

二次元電気泳動法を用いた表層タンパク質分離技術の開発

加工技術グループ バイオチーム 和田 潤, 泊 直宏, 高阪 千尋, 廣岡 青央, 山本 佳宏

要 旨

近年、生物系の研究では網羅的解析が盛んに行われている。なかでもプロテオーム解析は対象とするタンパク質が生命の機能を直接的に担うため重要である。一方で細胞表層タンパク質の網羅的解析は、細胞の未知な表現型や現象の原因因子が本画分に多く存在するにも関わらず、正確な分画が困難であるためあまり行われていない。そこで、本研究では、菌体表層を試薬であらかじめ標識することによって表層タンパク質を特異的に抽出し、研究所保有技術の二次元電気泳動法と、融合することによる細胞表層タンパク質の網羅的解析技術の開発を試みた。その結果、微生物由来サンプルで良好にタンパク質を抽出及び精製し、二次元電気泳動法による再現性の高い分離結果を得た。

1. はじめに

近年、測定機器や情報機器の進歩によって生物の保有する全遺伝子情報を抽出し、データベース化することが可能になった。生命現象を理解するため、ゲノムプロジェクトの名のもとに多くの生物のゲノムが解読された。最近ではゲノムに引き続きトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなど遺伝子レベルだけではなく転写レベル、タンパク質レベル、代謝物レベルでの網羅的解析が盛んに行われている。なかでも、タンパク質は生命現象に関する多くの機能を直接的に担っているため、細胞のタンパク質を網羅的に研究するプロテオーム解析¹⁾は、非常に重要となっている。昨今、タンパク質は質量分析技術の進歩により、分子量の測定や解析の自動化によるハイスループット化が進んでいるが、明瞭な解析結果を取得するためには、タンパク質サンプルの安定した分離技術が必要になる。長年、タンパク質の分離手段としては、簡便ながら分離能が高い電気泳動法が有効な手段として用いられており、プロテオーム解析には、等電点の違いと分子量サイズの違いで分離する二次元電気泳動法²⁾が用いられてきた。

研究所では、二次元電気泳動法の技術や試薬キットの開発を行い、これまでに酵母や細菌といった微生物を試料として、安定してタンパク質を抽出して再現性の高い分離結果が得られることを報告している^{3) - 5)}。しかしながら、二次元電気泳動法は、タンパク質のサンプル調製に変性剤を用いるためにタンパク質の大部分は失活する。したがって、本法はタンパク質の機能とは直接的に結びつかないので、機能を論じるためには泳動サンプルとしてあらかじめ機能、もしくは表現型に結びつく画分

を抽出してくる必要がある。

一方、細胞は様々な環境の変化に絶えずさらされており、生命を保持するためや、より有利に生息するために順応をしており、多くの場合は、現象あるいは細胞の表現型として観察できる。また、これらの表現型の多くはガン細胞のプロテアーゼや、病原性細菌の感染因子のように細胞表層に存在するタンパク質に起因すると考えられる⁶⁾。これらを調べるためには、細胞表層タンパク質だけを抽出してくる必要がある。しかし、細胞表層タンパク質の抽出法や網羅的解析法は確立されていないため、現象だけが既知で原因因子が特定されず、メカニズムが明らかにされていないものも多い。長年、細胞分画法には、処理できるタンパク質量の多さや操作の簡便性から遠心分離による方法が用いられてきた。しかし、遠心分離法は、異なった画分同士が連続して接しているため、目的画分への他画分の混入が絶えず危惧される。そこで、本研究では、これらの問題を払拭するために、細胞分画の前に細胞表層をあらかじめビオチンラベル化試薬によって標識する。本試薬は細胞内に取り込まれずに細胞表層だけを標識することができるので、細胞を破碎後にビオチンに特異的なアビジンタンパク質を用いることによって、細胞表層タンパク質だけを特異的に回収することができる。即ち、本研究では、細胞表層タンパク質の網羅的解析技術の開発を目指して、細胞表層タンパク質の抽出法と研究所保有の技術である二次元電気泳動法の融合を図った(図1)。

