SDS-PAGE で示すことに成功したのだ。この論文にはボスであるイーグルの名前は入っていないが、イーグルは米国科学アカデミーの会員だったので、論文を PNAS 誌に推薦し、すぐに受理された (1965 年 6 月 21 日受理, 8 月発行) (注 13a)。メイズル自身の手になる回想録が参考になる。 (注 13b)

メイズルが「サバティカル」休暇制度を利用して、英国の MRC 研究所にウイルスの電子顕微鏡による観察技術を習いに行った時 (1969) に、博士号取り立ての若者 (ラムリ 30, Ulrich K. Laemmli,) もスイスからやってきた。その若者ラムリはスイス連邦工科大学チューリッヒ校 ETHZ で物理を学んだ後に、ジュネーヴ大学 UNIGE で、バクテリオファージ T4 (30 上) のキャプシドタンパク質を変性剤である 8 M 尿素存在下で電気泳動にかけて分析する実験を行って博士論文を書いたばかりだったので、メイズルに SDS の効果を聞いてきた。「SDS-PAGE は有用な方法だ。しかし、分離のシャープさに関しては、難しいかもしれないが、まだまだ改良しなければならない」と答えると、ラムリは「がぜんやる気になった。普通は躊躇するところだが、彼は難しいと聞くと燃えるタ

イプらしい。さらに、ラムリは物理と化学が得意だったので、電気泳動の基本原理がよく理解できた。

こうして、ポリアクリルアミドゲル内の溶液組成や電極液の組成・pH などを工夫し、繰り返し実験することにより、SDS-PAGE を理想的な形に仕上げた。その方法を使ってバクテリオファージ T4 の頭部を形成するタンパク質の種類や 1 本の前駆体から切断によって生じるものもあることを明らかにし、Nature 誌に単独著者の論文として発表した (注 14)。

方法論の論文ではないので、SDS-PAGE の手順は図の説明に記されているだけだが、この論文は 21 万回を超える被引用回数を誇っており、頂点を極めた論文の一つとなっている。バイオ系でラムリ Laemmli の名前を知らない人はいないだろう。最も大きな改良点は、緩衝液 running buffer をリン酸 (注 15) からトリス (Tris-Cl) & グリシンに変えた点だ。

(3) 東京工業大学にて

昭和 23 年 (1948)、本学の化学科に生物化学教室が新設され、高宮篤 (1910.8.23 ~ 1976.1.16) が助教授として着任した。高宮さんが東大に転出した後任として、昭和 32 年 (1957) に柴田和雄 (1917 ~ 1983) が教授として迎えられた。柴田研究室のテーマの一つが「植物の光合成機構の

解明」で、ハウレンソウの葉から単離した葉緑体を材料にして実験していた。このチームに大学院生として加わった小川晃男 28 は、葉緑体の膜に組み込まれているエネルギー補足・変換装置 (太陽の光を化学エネルギーに変換する光化学反応系 I と光化学反応系 II) の正体を明らかにする研究を始めることにした。

それには、光化学系 I (Photosystem I, PS I) と II (PS II) を分離できれば都合がいい。そこで、葉緑体膜から PS I と PS II を界面活性剤で可溶化し、遊離してきた PS I と PS II を電気泳動で分けるという戦略を立てた。実験を始めたのは 1962 年で、手に入る界面活性剤を片っ端から試してみたが、どれも満足すべき結果は得られなかった。苦勞して最後にたどり着いたのが SDS だった。SDS の濃度を最適化し、ホウ酸緩衝液下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと PS I リッチフラクションと PS II リッチフラクションが得られることが分かった。まさしく SDS-PAGE による PS I 及び PS II 複合体の最初の分離例であり、急いで論文 (注 16) にすることにした。オランダの出版社エルゼビアに原稿が届いたのが 1965 年 6 月 29 日で、メイズルら EINSTEIN 医科大グループが PNAS 誌に論文 (注 13a) を持ち込んだのが、前述のように、1965 年 6 月 21 日で、記録の上ではタッチの差で遅れたことにな

るが、同時並行で進んでいたことは間違いない。小川さんらが使っていた平板型 SDS-PAGE の装置を図 31 に示す。

小川さんはその後 1967 年に「光合成生物における二つの色素蛋白複合体」というタイトルの博士論文をまとめ、C.F. Kettering 研究所 (Ohio), 理化学研究所を経て、名古屋大学の教授を務めた。

SDS-PAGE の原理

最後にバイオ系の学生のために SDS-PAGE の原理を図解しておきたい (図 32)。分かり易い解説もあるので参照されたい。(注 17)

(注 1) Tanford, C. & Reynolds, J., *Nature's Robots: A History of Proteins*, Oxford University Press, 2001.

