

微生物細胞表層タンパク質の簡便な分離手法の開発

バイオ系チーム 泊 直宏, 和田 潤, 廣岡 青央,
山本 佳宏

要 旨

細胞膜は生物の細胞を取り囲んでいる膜で、細胞内部と外部環境とを隔てている。その構成要素は脂質やタンパク質であり、膜タンパク質はその脂質の中に埋め込まれるように存在している。そのため、脂質と結合した膜タンパク質を抽出・回収し分析することは容易ではない。今回、界面活性剤が一定濃度・温度を超えるとミセル化することにより水相と分離する現象を利用し、大腸菌の膜タンパク質について脂質と共にミセル相に回収した。

回収したサンプルについては二次元電気泳動法にて分離した。分離したタンパク質スポットについてMALDI-TOF/MS(SHIMADZU AXIMA Performance)により分析した結果、膜に存在するタンパク質であることが確認でき、本手法により簡便に膜タンパク質が回収可能であることが示された。

1. はじめに

細胞膜は細胞が外部環境と接する細胞表層の組織であり、細胞の外部と内部を物理的に隔てている。しかし、その役割は単に細胞の外部と内部を隔てるためのものだけではなく、分子の取り込みや不要物の細胞外への排出などの他、細胞外部との情報伝達を行うなど、生物が生きていくうえで非常に重要なものである。一方、細胞表層には我々がその生物種を認知するうえで目印となる物質が多様に存在する。そのため、これら細胞表層の情報を得ることは、例えば出血性大腸菌 O157 などのような病原微生物を検知するうえでも非常に有用であり、これまでも抗体や医薬などの研究開発に寄与し、結果として我々人間の生活の質を向上させてきた。

この生物種の認知に必要な細胞表層の情報を得るにはその構成要素である膜タンパク質やリポ多糖などを分析する必要があるが、これらの分子は細胞表層の薄い部分にしか存在しないため、膜タンパク質を分析する場合、細胞全体のタンパク質を分析しても最も少ない膜タンパク質はほとんど検出・確認することができないことが多い。そのため、細胞の表層部分を含む画分をできるだけ効率よく分離回収することが重要になる。

しかし、細胞には様々な器官が存在するため、膜成分を分画して回収するには非常に手間のかかるステップをいくつも経る必要がある。また、膜の主要成分である脂質とともに回収されることが多く、疎水性が高くなり容易に水溶性の抽出液に溶解しない。

そこで本研究では、大腸菌をサンプルとして選択し、非イオン性界面活性剤を利用した簡便な方法で膜タンパク質を含む画分を抽出する方法について検討を行った。界面活性剤にはミセルを形成して水層と分離する温度(曇点)があり、その温度は界面活性剤の種類によりさまざまである。今回用いた非イオン性界面活性剤であるTritonX-114はその曇点が23℃と比較的低温であり、これまでも細胞膜のリポ多糖を分離する手法等に用いられてきた¹⁾。

サンプルとして選択した大腸菌はグラム陰性細菌に属し、その細胞膜はリン脂質が隙間無く並んだ脂質二重層を主要構成要素とする外膜と内膜からなり、膜タンパク質はこの脂質二重膜に埋め込まれるように存在している(図1)。ここにTritonX-114を作用させ、脂質二重層膜をほどこき、界面活性剤とミセルを形成させることで膜画分を抽出する手法を検討したので報告する。