本研究では、当チームにおいて研究対象にしている微生物(大腸菌、乳酸菌及び酵母)を用いて安定した表層タンパク質抽出と、再現性の高い分離結果が得られるか

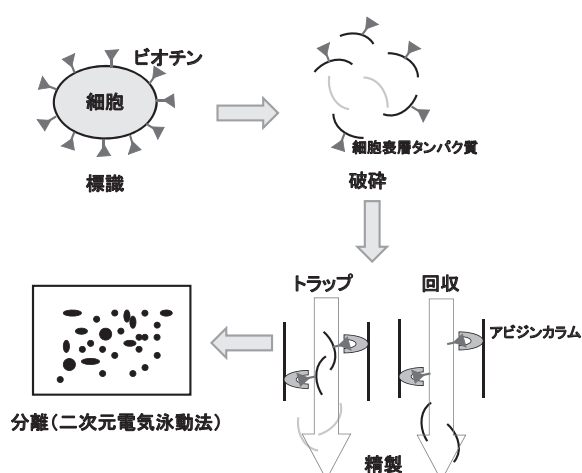


図1 細胞表面タンパク質画分の抽出、精製及び電気泳動の一連の実験操作

菌体をバイオチン試薬で標識した後に破碎して、タンパク質を抽出した。アビジンカラムを用いて標識されたタンパク質だけを特異的に溶出して細胞表面タンパク質画分とした。本画分を二次元電気泳動法に投じてタンパク質を分離した。

検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 菌体の培養方法

大腸菌の培養はLB培地(1.0%トリプトン, 0.5%酵母エキス, 1.0%塩化ナトリウム)を用いて37℃で一晩振とう培養を行った。乳酸菌の培養はMRS培地(DIFCO)を用いて37℃で一晩静置培養を行った。酵母の培養はYPD培地(2.0%ペプトン, 1.0%酵母エキス, 2.0%グルコース)を用いて30℃で3日静置培養を行った。培養した菌体は遠心分離機で遠沈管に集菌し、PBS(0.15M塩化ナトリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2))を用いて洗浄を行った。

2.2 表面タンパク質の標識、抽出及び精製

菌体表面タンパク質のバイオチン標識はCell Surface Protein Isolation Kit(Thermo SCIENTIFIC)のバイオチン標識試薬を本キットの取扱説明書に従って用いた。標識後のタンパク質の抽出には大腸菌はB-PER(Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo SCIENTIFIC)とY-PER(Yeast Protein Extraction Reagent, Thermo SCIENTIFIC)を用いて菌体破碎の検討を行い、酵母はB-PER, Y-PERとY-PERで菌体を懸濁した後にガラスビーズを添加してビードビーターを用いる物理的破碎法で菌体破碎の検討を行った。乳酸菌はB-PER, Y-PER,

BugBuster(BugBuster Protein Extraction Reagent, MERCK MILLIPORE)とY-PERで菌体を懸濁した後にガラスビーズを添加してビードビーターを用いる物理的破碎法で菌体破碎の検討を行った。破碎具合の確認はブラッドフォード法(プロテインアッセイCBB溶液(ナカライテスク))を用いて良好にタンパク質の抽出が行われたかを確認した。アビジンタンパク質との特異性を利用した表面タンパク質の精製には二次元電気泳動法の一次元目の緩衝液(二次元電気泳動用タンパク質抽出キット(日本エイドー)の溶解液)に還元剤を添加したものを溶出液とし、Cell Surface Protein Isolation Kitのアビジンカラムを本キットの取扱説明書に従って用いて溶出されたものを細胞表面タンパク質画分とした。また、本溶出液に二次元電気泳動用タンパク質抽出キットの抽出助剤(キット中のエクストラクトC液)を加えたものを二次元電気泳動用の試料とした。

2.3 二次元電気泳動

2.3.1 等電点電気泳動(一次元目)

等電点電気泳動試薬セット(ナカライテスク)に準拠した試作キットとガラスチューブを用いて等電点ゲルを作製した。試料溶液を等電点ゲルに添加し、その上にサンプルキャッピング溶液20μlを重層した。等電点電気泳動の通電条件は200V 1時間, 400V 16時間, 800V 1時間とした。

2.3.2 等電点ゲルの洗浄

泳動が終了した等電点ゲルは、シリンジを用いてイオン交換水でガラスチューブより押し出し、イオン交換水で洗浄後、二次元電気泳動ゲル処理試薬セット(ナカライテスク)を用いて洗浄及びバッファー置換を行った。

2.3.3 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(二次元目)