(注 2) Atom の語源: a (ギリシャ語の否定) + tom (ギリシャ語の切る)。否定接頭辞 a の例: apolitical (政治に無関心な, ノンポリ), asymmetric (非対称の), atypical (典型的でない)。

(注 3) 当大学の創設者の一人であるワグネル (Gottfried Wagener, 1831 ~ 1892) は、フランス滞在中にデュマの講義を聴講しながら化学を独習した。

(注 4) 今からみれば、最初に同定された原子団 (基) は CN とみなすこともできる (表 1)。

(注 5) Mulder, G.J., Zusammensetzung von Fibrin, Albumin, Leimzucker, Leucin u. s. w. *Annalen der Pharmacie* 28, 73-82, 1838.

(注 6) 母国語を異にするベルセリウス (スウェーデン語) とムルダー (オランダ語) はフランス語で文通した。

(注 7) Mulder, G.J., Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. *Journal für praktische Chemie* 16, 129-152, 1839.

(注 8) 当時は、通常のタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち 18 種類が同定されていた。残りのメチオニン Met とスレオニン Thr の同定は、それぞれ 1922 年と 1936 年。最初に同定されたアミノ酸はロイシン Leu で、1819 年。

(注 9) アミノ酸は結合の手を 2 本 (アミノ基 $-NH_2$ とカルボキシル基 $-COOH$) 有するので、お互いに脱水縮合 (R_1-

$COOH + H_2N-R_2 \rightarrow R_1-CONH-R_2 + H_2O$) によって結合し直鎖上の高分子となる。この時生じる **ペプチド結合 (CONH)** が新たな結合手となって、お互いに水素結合することにより、タンパク質の骨格ともいべき α ヘリックスや β シート構造 (2 次構造) を形成する。

(注 10) F. Crick (1916 ~ 2004) によって、遺伝子上の情報は “DNA $\rightarrow$ (転写) $\rightarrow$ mRNA $\rightarrow$ (翻訳) $\rightarrow$ タンパク質” の順に伝達されるという概念 (セントラルドグマ, Central dogma) が提唱されたのは 1958 年。◆実際に中継役である mRNA が同定されたのは 1956 年から 1961 年にかけてで、中心的な役割を果たした Volkin & Astrachan (*Virology* 2, 433-437, 1956), Nomura, Hall, & Spiegelman (*JMB* 2, 306-326, 1960), Brenner, Jacob, & Meselson (*Nature* 190, 576-581, 1961) にはノーベル賞も期待されたが実現しなかった。恐らく 3 人に絞ることが難しかったのだろう (ノーベルの遺言で 3 人以内とされている)。Jacob (1965) と Brenner (2002) は別のテーマで受賞している。

緒方規矩雄, タンパク質合成研究初期の歴史的背景, **蛋白質・核酸・酵素** 42, 770-776, 1997。

(注 11) 菅野 浩, 電気泳動法の発展の歴史, **生物物理化学** 21, 151-158, 1977。◆高木俊夫, 『電気泳動の歴史』バイオサイエンス最前線 '97 増刊号, アト株式会社, 1997。◆GE ヘルスケア・ジャパン(株) ライフサイエンス統括本部, 「**生化夜話 第 2 回: 論文なんて後付けの合理化です——ティセリウスの電気泳動**」; https://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/biodirect_mail/chem_story/73.html ◆GE ヘルスケア・ジャパン(株) ライフサイエンス統括本部, 「**生化夜話 第 3 回: アガロースゲルとアクリルアミドゲル, 先に開発されたのは?**」; https://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/biodirect_mail/chem_story/74.html ◆GE ヘルスケア・ジャパン(株) ライフサイエンス統括本部, 「**生化夜話 第 46 回: 引用したいのは図の説明——SDS-PAGE**」; https://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/biodirect_mail/chem_story/131.html

◆Pederson, T., Turning a PAGE: the overnight sensation of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *FASEB J.* 22, 949-953, 2008. ◆Biscombe, C.J.C., The discovery of electrokinetic phenomena: setting the record straight. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 8338-8340, 2017.

(注 12) MIT のフェアバンクスは、大腸菌の膜タンパク質に関する SDS-PAGE 等による解析結果を 1970 年に博士論文としてまとめた後、SDS-PAGE

が登場する正式な論文としては、EINSTEIN 医科大グループに遅れること 6 年、全く別のテーマである赤血球膜タンパク質の電気泳動解析として 1971 年に発表している (*Biochemistry* 10, 2606-2617, 1971)。論文発表では大幅に遅れながら、業績が歴史に残ったのはめずらしい。

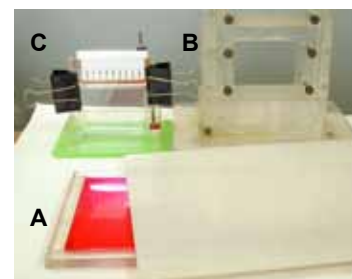
(注 13) ^a Summers, D.F., Maizel, J.V., Jr., and Darnell, J.E., Jr., Evidence for virus-specific non-capsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 505-513, 1965.

