

平成 1 9 年度

実験実習支援センター特別講習会

平成 1 9 年 9 月 4 日～9 月 1 2 日

滋賀医科大学

実験実習支援センター

平成19年度医学総合研究特論（大学院特別講義）集中講義 プログラム

【第1日目 9月4日（火）】

14:00～15:40 遠心機の利用法

洲崎雅史・岡本良平・漆山昇・小山由起子

（実験実習支援センター）

15:50～17:30 スペクトル共焦点レーザー顕微鏡とそのアプリケーション

長谷川茂・井野正子（ニコンインステック）

山元武文・森康博（実験実習支援センター）

【第2日目 9月5日（水）】

14:00～15:40 実験動物の取扱手技 ―マウス、ラットについて―

鳥居隆三、寺門一郎（動物生命科学研究センター）

15:50～17:30 マルチメディアセンター（MMC）の機器を活用した

プレゼンテーション法

重歳憲治（マルチメディアセンター）

【第3日目 9月6日（木）】

14:00～15:40 ラジオアイソトープ（R I）取り扱い実験法＊

BELLIER Jean-Pierre（分子神経科学研究センター）

福堀順敏・森本国男・小山由起子（実験実習支援センター）

15:50～17:30 機器分析入門2 ～走査顕微鏡の活用法他～

小松直樹（生命科学）

【第4日目 9月11日（火）】

14:00～15:40 DNAシーケンサーを活用した遺伝子解析法

丸尾良浩（小児科学）

15:50～17:30 ヒューマンサンプルの取得と長期保存・保存検体を

活用した研究の事例

喜多義邦（社会医学）

【第5日目 9月12日（水）】

14:00～15:40 フローサイトメーターとセルソーターの活用法

伊藤靖（病理学）

15:50～17:30 タンパク質研究へのTyphoon活用法

礪野高敬（実験実習支援センター）

＊ R I 研究施設 3 階 教育訓練実習室

その他は基礎研究棟 2 階 教職員ロビー

遠心機の利用法

洲崎 雅史、岡本 良平、漆山 昇、小山 由起子
(実験実習支援センター)

遠心機は、生化学研究、特にタンパク質や遺伝子の解析を行う実験において、試料の調整等、実験の基礎的な部分で多用される装置です。

最近、遠心機の間違った使用方法に起因すると見られる故障や事故が多く発生しています。

この実習では、これから支援センター内の遠心機（分離用超遠心機、卓上超遠心機、高速冷却遠心機）の利用を予定している方や、すでに利用されている方を対象に、遠心機を安全に、効率良く使っていただくための正しい取り扱い方を、実際に遠心機を操作して体験していただきます。

遠心機の取り扱いについて

遠心機は、試料を高速で回転させ、その時得られる遠心力を用いて、試料を密度の差で分離するための装置で、試料に遠心力をかけるためのローターとそれを回転させるための駆動部よりなっています。そして、安全確保のため回転部は丈夫なチャンバー内に収められています。

遠心機には、低速遠心機、高速冷却遠心機、分離用超遠心機等があり、また、ローターにも固定角ローター（Fixed-angle rotor）、水平ローター（Swinging-bucket rotor）、急速密度勾配で短時間で分離するのに用いる垂直ローター（Vertical tube rotor）などがあり、それぞれのローターには、容量、最高回転数が決められています。実験の目的に合わせて最適なものを選択する必要があります。

遠心機の種類

低速遠心機

最高回転数3,000rpm程度の遠心機で、試料中の比較的大きな粒子（培養液中の培養細胞や、血球等）の分離に用います。試料を冷却できるものもあります。（日立CF-7D2、ベックマンGPR）

高速冷却遠心機

最高回転数20,000rpm程度の遠心機です。試料の温度が空気との摩擦熱で上昇しないように強力な冷却機を備えています。冷却の必要な試料や、低速遠心機では分離できない粒子の分離に用います。ローター室内を減圧（0.5気圧程度）するものもあります。（ベックマンJ2-21、J2-21/ME、HP-25、HP-26）

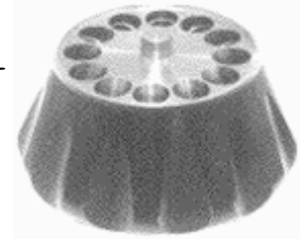
分離用超遠心機

最高回転数が数万rpmの遠心機で数十万 g の遠心力を得ることができます。ローターを非常に高速で回転させるのでローター室内を高真空に保つような仕組みになっています。この遠心機は、強大な遠心力を必要とするようなマイクロソームや、リポタンパク質等の分離に用います。微量試料を迅速に遠心できる小型のものもあります。（ベックマンL7-65、TL-100、Optima TL）

ローターの種類

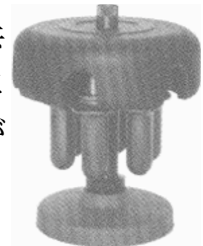
固定角ローター（アングルローター）

通常の遠心分離にはこのローターを用います。アングルローターには、色々な種類（駆動軸に対する遠心管の角度や、容量）があるので目的に応じたローターを選ぶ必要があります。



水平ローター（スイングローター）

このローターは遠心管を挿入したバケットが、ローターの回転と共に遠心方向にスウィングし、水平になるものです。バケットは常に遠心力の方向に向いているので、試料が舞い上がったり密度勾配が乱れたりしないため、主に密度勾配法による遠心分離に使用します。



遠心管について

遠心分離を行なう試料は遠心管と呼ばれる容器に入れます。遠心機やローターに色々な種類があるように、遠心管にも色々な種類（材質、形状）があります。使用するローターに適合したもの（サイズ、耐荷重）を選ぶことは言うまでもなく、使用する溶媒への耐性や、滅菌の必要の有無などから判断し、適切なものを用いる必要があります。必ず純正品を使用してください！！

遠心機使用時の注意事項

遠心機を使用するときには以下の点について注意してください。

1. 遠心機に適合したローターを使用すること。
2. ローターに適合した遠心管を使用すること。
3. 亀裂やひび、傷のある遠心管は絶対に使用してはいけない。
4. 試料は、必ずバランスを取り、ローターへは対称位置にセットする。
5. ローターの最高許容回転数を厳守する。
6. ローターが設定回転数に達するまで、遠心機のそばを離れない。
7. 初めて遠心機を使用する場合や、取り扱いに不明な点のある場合は、前もって支援センター機器部門に連絡し、使用方法、注意事項等の説明を受けること。
8. 必ず予約表に予約して使用し、他の利用者の迷惑にならないようにすること。予定が変更になったときは速やかに予約表を訂正すること。
9. 使用後は、利用ノートに必要事項を記入すること。
10. 実験終了後は、ローター室、ローター、実験台の上をきれいに掃除すること。
11. トラブルが発生したときは、どんなに些細なことでもすぐセンターに知らせること。

高速冷却遠心機使用時の注意事項

高速冷却遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. 遠心機に適合したローターを使用する。
Beckmanの遠心機には、Beckmanのローター。
2. ローターを駆動軸に正しくセットする。
ローターのピンを駆動軸のクラウンにはめ込むようにする。
ローターカバーの中央のネジで駆動軸に固定する。
これらを怠ると、必ずローターが駆動軸からはずれて遠心機を壊します。
3. 実験終了後は、ローター室、ローター、実験台の上をきれいに掃除する。
塩類を使用した場合は念入りに洗浄する。また、必要に応じて消毒も行なうこと。
(液漏れをおこしたときは、ローターだけでなくローター室も必ず洗浄すること。)

分離用超遠心機使用時の注意事項

分離用超遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. 水平ローター使用時は、すべてのバケットをセットして運転すること。
バケットをローターにセットする際はバケットの番号とローターに刻印されている番号を合わせて図のように正しい方向にセットしてください。（試料数が少ないときは、遠心管は入れずに空のバケットをセットしてください。）
2. 固定角ローターは、ローターカバーのシールを確実にすること。
シールチューブを用いるときは必ずスペースキャップを使用してください。（スペースキャップを忘れると遠心管が破裂します。）
3. ローターの最高許容回転数を厳守すること。ローターには寿命があり、最高回転数を制限しているローターもありますので、はり紙等の注意書きを良く読んでください。
比重が1.2を超える試料を遠心するときには最高回転数を次式によって減じること。

$$\text{許容回転数} = \text{最高許容回転数} \times \sqrt{\frac{1.2}{\text{平均比重}}}$$

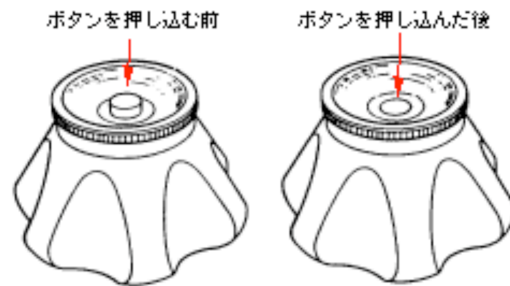
CsClを用いてIsopycnic法で遠心分離をするときはCsCl凝結曲線を参考にして最高回転数を決める必要があります。

4. 予約表には使用を予定しているローター名も記入すること。予定が変更になったときは速やかに予約表を訂正すること。
5. 使用後は、LOGBOOKに必要事項を記入すること。（ローターの寿命を管理していますので、必ず記入してください。）
6. 実験終了後は、ローター、実験台の上をきれいに掃除しておくこと。

卓上型超遠心機使用時の注意事項

卓上型超遠心機を運転するときには、特に以下の点についても注意すること。

1. ローターを遠心機に正しくセットする。
ローター上部のボタンを押し込んで、駆動軸にローターを固定してください。
これを怠ると必ずローターが駆動軸からはずれ、非常に危険です。



2. 使用後は、LOGBOOKに必要事項を記入すること。
(ローターと本体の寿命を管理していますので、必ず記入してください。)
3. 実験終了後は、ローター、実験台の上をきれいに掃除しておくこと。

ローターについて

支援センター機器部門には下記のローターを用意しております。講座等でお持ちのローターは使用しないでください。

高速冷却遠心機用ローター

アングルローター

ベックマン

JLA10.500 (500ml 6本用) 1台

JA-10* (500ml 6本用) 1台 (HP-25、HP-26では使用できません)

JA-20* (50ml 8本用) 2台

JA-21 (10ml 18本用) 1台 (HP-25、HP-26では使用できません)

超遠心機用ローター

アングルローター

ベックマン

Type 45 Ti (95ml 6本用) 1台

Type 50.2 Ti (39ml 12本用) 1台

Type 70.1 Ti (13.5ml 12本用) 1台

スイングローター

ベックマン

SW28 (38ml 6本用) 1台

SW41Ti (13.2ml 6本用) 1台

！ 日立のローターをベックマンの超遠心機に絶対にセットしないでください。

ローターの構造上、駆動軸にセットしただけで、遠心機が破損します。

卓上超遠心機用ローター

アングルローター

TLA-100.4 (5.1ml 8本用) 2台

TLA-100.4** (5.1ml 8本用) 1台

スイングローター

TLS-55**

注 意

*印のローターは、遺伝子工学実験室にも設置してあります。

**印のローターは、病原ウイルス実験室にのみ設置してあります。

遠心管について

高速冷却遠心機用の遠心管には、キャップ無しタイプと、キャップ付きのボトルタイプのものがあります。用途に応じて選択して使用してください。

ただし、JLA10.500（500ml 6本用）とJA-10（500ml 6本用）ローターでは、必ずキャップ付きのボトルを使用して下さい。

超遠心機用の遠心管には、肉薄のキャップ無しタイプと、肉厚のキャップ無しタイプ、キャップ付きのボトルタイプ、および、シールチューブがあります。

1. 肉薄のキャップ無しタイプはスイングローターでのみ使用してください。
2. 肉厚のキャップ無しタイプとキャップ付きのボトルタイプ、および、シールチューブは、アングルローターでのみ使用してください。
3. シールチューブを使用するときには、必ずスペースキャップ（右図）をチューブの上にのせてください。これを忘れると遠心中にチューブが破損し、事故の原因になります。



肉薄タイプの遠心管を使用するときには、液の量に注意してください。キャップ無しタイプの場合はできるだけ液で満たし、シールチューブの場合には、米粒大の気泡が1つ残る程度に液を満たして下さい。

遠心管の材質についての注意点

遠心管の材質としては、ポリアロマー、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ステンレススチールなどがあり、用途に応じて使い分けてください。一般には、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアロマーが用いられています。

従来、密度勾配遠心によく用いられていたニトロセルロースチューブは発売中止になり、これに代わるものとしてウルトラクリアーチューブ（ベックマン社）が市販されていますが、ウルトラクリアーチューブに比べて透明度は劣りますが強度的に優れているポリアロマーチューブをニトロセルロースチューブの代わりに使用することを奨めます。最近の製品は透明度もかなり改善されています。使用前に肉眼でキズやユガミがないかよく調べてから使用するようにしてください。なお、ウルトラクリアーチューブやポリアロマーチューブは使い捨て遠心管ですので再使用しないでください。

遠心管は、それぞれのローターに合致した純正品をお使いください。また、遠心管は利用者で用意して頂くことになっております。詳細は、担当者までお問い合わせください。

スペクトル共焦点レーザー顕微鏡とそのアプリケーション

長谷川 茂、井野 正子
(ニコンインステック株式会社 AS 部)

リアルスペクトルイメージング共焦点レーザー顕微鏡 C1si は、光学機器メーカーとして実績のあるニコン社の開発した従来の高精細で光学断層像を取れる基本性能に加え、最大320nmの正確な蛍光スペクトルをワンショットスキャンで取得できる新しい機能を備えた共焦点レーザー顕微鏡システムです。

今回は、この新しいリアルスペクトルイメージング共焦点レーザー顕微鏡の共焦点の原理、スペクトルイメージングと基本技術のご紹介と新しい機能を使ったアプリケーションをご紹介します。これから共焦点レーザー顕微鏡をお使いになる方、さらに共焦点を活用されたいとお考えの方のご参加をお待ちしております。

講義時間は以下のとおりです。

- 共焦点の原理
 - スペクトルイメージングの基本技術
 - スペクトルアンミックス（スペクトル分離）の原理
(50 分、質疑応答 10 分)
 - アプリケーション紹介
 - マルチカラーと 3 D
 - FRAP / FRET
 - スペクトル - 近接蛍光分離
 - スペクトル - 自家蛍光除去
 - スペクトル - 波長変化を見る (Kaede / FRET)
- (40 分、質疑応答 10 分)



スペクトル共焦点レーザー顕微鏡の アプリケーションご紹介

滋賀医科大学様

DIGITAL ECLIPSE

E1^{si}
Spectral Imaging

株式会社ニコンインステック
井野正子



- マルチカラーと3D
- タイムラプス
- FRAP/FRET
- スペクトル-近接蛍光分離
- スペクトル-自家蛍光除去
- スペクトル-波長変化を見る(Kaede/FRET)

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



マルチカラー

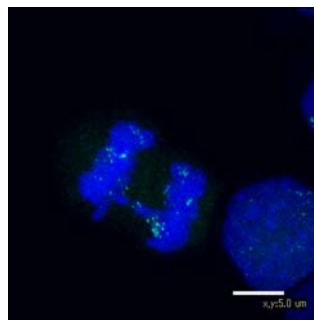
クロストーク
H線補正

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



蛍光(2カラー)



青(DAPI)と緑(DM:Double Minutes;
がん細胞に見られる染色体外遺伝
子:GFPで可視化)をZシリーズで取
得後、3次元再構築画像。

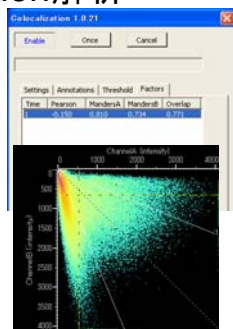
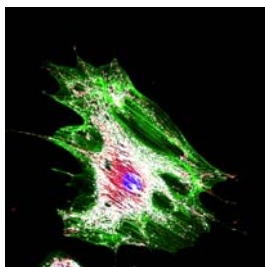
試料ご提供: 広島大学大学院生物園
科学研究科 生物機能開発学専攻
分子生命開発学講座
清水典明先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Co-localization解析

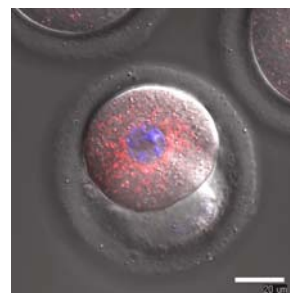


滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



DIC+蛍光



画像ご提供
理化学研究所 筑波研究
所 バイオリソースセン
ター遺伝子工学基盤技
術室
小倉 淳郎 先生、
三木 洋美 先生

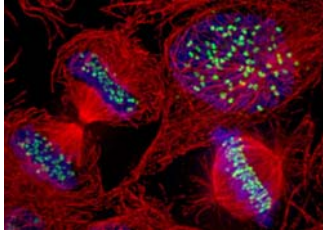
生きたマウス卵子Hoesht3342(核)とMitoTrackerOrange(ミトコンドリア)

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



蛍光 (3カラー)



Dr. Jennifer Watters Shuler and Dr. Adrian Salic
Department of cell biology Harvard Medical School Boston, Massachusetts, USA
Mitotic human cells (microtubules kinetochore, and DNA)(x1000)

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



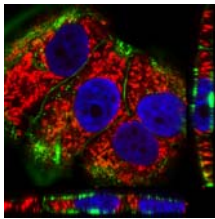
3D

滋賀医科大学様

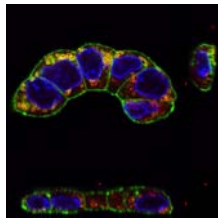
株式会社ニコンインステック



蛍光 (3カラー)



抗がん剤投与前



抗がん剤投与後

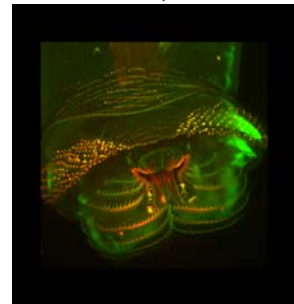
試料ご提供: 日本医科大学病理第二講座 工藤光洋先生
試料: T47D 乳がん細胞 にハーセプチン20nM投与し、24H 後にバクリタセル $4\mu\text{g/ml}$ を投与し投与前
と投与後の比較画像。青: 核、緑: アクチン、赤: ミトコンドリア

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



3D (低倍)



画像ご提供

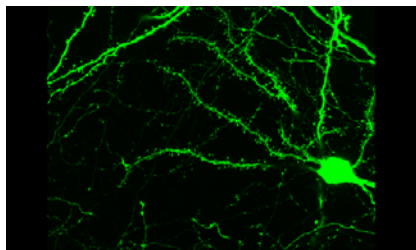
ハーバード・メディカルスクール アーロン・ストリート博士 ショウジョウハエ: 488nm (GFP) 543nm (自家蛍光)

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



3D (高倍)



滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



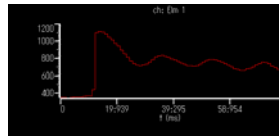
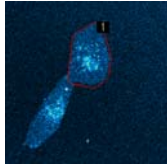
タイムラプス

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Time Laps (XY-t)



Fluo-4AMをロードし、ATPで刺激

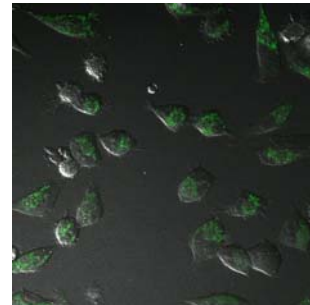
産総研・Live Cell Imaging講習会
画像ご提供 加藤薫先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



長期Time Laps (XY-t/DIC)



ミトコンドリアを染色

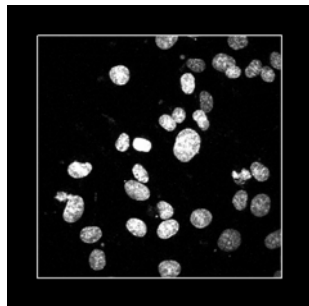
細胞生物ワークショップ

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



長期Time Laps (XYZ-t)



CHL細胞をHoechst33342で染色。15分おきに9時間観察

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



FRAP

分子の動きを観る

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



細胞内分子移動のマーカー (FRAP)

▶観察方法

–FRAP

Fluorescence Recovery After Photobleaching

–FLIP

Fluorescence Loss In Photobleaching

–Photoactivation

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



FRAP

▶Cell-Cell Communication (細胞間)

ギャップジャンクションによる細胞間情報交換

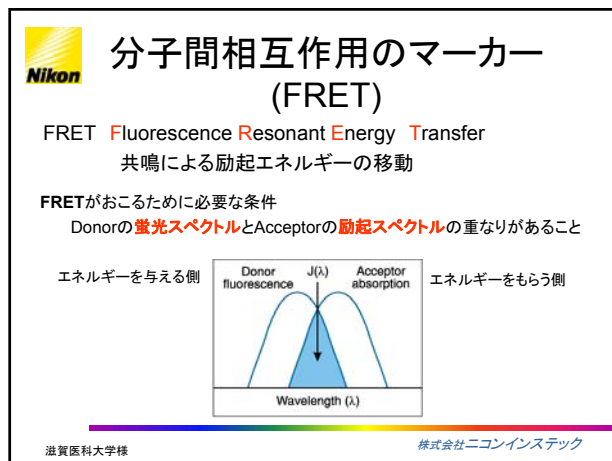
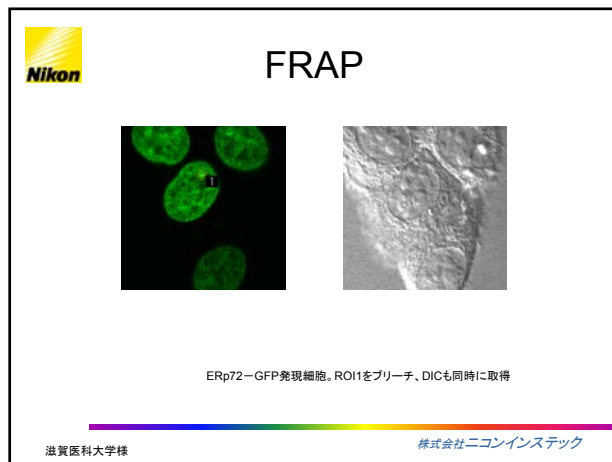
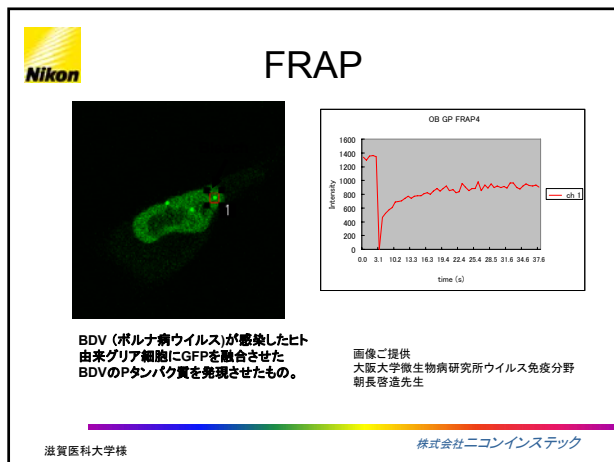
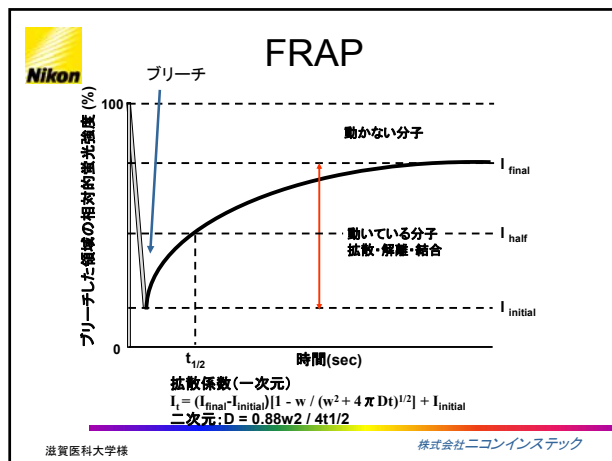
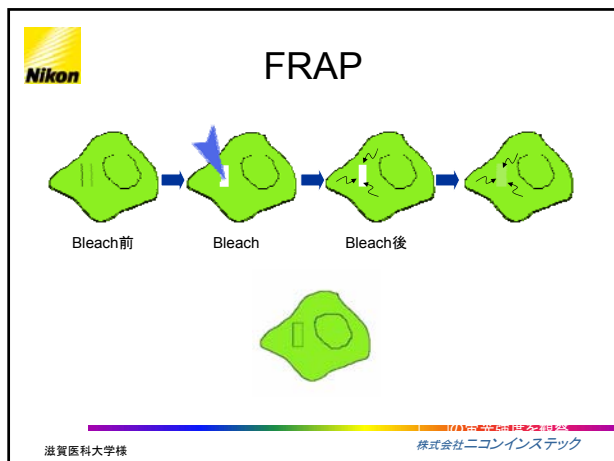
▶核、細胞内の分子動態

クロマチンの分子動態、ミトコンドリアの分子移動

▶細胞膜の流動性

滋賀医科大学様

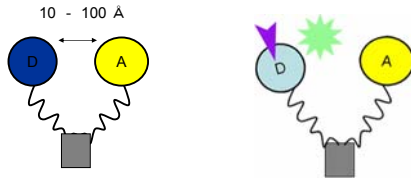
株式会社ニコンインステック





FRETがおこるために必要な条件

DonorとAcceptorがある程度近くに存在すること
DonorとAcceptorが適切な配向をとっていること



滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



FRET 色素の組み合わせ

ドナー	アクセプター	励起(ドナー) (nm)	蛍光(nm) 蛍光(ドナー)	蛍光(アクセプター)
BFP	CFP	365	460	535
CFP	YFP	440	480	535
GFP	Rhod-2	488	535	595
FITC	Cy3	488	535	595