SDSポリアクリルアミドゲルは、SDS電気泳動試薬セット(ナカライテスク)に準拠した試作キットを用いて作製した。分離ゲル濃度は17%となるように調製し、ゲル化されていることを確認後、二次元電気泳動ゲル処理試薬セットで平衡化された等電点ゲルをSDSポリアクリルアミドゲルに固定し電気泳動を行った。通電条件はゲル1枚あたり40mAとした。

2.4 タンパク質スポットの検出

電気泳動後の SDS ポリアクリルアミドゲルは、CBB Stain One (ナカライテスク) を用いて染色を行った。染色液を捨ててイオン交換水により洗浄・脱色してタンパク質のスポットを検出した。タンパク質のスポットが検出されたゲルをデジタルカメラでの撮影もしくは、レーザー蛍光スキャナー FLA-5100 (富士フィルム) で読み取り二次元電気泳動画像とした。

2.5 タンパク質スポットの定量

タンパク質スポットの定量解析には画像解析ソフトウェア Multi Gauge Ver. 3.0 (富士フィルム) を用いてスポット強度 (Intensity) を数値化して定量を行った。

3. 結果と考察

3.1 サンプル調製及び電気泳動結果

市販されている菌体破砕液を用いて菌体の破砕を検討した。大腸菌は B-PER もしくは Y-PER を用いて菌体破砕を行ったところ、ブラッドフォード法を用いて良好にタンパク質の抽出が行われたことが確認できた。酵母は B-PER もしくは Y-PER を用いて菌体破砕を試みたところ、Y-PER を用いた方法で良好なタンパク質の抽出が確認できた。一方、乳酸菌は B-PER、Y-PER や BugBuster では高濃度のタンパク質の抽出ができなかった。そこで、破砕液 Y-PER で乳酸菌を懸濁した後に、ガラスビーズを添加してビードビーターを用いて物理的に破砕を行ったところ、タンパク質の抽出が確認できた。酵母においても Y-PER とガラスビーズを用いた物理的

破砕法の併用によって、良好なタンパク質の抽出が確認できた (表 1)。Cell Surface Protein Isolation Kit を用いて標識及び精製を行った試料を、タンパク質抽出キットの抽出助剤を用いた処理を行った後に二次元電気泳動に投じたところ、大腸菌、乳酸菌及び酵母由来サンプルにおいて良好な分離スポットが得られた (図 2)。実験データは示さないが、ビオチン標識を行わなかった大腸菌を用いてアビジンカラムを用いた精製工程を、同様に行ったものを対照実験として二次元電気泳動法で分離した結果、ほとんどスポットは確認されなかった。

これらのことから、各サンプルそれぞれにおいて良好にタンパク質の抽出及び精製が行われたことが示唆された。破砕方法としては破砕液のみで破砕が可能なサンプルに関しては、操作工程を簡略化する意図で破砕液のみでサンプル調製を行い (大腸菌と酵母)、ガラスビーズを用いた物理的破砕を併用しないと良好なタンパク質の抽出が得られないサンプル (乳酸菌) は、破砕液と物理

表 1 菌体破砕方法の検討

	破砕方法			
	B-PER	BugBuster	Y-PER	Y-PER+物理的破砕
大腸菌	+	untested	+	untested
菌体 乳酸菌	-	-	-	+
酵母	±	untested	+	+