^b Maizel, J.V., Jr., SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Trends Biochem. Sci.* 25, 590-592, 2000.

(注 14) Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

(注 15) Weber K, Osborn M.J. 29, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412, 1969.

(注 16) Ogawa T, Obata F, Shibata K., Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 223-234, 1966.



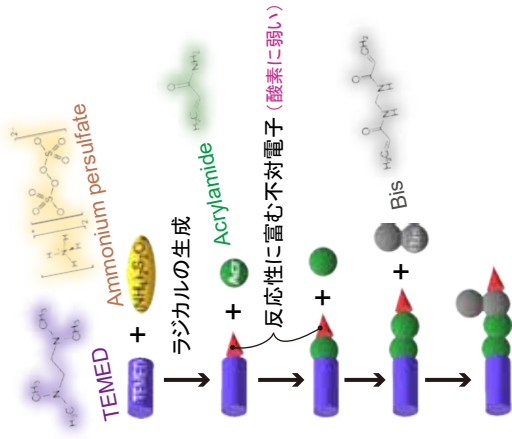
31 初期の平板型 SDS-PAGE 装置

A: 小川らが使用した水平型ゲル板 (実際のゲルは透明であるが、ここでは見やすくするために赤く着色; ゲルを固める際には、空中の酸素を遮断するためにプラスチック板でカバーした)。B: 写真提供者の中谷一泰 (1968 化学 Dr. 現昭和大学名誉教授、小川さんの 1 年後輩) がシカゴ大学の I.G. Wool 研究室で使っていた初期の縦型電気泳動装置。それまでの横型から縦型になった結果、操作のし易さや分離能が著しく上昇した。C: 比較的最近の電気泳動槽。

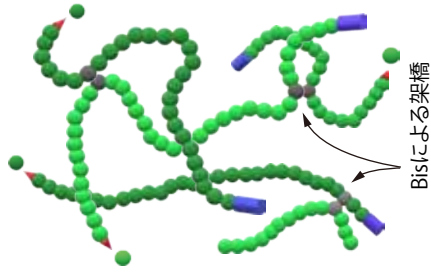
(注 17) 福田青郎, 生物工学基礎講座 バイオよもやま話「濃縮ゲルだよ! タンパク集合」, **生物工学** 89, 332-335, 2011。

2018 年 4 月
東京工業大学 博物館 資料館部門
centshiryou@jim.titech.ac.jp

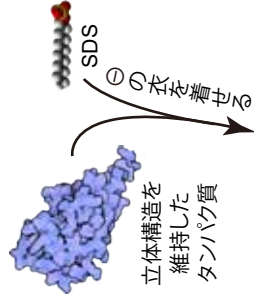
(A) ラジカル反応による重合



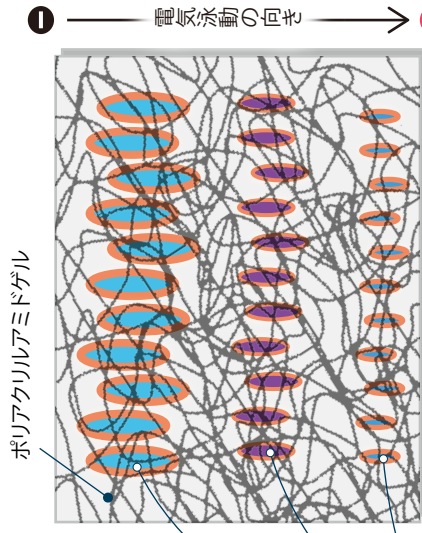
(B) 網目状構造を有するポリアクリルアミドゲル (電気泳動の支持体)



(C) サンプル調製

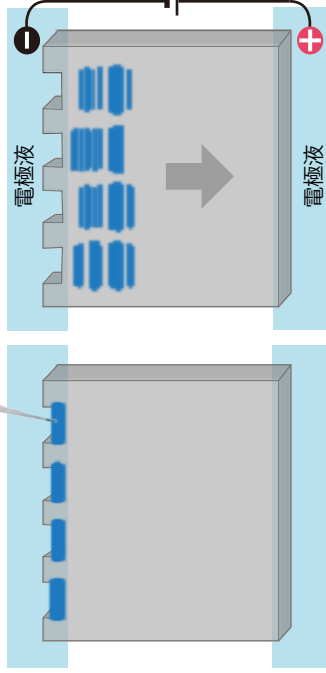


(D) タンパク質の大きさによる分離 (網目をくぐり抜ける障害物競走)