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



FRETの観察方法

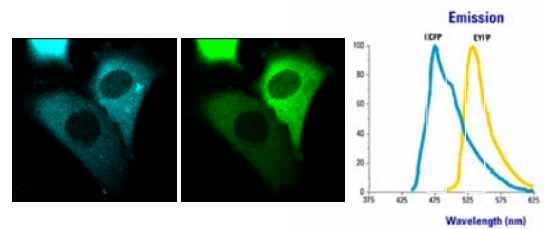
- Filter FRET
 - Z方向の分解能を持ったFRETイメージング
- Spectral FRET
 - Z方向と波長方向の分解能を持ったFRETイメージング

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Filter FRET



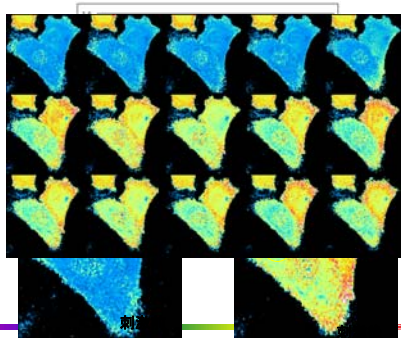
HeLa細胞にCameleonを発現。

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



FRET

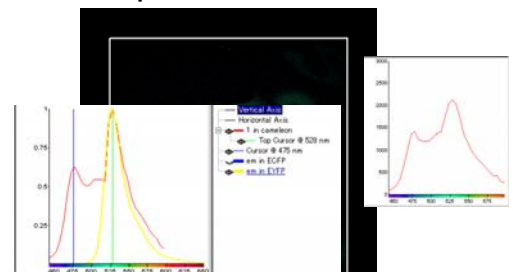


滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Spectral FRET



Cameleon: Ex 408nm
波長取得領域440-600nm(波長分解能5nm)

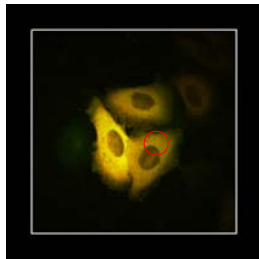
試料ご提供: 浜松医科大学
光子センター
櫻井孝司先生

滋賀医科大学様

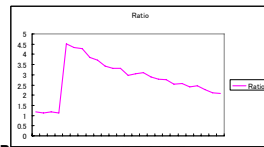
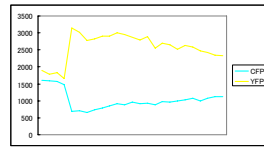
株式会社ニコンインステック



Spectral FRET



Unmix後 緑:CFP、赤:YFP



元重子センター
櫻井孝司先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Spectral FRET

Filter FRETに比べて何が良いのか？

- CFPのYFP側への蛍光のもれこみを除去できる
- 変化量(Ratio)を大きく捉えられる

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Spectral

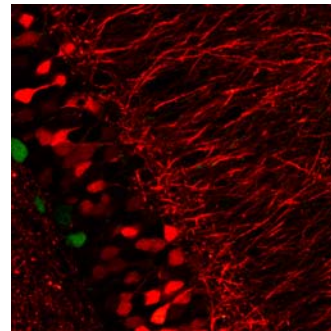
近接蛍光の分離

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



近接蛍光の分離-輝度差のある場合-



画像ご提供:
国立精神・神経センター
神経研究所 疾病研究
第4部
関口 正幸先生

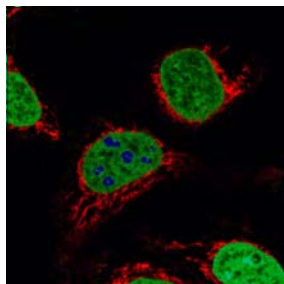
マウス海馬(GFP:抑制
ニューロン、YFP興奮性
ニューロン)

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



近接蛍光の分離



GFP-Histone
YFP-核小体
MitoTracker Green

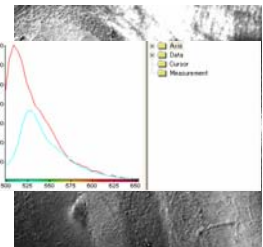
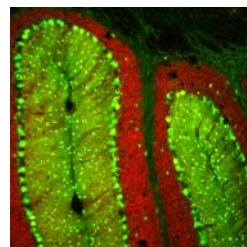
細胞ご提供:大阪大学医学部 才脇卓也先生、米田悦啓先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



近接蛍光の分離(GFP/YFP)



データ提供
理化学研究所脳科学総合研究センター神経回路ダイナミクス研究チーム
トーマス・クヌッフェル先生

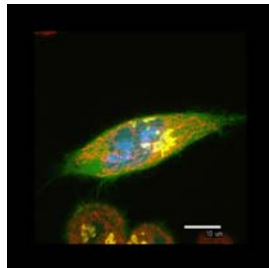
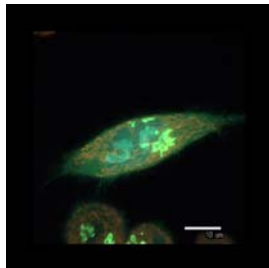
小脳
GFP: GABAergic neurons
YFP: Potassium channel protein

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



4カラー (CFP/GFP/YFP/DsRed)



核:CFP、ファシン:GFP、ER:YFP、ミトコンドリア:DsRed

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



4カラー (CFP/GFP/YFP/DsRed)



滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Spectral

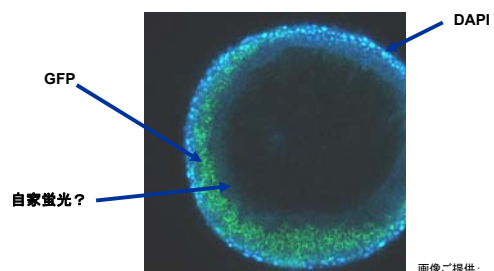
自家蛍光の除去

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



自家蛍光



青:DAPI(450-480nm)
緑:GFP(500-530nm)

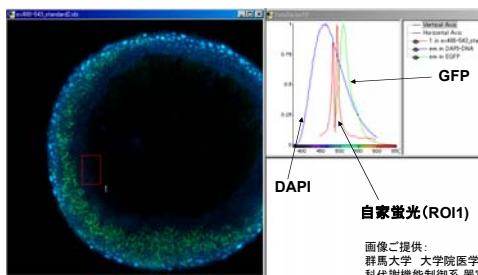
画像ご提供:
群馬大学 大学院医学研究
科代謝機能制御系 器官機能
制御学器官機能構築学
村上徹先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



自家蛍光



励起(408nm/488nm)
波長取得領域:440nm-600nm(波長分解能5nm)

自家蛍光(ROI1)

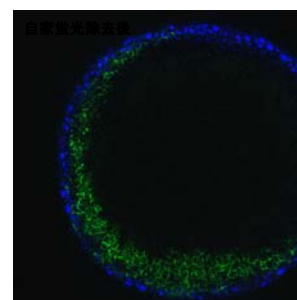
画像ご提供:
群馬大学 大学院医学研究
科代謝機能制御系 器官機能
制御学器官機能構築学
村上徹先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



自家蛍光

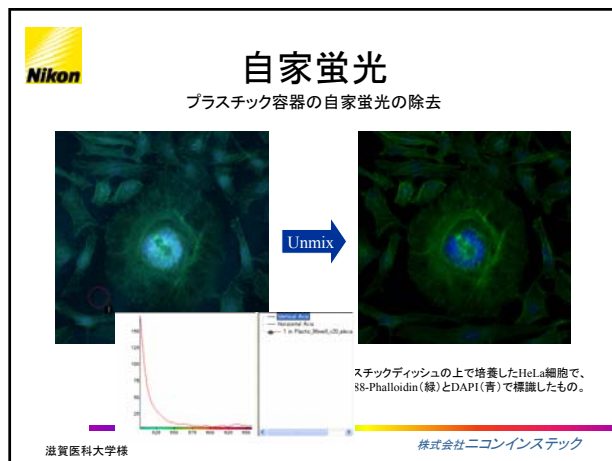
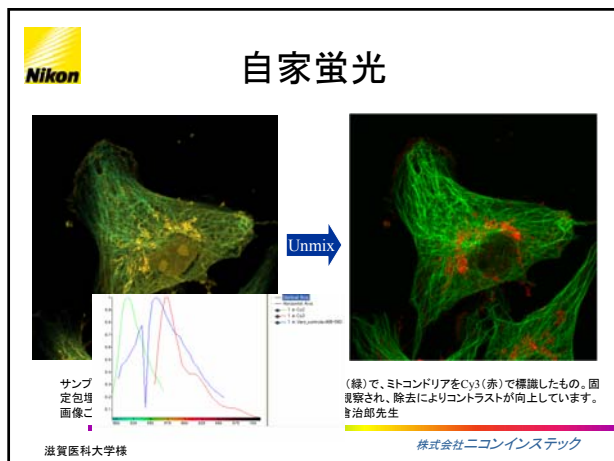
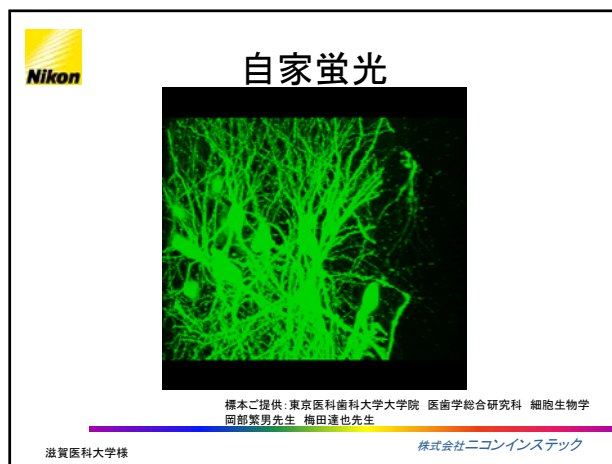
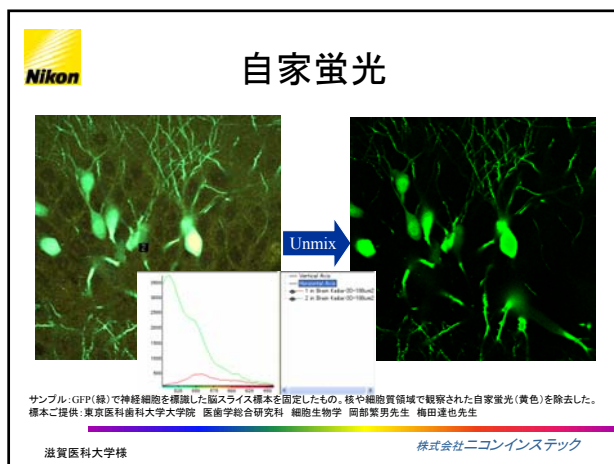
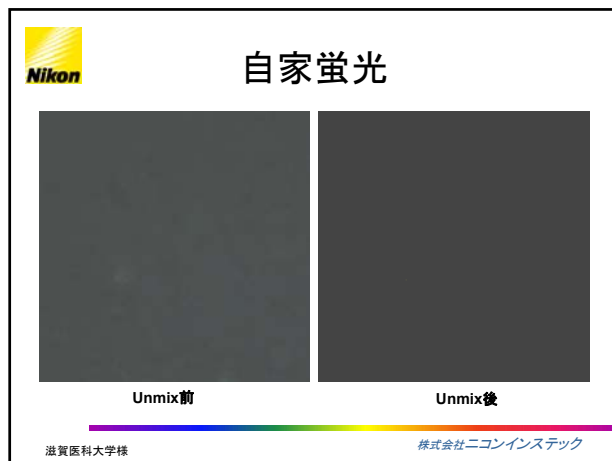
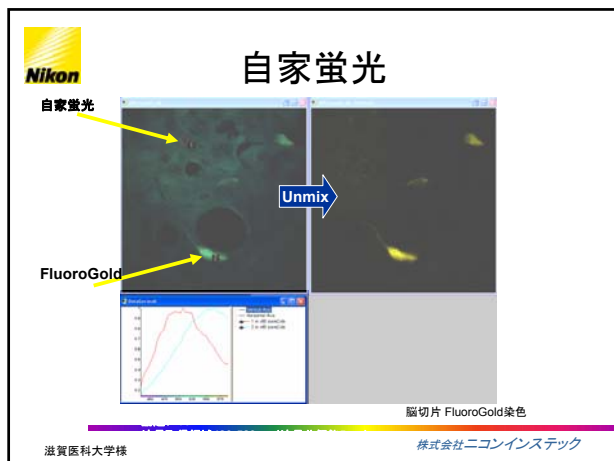


青:DAPI
緑:GFP

画像ご提供:
群馬大学 大学院医学研究
科代謝機能制御系 器官機能
制御学器官機能構築学
村上徹先生

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック





Spectal

Kaede

Photoconversion

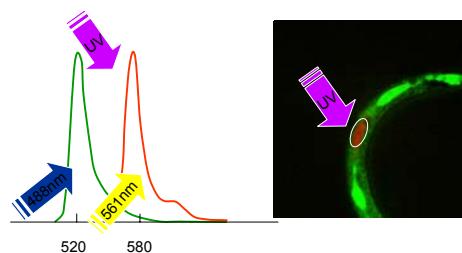
滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Photoconversion

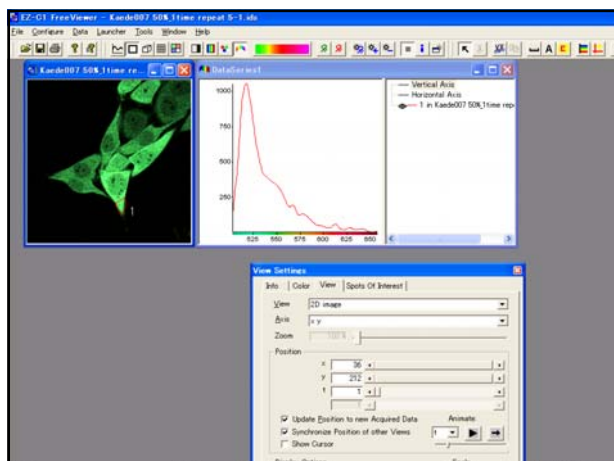
(Kaede)



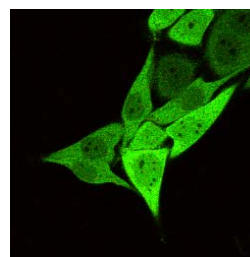
線虫にKaedeを発現させ、408nmレーザーを一部に照射し一部の細胞のみを変化させた例

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



Kaede



HeLa細胞にKaedeタンパクを発現。408nmを用いて5回繰り返しPhotoconversionを起こさせた。

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック



ありがとうございました

滋賀医科大学様

株式会社ニコンインステック

実験動物の取扱手技 — マウス、ラットについて —

鳥居 隆三、寺門 一郎
(動物生命科学研究センター)

医学研究のための動物実験を行う際には、動物愛護、福祉および生命倫理の観点にたち実験動物を適正に飼育し、取扱うことが基本である。

本学では、動物実験を行うもの全てを対象に我が国で初めての動物実験資格認定制度を平成16年度から導入し、また動物実験委員会による動物実験計画書の丁寧かつ厳しい審査、さらには動物の福祉、生命倫理の観点から動物生命科学研究倫理委員会によるより厳しい審査を行う等、動物実験に対しては慎重かつ厳格な対応を行っている。

一方、平成17年6月22日に「動物の愛護及び管理に関する法律」改正が施行され平成18年6月1日施行されたが、この改正の中で最も重要な点は、動物実験の3R (Replacement, Reduction, Refinement)が明文化されたことである。さらに機関内規程の作成が現在進行中であるが、ここには動物実験の実施に関する最終責任者が学長にあることも盛り込まれることになっている。このように動物実験を取り巻く環境は益々その厳しさを増し、適正な動物実験の遂行が強く求められてきている。このような状況をふまえ、本講義ではこれから動物実験を実際に始めようとする大学院生を対象に、適正な動物実験を行うための正しい実験動物の取扱手技を教示する。

すでに動物実験を行う予定の大学院生は、本年6月に実施する(H18年2月時点では予定)当センター講習会(実験動物学概論)の受講と認定試験の受験を終え、「動物実験(基礎)」の認定、即ち、マウスからイヌまでの動物実験を行える資格を有していると思われるので、まずはマウス、ラットを用いる動物実験を実際に行うに際しての飼育室への入退室から、ケージ交換、個体識別法、雌雄鑑別法、繁殖、麻酔法、投与法、採血法に至るまでの具体的な取扱方法を、当センターで作成したビデオを用いて詳細に説明する。また、利用者に活用していただくための当センターのホームページについても紹介する。

マルチメディアセンター（MMC）の機器を活用した プレゼンテーション法

重歳 憲治（マルチメディアセンター）

代表的なプレゼンテーションのスタイルとして、口頭発表とポスター発表がある。口頭発表では、液晶プロジェクターやスライドプロジェクター、OHP等を使って大型のスクリーン上に資料を投影して発表する。一方、ポスター発表では割り当てられた領域に発表資料を貼り付けるスタイルをとる。ポスター発表用の資料には、A0 サイズや B0 サイズといった大判用紙に発表内容を集約する場合と、A3 サイズを複数枚用意する場合がある。マルチメディアセンターでは、このようなプレゼンテーション用資料を作成するための種々の機器が設置されており、日々研究者が利用している。本講演では、これらマルチメディアセンターが管理している機器を活用したプレゼンテーション資料の作成方法について説明する。

マルチメディアセンター(MMC)の機器 を活用したプレゼンテーション法

2007年9月5日
マルチメディアセンター
重蔵憲治



1

目次

- 機器の紹介
- 用語の説明
- プレゼン用素材について
- パワーポイントの小技
- 知っておきたい規格
- マルチメディアセンターに移動して機器見学



2

機器の紹介



3

大判プリンタ(プロッタ)

特 徴 : 1mを超えるサイズでプリント可能
解 像 度 : 標準300dpi, 最高600dpi
印刷サイズ : B0サイズまでプリント可能
(長軸方向はさらに延長可能)
料 金 : B0 2,300円/枚
A0 1,900円/枚



レーザー露光熱現像転写プリンタ

特 徴 : 銀塩写真と同等の画質
解 像 度 : 400dpi
印刷サイズ : A3サイズまでプリント可能
料 金 : A4 300円/枚
A3 500円/枚



昇華型プリンタ

特 徴 : 銀塩写真と同等の画質
解 像 度 : 300dpi
印刷サイズ : A4サイズ
料 金 : A4 200円/枚



ラミネーター

- 特 徴： フィルムが用紙に直接接着されるので、はがれにくい
- サ イ ズ： A0サイズまでラミネート可能
- 料 金： A0 300円／枚



X線フィルムデジタイザ

- 特 徴： X線フィルム等の透過フィルムのスキャン用。連続15枚まで取込可能なオートフィーダ付
- 解 像 度： 300dpi
- サ イ ズ： 六切, 四切, 大四切, 大角, 半切, B4
- 料 金： 0円



フィルムスキャナ

- 特 徴： 各種サイズのフィルムをスキャン可能
- 解 像 度： 2000dpi × 4000dpi
- サ イ ズ： 4×5inch, 6×7cm, 6×6cm, 35mm
- 料 金： 0円



フィルムレコーダ

- 特 徴： パワーポイントのスライドを35mmフィルムに撮影する
- 持 参 物： 35mmフィルム
- 料 金： 0円



フラットベッドスキャナ

- 特 徴： 透過原稿, 反射原稿どちらもスキャン可能
- 解 像 度： 1600dpi × 3200dpi
- サ イ ズ： A3まで
- 料 金： 0円



動画編集システム

- 特徴： 動画の取り込みから編集, 書き出し (DVD, パワーポイント貼り付け用) まで処理可能
- 主に使用するソフトウェア (Windows): Adobe Premiere, TMPGEnc, X264
- 利用可能なメディア: VHSテープ, DVテープ, ミニDVテープ
- 料金： 0円



CD/DVDデュプリケーター

特徴：自動でCD/DVDのコピーが可能(DVD書き込み16倍速)
 操作：マスターディスクとブランクディスクをセットするだけ
 料金：0円



液晶プロジェクター

説明：スクリーンに画像を投影する機械
 明るさ：3500ANSIルーメン
 解像度：XGA(1024×768pixel)
 重量：3.1kg
 貸出期間：1日



※小型(1.3kg)の液晶プロジェクターも貸し出しています。

料金表

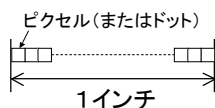
MMC入出力室における消耗品の金額			
機器名	機器番号	消耗品	金額
コダック プロフェッショナル8660	N7	専用紙+カラーリボン	¥200/枚 (A4)
HP / DesignJet5500os	N8	コート紙+インク	¥500/枚 (B0) ¥400/枚 (A0)
	N9	光沢紙+インク	¥2,300/枚 (B0) ¥1,900/枚 (A0)
理光株式会社 / MSI1774 PHL-960	N10	ラミネートフィルム	¥300/枚 (A0)
FLUJIFILM / PICTOGRAPHY4500	N11	写真用光材料 (変遷紙+ドナー)	¥300/枚 (A4) ¥500/枚 (A3)

用語の説明

解像度

解像度とは、画像を表現する格子のきめの細かさのことをいう。

ppi (pixels per inch)や**dpi** (dots per inch)という単位が用いられる。



コーデック(CODEC)

- コーデック (Codec) は、符号化方式を使ってデータのエンコード(符号化)とデコード(復号)を双方向にできる装置やソフトウェアなどのこと。また、そのためのアルゴリズムを指す用語としても使われている。(ウィキペディア、「コーデック」より引用)

プレゼン用素材について

19

画像の種類(1)

BMP (Bit MaP; ビットマップ):

無圧縮, フルカラー(1677万色)

GIF (Graphics Interchange Format; ジフ):

可逆圧縮, 256色, アニメーション可, 透明色可

JPEG (Joint Photographic Experts Group; ジェイペグ):

非可逆圧縮, フルカラー(1677万色), 圧縮率高,
透明色不可

PNG (Portable Network Graphics; ピング):

可逆圧縮, フルカラー(281兆色), アニメーション不可,
透明色可(透明度の指定可), GIFより圧縮率高

20

画像の種類(2)

TIFF (Tagged Image File Format; ティフ):

無圧縮/可逆圧縮, フルカラー(1677万色)

DICOM (Digital Imaging and Communication in
Medicine; ダイコム):

CT, MRIなどで撮影した医用画像のフォーマット
画像以外の情報も含められる

PICT (ピクト):

Apple社のMac OSが標準でサポートしている
画像形式の一つ

21

解像度の種類

画像解像度 : ppi (pixels per inch)

モニタ解像度 : ppi (pixels per inch)

プリンタ解像度 : dpi (dots per inch)

※モニタに出力するだけなら, 72ppi程度で十分

※プリントアウト時にきれいに出力するためには,
200~300ppi程度の画像解像度が必要.

22

解像度とファイルサイズ

- BMP (ビットマップ) 形式の画像を例に -

解像度の目安

モニタ出力では, 72ppi

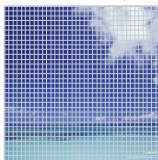
プリンタ出力では, 300ppi

大きさ1インチ四方の画像なら

$72 \times 72 \times 3 = 15,552$ [byte]

$300 \times 300 \times 3 = 270,000$ [byte]

※フルカラー表示には, 1ピクセルあたり
3byteのデータが必要



約17倍の差があり, 用途
に応じて解像度を変えな
いと非常に大きなファイル
になってしまう!

23

画像を使用する上での注意点

- 解像度

プレゼン用なら72ppi程度,

印刷用なら200~300ppi程度

- 画像の種類

色数に応じて画像の種類を使い分ける.