+, 菌体が破砕されて良好なタンパク質の抽出が確認されたもの。
-, 菌体が破砕されて良好なタンパク質の抽出が確認されなかったもの。

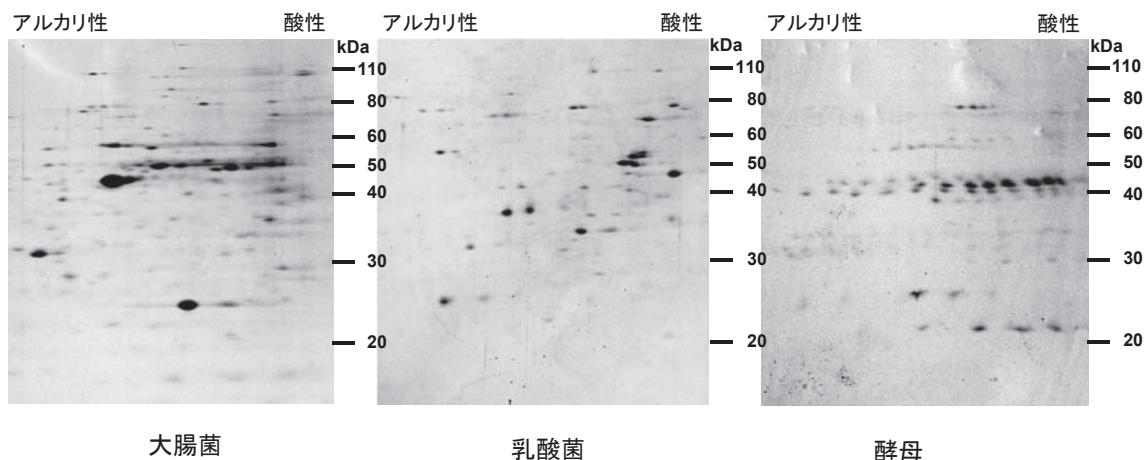


図 2 微生物由来表層タンパク質画分の二次元電気泳動

大腸菌、乳酸菌、酵母由来の表層タンパク質画分をそれぞれ二次元電気泳動法に投じ、ゲルを染色してタンパク質の抽出状態や分離状態を確認した。

的破碎を併用することとした。

3.2 再現性の検証

まとめて培養した菌体を均等に分けたそれぞれをサンプルとし、その後の一連の操作(図1)をそれぞれ独立して行い、それぞれの結果を比較して再現性を評価することとした。試験には大腸菌を用いて菌体の標識、菌体の破碎、表層タンパク質の精製及び前処理、一次元目の電気泳動(等電点電気泳動)、二次元目の電気泳動(SDS-PAGE)、ゲルの染色を独立して行い、タンパク質のスポットが検出されたゲルを複数枚得た(図3)。目視でそれぞれのゲル間で得られたタンパク質スポットのパターンが良く似ていることが確認できた。さらに、3枚のゲルを用いてそれぞれのゲルの特定の領域でスポットと認識できる60スポットについて画像解析ソフトウェアでスポット強度を算出し、2枚のゲルの対応するスポット間で比較した(図4(1))。次に、3枚のゲルのう

ち2枚ずつを用いて対応するスポット間で相関係数をそれぞれ求めたところ、相関係数の平均値は0.99であった。また、3枚のゲルの対応するスポット間ではCV値5%未満に25.0%の、CV値5%以上10%未満に28.3%の、CV値10%以上15%未満に25.0%の、CV値15%以上20%未満に18.3%の、CV値20%以上25%未満に3.3%の、CV値25%以上30%未満に0%のスポットがそれぞれ適合し、95%以上のスポットがCV値20%以下となった。全スポットはCV値25%以下だった(図4(2))。

網羅的に比較解析を行う上で再現性は非常に重要である。これらのことから表層タンパク質画分の抽出から二次元電気泳動法でのタンパク質分離までの一連の工程が非常に安定しており、サンプルが対照実験サンプルを有する場合において、各群複数枚のゲルを作製して比較をすることにより有意性を十分に検証できることが示唆された。