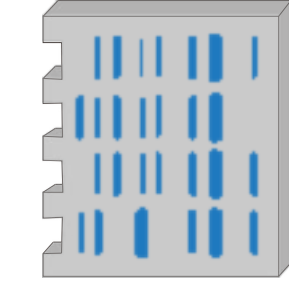


SDSで変性し、直鎖状に伸展したタンパク質 (分子量当たりのマイナス電荷はほぼ一定)

(E) サンプルの添加



(F) 電気泳動 (分離の途中)

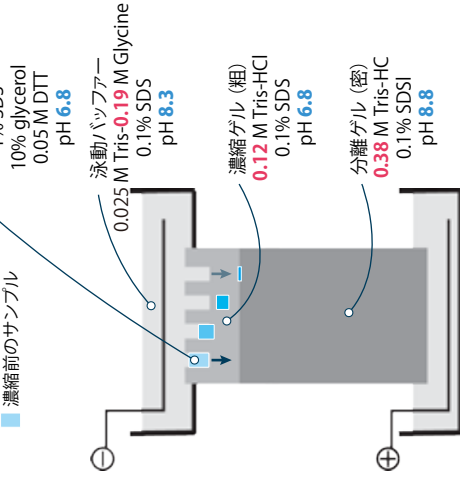


(G) 染色 (分離パターン)



(H) 実際のゲル (染色後)

(I) 濃縮ゲルの働き



32 SDS-PAGEの原理

電気泳動の支持体となる網目構造 (ポリアクリルアミドゲル) はアクリルアミドとビスアクリルアミドの混合物を重合させて作る (A, B)。網目の大きさは、アクリルアミドの濃度を変えることによって調整できる。この重合反応はラジカル反応ゆえ、アクリルアミド溶液中の溶存酸素によって阻害されるので、開発初期の頃は重合の前に脱気操作を行っていたが、現在ではラジカル生成量をラジカル反応誘起剤である過硫酸アンモニウムとTEMEDの量を変えることにより調整し、脱気は省略するのが定石となっている。冷暖房が完備していなかった頃は、夏場と冬場でゲルの固まり方が違い、苦労した人も多かったろう。

SDS (Sodium dodecyl sulfate = Sodium lauryl sulfate, $C_{12}H_{25}SO_4^- Na^+$) は強力な陰イオン性界面活性剤で、タンパク質を変性させて立体構造を破壊し、直鎖状のポリペプチド鎖とする (C)。このとき、ポリペプチド鎖は多数の

SDS $^-$ 分子によって包み込まれており、鎖の長さとともに結合している SDS $^-$ の数はほぼ比例する、すなわちタンパク質の重量当たりのマイナス電荷量はタンパク質の種類によらずほぼ一定となるので、網目構造を有するゲル内で電気泳動すると網目のくぐり抜けやすさのみで分離できることになり、分子量既知のマーカー タンパク質と一緒に泳動すれば分子量が推定できる (D-H)。

最新のSDS-PAGEは、濃縮ゲルと分離ゲルからなる (I)。電気泳動の様子を観察しているとサンプル量が多くても、濃縮ゲルを通過しているうちに徐々に濃縮され、分離ゲルに入る頃には薄い層に圧縮されていることに驚かされる。この感動的ともいえる現象はどのようなようにして起きるのだろうか。その秘密は、サンプルバッファーの組成と濃縮ゲルのpHにある (注17)：

(1) サンプルバッファーは濃度が薄く、電流が流れにくいので、他の部分に比べて高電圧がかかり (直流電源に抵抗R1, R2, R3を直列につないだイメー

ジ)、かつpHが6.8と低いので、陰極 (上の槽) 側から泳動されてきたグリシンがサンプルに入っても、グリシンはpHの低下に伴い電荷の大部分を失うので、サンプルを追い抜くことはできない。

さらに (2) 濃縮ゲルのpHも6.8と低いので、ここでもグリシンはサンプルを追い抜くことができず、サンプル部分に高電圧がかかり続けるので、サンプル層は圧縮され続け、ついには薄板のようになる。この状態で分離ゲルに入ると、そこはpHが8.8なので、グリシンが負の電荷をもちサンプルを追い抜いて泳動されるようになる。この状況では比較的一様な電場の中で電気泳動となり、サンプル中のタンパク質がゲルの網目をくぐりぬげながら、分子サイズに依存して分離される。