イラスト(256色以下)ならGIF,

写真ならJPEG

24

動画の種類

AVI (Audio Video Interleave): 画像と音声を交互に格納する。任意のコーデックが使える。

WMV (Windows Media Video): Microsoftが開発したコーデック。Windows標準対応。

MOV: QuickTimeで使用される動画の形式。Macintoshでよく用いられる。

RM: Real Playerで使用される動画の形式

25

国際標準のCODEC(MPEG)

- **MPEG**: ISOのMPEG (Moving Picture Experts Group) が制定した動画フォーマットの規格。規格は「映像」、「音声」、「映像と音声の多重化」の3つから成り立っている。DVDやBSデジタル、CSデジタル放送などでは、MPEG2形式が使われている。

- **MPEG1**: ISO/IEC11172によって国際的に定められたデジタルビデオファイル形式の規格。VHSビデオ並みの画質でCD上にデータを記録する。MPEG1はVideo CDなどで使用されている。解像度は、352×240ピクセル。

- **MPEG2**: ISO/IEC13181によって定められたMPEG1の上位に位置するCODEC(圧縮/伸張方式)。圧縮にも再生にもMPEG1と比較して高いスペックを要求する。MPEG2はDVDなどで使用されている。解像度は、720×480ピクセル

26

動画を使用する上での注意点

- AVIで利用できるコーデックは任意のため、自分のコンピュータで再生できても、他人のコンピュータで再生できるとは限らない。

- Windowsであれば、プレゼン用の動画は、WMVにしておくとよい(ファイル容量も格段に圧縮される)。

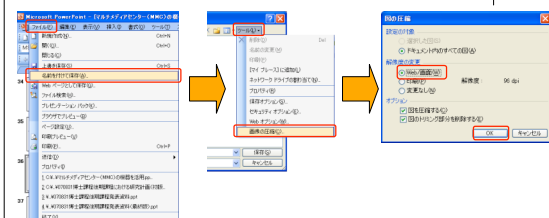
- WindowsXP以降なら標準でインストールされている「Windowsムービーメーカー」を使ってAVIからWMVに変換できる。

27

パワーポイントの小技

28

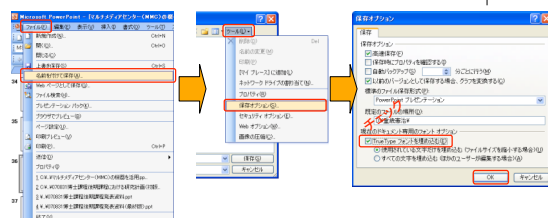
ファイルサイズを小さくする方法



ファイル→名前を付けて保存→ツール→画像の圧縮→「Web/画面」にチェック→OK

29

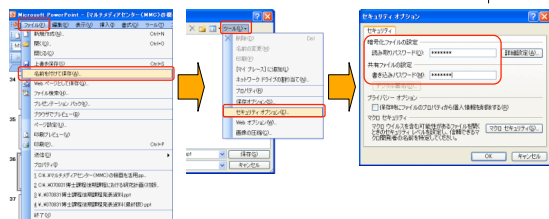
他のコンピュータでも文字化けしないようにする方法



ファイル→名前を付けて保存→ツール→保存オプション→「TrueTypeフォントを埋め込む」にチェック→OK

30

ファイルにパスワードをかける



ファイル名を付けて保存→ツール→セキュリティオプション
→パスワードの入力

31

知っておきたい規格

32

モニター外部出力コネクタの規格



アナログRGBコネクタ
(ミニD-Sub15ピン)



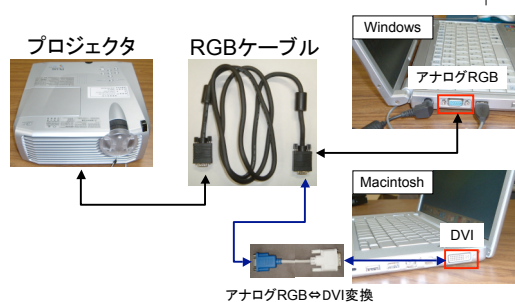
DVI (Digital Visual Interface)コネクタ



アナログRGB⇄DVI変換コネクタ

33

プロジェクタに「ミニD-Sub15ピン」 のケーブルで接続する場合



34

モニター解像度

呼称	解像度(pixel)
QVGA (Quarter-VGA)	320 × 240
VGA	640 × 480
SVGA (Super-VGA)	800 × 600
XGA	1024 × 768
SXGA (Super-XGA)	1280 × 1024
SXGA+	1400 × 1050

35

用紙サイズ(Aサイズ, Bサイズ)

ペーパーサイズ(定型一覧)

規格	寸法(mm)
ISO A0	841 × 1189
ISO A1	594 × 841
ISO A2	420 × 594
ISO A3	297 × 420
ISO A4	210 × 297
ISO A5	148 × 210
JIS B0	1090 × 1456
JIS B1	728 × 1030
JIS B2	515 × 728
JIS B3	364 × 515
JIS B4	257 × 364
JIS B5	182 × 257

36

END



Determination of enzymatic activity using radiobiochemicals

BELLIER Jean-Pierre (分子神経科学研究センター)

Biochemical labeled with radioisotope can be used in enzymatic analysis for the determination of enzymatic activities. In comparison with most conventional techniques (such as photometry, fluorimetry, luminometry, etc ...), the use of radioisotope introduces a number of unique concerns which make radiometric techniques tedious to establish and use (choice of the radionuclide, calibration, radiation safety, separation of the metabolites after reaction ...).

Regardless of those issues, radiometric technique is accurate and can considerably increase the sensitivity of the determination. Moreover, since it is nearly possible to radiolabel any kind of molecules, then it is nearly possible to perform any kind of determination.

For those reasons, radiometric technique has found a huge field of application in enzymatic analysis, becoming a method of choice when sensitivity is an issue or when conventional methods cannot be used.

This seminar will start with a brief introduction on the theoretical basis for the determination of the enzymatic activity. Then, it will be followed by an overview of the benefits and the difficulties related to the usage of the radiometric technique. Next, in an application example, we will see why to choose and how to set-up a radiometric technique to measure the enzymatic activity of the choline acetyltransferase, the enzyme synthesizing the neurotransmitter acetylcholine. Finally, we will overview general principles to avoid error in estimation of enzymatic activity, including procedures to optimize the assay and to survey interference and specificity.

R I センター利用に際して

福堀 順敏
(実験実習支援センター R I 部門)

R I センター利用の注意事項

1. 共同利用施設としてのルールを守る。
2. 法律で規制された施設である認識をもつ。
3. 研究を志す者としてのマナーを自覚し行動する。

機器利用に関する注意事項

1. 他の研究者に迷惑をかけない。
2. 機器を R I で汚染しない。
3. 困った時、勝手な判断をしない。

インスタントイメージャーについて

InstantImager 測定原理

1. X 線フィルム、フォスファースプレート (IP) 等二次媒体を使用せずにサンプルを直接測定する。
2. マルチワイアープロポーションナルカウンターの原理を応用し MICAD 検出器により測定。ガスが充填された検出器内でイオン化現象を誘発し、定位、増幅させる。
3. デジタルシグナルプロセッサと光ファイバーにより、リアルタイムに画像情報を外部コンピュータに転送し表示する。

InstantImager の特長

1. 直読型検出器
二次媒体を使用せずサンプルを直接測定。
2. 高感度測定 (スピード)
X 線フィルムの約 100 倍の感度。
フォスファースプリーン (IP) の約 10 倍の感度。
3. リアルタイム画像表示・データ解析
4. 簡単な操作

InstantImager の性能

1. 高い再現性
二次媒体を使用しない高い再現性。
2. 定量性
液シンと同じ CPM として定量解析可能。
3. リニアダイナミックレンジ
 10^6 カウントまでのダイナミックレンジ。

InstantImager の仕様

1. 測定可能な核種
 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I
2. サンプルの大きさ
20 x 24cm 厚さ 1cm まで
3. サンプルの種類
メンブレン、ゲル（ドライ、ウェット）、TLC、組織切片

InstantImager 使用のメリット

1. 実験の迅速化
今行なった実験の結果を直ぐに知ることができます
その結果を基に実験の次のステップへ早く進むことができます
2. 信頼できる定量値

InstantImager アプリケーション

RNA(Northern, RNAgels,transcription assays)

DNA (Southern, DNAgels, DNA Adduct assays)

TLC

CAT Assays

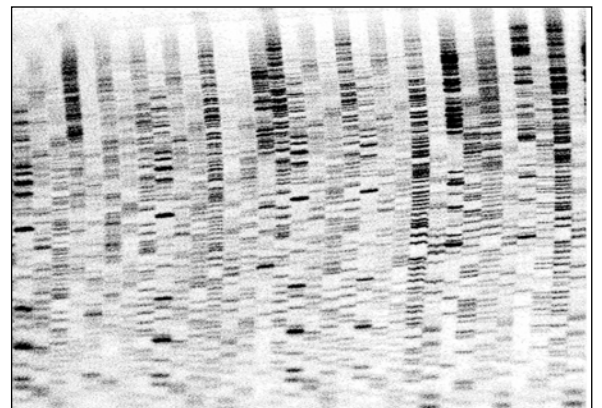
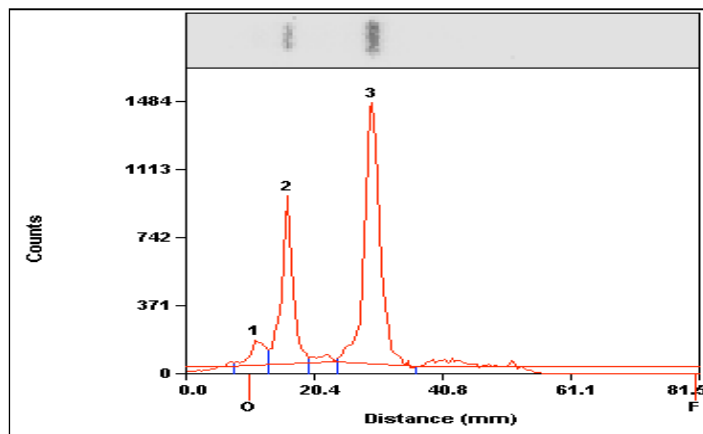
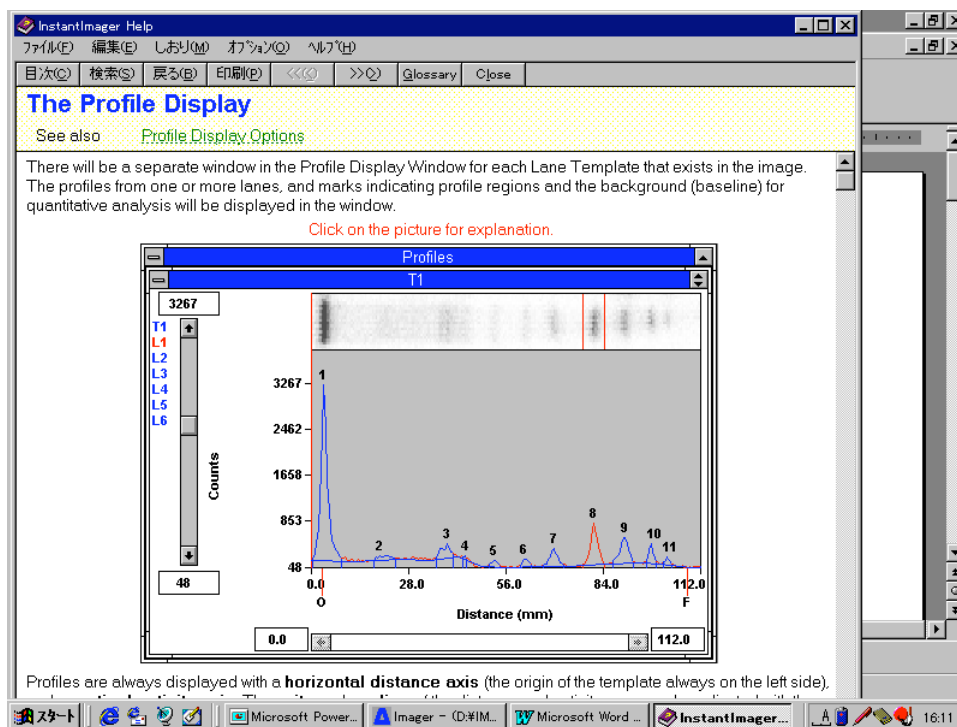
^{32}P labeled protein (Gel shift, phosphorylation assays)

^{35}S labeled protein

^{125}I labeled protein (Western blots)

High density hybridization; colony screening

データ解析法



液体シンチレーションカウンターについて

実験実習支援センター R I 部門

1. 液体シンチレーションカウンターの特徴

- ・ GM 管でも検出できないような、弱い β 線を測ることができる。
- ・ 主な測定対象・・・ ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S など

2. 原理

- ・ β 線を直接測るのではない。
 β 線を蛍光物質に当てて励起させ、基底状態に戻るときに放出される光を検出している。
- ・ シンチレーターカクテル・・・有機溶媒に蛍光物質を溶かしたもの。
- ・ 光電子増倍管・・・光電効果を利用して、光子を電子に変換し、かつ増幅する。

3. 測定の際の注意

- ・ シンチレーターカクテルの選び方・・・サンプルの液性などを考慮する。
- ・ クエンチング・・・色や不純物によって蛍光が阻害され、計数効率が減少してしまう現象。

4. 実際の測定

- ①バイアルにサンプルとカクテルを入れ、よく混ぜる。
- ②プロトコルを設定する。
※ どの番号を使っても構いません。
ただし、1～6 は専用のプロトコルなので、触らないでください。
- ③プロトコル番号と同番号のセレクターをカセットにはめる。
- ④フタを閉め、スタート。

5. その他

- ・ チェレンコフ光の測定について

* 使用時にわからないことがあれば、気軽に相談してください。
管理室もしくは R I 施設内か技術支援室にあります。

機器分析入門 2

～走査型電子顕微鏡（SEM）の活用法他～

小松 直樹（生命科学講座・化学）

トップダウンとボトムアップ、このごろよく耳にするフレーズである。ナノテクノロジーにおいては、ナノの領域への筋道を示す言葉としてすっかり定着しているが、学問の特徴を表現する言葉としても有用である。

私が専攻する化学は、物質の構造と物性に関する学問であり、その研究対象は、分子である。本学門領域において、分子、あるいは、いくつかの分子からなる超分子へのアプローチは、常にボトムアップである。一方、生物学は、生き物という比較的大きなものを扱う学問であったが、その基本原理を知る上で、次第により小さな構成単位を扱うようになり、それが、分子生物学、あるいは、生物化学という学問領域の発展につながっている。まさにトップダウンの流れである。そして当然の帰結として、医学、生物学を学ぶ方々の中で、生命現象を分子レベルで理解しようとする研究者の割合は、次第に増えていると思われる。まさに、医学、生物学のトップダウンの流れの中で、化学のセンスが必要となってきたのである。

本講義では、化学の分野で用いられる分析機器が、分子のどのような性質に対応しており、その分析により分子に関するどのような情報が得られるかについて学ぶ。また、サブミクロン、あるいは、ナノオーダーの形態分析に強みを持つ、走査型電子顕微鏡（SEM）、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた生体試料分析についても、事例を交えながら、解説する。

電磁波と物質との相互作用

電磁波エネルギー（電子線）の

吸収：UV-VIS-NIR, IR

発光：蛍光

散乱：ラマン、SEM-EDX

反射：X線回折

透過：TEM

偏光（旋光）：CD, 旋光度

エネルギーと物質の相互作用を利用し、
その物質に関する情報を引き出す。

物質がエネルギーを受け取ると

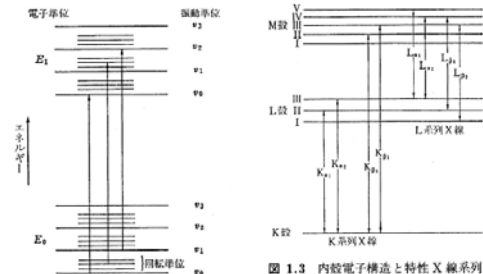


図 1.2 分子の電子、振動、回転エネルギー準位図

分子の内部エネルギー＝電子エネルギー＋振動エネルギー＋回転エネルギー
2つのエネルギー状態間の遷移に伴う電磁波の吸収または放出を検出する。

分子のエネルギーとスペクトル

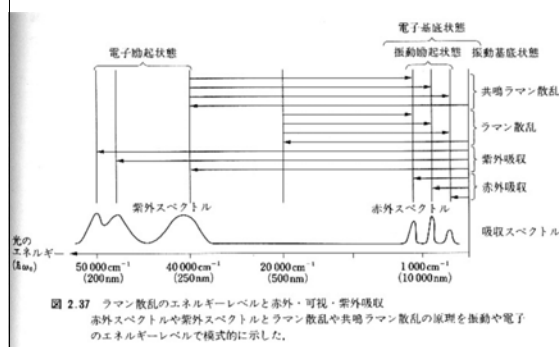


図 2.37 ラマン散乱のエネルギーレベルと赤外・可視・紫外吸収
赤外スペクトルや紫外スペクトルとラマン散乱や共鳴ラマン散乱の原理を振動や電子のエネルギーレベルで模式的に示した。

一般的な分析機器の構成

吸収スペクトル

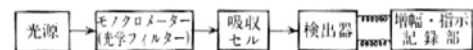


図 2.4 光電光度計の構成

発光（散乱）スペクトル

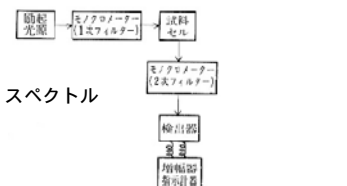


図 3.2 蛍光光度計の基本構成

各論

- ・ 紫外、可視、赤外
(吸収)
紫外可視近赤外吸収スペクトル (UV-VIS-NIR)
円偏光二色性 (CD)、旋光度
赤外吸収スペクトル (IR)
原子吸光
(散乱)
ラマンスペクトル
(発光)
蛍光スペクトル
- ・ マイクロ波
核磁気、電子スピン共鳴スペクトル (NMR, ESR)
- ・ X線、電子線
X線回折 (XRD)
透過型、走査型電子顕微鏡 (TEM, SEM)

紫外可視近赤外吸収スペクトル (UV-VIS-NIR)

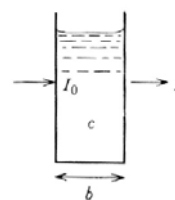


図 2.3 光の吸収

Lambert-Beer（ランベルト・ベール）
の法則

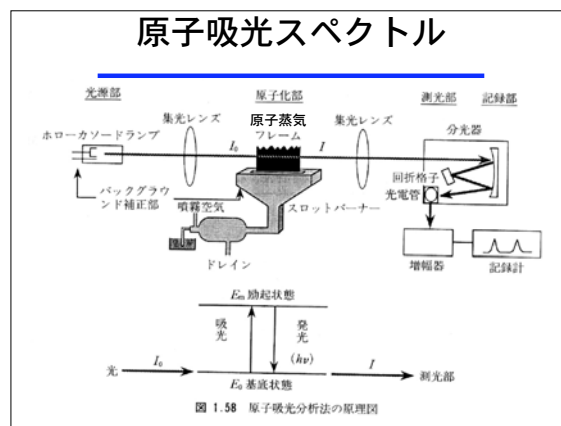
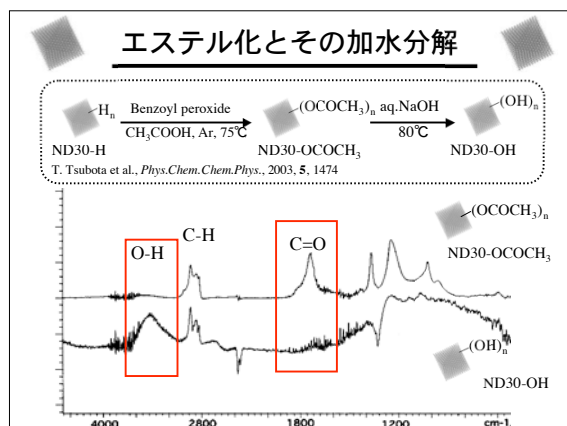
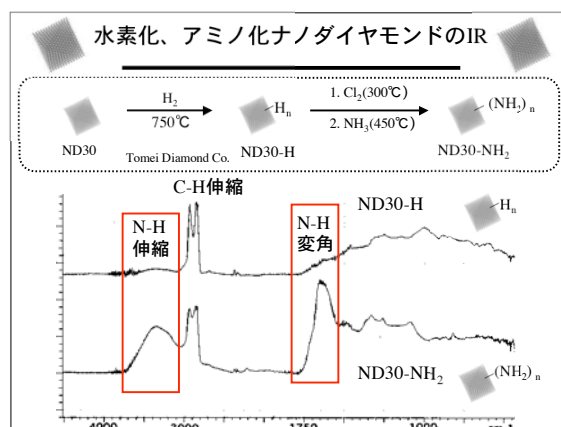
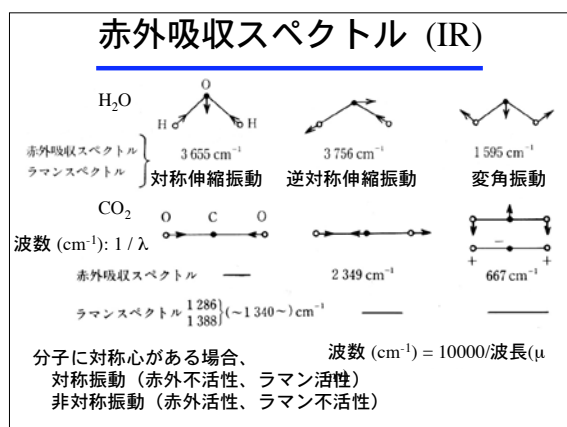
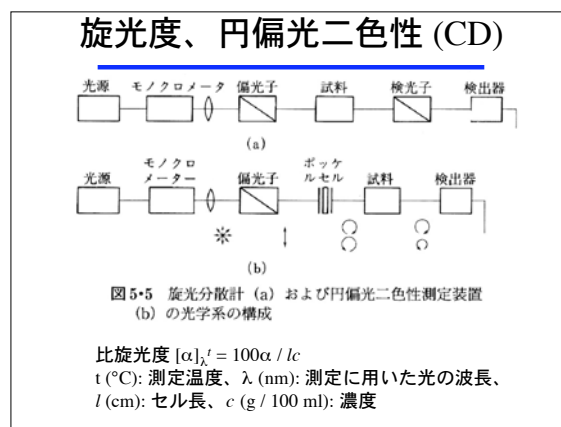
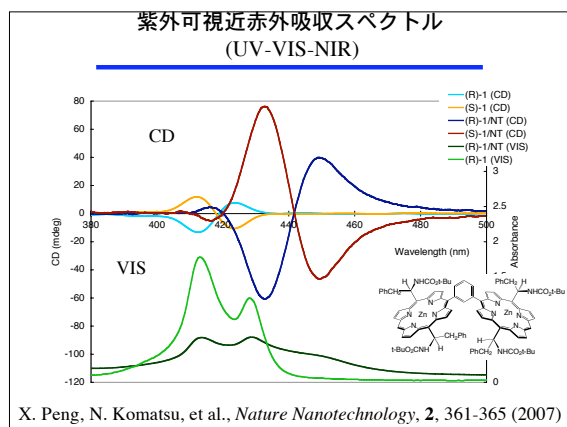
$$-\log I / I_0 = abc(g/L) = \epsilon bc(\text{mol/L})$$

a: 吸光係数、 ϵ : モル吸光係数
c: 濃度、b: 光路長（セルの長さ）

$$T \text{ (透過度, transmittance)} = I / I_0$$

$$A \text{ (吸光度, absorbance)} = -\log I / I_0$$

パイレックスガラス製セル：320~350 nm以上
石英製セル：紫外域



原子吸光スペクトル

表 8・1 主な元素の励起エネルギーと N^*/N_0 の値

元 素	波 長 (nm)	g^*/g_0	励起エネ ルギー (eV)	N^*/N_0		
				2 000 K	3 000 K	4 000 K
Cs	852.1	2	1.45	4.44×10^{-4}	7.24×10^{-3}	2.98×10^{-2}
Na	589.0	2	2.10	9.86×10^{-6}	5.83×10^{-4}	4.44×10^{-3}
Sr	460.7	3	2.69	4.99×10^{-7}	9.07×10^{-5}	
Ca	422.7	3	2.93	1.21×10^{-7}	3.69×10^{-5}	6.04×10^{-4}
Fe	372.0	11/9	3.33	2.29×10^{-9}	1.31×10^{-6}	
Cu	324.8	2	3.82	4.82×10^{-10}	6.65×10^{-7}	
Mg	285.2	3	4.35	3.35×10^{-11}	1.50×10^{-7}	
Zn	213.9	3	5.80	7.29×10^{-13}	5.38×10^{-10}	1.48×10^{-4}

ラマンスペクトル

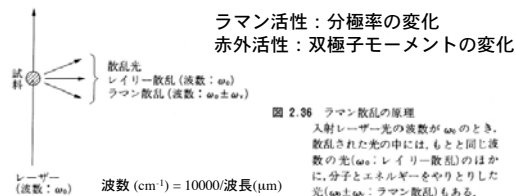
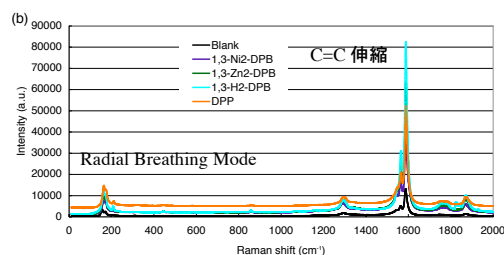


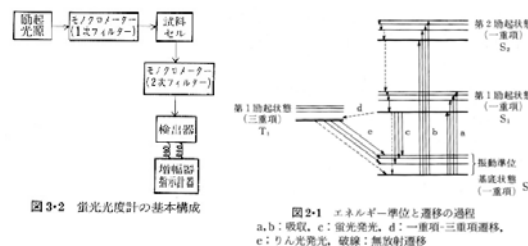
表 2.11 光の色、波長、波数

色	波長 (nm)	波数 (cm^{-1})	色	波長 (nm)	波数 (cm^{-1})
赤外	10 000	1 000	緑	530	18 900
近赤外	1 000	10 000	青	470	21 300
赤	700	14 300	紫	420	23 800
だいだい	620	16 100	近紫外	300	33 300
黄	580	17 200	遠紫外	200	50 000

ラマンスペクトル

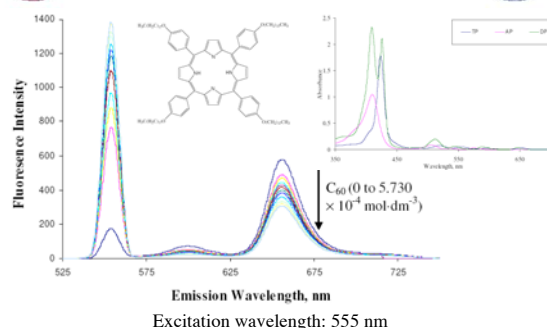


蛍光スペクトル

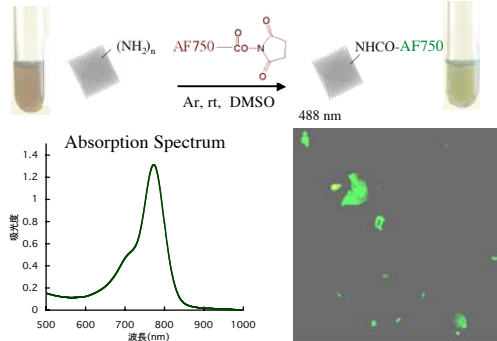


emission (nm) は、excitation (nm) より長い。

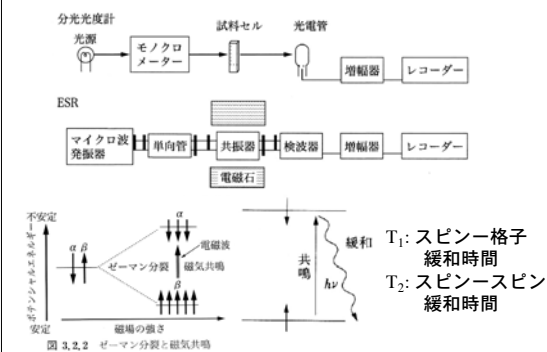
蛍光スペクトル



ND5への蛍光タグの導入



核磁気、電子スピン共鳴スペクトル (NMR, ESR)