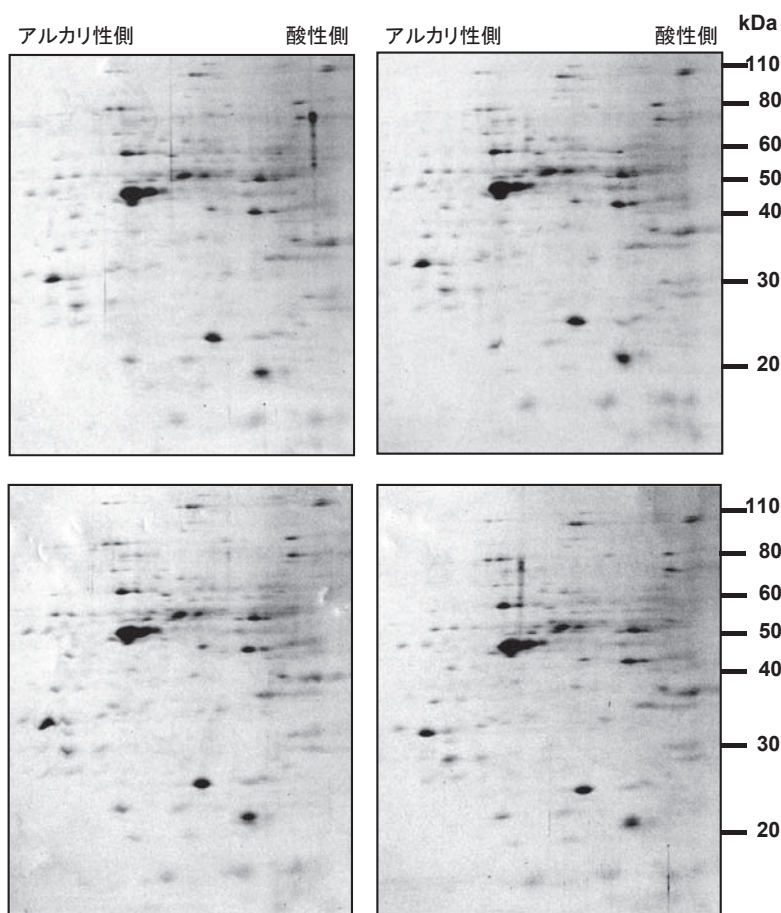


図3 大腸菌サンプルの二次元電気泳動法によるタンパク質の分離パターン
四枚のゲルはビオチン標識、タンパク質の精製、電気泳動、タンパク質スポットの検出(ゲル染色)などの一連の実験操作をそれぞれ独立して同様に行った。