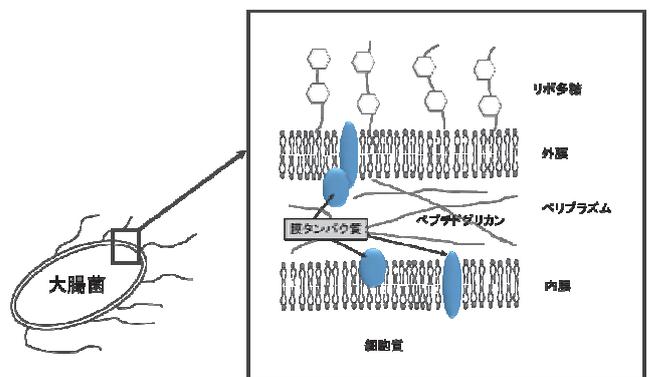


図1 大腸菌の細胞膜の模式図

2. 実験方法

2. 1 細胞表面膜タンパク質画分の抽出

大腸菌 (DH5 α 株) をLB培地100mlで37 $^{\circ}$ C, 16時間培養し, 8,000rpmで5分間遠心後培地成分を捨て, 生理食塩水で菌体を洗浄し, 菌体を回収した。そこに1% Triton X-114, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaClからなる抽出分離溶液を10ml添加し, ピペットで懸濁後, 30分間氷上に置き, 5分おきに攪拌した。その後20 $^{\circ}$ C, 8000rpmで5分間遠心し上清を回収した後, さらに残った菌体を取り除くため12500rpmで5分遠心し, 上清を回収した。上清を回収後, 37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし, ミセルを形成させ, ミセル層を回収した (図2)。

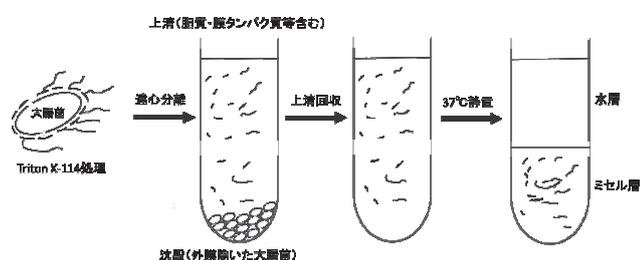


図2 細胞表面膜タンパク質画分抽出の一連操作

2. 2 膜タンパク質の分離・同定

タンパク質の分離は, 二次元電気泳動法により行った²⁾³⁾。一次元目の等電点ゲルに充填するサンプルについては以下の方法で調製した。まず2. 1で回収したミセル層に4倍量のアセトンを加え-20 $^{\circ}$ Cに静置しタンパク質を沈殿させるとともに脂溶性物質を取り除いた。4 $^{\circ}$ C, 12500rpmで10分間遠心した後, 上清を捨て, 沈殿に等電点電気泳動試薬キット (ナカライテスク株) に含まれるLysis bufferと二次元電気泳動用タンパク質抽出キット (日本エイド一株) の膜タンパク質可溶化試薬 (キット中エクストラクトエイドC) を等量ずつ添加し膜タンパク質を可溶化させた。

二次元目のSDS-PAGEにてタンパク質を分離, 染色した後, 得られたタンパク質スポットを切り抜いた。切り抜いたスポットにタンパク質分解酵素であるトリプシンを作用させペプチドに断片化した後, MALDI-TOF/MS (SHIMADZU AXIMA Performance)にてMS及びMSMS解析を行いタンパク質を同定した。