核磁気、電子スピン共鳴スペクトル (NMR, ESR)

NMR: 核スピン ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P
 ^1H の共鳴周波数: 100 MHz (2.4 T), 300 MHz (7 T)

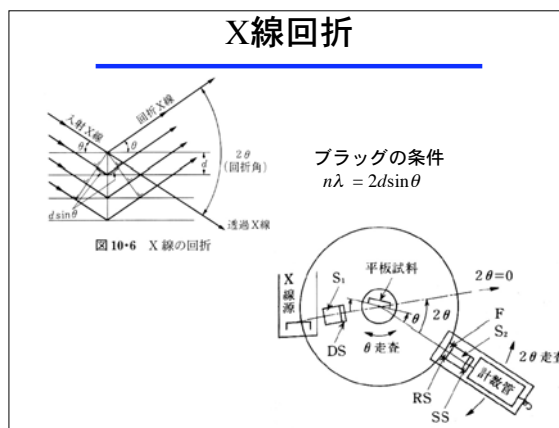
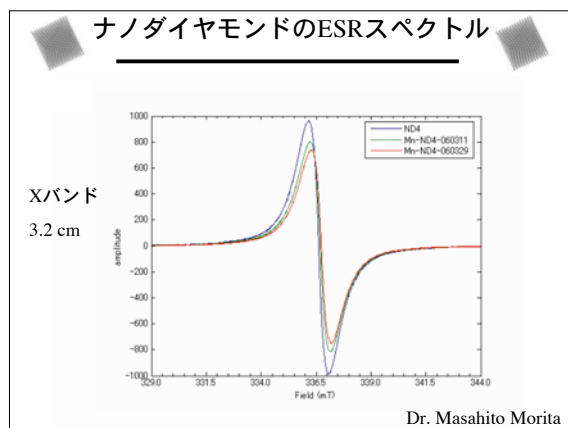
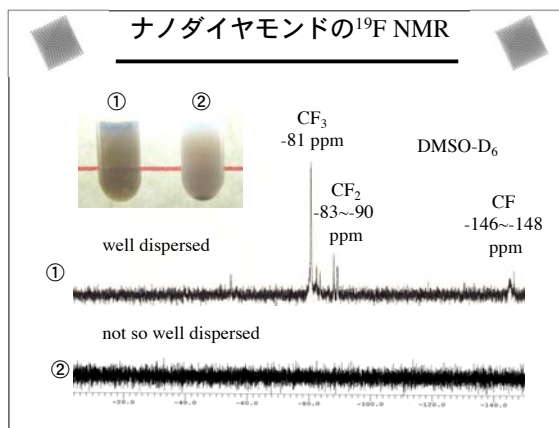
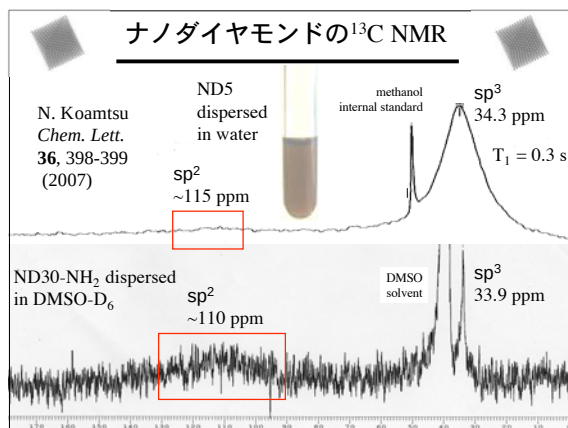
ESR: 電子スピン ラジカル (不対電子) 常磁性イオン, NO

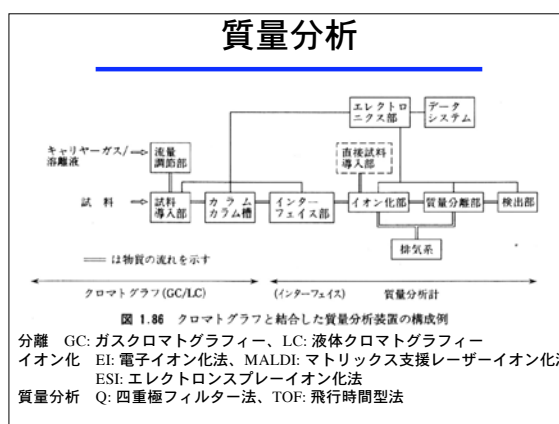
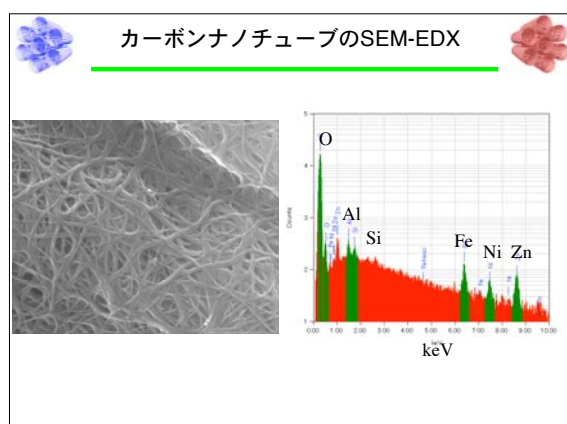
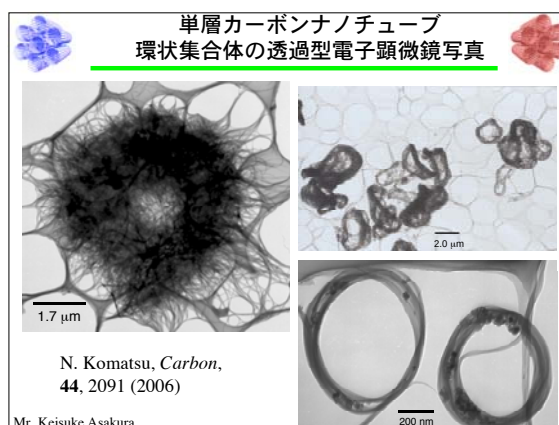
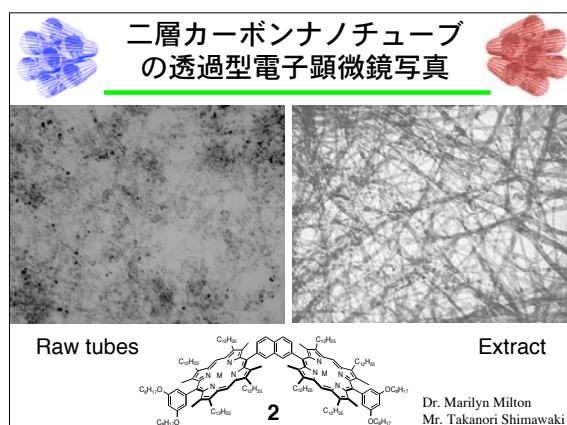
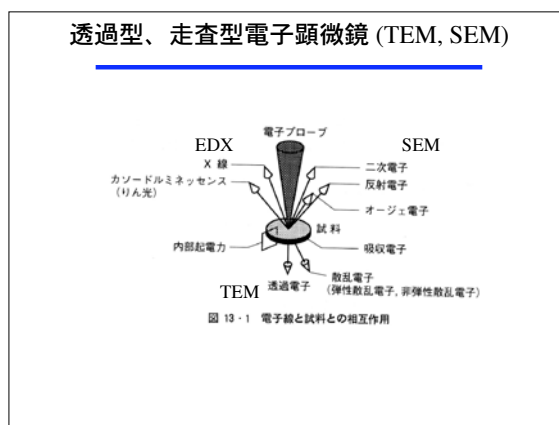
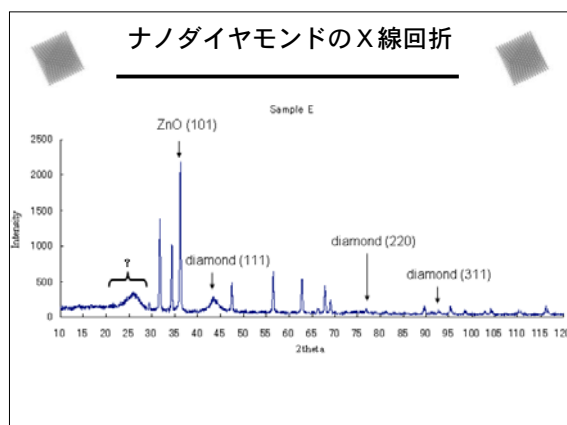
表 2.18 NMR 周波数と相対感度

核種	スピン数	測定周波数 (MHz)	天然存在比 (%)	測定感度	磁気回転比 γ^a
^1H	1/2	100	99.985	1.00 ^a	26.751
^1H	1	15.351	0.015	9.65×10^{-3}	4.1064
^{13}C	1/2	25.145	1.108	1.108	6.7283
^{15}N	1/2	10.137	0.37	1.04×10^{-3}	-2.7116
^{17}O	5/2	13.556	0.037	2.91×10^{-3}	-3.6264
^{19}F	1/2	94.094	100	0.833	25.181
^{23}Na	3/2	26.452	100	9.25×10^{-2}	7.0761
^{27}Al	5/2	26.057	100	0.206	6.9704
^{31}P	1/2	40.481	100	6.63×10^{-2}	10.8289

^a ^1H NMR の感度を 1.00 として相対的に表示したもの。

^b 10^7 ラジアン $\text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。





質量分析

様々なイオン化法

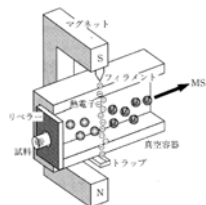


図 8.1 電子イオン化法の原理

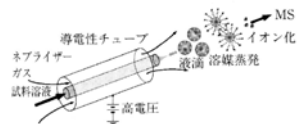


図 8.2 エレクトロスプレーイオン化法の原理

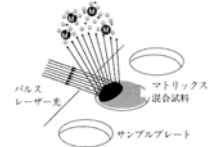


図 8.5 MALDI 法の原理

質量分析

様々な質量分析法

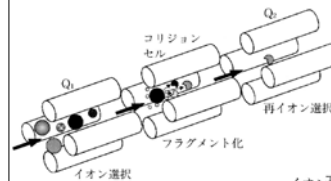


図 8.9 タンデム型四重極法の概略

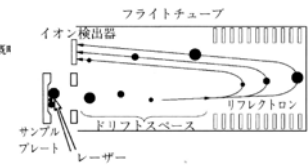
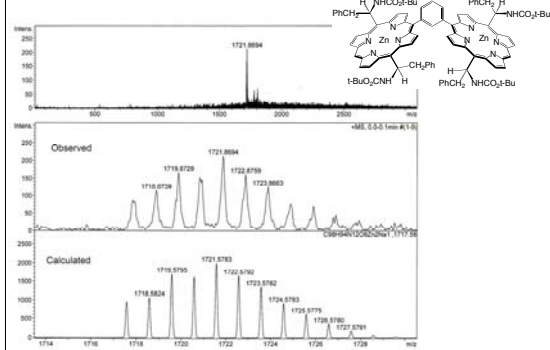


図 8.11 MALDI-TOF 法の原理

質量分析



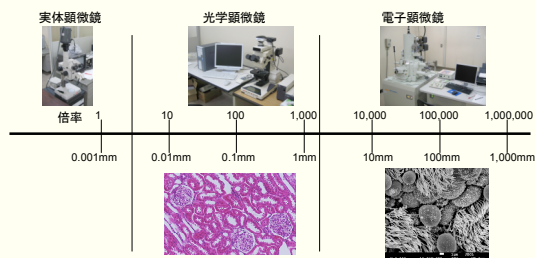
電子顕微鏡による生物試料観察

実験実習支援センター
技術職員
山元・森

顕微鏡について

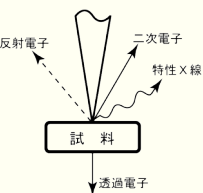
顕微鏡の機種は、観察する組織の部位によって使い分ける

1 μ mのものを観察した時の大きさ



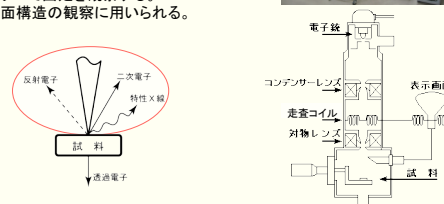
電子顕微鏡について

- 光源に電子線を用い、光学顕微鏡より遥かに高い分解能（約0.1nm）をもち微細な形態を観察する。
- 鏡体中は高真空である。
- 加速された電子線が試料に入射すると、試料から発生する、二次電子、反射電子、特性X線等の信号が発生する。また、試料が薄膜の場合は、透過電子も得られる。
- 電子線照射することにより得られる特性X線で、元素分析が可能である
- 構造の違いにより、2種類に分けられる。
走査型電子顕微鏡
透過型電子顕微鏡
- 観察倍率は、100倍～100万倍の範囲である。



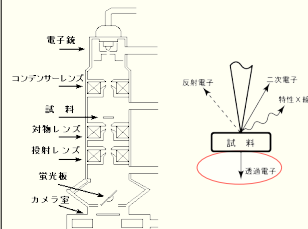
走査型電子顕微鏡について (Scanning Electron Microscope : SEM)

- 対物レンズでスポット状にした電子線を走査コイルで走査しながら試料面上に照射し、そこから発生する、二次電子、反射電子、特性X線等の信号の強度を検出器で検出し、試料面上の走査と同期させたモニターで画走を観察する。
- 表面構造の観察に用いられる。



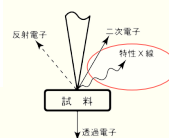
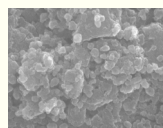
透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope:TEM)

- 超薄切した試料を透過した電子線を拡大し、蛍光板上で観察、撮影する。
- 内部構造の観察に用いられる



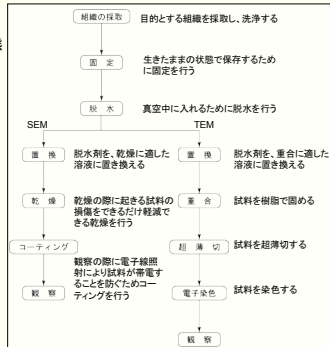
特性エックス線分析(EDX)について

- 電子線照射により放出された特性X線を、電氣的に選別し、試料を構成する、元素の種類、含有量や試料表面上の元素の分布状態を観察する。



生物試料作製方法

- できるだけ生きたままの状態を反映する像を得るために、試料作製は様々な工夫がなされている。
- 高真空の中に持ち込み、強力な電子線の照射を受ける。
- 充分乾燥し、電子線による発熱や帯電を軽減し、必要でかつ十分な情報を得られなければならない。



固定

アルデヒド系固定剤や、四酸化オスミウムなどの重金属系固定剤を用い、酸化反応や還元反応により、タンパク質や脂質を凝固し、さらに架橋することにより、組織の形態を保持するものである。

灌流固定

心臓の左心室等に針を入れ、洗浄液や固定液を注入し、組織全体を固定する。

固定後、目的の組織を取り出し、さらに浸漬固定を行う

灌流固定液
4%ホルムアルデヒド 0.5%グルタルアルデヒド
0.2%ピクリン酸 in PBS

浸漬固定

1次固定(タンパク質を架橋)

2.5%グルタルアルデヒド in PBS 水温
30分～4時間
洗浄 PBS 水温 15分 × 2回

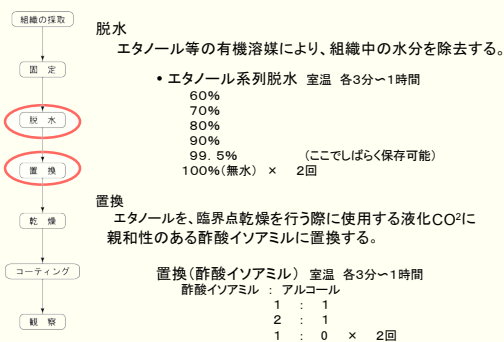
2次固定(リン脂質不飽和脂肪酸を固定)

2%四酸化オスミウム in PBS 水温 1時間

ホルマリンとホルムアルデヒド
ホルマリンは、40%ホルムアルデヒド溶液のこと。

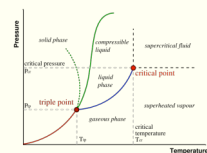
10%ホルマリンは、4%ホルムアルデヒド溶液である

脱水・置換(SEM)



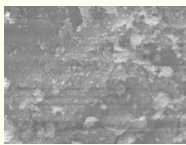
乾燥(SEM : 臨界点乾燥)

- 水分を含んだ試料を乾燥すると水の表面張力により組織表面の構造が損なわれるため、試料損傷を軽減するために、臨界点乾燥装置を用いて乾燥を行う。
- 臨界点乾燥装置は、酢酸イソアミルに置換された試料を、液化CO₂に置き換え、CO₂の臨界点状態(CO₂が気化した状態)で乾燥を行う。



コーティング(SEM)

- 乾燥させた生物試料は、ほとんど導電性がないため、電子線照射により帯電(チャージアップ) するために、試料表面に金属の(金、白金、オスミウム等)コーティングを行う。
- 元素分析をする場合は、金属の代わりにカーボンコーティングを行う。



脱水・置換(TEM)

脱水 エタノール等の有機溶媒により、組織中の水分を除去する。

- エタノール系列脱水 室温 各3分～1時間
- 60%
- 70%
- 80%
- 90%
- 99.5% (ここでしばらく保存可能)
- 100%(無水) × 2回

置換

エタノールを、エポキシ樹脂に溶解しやすいプロピレンオキシドに置換する。

置換(プロピレンオキシド) 室温 各3分～1時間

プロピレンオキシド : アルコール

1	:	1
2	:	1
1	:	0 × 2回



重合(TEM)

組織の採取

固定

脱水

置換

重合

重合

超薄切

電子染色

観察

置換

プロピレンオキシドを、エポキシ樹脂に置換する。

樹脂：プロピレンオキシド

1 : 1 1時間
1(100%) 5時間 ~ over night

重合

重合用オーブンで60℃で8時間加熱する。



超薄切(TEM)

組織の採取

固定

脱水

置換

重合

超薄切

電子染色

観察

超薄切

ウルトラミクロトームで、約65nmの厚みに超薄切する。



電子染色

超薄切した試料にコントラストをつけるために2重染色を行う。

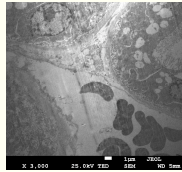
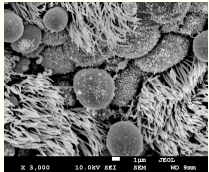
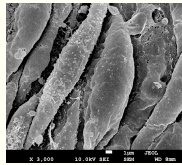
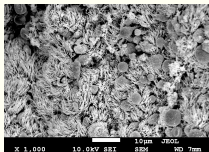
酢酸ウラン染色

2%酢酸ウラン水溶液 室温 5分~30分

硝酸鉛染色

硝酸鉛溶液 室温 5分以内

実際の画像



DNA シーケンサーを活用した遺伝子解析法

丸尾 良浩（小児科学講座）

実際の遺伝子解析を例にして、DNA シーケンサーを活用した遺伝子解析の手法を解説する。

1. PCR からシーケンスまで

- ① PCR 法による遺伝子の増幅: PCR プライマーの設計のための塩基配列入手法
- ② 電気泳動
- ③ PCR 産物の回収: クロロフォルム・エタノール沈殿
- ④ シーケンス法: シーケンス法の原理、³²P を用いたダイレクトシーケンス法、Big Dye terminator を用いたシーケンス法

2. 実際の解析例

ビリルビン UDP- グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の解析を基に、PCR からダイレクトシーケンスの流れを説明する

3. シーケンス上の注意点

- ① シーケンスのコストを下げるためには
- ② シーケンスプライマーの設計上の注意
- ③ シーケンサーにより得られたデータを読む上での気をつけるべき配列
- ④ シーケンス反応後の処理法の違い

4. シーケンス後に考えるべきこと

- ① 変異、それとも多型?
- ② その変異に病原性はあるのか?
- ③ 発現実験へ

DNAシーケンサーを活用した 遺伝子解析法

小児科
丸尾良浩

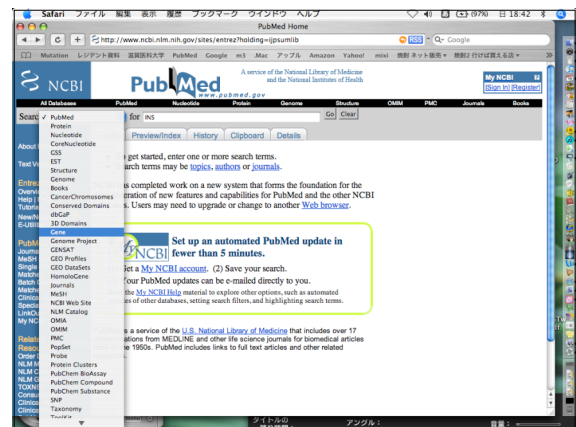
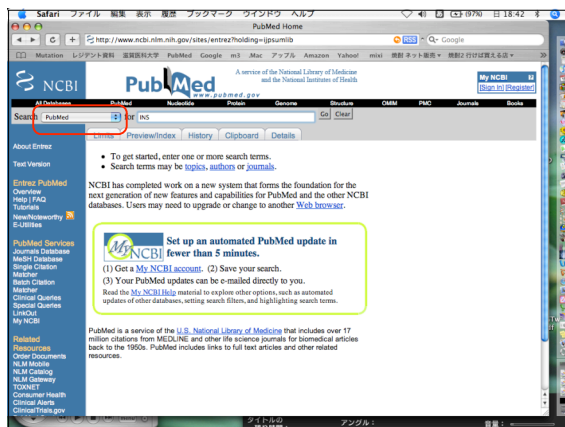
- PCRからDNAシーケンスまで
- 実際の解析例
- シーケンス上の注意点
- シーケンス後に考えるべきこと

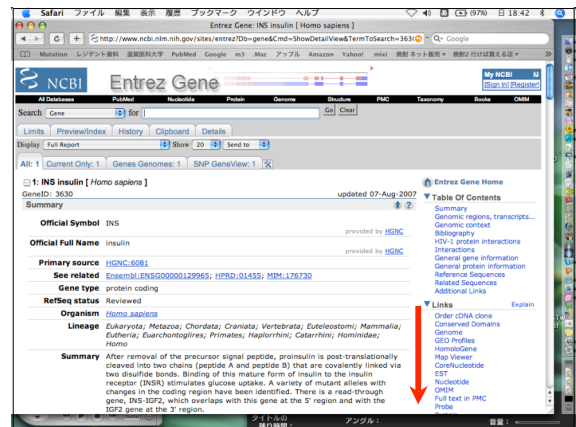
PCRからDNAシーケンスまで

- PCR法による遺伝子の増幅
- 電気泳動
- PCR産物の回収
- シーケンス法
 - シーケンス法の原理
- RI (^{32}P)を用いたダイレクトシーケンス
- Big Dye terminator (Perkin Elmer)を用いたダイレクトシーケンス

PCR法による目的遺伝子の増幅

- PCR プライマーの設計のための塩基配列の入手
(シーケンスプライマーについても同様)
- 自分でクローニングして配列を決定
- 文献より
- NCBIのサイトを利用した遺伝子検索 (実演)





Safari ブラウザで CCDS Report for Consensus CDS を表示しています。

Genome Browser links: **NUE**

Chromosome	Start	Stop	Links
11	2137658	2137803	NNUE
11	2138591	2138777	NNUE

この塩基数が近ければ複数のエクソンを一括でPCRがかけられる！

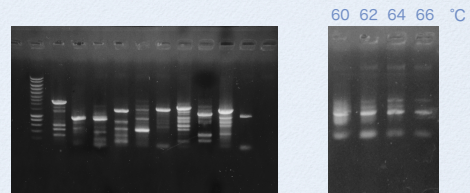
On '+' strand of Chromosome 11 (NC_000011.8)

Chromosome	Start	Stop	Links
11	2137658	2137803	NNUE
11	2138591	2138777	NNUE

CCDS Sequence Data

電気泳動

- できるだけPCR産物のバンドは一本がいい
- しかし怪しいバンドがあってもシーケンスプライマーを別に設計すればあまり問題にはならない



PCR産物の回収

- 古典的にはクロロフォルム・イソアミルアルコール (CI) 抽出の後、エタノール沈殿し、遠心後に乾燥
- 長所: この方法は安価
- 短所: 全行程が2時間以上かかる、有機溶媒の使用、サンプルのロスが多い
- 今はいろいろなカラム類で手早く回収ができる
- 長所: 短時間15-20分以内、回収量も良い
- 短所: キットが高い

- 今回は例としてSUPREC-02カラム (TaKaRa)
- 一サンプルあたりのコストは180円くらい
- 90%位の回収量



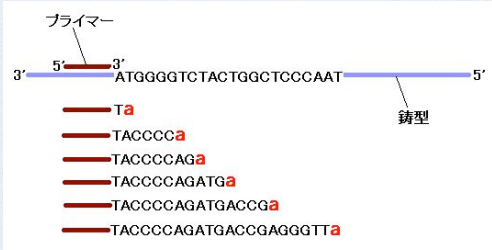
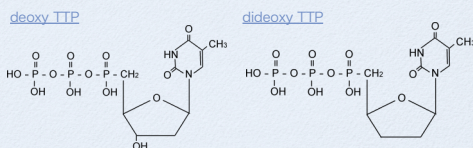
カラムにPCR反応溶液とDWを加え400μlにする

遠心6400rpm 8分

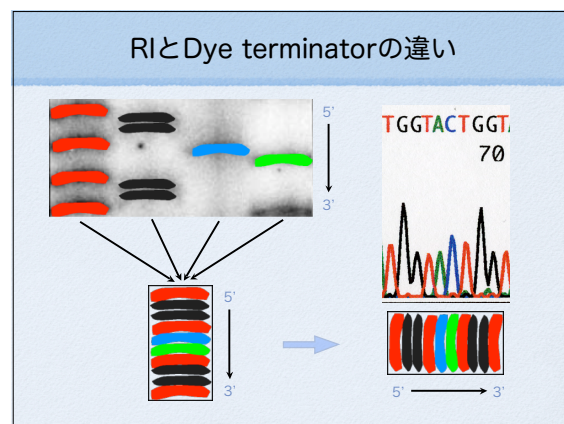
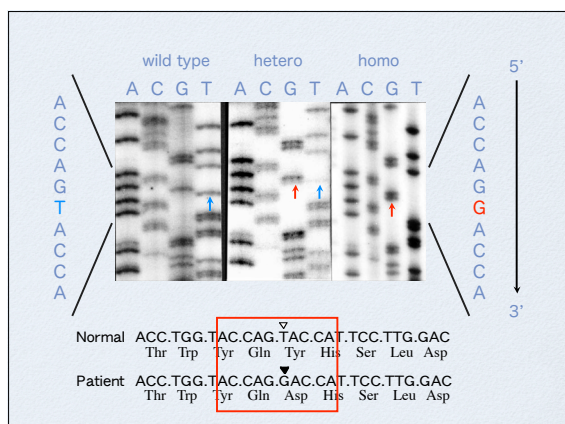
DW 20-25 μl加えピペッティングをして回収

Dideoxy法による塩基配列決定

- 塩基配列の決定法として現在広く使われている方法は Sanger et al. (1977) が発明したジデオキシ法です。
- 塩基配列のための DNA 合成反応では、基質となる dNTP に一定の割合でジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) を混ぜて合成反応を行います。ddNTP には 3' 末端に OH 基がないため、鎖の伸長がそこで止まってしまうという性質を利用している



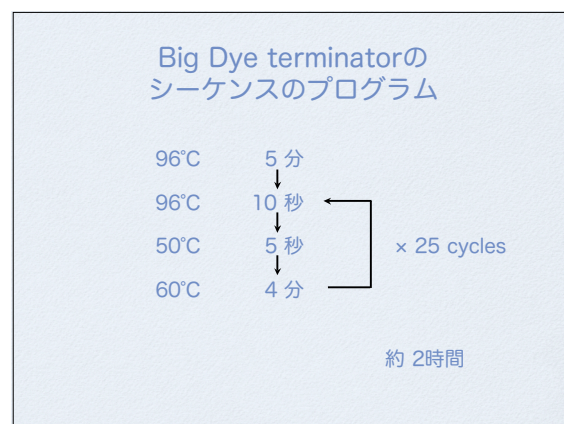
ddATPが入り伸長反応が止まると、様々な長さのフラグメントができる。TTP, CTP, GTPについても同様の反応を行う。このとき、加えるdCTPに3' 2' PでラベルしたdCTPを一部加えアクリルアミドゲルで電気泳動しそのゲルを乾燥しフィルムにオートラジオグラフィーすると...