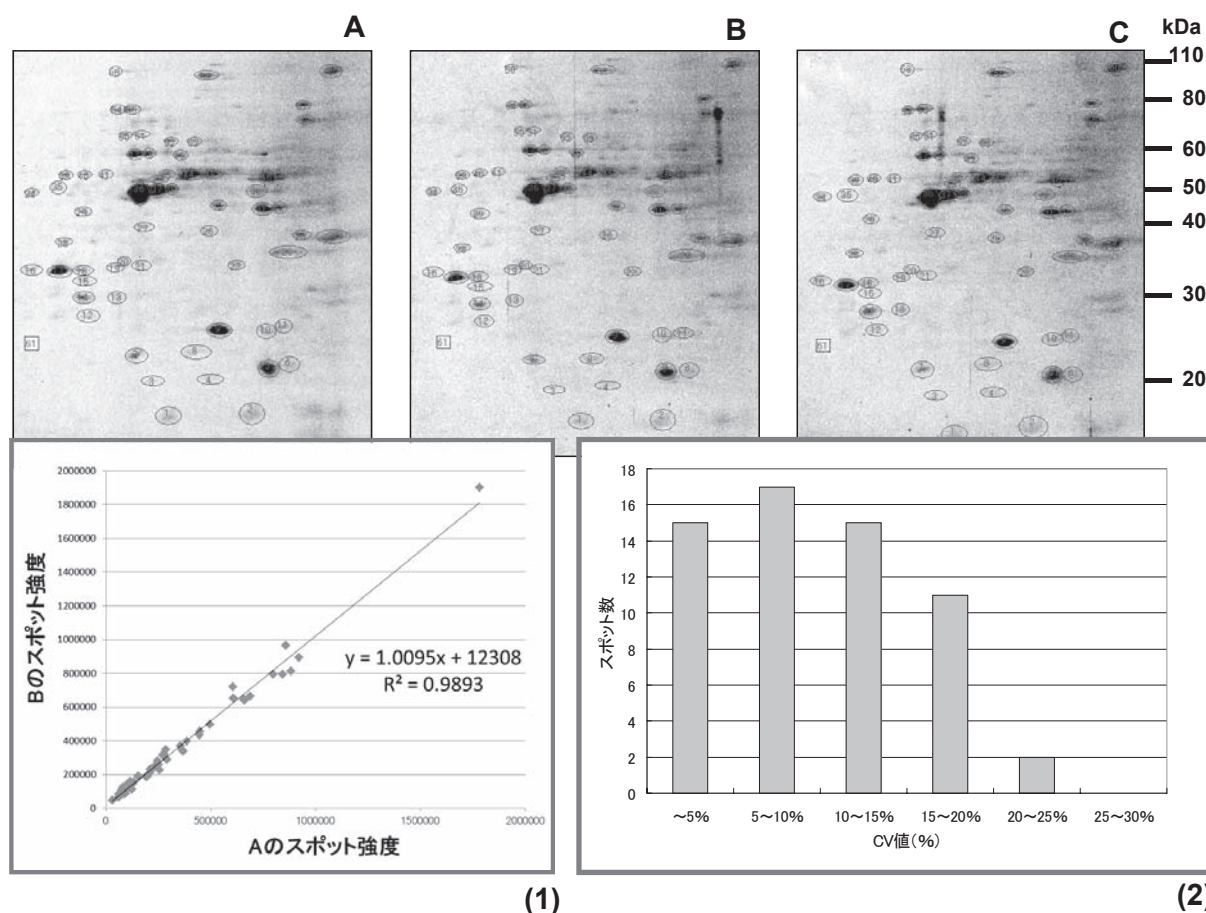


図4 タンパク質スポット定量値の相関係数とCV値分布

画像解析ソフトウェアを用いてゲル間で対応するタンパク質スポットを数値化した。(1) AとBのゲルの対応するタンパク質スポットの数値間での相関係数を算出した。(2) A, B, C3枚のゲル間でのCV値を計算し、分布を調べた。

4. まとめ

微生物のモデル実験として、菌体表層が異なったもので試験することを意図してグラム陰性細菌の大腸菌、グラム陽性細菌の乳酸菌、真核微生物の酵母を用いて本研究を行った。これらの菌体の表層のビオチン標識、菌体破碎及びタンパク質抽出、アビジンカラムを用いた細胞表層タンパク質画分の特異的精製、二次元電気泳動法によるタンパク質の分離といった一連の操作を行ったところ、どの菌株由来のサンプルからも良好な二次元電気泳動結果を得ることができた。研究目的である、あらかじめ菌体表層をビオチン標識して特異的に精製する細胞表層タンパク質の抽出法と、タンパク質の二次元電気泳動法を融合させることができた。一方で、細菌の中でもグラム陽性であるか、陰性であるか、もしくは真核微生物であるかによって、タンパク質の抽出条件は異なった。異なる属種の生物を対象とする時には、あらかじめタン

パク質の抽出条件を検討する必要があると思われる。また、二次元電気泳動法を用いたタンパク質の分離技術は研究所保有の技術であり、本研究においても良好な分離が観察されたが、表層タンパク質の純度や従来からの遠心分離法による分画との比較は行えていない。近年、微生物においては細胞質に局在すると考えられていたタンパク質が、細胞表層においても局在することを示唆する報告もあるので、このあたりの議論は難しいが、今後既知の細胞表層タンパク質を用いるなどして詳細な検討をする必要がある。

しかしながら、酵母のような真核微生物や乳酸菌のような細胞壁の堅い生物でも、アビジンカラムの活性を損なわない条件でタンパク質を抽出できた。今回は検討できなかったが、中にはより高等生物の細胞がサンプルの対象となることもある。例えば、動物細胞の場合は細胞壁を有する酵母などと比較すると容易にタンパク質を溶

出できる可能性も高い。したがって本技術はさらに詳細に検討する必要はあるが、今後幅広い生物種を対象にすることが可能である。

生命の仕組みを紐解くために盛んに網羅的解析が行われ、なかでもポストゲノムとして実際に生命の機能を担うタンパク質を対象としたプロテオミクスは強く興味をもたれ、多くの研究が行われている。しかし、対象画分が細胞表層タンパク質となると、簡便にかつ同時に多数のタンパク質を定量分析できる解析技術は、確立されていないのが現状である。細胞表層タンパク質の動向は細胞の多くの表現型や現象に直接的に影響するので、本画分の網羅的解析技術の重要性は高く、今後更なる詳細な検討の上、本技術を発展させて確立する必要がある。

参考文献

- 1) 平野久:”プロテオーム解析”, 東京化学同人 (2001)
- 2) O' Farrell PH.: J. Biol. Chem., **250**, 4007 (1975)
- 3) 山本佳宏, 廣岡青央, 高阪千尋, 泊直宏, 筒井延男: 京都市産業技術研究所工業技術センター研究報告, No. 35, p. 39 (2007).
- 4) 和田潤, 泊直宏, 高阪千尋, 廣岡青央, 山本佳宏: 京都市産業技術研究所研究報告, No.1, p. 83 (2011)
- 5) 和田潤, 泊直宏, 高阪千尋, 廣岡青央, 山本佳宏: 京都市産業技術研究所研究報告, No.3, p. 33 (2013)
- 6) H. Connell, W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Mårild, C. Svanborg: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 9827 (1996)