3 結果と考察

3. 1 膜タンパク質の抽出

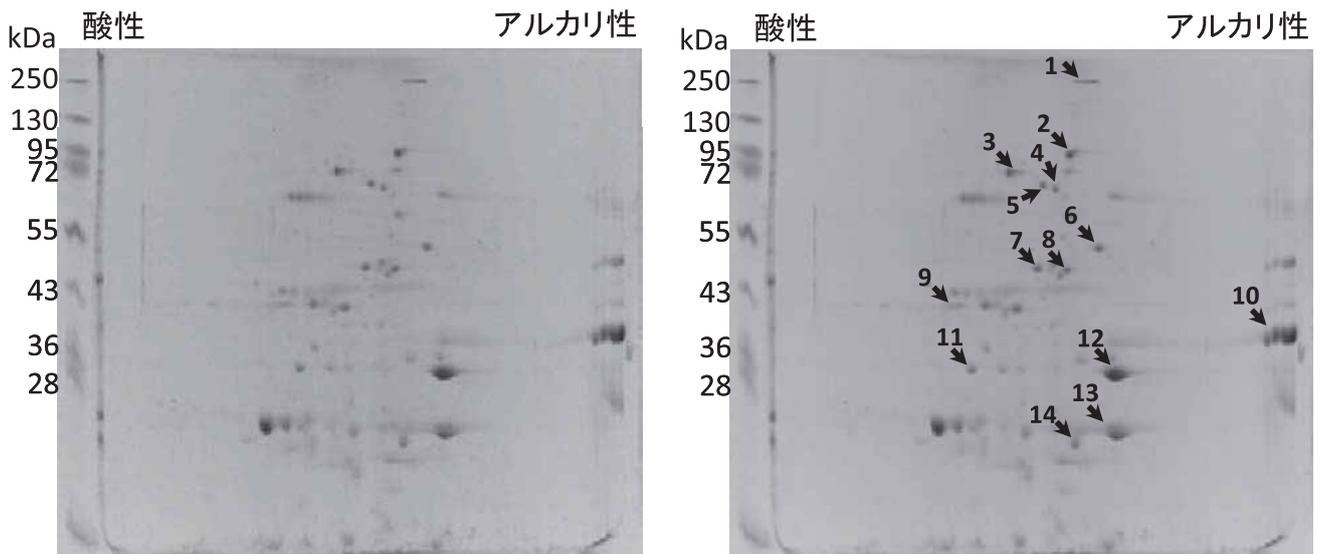
TritonX-114によるミセルは37 $^{\circ}$ C条件下では30分程度経過した段階から形成され始め, 4時間経過した段階でははっきりと分層している様子が見てとれた (図3)。しかし, 上層の水層部分を別のチューブに移し, それをさらに長時間インキュベートすることでミセルが形成されることが確認されたため, 本研究では16時間インキュベートしたミセル層をサンプルとして回収した。

3. 2 膜タンパク質の分離・同定

3. 1で抽出したサンプルについて二次元電気泳動で分離した結果, 良好な分離パターンを得た (図4左図)。得られたタンパク質スポットについて, 2. 2の操作に従いタンパク質の同定を行った結果, 膜貫通型タンパク質や輸送体タンパク質など種々の膜タンパク質であることが示され (図4右図), 本分離手法により膜タンパク質が効率よく回収できることが確認できた。一方で同定の結果, 細胞内タンパクの存在も確認されたため界面活性剤の作用が一部内膜にも及んでいることが示唆された。今回検討した回収条件では37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートであるため, 細胞内タンパク質が混入してくると分層過程で目的の膜タンパク質が分解されることも考えられるため分解を抑制する組成を今後検討する必要がある。



図3 界面活性剤による層分離
左:20 $^{\circ}$ C 4時間 右:37 $^{\circ}$ C 4時間



MALDI-TOF/MS タンパク質同定結果

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1:innermembrane lipoprotein | 8: outermembrane protein |
| 2:outermembrane protein | 9:transporter |
| 3:transporter | 10:outer membrane protein |
| 4:transporter | 11:outer membrane protein |
| 5:receptor | 12:outer membrane protein |
| 6: outermembrane protein | 13:outer membrane protein |
| 7:outermembrane protein,precursor | 14:transporter substrate binding protein |

図4 膜表層を含むミセル層の二次元電気泳動パターン（左図）と同定された膜タンパク質スポット（右図矢印）

4 まとめ

本研究において、非イオン性界面活性剤である TritonX-114のミセル形成能を利用することにより、大腸菌の膜タンパク質を含む画分を効率よく回収し、二次元電気泳動法により分離・同定することができた。今後、本研究で得られた知見を応用して単膜を有するグラム陽性細菌や酵母など他の微生物の膜タンパク質を抽出する手法を確立して、膜タンパク質抽出試薬キットの開発へと繋げたい。

参考文献

- 1) Perola O.Magalhaes et al: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,10,[3],388(2007).
- 2) 平野久:“プロテオーム解析”,東京化学同人(2001).
- 3) 和田潤他:京都市産業技術研究所研究報告, No.4,p45(2014).