例として最も用いられている、Big Dye terminator FS Ready Reaction Kitについて説明

Big Dye terminator	8 μ l
Template (PCR産物)	4 μ l
Sequencing primer (3 pmol/ μ l)	1 μ l
DW	7 μ l
計	20 μ l

Template (PCR産物)の量は20-200 ng、モル数によるので長ければ多めに。
そして、Templateの量に対しDWの量を調節し、最終20 μ lとする。



シーケンス反応後の処理

- エタノール沈殿
 - エタ沈 (30分) → 遠心 (10分) → 乾燥 (30分)
 - 計約1-2時間
- CenrtiSep spin coulum
 - カラムの水抜き (2分) → 遠心 (2分) → 乾燥(30分-2時間)
 - 計 1-3時間
- X-terminater
 - Voetex 30分 → 遠心 5分 → 上清を提出
 - 計40分

エタ沈、カラムで乾燥させた反応物はTSR (template supression reagent)を20 μ l加えて提出

CenrtiSep spin coulum

- 1. 使用2時間前に蒸留水 800 μ lを入れる
- 2. カラムの蓋をはずし、水抜き用チューブに立て2500rpm 2分
- 3. 新しいチューブに移し、反応物 20 μ lを加え2500rpm 2分

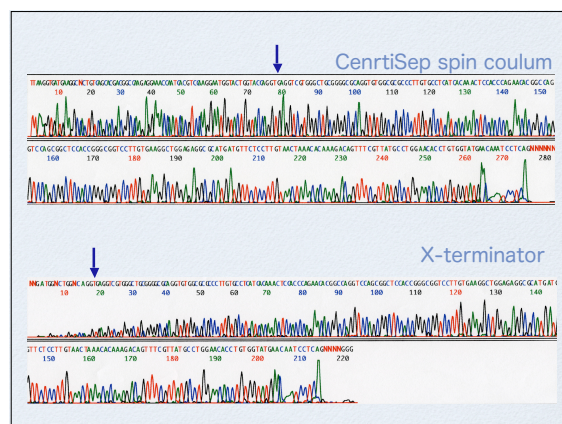
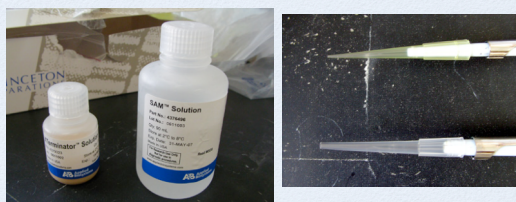
蒸留水をいれるとゲル状に凝固する

水抜きするとゲルのみ残る

カラムを新しいチューブに移しシーケンス反応物をいれ遠心

X-terminator

- シーケンス産物にX-terminator 20 μ lとBuffer 90 μ lを加えVortex 30分 (マニュアル)
- 遠心 3000rpm 5分の後、上清を新しいチューブに移し提出



X-terminator vortex時間による違い



シーケンス反応後の処理

- エタノール沈殿
 - エタ沈 (30分) → 遠心 (10分) → 乾燥 (30分)
 - 計約1-2時間
- CenrtiSep spin coulum
 - カラムの水抜き (2分) → 遠心 (2分) → 乾燥(30分-2時間)
 - 計 1-3時間
- X-terminator
 - Vortex 3分→遠心 5分→上清を提出
 - 計10-15分
 - エタ沈、カラムで乾燥させた反応物はTSR (template supression reagent)を20 μ l加えて提出

- PCRからDNAシーケンスまで
- 実際の解析例
- シーケンス上の注意点
- シーケンス後に考えるべきこと

実際の解析例

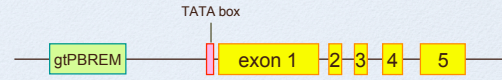
- 遺伝性非抱合型高ビリルビン血症性におけるビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子 (UGT1A1) の解析
 - Crigler-Najjar症候群 I 型
 - Crigler-Najjar症候群 II 型
 - Gilbert症候群
 - 母乳性黄疸

遺伝性非抱合型高ビリルビン血症

	Crigler-Najjar syndrome		Gilbert syndrome
	type I	type II	
Incidence	Very rare (4 / Japan)	Rare (1 / 1 million)	Popular (6%)
Serum bilirubin concentration mg/dl (μM)	30 - 50 (513-855)	6 - 20 (102-342)	1 - 5 (17-85)
Residual activity (%)	0	< 10%	< 30%
Response to phenobarbital	(-)	(+)	(+)
Prognosis	Lethal	good	good
Inheritance	AR	AR	perhaps AR

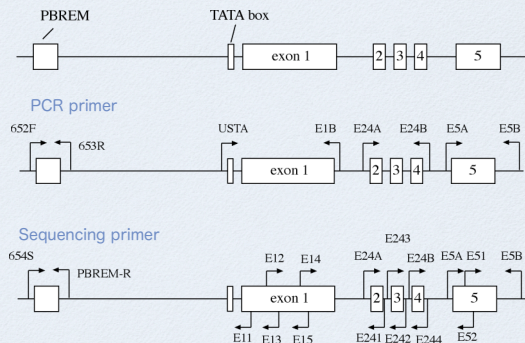
UGT1A1の遺伝子構造

ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子 (UGT1A1)



- ✧ UGT1A1は1991年にRitterらにより発見された。533個のアミノ酸からなる。
- ✧ 遺伝子構造は5つのエクソンと、その上流にTATA box、さらに上流約3200-3600bpsの位置にフェノバルビタールに反応するエンハンサー領域、phenobarbital responsive enhancer module (gtPBREM)が存在する。

UGT1A1遺伝子構造

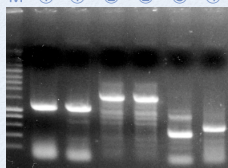


症例

- 2歳3ヶ月 インド人 女児
- 家族に明らかな黄疸の既往はない。第一子
- 妊娠分娩歴に異常なく、骨盤位のため帝王切開で出生。生後3日目より高ビリルビン血症をみとめ、生後5日目にはT-Bil 22.6 mg/dlまで上昇した。光線療法が続けられたが高ビリルビン血症は続いている。フェノバルビタールを投与するも血清ビリルビン値の低下はなかった。発達年齢は7ヶ月程度で、核黄疸の症状を認めた。現在もT-Bil 13 mg/dl以上が持続している。肝機能障害や溶血性貧血は認めていない。次子の希望もあり、遺伝子診断を行った。

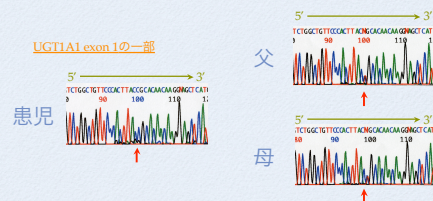
電気泳動

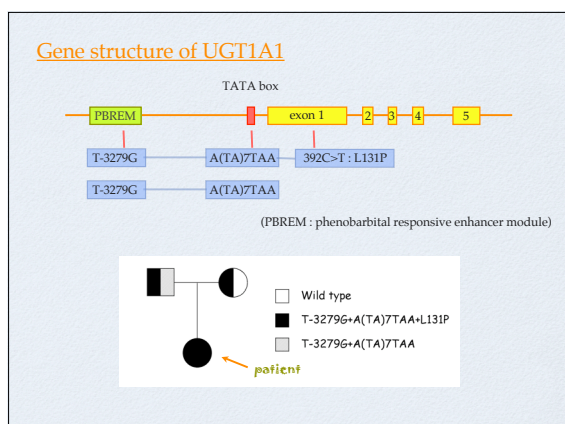
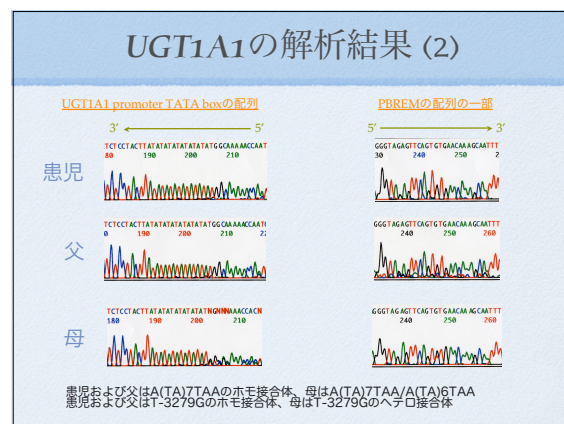
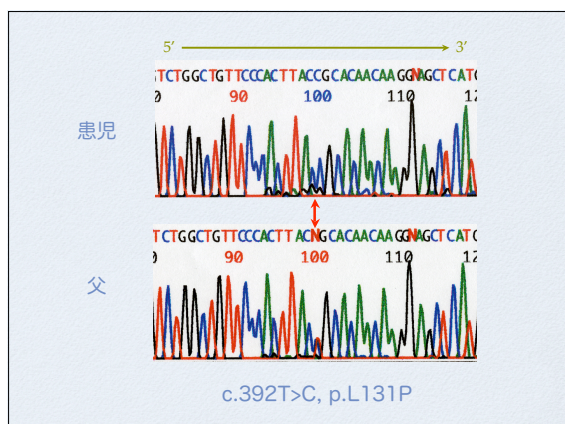
- ① TATA box～exon 1 1200 bps
- ② exon 2～exon 4 2000 bps
- ③ exon 5 500 bps
- ④ gtPBREM 800 bps



UGT1A1の解析結果 (1)

- エクソン1の392番目のT>Cの点突然変異がみられ、そのためコドン131がロイシン (L) からプロリン (P) に置き換わるミスセンス変異が認められた (c.392T>C, p.L131P)。本変異は新規変異である。患児はホモ接合体、両親はヘテロ接合体であった。





- PCRからDNAシーケンスまで
- 実際の解析例
- シーケンス上の注意点
- シーケンス後に考えるべきこと

- ### シーケンス上の注意点
- シーケンスデータの評価
 - シーケンス後の処理法による読める塩基数の違い
 - シーケンスプライマーの設定
 - 挿入変異、欠失変異の解釈
 - サブクローニングしたPCR産物の塩基配列決定
 - 解析のコストを下げるためには

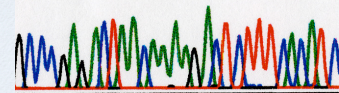
- ### シーケンスデータの評価

データのシグナルの強度



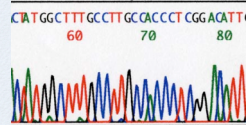
Signal G:226 A:148 T:255 C:307
DT POP6(BD Set-Any Primer)
dR 0093MATRIX
Points 1234 to 6720 Pk 1 Loc: 1234

CCCCGAGACTAAACAAAGACTCTTTCACATC
90 100 110



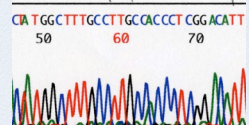
この値が100-300位ならまずまず。

Signal G:161 A:68 T:270 C:236
DT POP6(BD Set-Any Primer)
093BDV1(07/03/26)Matrix
Points 1301 to 6680 Pk 1 Loc: 1301

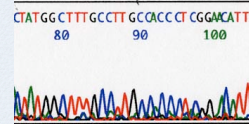


シグナルの強度が弱いと
器械が自動的にシグナル
の見かけを増強するた
め、ノイズがあるとそれ
も増強される

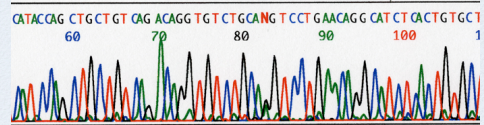
07-07-21 Signal G:48 A:22 T:75 C:64
DT POP6(BD Set-Any Primer)
093BDV1(07/03/26)Matrix
Points 1368 to 6680 Pk 1 Loc: 1



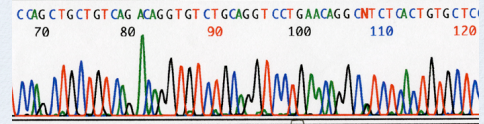
Signal G:16 A:11 T:24 C:20
DT POP6(BD Set-Any Primer)
093BDV1(07/03/26)Matrix
Points 1000 to 6680 Pk 1 Loc: 1000



Signal G:37 A:21 T:35 C:38
DT310POP4(BD)v1.mob
921 BD MATRIX
Points 1649 to 5960 Pk 1 Loc: 1649



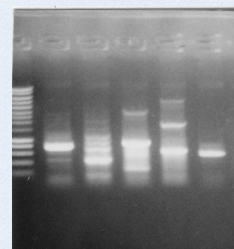
Signal G:160 A:90 T:314 C:280
DT310POP4(BD)v1.mob
921 BD MATRIX
Points 1480 to 5960 Pk 1 Loc: 1480

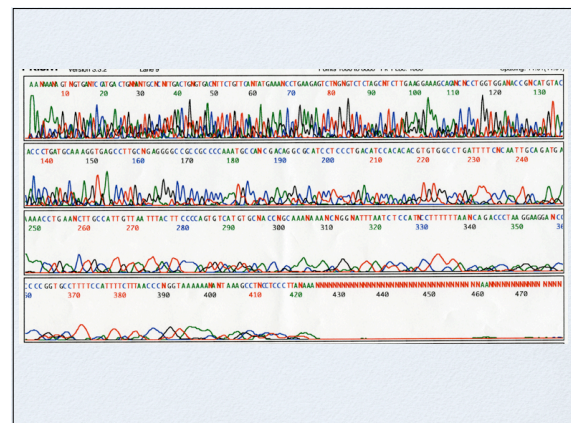


シーケンス後の処理法による 読める塩基数の違い シーケンスプライマーの設計

PCRプライマーとシーケンスプライマー

- きれいにPCRがかかって
いればPCRプライマーと
シーケンスプライマーは同
じでもよい
- 必ずしもPCRの条件がい
いとは限らないため、その
ときはシーケンスプライ
マーを別に設計する

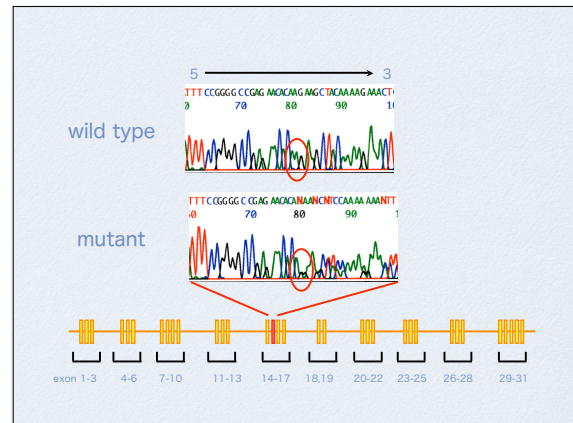




欠失変異や挿入変異の解釈

- 挿入変異も欠失変異もsense側とanti-sense側を読むとおおよそ何塩基欠または挿入されているかがわかる。

欠矢変異



サブクローニングにより変異を同定

5 $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ 3

CCGGGG C CGA **GA** CACA **GA** G CTA CAAA G

70 80 90 100

wild type

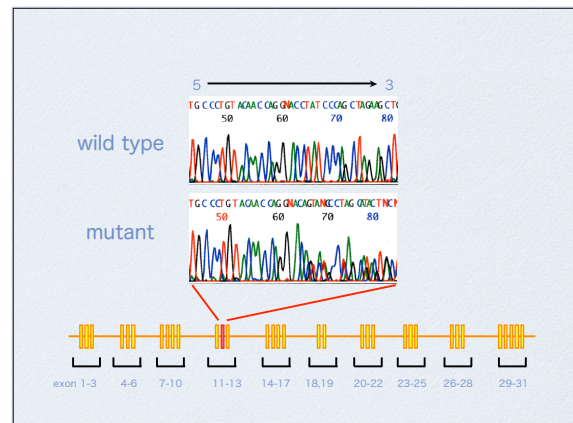
H A K K L Q K K L K E S V K
CAC AAG AAG CTA CAA AAG AAA CTC AAA GAG AGC GTG AAG
CAC AGA AGC TAC AAA AGA AAC TCA AAG AGA GCG TGA AGA
H R S Y K R N S K R A X

CCGGGG CCGG CCAAGACAGAGCTACAAA G

70 80 90 11

1883delA K628RfsX10

- しかし、最終的にはplasmidにサブクローニングして確認しなければならない
- 欠失変異だけ、挿入変異だけではかぎらない！



wild type

1435-1440delCTATCCinsAG

L479SfsX2

サブクローニングしたPCR産物の塩基配列決定での注意点

ダイレクトシーケンすだけではダメなわけ

- 一般的に、遺伝子の変異や多型をみるのにはダイレクトシーケンス法が有用です。
- しかし、時にプラスミドにサブクローニングしてシーケンスをしなければなりません。

サブクローニングしたPCR産物の塩基配列決定

- PCR産物をプラスミドにサブクローニングして塩基配列の決定が必要な場合
 - 1. 新規の変異がヘテロ接合体で、配列の確認が必要とき
 - 2. 欠失変異や挿入変異の場合
 - 3. 発現ベクターの作成の時
- Taq polymeraseでPCRをしている場合は注意が必要

wild type

CCGGGG C CGAG AAG C AAG C TACAAAAG AAAC T

80 90 100

mutant

CCGGGG C CGAG AAG C CAG AAG C TACAAAAG AAAC T

70 80 90 100

UGT1A1のTATA boxをTaq polymeraseでPCRし、プラスミド(pCR2.1)にサブクローニングした後にシーケンスをすると

CCTCTCCTACTTATATATATATATATGCGAA AAGCC
0 110 120 130

A(TA)₆TAA

野生型はTAの繰り返しが6つ

A(TA)₇TAA

CCTCTCCTACTTATATATATATATATGGCAAAGC
90 110 120 130

A(TA)₇TAA

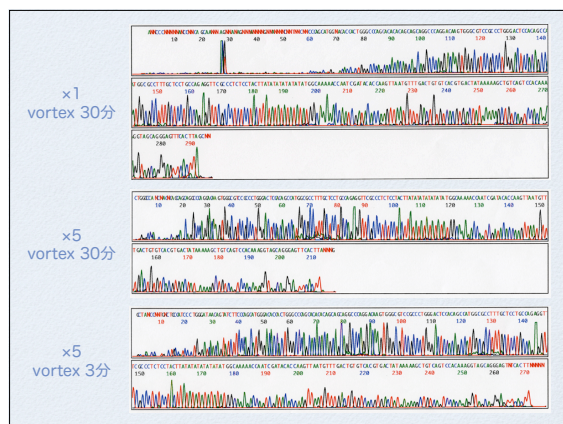
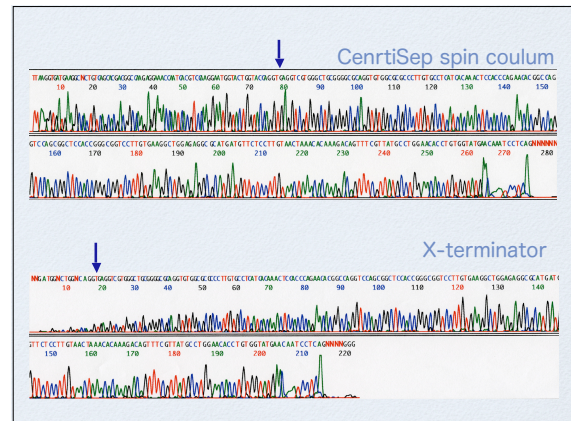
7 6 5 4 3 2 1

CCTCTCCTACTTATATATATATATATGGCAAAGC
100 110 120 130

A(TA)₈TAA

シーケンス後の処理法による読める塩基数の違い

- クロロフォルム・イソアミルアルコール沈殿
最も安価、初めの50bp位は読めない
- CenrtiSep spin coulum
1 カラム340円高いがシーケンスプライマーの直後より読める
- X-terminator
170円/反応、初めの50-80bp位は読めないが、シグナルが強く遠くまで読める > long向き、また、手間が少ない



ではどこまで安くできるのか？

Ex Taq	200 円
SUPREC 02	180 円
Big Dye terminator (x1)	1200 円
Cenrtisep spin coulum	340 円
シーケンサー代	250 円
合計	2170 円+α

ではどこまで安くできるのか？

Ex Taq	200 円
CI	0 円
Big Dye terminator (x1)	1200 円
X-terminator	170 円
シーケンサー代	250 円
合計	1820 円+α

ではどこまで安くできるのか？

Ex Taq	200 円
CI	0 円
Big Dye terminator (x5)	220 円
X-terminator	170 円
シーケンサー代	250 円
合計	1090 円+α

ではどこまで安くできるのか？

Ex Taq	200 円
Cl	0 円
Big Dye terminator (×5)	220 円
エタノール沈殿	0 円
シーケンサー代	250 円
合計	670 円+α

あと大事なのは

- 。シーケンスプライマーの設計！
- 。これが悪いとうまくシーケンスがかからない！

もし先ほどの安い方の価格でも2検体うまくいかなければ
670 円 × 2 検体 = 1340 円

一方、シーケンスプライマーの価格は
60 円 × 20 塩基 = 1200 円

さらに定額制なら 20-30 塩基 = 830 円！
プライマーは作り直した方が断然お得！！

また

- 。多型解析などで、シーケンサーを用いなくても、PCR 産物を制限酵素で処理することで変異が検出できるもの、WAVE で変異が検出できるものはそちらを利用した方がはるかにやすい。
- 。シーケンスの強みは
 - 。①新たな変異の検出同定
 - 。②他に新たな変異がないことの確認ができること。

最後に

- 。シーケンサーを動かすにあたり、実験支援センターにシーケンサーの試薬やレーザーの減価償却がかかっており、これがかさむと最終的にはユーザーのシーケンサーの泳動費用が上がります。そこで、できるだけシーケンスの失敗を減らし、お互いの負担を増やさないようにしてゆくことが、長期的にシーケンスを行ってゆく上で必要です。

- 。PCR から DNA シーケンスまで
- 。実際の解析例
- 。シーケンス上の注意点
- 。シーケンス後に考えるべきこと

シーケンス後に考えるべきこと

- 。変異？ それとも多型？
- 。その変異には病原性があるの？
- 。発現実験へ
 - 。酵素活性測定、ウェスタンブロッティング
 - 。転写活性測定

変異？それとも多型？

UGT1A1の上流領域



これだけの変異が見つかったが、多型の可能性があるため、日本人における変異の頻度の算出が必要

その変異には病原性があるの？

- ミスセンス変異であっても病原性がないこともある！
- 頻度の高い多型にあっても病原性があることもある！

ミスセンス変異であっても病原性がないこともある！

Amino acid alterations in UGT1A3

Amino acid alterations in UGT1A3	Mutant Frequency n=200
(wild type)	122 (0.61)
W11R E27E A159A	20 (0.10)
Q6R W11R E27E A159A	11 (0.055)
W11R E27E V47A A159A	25 (0.125)
R45V	22 (0.11)

Iwai M et al. J Hum Genet 2004

Kinetic parameters of wild type and mutant UGT1A3

Allele	Vmax* (pmol/min/mg)(μ M)	Km** (μ M)	Vmax/Km (μ M/min/mg)	% of Wild type (%)
Wild type	263.8 $\pm$ 36.8	7.392 $\pm$ 2.113	39.61 $\pm$ 7.29	100
W11R	244.3 $\pm$ 61.0	8.432 $\pm$ 3.734	47.93 $\pm$ 21.87	121
Q6R-W11R	307.2 $\pm$ 70.2	9.359 $\pm$ 2.766	33.99 $\pm$ 1.97	86
W11R-V47A	231.4 $\pm$ 14.7	1.683 $\pm$ 0.338	146.3 $\pm$ 24.2	369***
R45W	191.3 $\pm$ 58.6	10.84 $\pm$ 4.45	27.66 $\pm$ 12.27	70

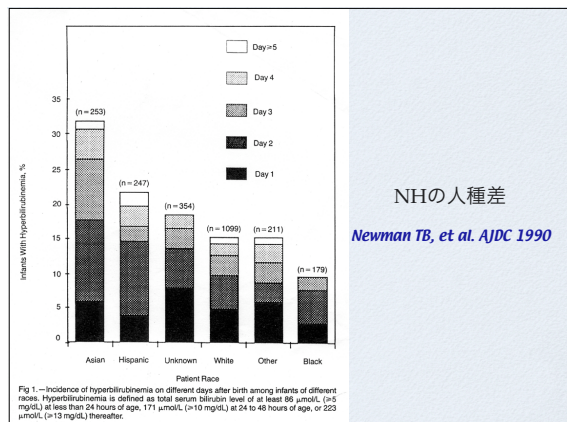
Assays were performed as outlined in Materials and Methods using 500 μ M UDPGA. COS-7 extracts using 150 μ g protein for each assay in reactions that were incubated for 10 min at 37°C. Data are shown as means $\pm$ SEM of three independent experiments. *Vmax maximum velocity, **Km Michaelis constant. ***Significant difference from the wild type (P = .0126). P value was obtained by using Scheff's test.

Iwai M et al. J Hum Genet 2004

頻度の高い多型であっても
病原性があることもある！

日本人には新生児高ビリルビン血症が多い！

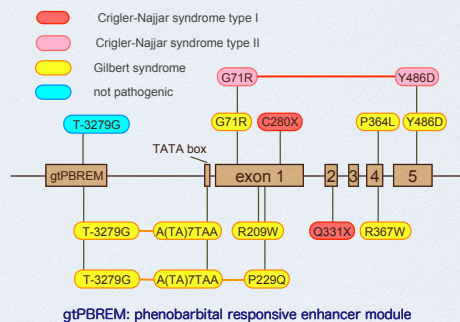
☆ 日本人には新生児黄疸が多い、なぜか？新生児医療の現場で、なんでこの子は危険因子もないのに黄疸がきついんだろう？と気になることはありませんでしたか。中国、韓国、日本の東アジアでは白人の2倍、黒人の3倍の頻度で新生児高ビリルビン血症がみられます。新生児高ビリルビン血症に人種差や家族歴があるということは遺伝的な背景があることを示唆します。



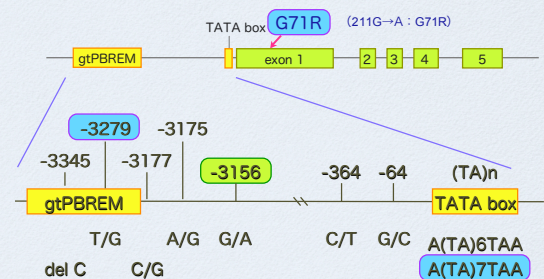
NHの人種差

Newman TB, et al. AJDC 1990

☆ 日本人には十数個のUGT1A1の遺伝子変異や多型がみついている。



UGT1A1の遺伝子多型



G71R変異は新生児高ビリルビン血症の危険因子である

	n	Genotype distribution Codon 71 mutation (G71R)			アレル頻度
		正常	ヘテロ	ホモ	
コントロール群	50	35	14	1	
新生児高ビリルビン血症群	25	11	11	3	*
	50	0.34			

コドン71のミスセンス変異, GGAがAGAに変わる (G71R) 高ビリルビン血症群のG71Rのアレル頻度はコントロール群に比べ有意に高い: * $\chi^2=5.56$, $p<0.025$.
このことは、G71R変異は新生児高ビリルビン血症の危険因子であることを示す。

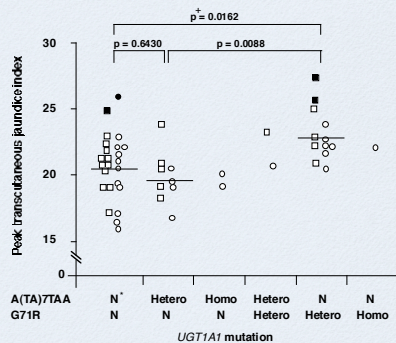
Maruo Y, et al. Pediatrics 1999

A(TA)7TAAは新生児高ビリルビン血症の危険因子でない

	n	Genotype distribution A(TA)7TAA			アレル頻度
		正常	ヘテロ	ホモ	
コントロール群	50	37	11	2	
新生児高ビリルビン血症群	25	23	2	0	*
	50	0.04			

正常はwild typeのTATA box : A(TA)6TAA. ヘテロはA(TA)6TAA/A(TA)7TAA. ホモはTAの2塩基挿入変異のA(TA)7TAAのホモ接合体. 高ビリルビン血症群のA(TA)7TAAのアレル頻度はコントロール群に比べ有意に低い: * $\chi^2=5.92$, $p<0.025$. つまりA(TA)7TAAは新生児黄疸の危険因子ではなかった. A(TA)7TAAはT-3279G+A(TA)7TAAのことをしめす。

新生児高ビリルビン血症におけるUGT1A1多型



Maruo Y, et al. Pediatrics 1999

新生児高ビリルビン血症とUGT1A1の遺伝子多型

この、解析では日本人にはG71Rのミスセンス変異とプロモーター領域のA(TA)7TAAの2つの遺伝子多型が存在することがわかった。

G71R → 東アジア人にしか認められない
新生児高ビリルビン血症の危険因子

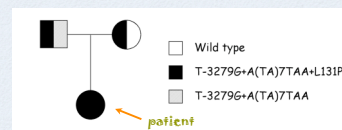
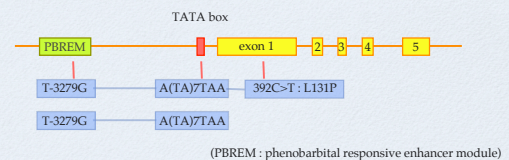
A(TA)7TAA → 白人(0.36-0.40)、黒人(0.48)に多く認められる日本人は比較的少ない(0.15)
[T-3279G+A(TA)7TAA] 新生児高ビリルビン血症の危険因子ではない



G71Rの遺伝子多型が存在することが、日本人を含む東アジア人に新生児高ビリルビン血症が多い遺伝子的背景であった。

発現実験へ

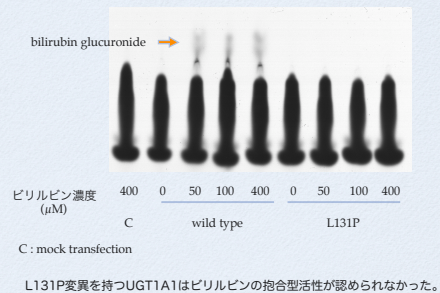
Gene structure of UGT1A1



発現実験

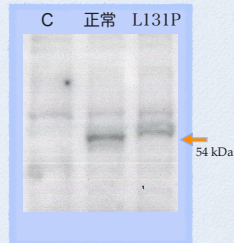
- pCR3.1 (Invitrogen) に正常な UGT1A1 cDNA をサブクローニングして作成した発現ベクターと pkF18 (TaKaRa) を用いて UGT1A1 cDNA 上に 392T>C を作成した後 pCR3.1 に変異を持つ cDNA を再ライゲーションしたベクターを使用する。
- COS-7 細胞に、リポフェクション法を用いて発現させる。
- 発現させた UGT1A1 と $[^{14}\text{C}]$ UDP-グルクロン酸、ビリルビンを 37°C で 20 分間反応させる。反応バッファーは pH7.0 の Tris-malate 0.5M を使用する。
- 反応した抱合型ビリルビンを薄層クロマトグラフィーで展開し、Instant Imager (Packard) で測定し活性とした。

酵素活性測定結果



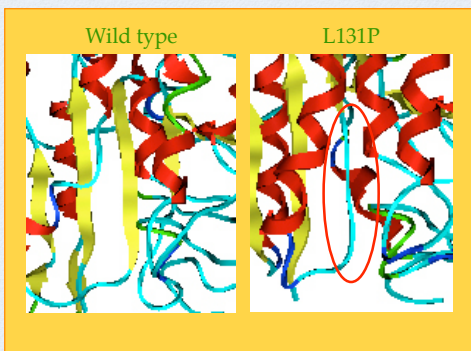
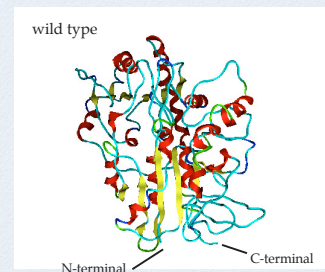
Western blotting

- UGT1A1 の酵素量は UGT1A1 の一部の合成ペプチド (GSMVSEIPEKKAMA) でウサギを免疫して作成したポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットングを行い比較した。
- L131P 変異を持つ UGT1A1 の泳動度が変化しており、L131P が UGT1A1 の構造に変化を与えている可能性が示唆された。



Molecular operating environment (MOE; Chemical Computing Group Inc.) によるホモロジーモデルの構築

タンパクデータベースより相同性の高かった Tdp-Epi-Vancosaminyltransferase GtfA (PDB code 1RRV) をもとに homology model を構築した。



最後に

- ヒトゲノムプロジェクトが終了し、今はポストゲノムの時代としてプロテオーム解析などに研究の流れは変わってきている。しかし、たくさんの遺伝子が発見されていてもその遺伝子の変異や多型、病気発症との関係についてはまだまだ明らかになっていない。
- 多型解析も、大きな研究室で精力的に行われているが、個人レベルでの病気との関係についてはまだまだ研究が十分進んでいない。
- シーケンス法をうまく利用し、病気の原因を突き止めていくことはこれからの臨床においても必要である。

ヒューマン・サンプルの取得と長期保存・ 保存検体を活用した研究の事例

喜多 義邦（社会医学講座・福祉保健医学）

①生体試料の取得に必要な手続き

調査対象者から生体試料を採取する際にはインフォームド・コンセント（IC）が必要となる。これまで、われわれが実施してきた様々な疫学研究の経験を基に、対象者の募集から IC の取得、その後の調査対象者への倫理的な対応などについて詳細を示す。

②生体試料の長期保存に必要な設備とシステム

本学では本年 1 月よりヒューマンサンプルリソースルーム（H S R）が実験実習支援センター内に設置され、運用が開始されている。本施設は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究のための倫理指針、臨床研究に関する倫理指針に基づいて設置されており、各指針の関連する部分について解説する。そのうえで、本施設の設備を説明するとともに管理システムを説明する。

③検体の長期保存と活用例

生体試料の長期保存の方法およびその管理方法について解説する。
また、生体試料の活用については、コホート研究で収集された生体試料を用いて一般に行われる Nested case-control study について実例をもとに解説する。

ヒューマンサンプルの取得と長期保存・ 保存検体を活用した研究の事例

社会医学講座福祉保健医学部門
喜多 義邦

1. 生体試料の取得に必要な手続き その1

・医学研究に係わる倫理指針

1)疫学研究に関する倫理指針

文部科学省厚生労働省 平成14年制定（平成16年改正）

2)臨床研究に関する倫理指針

厚生労働省 平成15年制定（平成16年改正）

3)ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する 倫理指針

文部科学省・厚生労働省・経済産業省 平成13年制定（平成17
年改正）

1. 生体試料の取得に必要な手続き その2

・その他の関連する法規

- 1)個人情報保護に関する法律 平成15年制定
- 2)医師法、薬事法など医療に関連する法律
- 3)住民基本台帳法
- 4)統計法

1. 生体試料の取得に必要な手続き その3

・生体試料の収集に係わる倫理指針の規定

1)疫学研究に関する倫理指針

(2)人体から採取された試料の利用

研究者等は、研究開始前に人体から採取された試料を利用する場合には、研究開始時までに研究対象者から試料の利用に係る同意を受け、及び当該同意に関する記録を作成することを原則とする。ただし、当該同意を受けることができない場合には、次のいずれかに該当することについて、倫理審査委員会の承認を得て、研究を行う機関の長の許可を受けたときに限り、当該試料を利用することができる。

1. 生体試料の取得に必要な手続き その4

- ① 当該試料が匿名化(連結不可能匿名化又は連結可能匿名化であって対応表を有していない場合)されていること。
- ② 当該試料が①の匿名化に該当しない場合において、試料の提供時に当該疫学研究における利用が明示されていない研究についての同意のみが与えられている場合は、以下の要件を満たしていること。
 - ア) 当該疫学研究の実施について試料の利用目的を含む情報を公開していること。
 - イ) その同意が当該疫学研究の目的と相当の関連性があると合理的に認められること。
- ③ 当該試料が①及び②に該当しない場合において、以下の要件を満たしていること。
 - ア) 当該疫学研究の実施について資料の利用目的を含む情報を公開していること。
 - イ) 研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるようにすること。
 - ウ) 公衆衛生の向上のために特に必要がある場合であって、研究対象者

1. 生体試料の取得に必要な手続き その5

2)ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 要点のみを示す。

- ① 第2章 7. 研究責任者の責務
- ② 第3章 10. 提供者に対する基本姿勢

詳細については添付資料1)を参照。

2. 生体試料の保存 その1

・ 生体試料の保存に関する指針

1)疫学研究に関する倫理指針 第4章10(1)資料の保存

研究責任者は、疫学研究に関する資料を保存する場合には、研究計画書にその方法等を記載するとともに、個人情報の漏えい、混交、盗難、紛失等が起こらないよう適切に、かつ、研究結果の確認に資するよう整然と管理しなければならない。

2. 生体試料の保存 その2

2)ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する 倫理指針

第4章14 試料等の保存及び廃棄の方法

- ・ (1)保存の一般原則
- ・ 研究責任者は、研究を行う機関内で試料等を保存する場合には、提供者又は代諾者等の同意事項を遵守し、研究計画書に定められた方法に従わなければならない。

2. 生体試料の保存 その1のつづき

・ (2)ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの提供

研究責任者は、試料等をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供する場合には、当該バンクが試料等を一般的な研究用試料等として分譲するに当たり、連結不可能匿名化がなされることを確認するとともに、バンクに提供することの同意を含む提供者又は代諾者等の同意事項を遵守しなければならない。

・ (3)試料等の廃棄

研究責任者は、研究計画書に従い自ら保存する場合及びヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供する場合を除き、試料等の保存期間が研究計画書に定めた期間を過ぎた場合には、提供者又は代諾者等の同意事項を遵守し、匿名化して廃棄しなければならない。

ちなみに その1

・ 遺伝子研究に必要なインフォームド・コンセントに含まれるべき事項

- 1)提供者を選ぶ方針(合理的に選択していることがわかる具体的な方法、提供者が疾病や薬剤反応性異常を有する場合等にあつては、病名又はそれに相当する状態像の告知方法等。)
- 2)研究の意義、目的、方法(対象とする疾患、分析方法等。将来の追加、変更が予想される場合はその旨。単一遺伝子疾患等の場合には研究の必要性、不利益を防止するための措置等の特記事項等。)、期間、予測される結果及び危険、個人情報の保護の方法(匿名化しない場合の取扱いを含む。)
- 3)試料等の種類、量
- 4)共同研究機関の名称
- 5)研究責任者等の氏名
- 6)インフォームド・コンセントのための手続及び方法
- 7)インフォームド・コンセントを受けるための説明文書及び同意文書

ちなみに その1

- 8)提供者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合、その研究の重要性及び提供者から試料等の提供を受けなければ研究が成り立たない理由並びに代諾者等を選定する考え方
- 9)遺伝情報の開示に関する考え方(必要に応じ開示の求めを受け付ける方法を含む)
- 10)研究実施前提供試料等を使用する場合の同意の有無、内容、提供時期、本指針への適合性
- 11)他の研究機関から試料等又は遺伝情報の提供を受ける場合のインフォームド・コンセントの内容
- 12)試料等又は遺伝情報を外部の機関に提供する場合や研究の一部を委託する場合の匿名化の方法等の事項(契約の内容を含む。)
- 13)試料等の保存方法及びその必要性(他の研究への利用の可能性と予測される研究内容を含む。)
- 14)ヒト細胞・遺伝子・組織バンクに試料等を提供する場合には、バンク名、匿名化の方法等
- 15)試料等の廃棄方法及びその際の匿名化の方法
- 16)遺伝カウンセリングの必要性及びその体制
- 17)研究資金の調達方法

3. 研究計画書等の実際例

- ・ 我々が行っている高島研究で用いている研究計画書および説明用資料・教材を以下に示す。

- 1)高島研究計画書(添付資料2)
- 2)高島研究説明用資料(添付資料3)
- 3)高島研究の一環として作成した説明用ビデオ(実際に上映する)

4. 本学における生体試料の管理システム その1

ヒューマンサンプルリソースルーム(HSR)



室内



監視システム

4. 本学における生体試料の管理システム その2

- 目的
ヒューマンサンプルリソースルーム (Human Sample Resource Room, HSR)は、大学内における実験、研究等に使用するヒト由来試料等を一括して保管するための施設である。
HSRに保管される試料等は、各講座または講座内の各部門で「滋賀医科大学倫理委員会規程(倫理委員会規程)」に申請し承認されたものに限る。

以上のように、このシステムは前述の倫理指針にのっとって設置されたものである。

4. 本学における生体試料の管理システム その3

- 試料の保管の申し込み
HSRに試料等を保管する場合は、次に掲げる手続きにより冷凍庫を登録すること。
また、冷凍庫ごとに管理担当者を定め、担当者が登録手続きを行うこと。
- 入退出
HSRの入室者は、倫理委員会に提出、承認された「審査申請書」に記載されている「主任研究者」、「分担研究者」、及びその関係者でセンター長が承認した者に限る。
カードキーで職員証を認証し入室退出を管理する
- 試料等の取り扱い
HSRでは冷凍庫からの試料等の出し入れのみとし、試料等の解凍、処理等の実験は行わない

4. 本学における生体試料の管理システム その4

- 冷凍庫の取り扱い
 - ① 冷凍庫は必ず鍵をかけ、冷凍庫の管理者以外が試料等を取り出せないようにする。
 - ② 入室者本人が取り扱うことのできる冷凍庫以外は操作しない
- 緊急時の措置
 - ① 冷凍庫の温度上昇時には、備え付けの緊急時予備冷却装置が作動し、HSRに炭酸ガスが充満し窒息死する可能性があるため、ただちに退室する。
 - ② 冷凍庫の異常により庫内温度が上昇した場合、当該冷凍庫の責任者に対し、e-mailにて緊急に連絡する。

5. 保存生体試料の活用 その1

- 保存された生体試料の目的
Research Involving Human Biological Materials: Ethical Issues and Policy Guidance, 1999. NBAC Report
1) がん研究:
例) 病理標本→詳細な医療情報の裏づけによる候補遺伝子の探索が可能
新しい研究のアイデアが浮かぶごとに新たな試料の提供を求めるよりはるかに低コストで実験することが可能である。

5. 保存生体試料の活用 その2

- 保存された生体試料の目的
2) 感染症研究:
未知のウイルスによる感染症が発生した場合は緊急事態と受け止められる場合がある。新たな感染事例と共に過去に当該ウイルスの感染事例があったかどうかを迅速に調査研究しなければならない。特に、広範に急速な感染の拡大が懸念される場合は迅速な調査研究が求められる。このような場合は、保存されている多数の**血液試料**を調査研究することが有効な研究手段となる。
1993年に米国南西部全域で健康な若者達が肺炎症状の疾患で次々と不可解な死を遂げ始めた。この数ヶ月以内に、病原体としてハンタウイルスが特定され、不可解な疾病の原因が究明され、解決に導かれた。

5. 保存生体試料の活用 その3

- 保存された生体試料の目的

3) 脳研究:

脳や中枢神経系の疾患のような人間がもつ特徴的な行動を指標とする疾患に関する研究を行う場合、疾患モデル動物などを活用することが困難な場合が多い。また、脳の場合、生体試料の提供が得にくい場合が多い。

脳バンクはこうした問題点を解決する有効な方法のひとつである。

5. 保存生体試料の活用 その4

- 保存された生体試料の目的

4) 長期疫学研究(コホート研究):

コホート研究にはベースライン調査時に血液標本を採取し、長期に保存することを目的に加えている研究が多くある。この研究での生体試料の保存の目的は以下のとおりである。

- ①将来の新たな候補危険因子の測定準備
- ②精度管理(縦断的精度、横断的精度)

5. 保存生体試料の活用 その5

- 保存された生体試料の目的

5) 人由来生体試料バンク(DNAバンク等):

疾患関連遺伝子、たんぱく質などの探索、あるいは医学研究結果の再現性の確認などを目的として、不特定多数の研究機関へ厚生に試料を分配することを業務として設立されている。

わが国においては、「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」でのバイオバンクなどがある。また、イギリスの

UK Human Genome Mapping Project Resource Centreなどが知られている。

5. 保存生体試料の活用 その6

- コホート研究における保存生体試料の活用

コホート内症例対照研究

(nested case control study):

追跡中のコホート内に発生した患者を症例とし、対照が症例と同じコホートから選択されるが、その選択が症例の発症後に行われる症例対照研究。

保存しておいた血液検体などを測定して「症例」と「対照」を比較する(例えば、胃がん患者と健康人で血清ビタミンの値を比べる)時などにこの方法が使われる。

5. 保存生体試料の活用 その7

コホート内症例対照研究の利点

- 1) 対照群と症例群の生存時間のバランスがとれるなど、多くの交絡因子が除去される。
- 2) コホートの対象者全員分を分析すると費用がかかるが、「症例」と「対照」として選んだ者の分だけを分析すれば、安価に研究ができる。

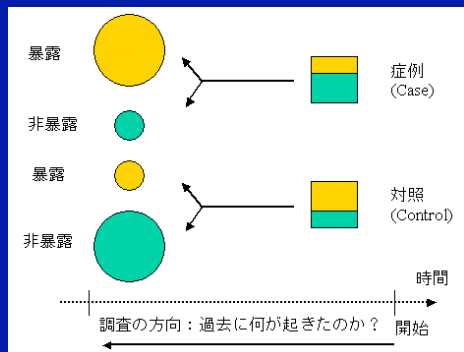
5. 保存生体試料の活用 その8

コホート内症例対照研究の方法

例題)「喫煙すると肺癌が起こりやすくなるのか?」という命題を検証する。

- ①まず、既に発症しているなどOutcomeが発生している(肺癌患者)を集め、これを「症例」とする。
- ②次に、Outcomeが発生していない(肺癌がない)が、年齢、性別、既往歴など、それ以外の背景因子が「症例」と似ている患者を集め、これを「対照」とする。
- ③「症例」と「対照」のそれぞれについて、検証したい曝露因子(喫煙)があったか否かを調査・測定する。
- ④「症例」と「対照」の曝露因子を持つ多寡により、曝露因子(喫煙)とOutcome(肺癌)の間に関連性があるかどうか、推定する。

5. 保存生体試料の活用 その9



オッズ比 (Odds Ratio)

喫食群の発症オッズと
非喫食群の発症オッズの比

$$\text{発症オッズ比} = \frac{a/a+b}{b/a+b} \div \frac{o/o+d}{d/o+d} = \frac{ad}{bo}$$

症例対照研究では発症オッズ比は計算できない

5. 保存生体試料の活用 その9

コホート内症例対照研究の実例をみてみよう。
添付資料を参照

- 例1) ヘリコバクターピロリと胃がんとの関連に関する研究 (JPHC)
- 例2) 突然死とn-3系不飽和脂肪酸との関連

4. 本学における生体試料の管理システム その5

ヒューマンサンプルリソースセンターを
見に行こう。

フローサイトメーターとセルソーターの活用法

伊藤 靖（病理学講座・疾患制御病理学部門）

この講義ではフローサイトメーター、セルソーターを用いた実験の例を示しながら、使用法、応用法を解説する。

フローサイトメーターは蛍光色素を検出する装置である。蛍光顕微鏡との違いは単一細胞浮遊液を用いること、蛍光強度が定量できること、細胞を分取できることなどである。

これらの特徴を生かしながら、以下の実験を行った。

1. T リンパ球の活性化に伴う表面タンパク質の発現の変化の解析
(activation marker)
2. T リンパ球のサイトカイン産生の単一細胞レベルでの解析
(intracellular cytokine staining)
3. 生体内でのインフルエンザウイルス抗原特異的キラー T 細胞活性の解析
(in vivo CTL assay)
4. 遺伝子導入 T リンパ球の分取と機能の解析
(cell sorting)

用いられている細胞は免疫系の細胞であるが、基本原理はどの分野にも応用可能なことである。以上の手法を解説することで、今後論文を読む際の理解の助けになり、実験の幅を広げることに役に立てば幸いである。

フローサイトメーターと セルソーターの活用法

伊藤 靖
病理学講座

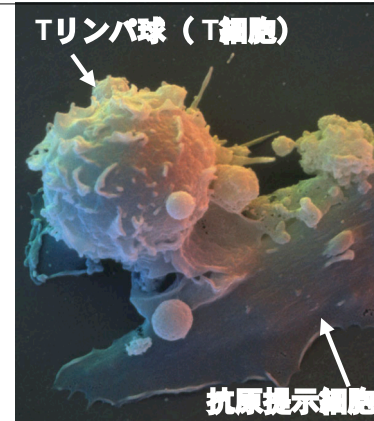
1. 細胞表面分子
2. 細胞内分子（サイトカイン）
3. In vivo CTL assay
4. 細胞内カルシウムイオンの測定
5. セルソーターの使用例

Tリンパ球の抗原認識

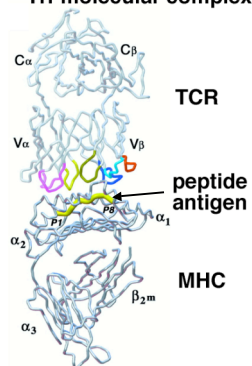
T細胞抗原受容体（TCR, T cell receptor）

抗原ペプチド

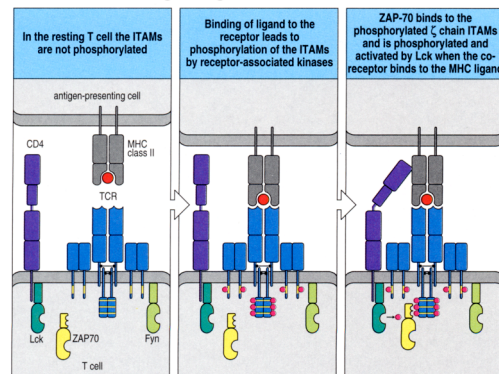
主要組織適合抗原複合体
(MHC, major histocompatibility complex)

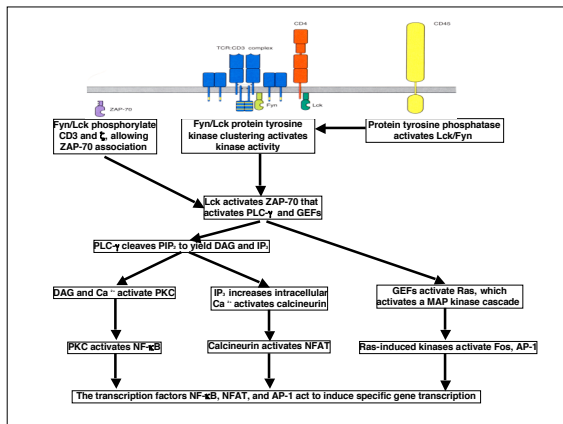


三分子複合体 Tri-molecular complex



Clustering of TCR and co-receptor initiates signaling within the T cells

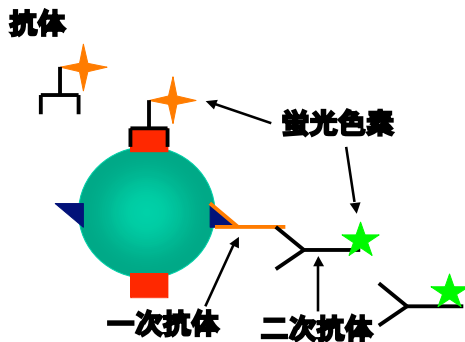




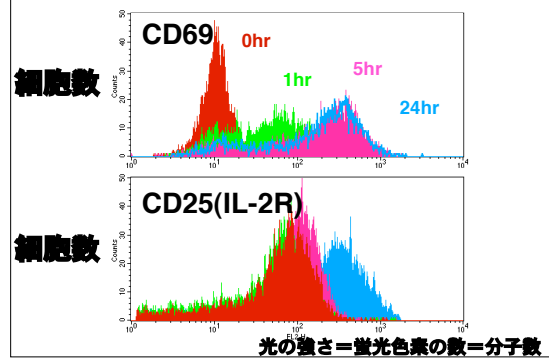
抗原認識に伴う 細胞表面分子の変化

活性化マーカーの解析

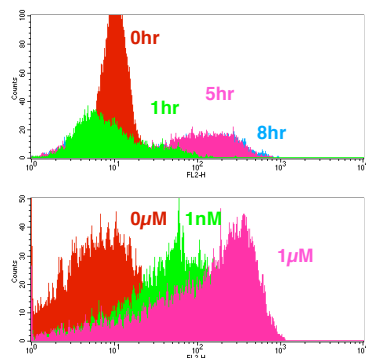
フローサイトメーター



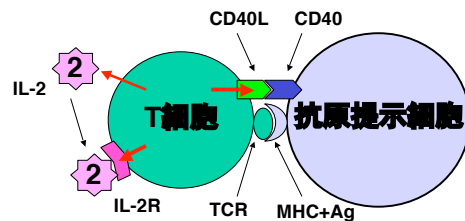
Tリンパ球表面分子の活性化に伴う変化



活性化Tリンパ球のCD40Lの発現



活性化T細胞は 抗原提示細胞の活性化を助けて、 自らは増殖する



細胞内分子の解析

サイトカインの染色

サイトカインの測定

mRNA RT-PCR
Northern blot

タンパク質 ELISA
ELISPOT
細胞内染色

サイトカインなど分泌型分子の染色

Monensin

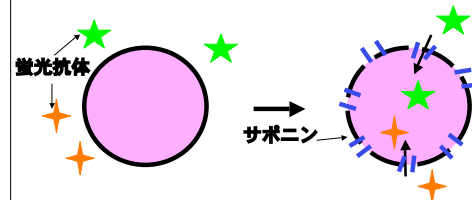
Brefeldin A

タンパク質の分泌を止める。
作用点は細胞の種類により異なる。
リンパ球ではERからGolgi体への
小胞輸送を止める。

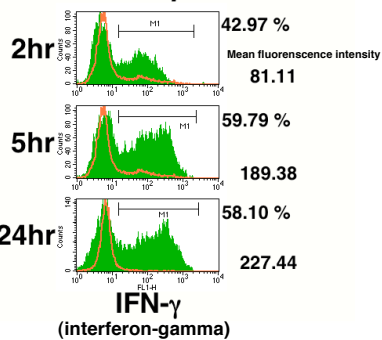
細胞内染色

パラホルムアルデヒドで固定

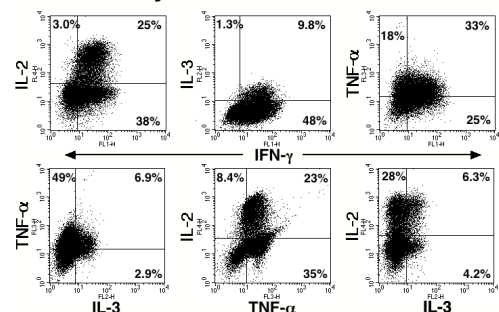
↓
サポニンで細胞膜に孔をあける



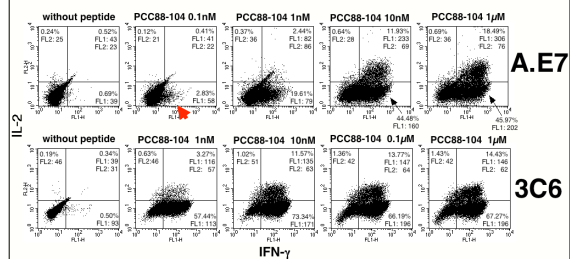
Stimulation of 3C6 with
PCC88-104 10 μ M + P13-9



Heterogeneous Cytokine Production
by T Cell Clone A.E7

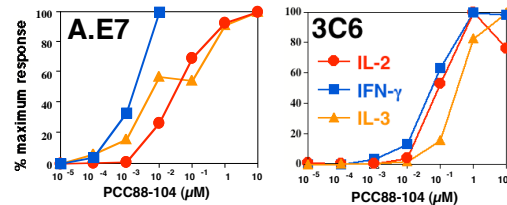


Hierarchical Relationship Between IL-2 and IFN- γ Production by Individual Th1 Clones

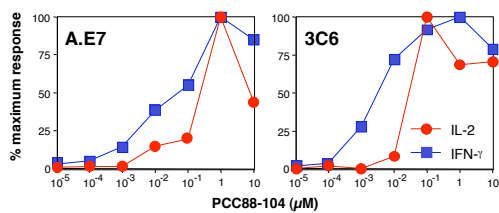


J. Exp. Med. 186, 757

Cytokine Response Hierarchy Detected with ELISA



Hierarchical Cytokine Response Determined by RT-PCR

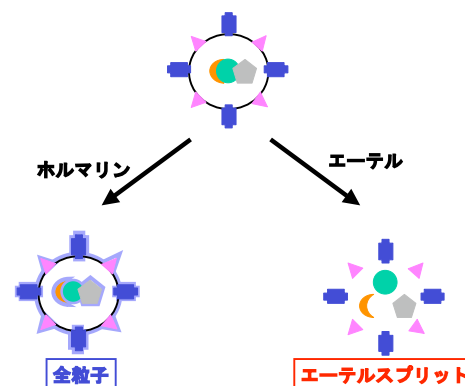


In vivo CTL assay

生体内でのキラーT細胞の活性を測定する

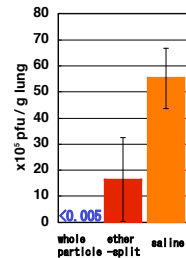
インフルエンザウイルス不活化ワクチン による免疫反応の解析

全粒子不活化ワクチンと エーテルスプリットワクチンの比較



Protective immune responses induced by vaccines (H3N2)

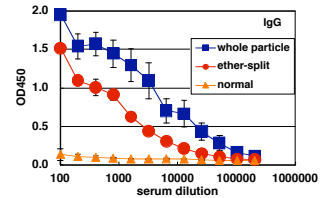
ワクチン: A/Aichi/2/68 (H3N2) 100 µg so x2
Challenge: A/Aichi/2/68 (H3N2) 10⁴ pfu



Sawai, et al. Immunology in press

Protective immune responses induced by vaccines (H3N2)

Antibody response

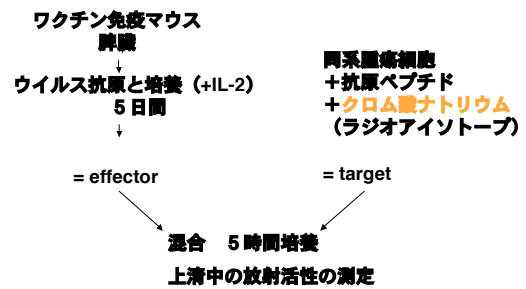


キラーT細胞機能活性化の測定法

1. クロムリリース法
2. 細胞内IFN-γ、パーフォリン染色
3. MHC抗原テトラマー (マルチマー) 染色
4. In vivo CTL assay

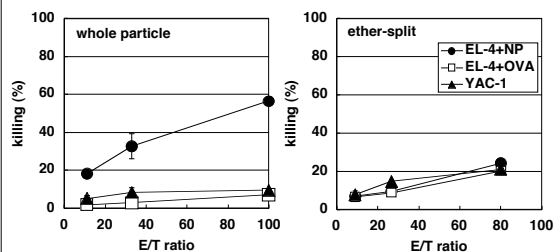
クロムリリース法

試験管内での標的細胞の破壊の測定

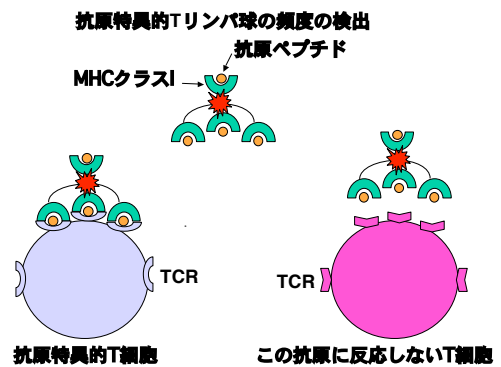


不活化ワクチン投与後のキラーT細胞反応

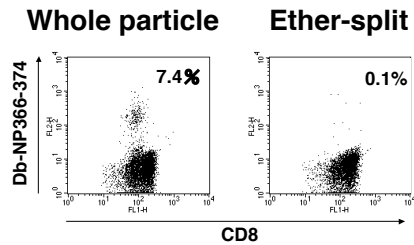
Chromium release assay



MHC-ペプチドテトラマー (マルチマー)



不活化ワクチン投与後の末梢血中の 抗原特異的CD8陽性細胞の割合



In vivo CTL assay

生体内での抗原特異的キラーT細胞反応の測定

利点

- ・フローサイトメーターで測定できる
(=アイソトープを用いない)
- ・培養が必要ない
- ・In vitroではなく、in vivoの反応

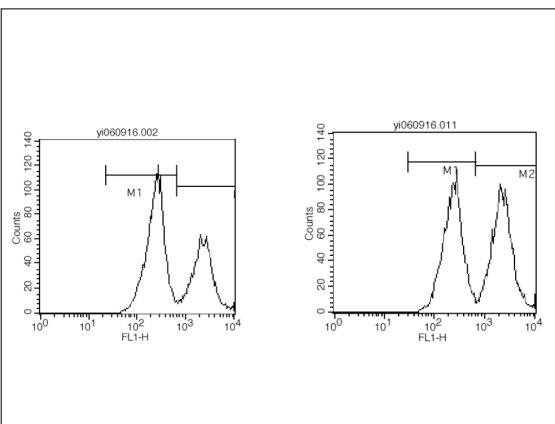
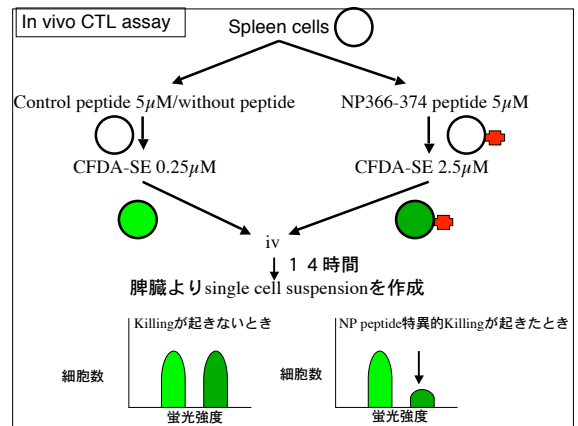
マウスをワクチンで免疫

ターゲット細胞を静脈に注射

同系マウス脾臓細胞
+インフルエンザウイルス抗原/対照抗原
+蛍光色素 (CFSE 濃/薄)

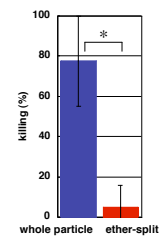
脾臓を摘出し、single cell suspensionを作製

フローサイトメーターで解析

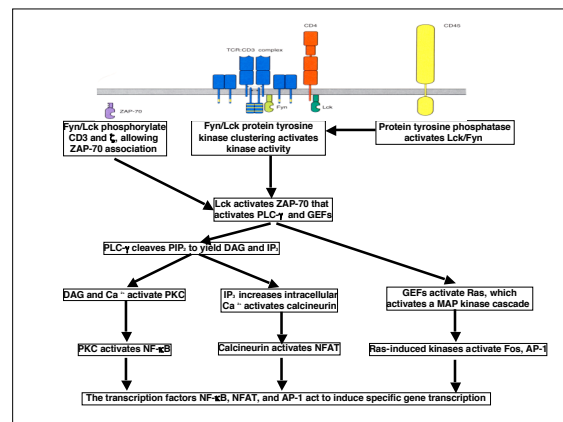


Protective immune responses induced by vaccines (H3N2)

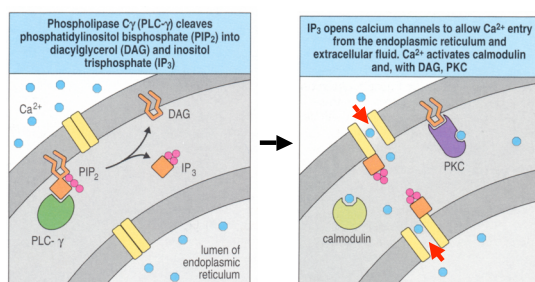
NP366-374-specific CTL responses



リンパ球活性化に伴う 細胞内カルシウムイオンの変化

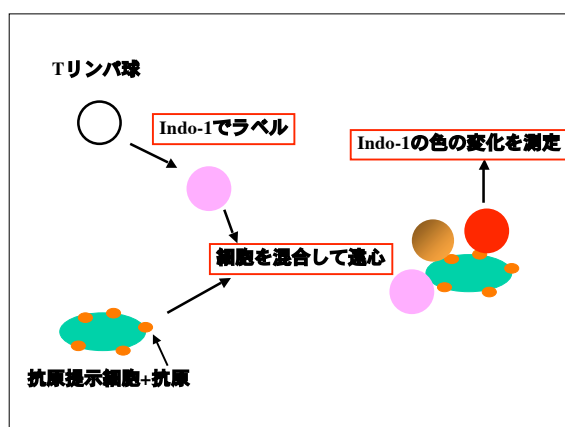


細胞活性化に伴うカルシウムイオンの移動

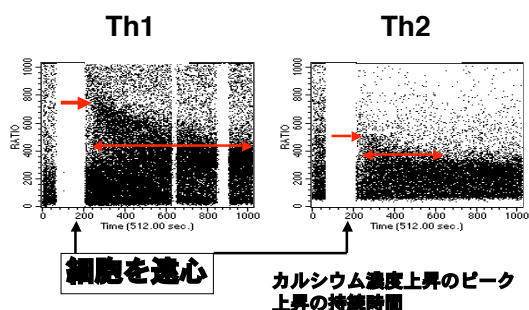


カルシウムイオンと結合する色素

Indo-1
Fura-2, 4

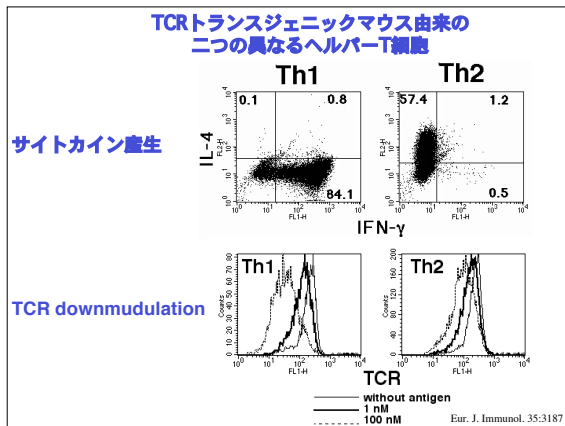
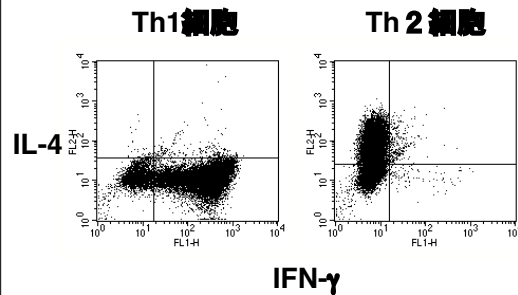


抗原認識に伴うカルシウムイオンの流入



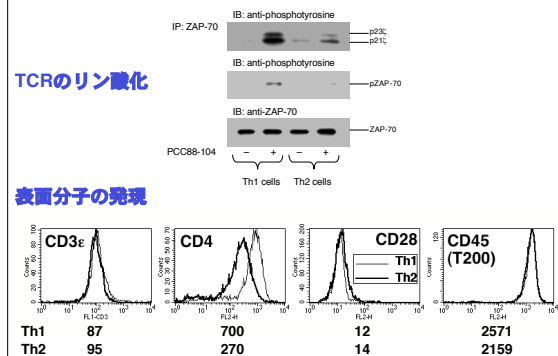
セルソーターを使用した実験例

TCRトランスジェニックマウス由来の 二つの異なるヘルパーT細胞

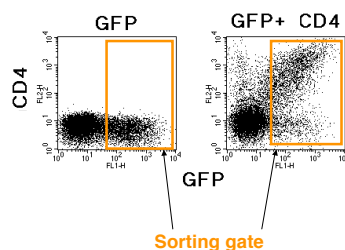


TCRのリン酸化

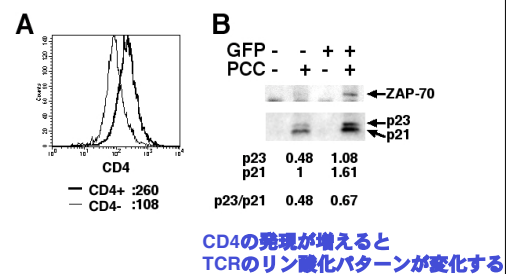
表面分子の発現



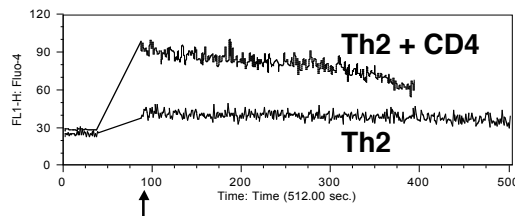
レトロウイルスベクターを用いてCD4分子の発現を増強させた 遺伝子が導入された細胞のみを選別して、分取した



CD4の発現が増強したことの確認



CD4の発現が増強するとカルシウムの反応も増強する



フローサイトメーターを用いてできること

1. 分子の発現の定量
細胞表面／細胞内部
細胞1個当たりの発現
2. リアルタイムのカルシウム反応の測定
3. 特定の細胞集団の選別
4. 細胞周期／分裂回数の測定
5. 生体内での細胞のトラッキング

タンパク質研究へのTyphoon活用法

磯野 高敬（実験実習支援センター）

実験実習支援センターのタンパク工学実験室に設置してあるバリアブルイメージャーTyphoon9200（GE ヘルスケアバイオサイエンス、図1）の活用法を、演者が行っているタンパク質研究での使用例を紹介しながら解説する。

図1



Typhoon は、Strage Phosphor・Chemiluminescence・Fluorescence の3つのモードでゲルやメンブラン等を測定できる装置である。

・Strage Phosphor モード

Strage Phosphor スクリーンを用いて、RIを検出する時に用います。

ノーザン解析やサザン解析に用いられます。演者は、このモードでは利用していませんが、X線フィルムより感度がよく、10～100分1の時間で検出できます。また、Typhoon 全体に使えるのですが、ダイナミックレンジが5桁も有り、定量するのに有効です。

・ Chemiluminescence モード

ECL などの化学発光を検出する時に用います。

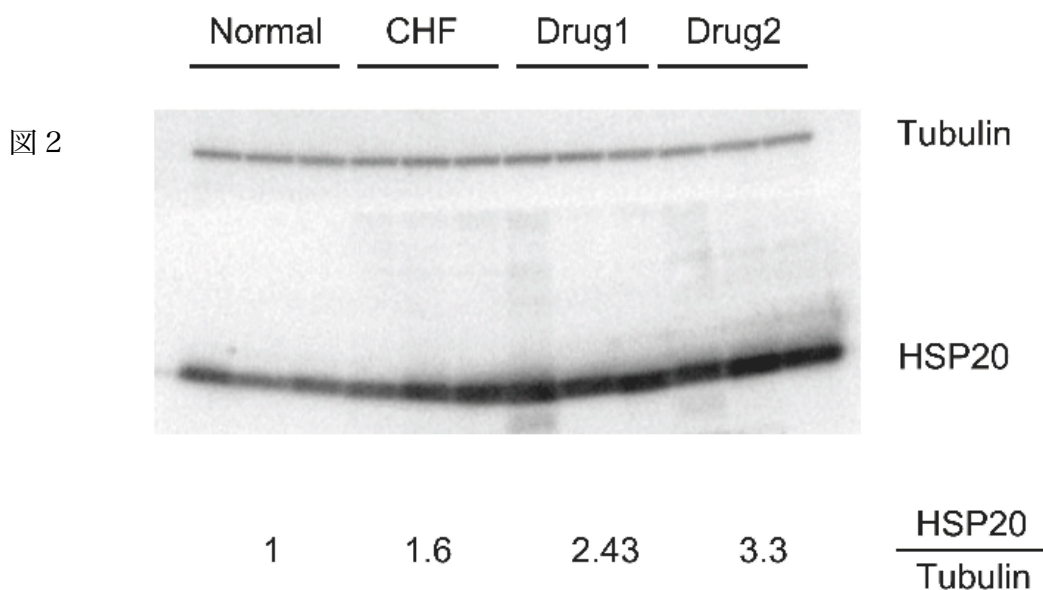
支援センターでは、化学発光を検出する専用の装置として ImageMaster-CL (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を設置しており、検出装置としてはこちらの方が優れていると思いますが、演者は、コンピューターの操作性と慣れで Typhoon を用いています。

演者は、Immunoblot 解析において、定性的解析には、ECL を用いて、支援センターの自動現像装置を用いて X 線フィルムに焼いていますが、定量的解析を行う時に、ECLplus で発光させ Typhoon を用いて測定しています。

<実施例 1>

われわれは、頻拍誘導性心不全イヌモデルを用いて、正常 (Normal) 左心室心筋と慢性心不全 (CHF) 左心室心筋とのプロテオーム解析により、慢性心不全心筋において HSP20 の発現が上昇することを見つけた (J. Cardiac Failure 2006)。今回、心不全治療薬 (Drug1, 2) により HSP20 の発現がどのように変化するかを調べた (図 2)。抗 HSP20 抗体と抗 Tubulin 抗体 (対照) を用いて Immunoblot した後、ECLplus で発光させ Typhoon を用いて測定した。このイメージを附属の定量ソフト ImageQuant で定量した。心不全治療薬群では、慢性心不全群より更に HSP20 の発現が上昇するという結果が得られた。

Immunoblot analysis of HSP20 in left ventricular muscle



・ Fluorescence モード

蛍光を検出する時に用います。用いる蛍光試薬により、励起レーザーとフィルターをメニューから選択して行います。Typhoon9200 は、532nm と 633nm のレーザーのみで、457nm と 488nm の短波長側のレーザーがないので、Cy3 や Cy5 などの長波長側の蛍光試薬は測定できますが、Cy2 などの短波長側の蛍光試薬は測定できません。

演者は、主に、二次元電気泳動および SDS ポリアクリアミド電気泳動のゲルの染色に蛍光試薬を用いたイメージ解析に Typhoon を使用している。イメージ解析だけであれば、Deep Purple (GE ヘルスケアバイオサイエンス) や Flamingo (Bio-Rad) などの蛍光試薬も用いているが、イメージ解析後、ゲルを切り出し、質量分析に用いる時は、高価ではあるが、SYPRO Ruby (Invitrogen) を用いている。演者の所有する Invitrogen 製のイルミネータ Safe Image が、SYPRO Ruby 用に作られていて、Typhoon とほぼ同等のイメージが得られて、興味あるスポットを切り取るのに好都合であるので、SYPRO Ruby を常用している。

<実施例 2>

最近、栄養およびストレスのセンサーとして、タンパク質の O-GlcNAc 修飾が注目されてきている。それゆえ、心負荷誘導され、かつ、心負荷により糖代謝が亢進すると考えられている心不全において、タンパク質の O-GlcNAc 修飾の関与が考えられる。抗 O-GlcNAc 抗体を用いた免疫沈降法により、不全心筋タンパク質の O-GlcNAc 修飾を調べた (図 3)。沈降したタンパク質を電気泳動したゲルを SYPRO Ruby で染色して Typhoon でイメージを取得した。Safe Image 上で、ゲルからバンドを切り出し、in gel digestion (付録のファイル参照) した後、支援センターの LC/MS/MS (LCQ : Thermo Fisher) でタンパク質の同定を行った。その結果、糖代謝やストレスに関連するタンパク質が不全心筋で O-GlcNAc 修飾の亢進を受けていることが示唆された。

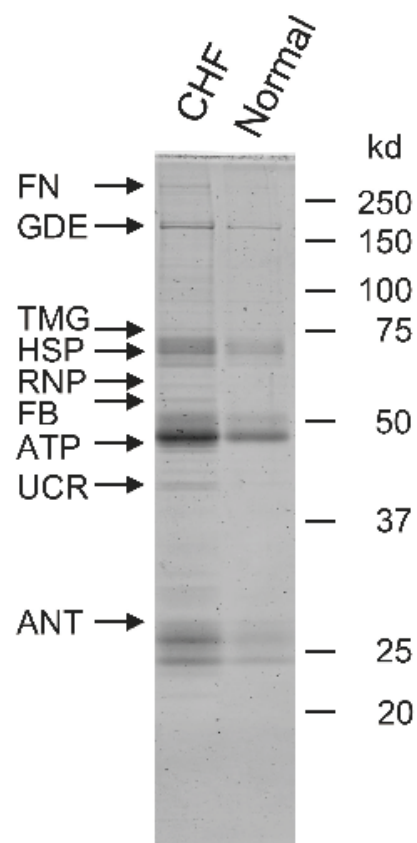


図 3

演者は、Fluorescence モードでこの他にも活用を試みている。Deep Purple は、転写した PVDF の染色にも使えるので、免疫沈降を行った時に、Immunoblot 解析の前に、転写されたタンパク質を検出するのに用いている。また、ECL Plex (GE ヘルスケアバイオサイエンス) は、Cy3 と Cy5 でラベルされた二種類の二次抗体を混合して、一度にリン酸化されたタンパク質 A と全タンパク質 A を染め分けて定量で切るシステムである。二次抗体が化学発光系より沢山いる欠点があるが、定量性はよさそうである。また、Cy3 と Cy5 にタンパク質を染め分ける方法として 2D DIGE 法などがあるが、それようなソフトが必要で、現状では使用できない。

本講義では、上記の説明の後、イメージの取得法や定量法を、実際に Typhoon を操作して説明を行う。

In Gel Digestion of Silver-stained Polyacrylamide Gel for MALDI/TOF-MS
(Gharahdaghi F, et al.,1999, Electrophoresis, partially modified)

2007-8-3 version By Takahiro Isono, Ph. D. (CRL, SUMS)

1. ゲルから目的のスポットを切り出し、200 μ L PCR チューブに入れる。
2. 30mM Potassium ferricyanide と 100mM Sodium thiosulfate を 1:1 に混合したものを 50 μ L 入れる。
3. 遮光して室温 10 分間振盪すると、ゲルが脱色され透明になる。液を捨てる。
4. DW を 50 μ L 加え洗浄、室温 3 分間振盪し液を捨てる。3 回繰り返す。
5. 200mM Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) を 50 μ L 加え、室温 20 分間振盪、液を捨てる。
6. 25 μ L の 50% acetonitrile in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
7. 室温 15 分間振盪し、液を捨てる。もう一度繰り返す。
8. 25 μ L の 10mM DTT (1.54mg/mL、R 保存) in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
9. 摂氏 56 度で 1 時間インキュベート。液は捨てる。
10. 25 μ L の 50mM iodoacetamide (10.2mg/mL、R 保存) in 100mM NH_4HCO_3 を加える。
11. 遮光して室温 40 分振盪、液を捨てる。
12. 25 μ L の 50% acetonitrile in 100mM NH_4HCO_3 を加え、室温 10 分間振盪し洗浄。
液は捨てる。2 回おこなう。
13. SpeedVac (Low) で 15 分間乾燥させる。この間にアイスバケツを用意。
14. 30 μ L の trypsin (0.01 μ g/ μ L) in 100mM NH_4HCO_3 液を加え、ゲルに再吸収させる。
氷上で 45 分置き、過剰の液を捨てる。
15. 30 μ L の 100mM NH_4HCO_3 を加える。パラフィルムを巻く。
16. 摂氏 37 度で一晩インキュベートする。
17. アイスバケツを用意し、氷上に 200 μ L の PCR チューブを準備し液を回収する。
18. 30 μ L の 50% acetonitrile 0.5% trifluoroacetic acid (TFA) を加え、室温 15 分振盪。
液は 17. で用意したチューブに回収する。2 回洗浄する。
19. 摂氏 -80 度の冷凍庫に 15 分間入れ、凍らせる。
20. SpeedVac (Low) で 1 時間以上完全に濃縮する。

TOF-MS

21. 80 μ L の 0.1% TFA を加える。
22. Zip chip (C18) をおこなう。方法は Zip chip の説明書参照。
23. 最後は 4 μ L の 50% acetonitrile 0.1% TFA に溶出する。
24. マトリックスと混じ TOF-MS に用いる。保存する場合は摂氏 -80 度の冷凍庫へ。

LC/MS/MS

- 30 μ L の 2% acetonitrile 0.1% TFA を加え振盪して溶出する。

(注) SYPRO Ruby 等の染色の場合は、5. から行う。

Typhoon システムの設定条件例

それぞれの蛍光試薬/検出方法/サンプル形状に応じて、最適なレーザー、フィルター、PMT ボルテージ（フォトマルの設定電圧）を選択してください。

PMT ボルテージは下記の値を参考として最適な電圧値を設定してください。

	Extation(nm)	Emission(nm)	PMT voltage
ECL plus	457	520BP40	400 to 600
Cy2	488	520BP40	400 to 600
Fluorescein	532	526SP	400 to 600
Vistra Green	532	526SP	400 to 600
SYBR Green I	532	526SP	400 to 600
Ethidium Bromide	532	610BP30	400 to 600
SYBR Gold	532	526SP	400 to 600
Fluorescence5' Oligolabelling kit	532	526SP	400 to 700
Pico Green	532	526SP	400 to 600
ECFRandomPrime Labelling and Signal Amplification Kit	488/532	555BP20/560LP	400 to 600
ECFSubstrate (AttoPhos)	488/532	555BP20/560LP	400 to 600
HEX	532	555BP30	400 to 600
Cy3	532	580BP30	400 to 600
SYPRO Orange	532	580BP30	400 to 600
SYPRO Red	532	610BP30	400 to 600
SYPRO Ruby	532	610BP30	400 to 600
Cy5	633	670BP30	400 to 600
DDAO Phosphate	633	670BP30	400 to 600

蛍光フィルターリスト

フィルター	カットオフポイント	使用蛍光試薬例
390BP100	340nm-440nm	Phosphor
520BP40	500nm-540nm	Cy2, BlueFAM, ECL plus
526SP	<526nm	Fluorescein, VistraGreen, ECF, FAM, PicoGreen
555BP20	545nm-565nm	HEX, R6G, TET, AlexaFluor546
560LP	>560nm	TRITC
580BP30	565nm-595nm	Cy3, TAMRA, HEX, SYPRO Orange
610BP30	595nm-625nm	EtBr, ROX, SYPRO Ruby/Red,
670DF30	655nm-685nm	Cy5

タンパク質研究への Typhoon活用法

滋賀医科大学
実験実習支援センター
磯野高敬

本講演での「**タンパク質研究**」とは

ゲノムサイエンス
に基づいた「タンパク質研究」

プロテオミクス研究
疾患プロテオミクス

ゲノムサイエンス

ゲノムからの一連の遺伝情報の流れに従い
生物の仕組みを総合的に研究する学術領域

遺伝情報の流れ

セントラルドグマ

DNA → mRNA → タンパク質
(→生物の体と機能)

ヒトゲノム計画

ポストシーケンス研究

静的研究から動的研究へ



プロテオームproteome

生物または細胞、臓器等が、
ある状態で発現している全てのタンパク質のセット

翻訳後の修飾を受けてどのような分子形をとった
タンパク質が発現しているかを調べられる
切断、糖鎖の付加、リン酸化 等

遺伝子が最終的にどのようなタンパク質を発現させて
生命現象をおこしているかが解る

プロテオミクス

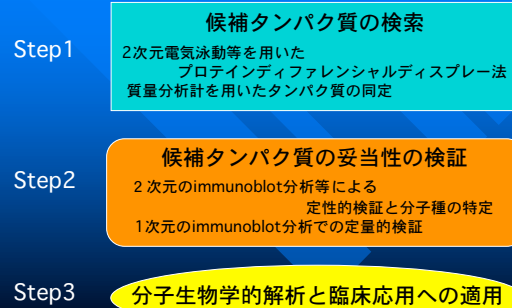
プロテオームを解析する手法

質量分析計を用いて
広く一群のタンパク質集団を
網羅的系統的に解析する方法

プロテオミクスは、 従来のプロテインケミストリーと どう違うのか

ゲノム情報を用いて同定：ヒトが有効
従来より少量の試料が扱える：臨床試料もOK
あまり精製をしない：電気泳動的分離
網羅的、系統的に解析
：多数のタンパク質を扱う
タンパク質の機能の保持はしない
：機能解析は遺伝子発現実験で行う

プロテオミクスの戦略



PSA	Clinical Chemistry 2002 (with Urology)
Bladder Cancer	Clinical Chemistry 2004 (with Urology) Cancer Science 2004 (with Urology) Proteomics Clin Appl 2007 (with Urology)
Heart failure	J Card Fail 2006 (with Card & Resp)
Drs	Oncogene 2004 (with Microbiology)

背景

心不全とは、種々の病因により心機能が低下し、末梢組織の酸素需要に必要なとされる血液を駆出できなくなった状態であり、心疾患の終末像であると定義されている。近年、心不全は単なるポンプ失調だけでなく、心室の拡大や心筋の変性による形態変化(リモデリング)を伴った進行性の病態であると認識されるようになってきた。(ACC/AHA guidelines 2005)

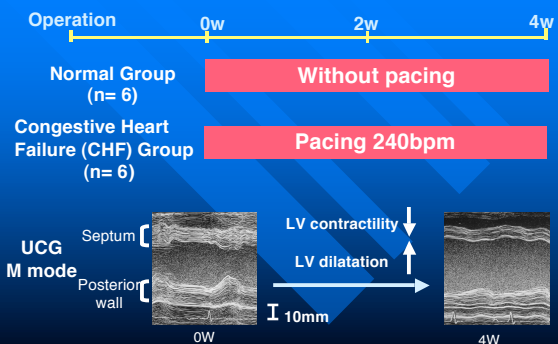
心不全の病態形成の原因は多因子であり、単一遺伝子や分子で形成されることはないため、不全心での多数のタンパク質発現の変化を系統的に解析することがその病態解明において重要である。

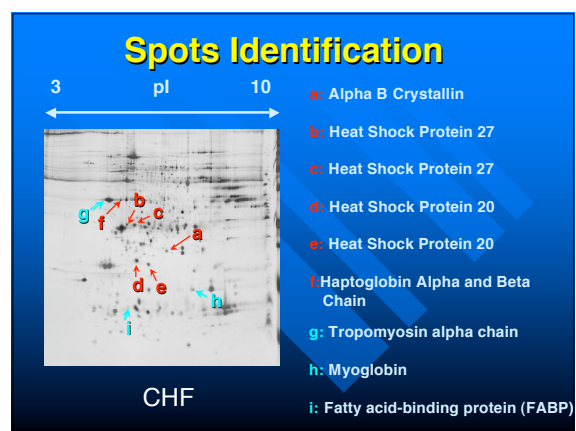
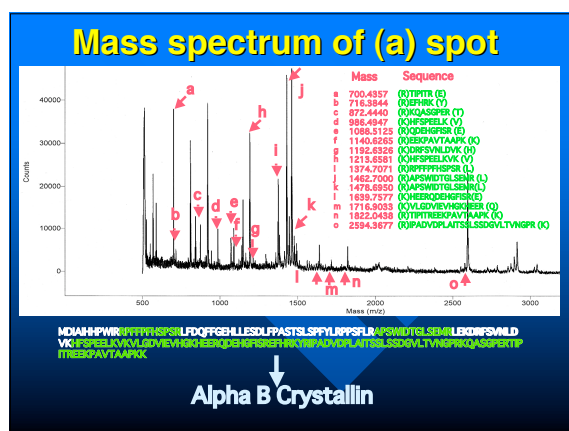
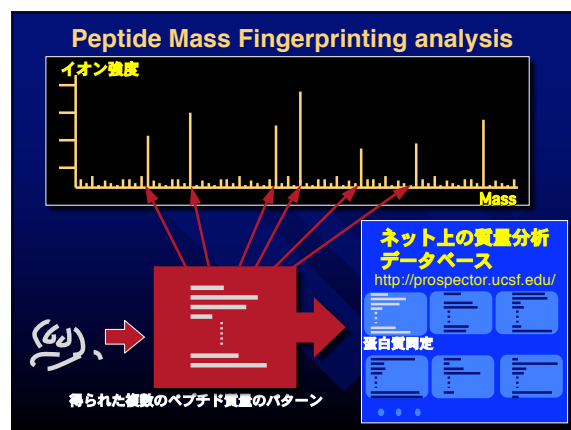
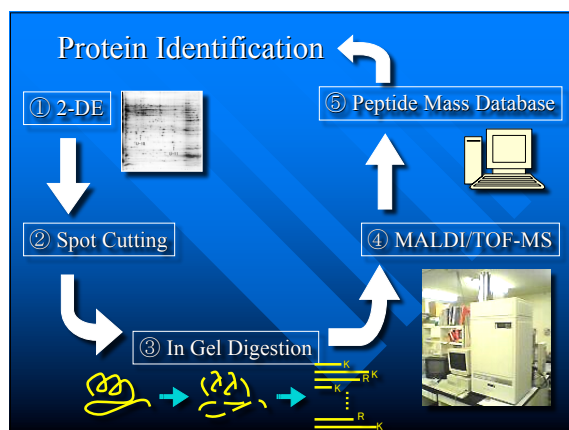
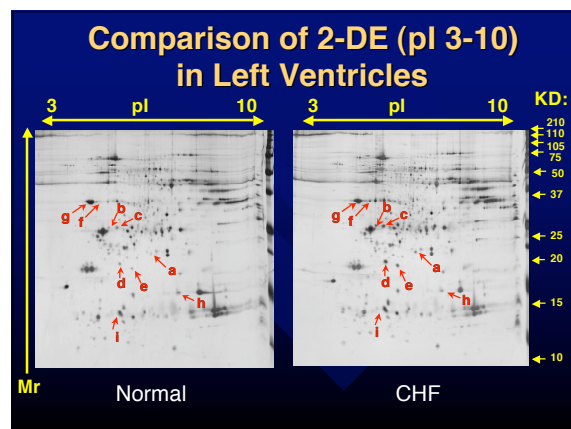
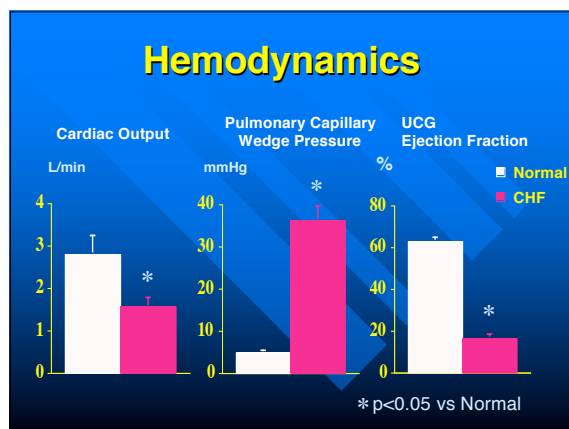
目的

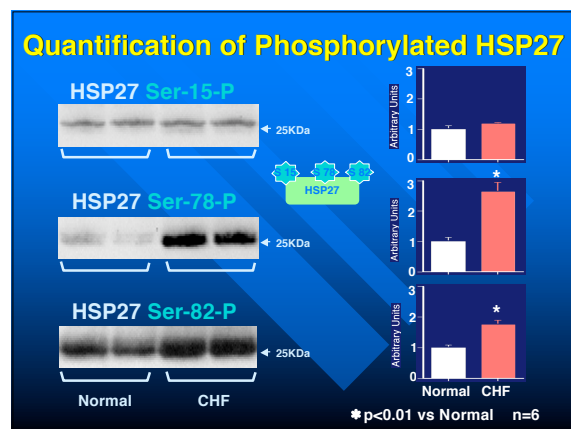
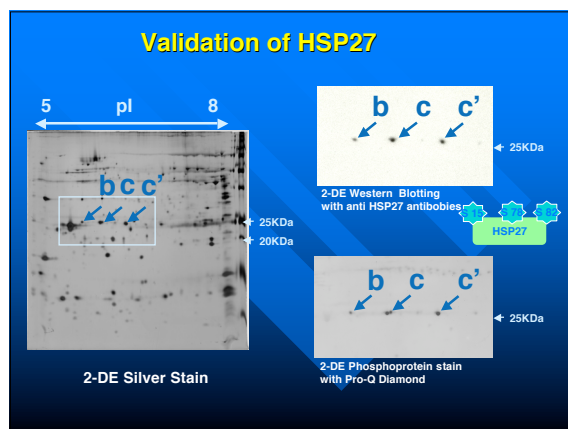
心不全の病態解明において、プロテオーム解析が有効と考え、頻拍誘発性心不全イヌモデルを用いて、正常心筋、高頻度ペーシング処理して誘導した不全心筋について二次元電気泳動法 (2-DE) を行った。

心不全に特異的なタンパク質変化の検索と解析を行い、これらのタンパク質の心不全の病態との関わりを明らかにする。

Protocol

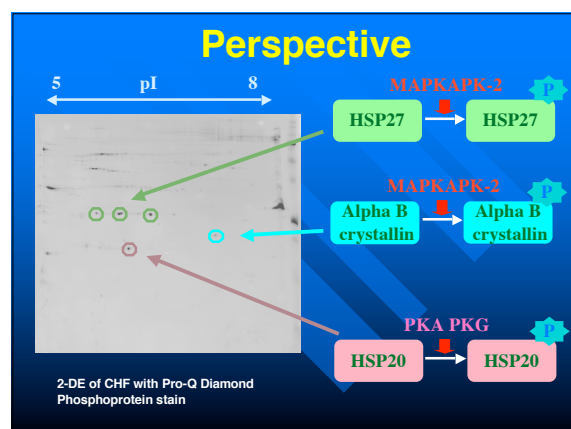
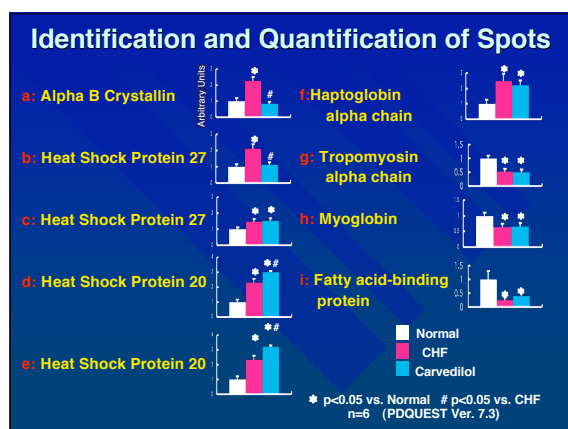
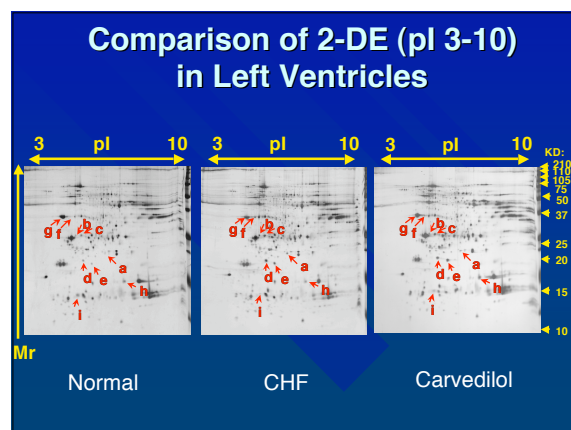






Conclusions

プロテオーム解析は心不全病態の分子機構を明らかにする新しい手法であり、我々が見いだしたsmall HSPとそのリン酸化は心不全の診断や治療の新たなターゲットとなり得る可能性が示唆された。



プロテオミクスの戦略への Typhoonの活用法

バリアブルイメージアナライザーTyphoon9200



Typhoonは、

- ・ Strage Phosphor
- ・ Chemiluminescence
- ・ Fluorescence

の3つのモードで

ゲルやメンブラン等を測定できる装置である。

・ Strage Phosphorモード

Strage Phosphorスクリーンを用いて α を検出

ノーザン解析やサザン解析に用いられる

X線フィルムより高感度

10～100分1の時間で検出できます。

ダイナミックレンジが広い(5桁)：定量に有効
(全てのモードで有効)

・ Chemiluminescenceモード

ECLなどの化学発光を検出する時に用いる

化学発光を検出する専用の装置
ImageMaster-CL

演者がTyphoonを用いる理由
コンピューターの操作性と慣れ

Immunoblot解析において、
定性的解析には、ECLを用いて、
自動現像装置を用いてX線フィルム
定量的解析には、ECLplusを用いて、
Typhoonを用いて測定

・ Fluorescenceモード

蛍光を検出する時に用います。

用いる蛍光試薬により、
励起レーザーとフィルターをメニューから選択

Typhoon9200は、532nmと633nmのレーザーのみで、
457nmと488nmの短波長側のレーザーがない

Cy3やCy5などの長波長側の蛍光試薬は測定できますが、
Cy2などの短波長側の蛍光試薬は測定できません。

二次元電気泳動およびSDSポリアクリアミド電気泳動のゲルの染色に蛍光試薬を用いたイメージ解析にTyphoonを使用している

イメージ解析用蛍光試薬

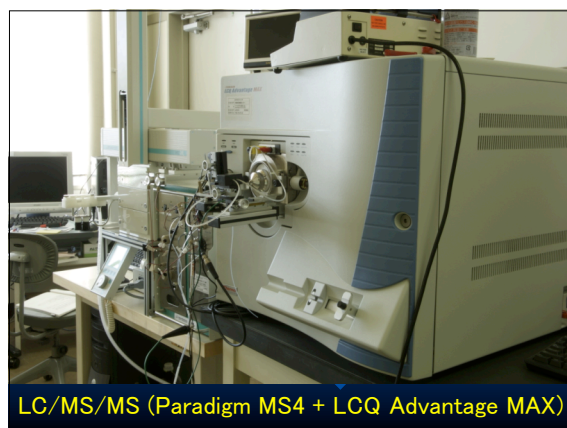
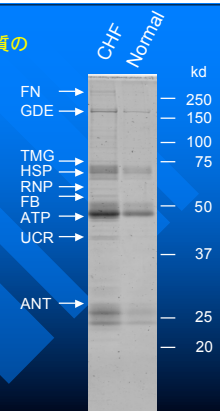
Deep Purple (GEヘルスケアバイオサイエンス)
Flamingo (Bio-Rad)
SYPRO Ruby (Invitrogen)

イメージ解析後、ゲルを切り出し、質量分析に用いる時は、高価ではあるが、SYPRO Ruby (Invitrogen) を使用

不全心筋のO-GlcNAc修飾タンパク質のSYPRO Ruby染色イメージ

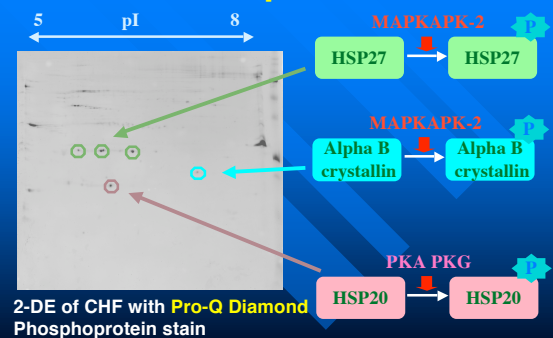
抗O-GlcNAc抗体を用いた免疫沈降成分

in gel digestion後、LC/MS/MSでタンパク質の同定



LC/MS/MS (Paradigm MS4 + LCQ Advantage MAX)

Perspective



Immunoblot analysis of HSP20 in left ventricular muscle

