

微生物サンプルを用いた二次元電気泳動法の開発

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、多くの生物種の遺伝子解析が行われたことをきっかけに生物系の研究では網羅的解析が盛んに行われている。多くの生命現象を直接的に担っているタンパク質の網羅的解析はプロテオーム解析と呼ばれている。本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が頻繁に用いられ、再現性の高い安定した結果が求められる。研究所では既に酒造用酵母菌体を用いた二次元電気泳動法において良好なサンプル調製と再現性の高い実験結果を得ている。また、酵母よりも細胞サイズが小さい大腸菌を用いても同様に安定した結果が得られたことを報告している。

本研究では新たに、細胞壁が厚く細胞サイズが小さいグラム陽性細菌の乳酸菌とビフィズス菌においても安定した結果を得るための検討を行った。その結果、グラム陽性細菌2種に対して再現性の高い分析結果を得ることが可能となった。

1. はじめに

従来のタンパク質研究は現象や表現形質を注意深く観察し、仮説を立てることから始まった。仮説に基づき特定のタンパク質を調べ、その原因となるタンパク質を同定して現象が由来するメカニズムを明らかにしようという研究が多く、仮説先にありき（Hypothesis driven）な研究が多かった。しかしながら、最初に立てる仮説が間違っていると当然のことながら研究はなかなか進展しない。当時から網羅的に解析できる方法があれば予想外な事象の見落としを防止できる可能性があった。

そこに近年のゲノム解析の進展が大きな影響をおよぼした。2000年前後から生命の設計図とも言えるゲノムDNAの構造が大腸菌をはじめとして次々と明らかになった。その結果、ゲノム解析が行われた生物では原因となりうるタンパク質がすべて網羅されてカタログ化されることになり、従来とは逆のプロセスでタンパク質の解析が行えるようになった。つまり、試料となる生物の要素（タンパク質）を全て抽出して比較解析を行うことで、どのような現象にどのようなタンパク質が関与しているかの推測が立てられるようになったのである。解析結果先にありき（Data driven）な研究と言える。

タンパク質の網羅的解析はプロテオーム解析と呼ばれており、プロテオームとは一揃いのタンパク質とい

う意味合いである。ゲノム解析の進展と測定機器や情報機器の進歩によって一揃いの莫大なデータを一度に整理して取り扱うことが可能になったことで生物系の研究の一見力ずくとも言える網羅的解析への進展を可能にした。近年では、タンパク質だけでなく、ゲノムに引き続き遺伝子発現や代謝物などの網羅的な解析も盛んに行われている。しかし、とりわけタンパク質は生命現象の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、分子量の測定や解析の自動化によってタンパク質解析の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⁾が用いられる。

研究所では平成16-17年度近畿経済産業局地域新生コンソーシアム研究開発事業「ポストゲノム解析を簡便にする生体試料精密分画キットの開発」において二次元電気泳動用の試薬キットの開発を行い、本キットを使用して酒造用酵母菌体での良好なサンプル調製と再現性の高い実験結果を得ている³⁾。一方で、食品分野及び医療分野に有効利用できる細菌（バクテリア）

は非常に多く、細菌のプロテオーム解析を行うために安定した二次元電気泳動法を確立することは非常に重要である。そこで、平成22年度に酵母と比べて細胞サイズが小さい（およそ1/2～1/10）大腸菌（細菌）を用いて酵母と同様のサンプル調製及び二次元電気泳動法の再現性の検討を行い、良好な結果が得られたことを報告した⁴⁾。本研究では、グラム陽性細菌であり、酵母と比べて細胞サイズが小さく（およそ1/2～1/10）、グラム陰性細菌の大腸菌と比較して細胞壁のペプチドグリカン層が厚く細胞破碎が困難で安定したタンパク質抽出が難しい乳酸菌とビフィズス菌を用いて再現性の高いサンプル調製及び二次元電気泳動が可能となる条件を検討した。

2. 実験方法

2.1 評価用試料の調製

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後、遠心分離機で50ml遠沈管（IWAKI）に集菌した。次に、少量の20mMリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁させ2mlチューブ数本に均等に分注し、破碎処理は分注したそれぞれのサンプルに対して以下の操作を行った。二次元電気泳動用タンパク質抽出キット（日本エイドー）の抽出剤とガラスビーズ（0.1mm）を添加し、ビーズビーターを用いて1分間激しく振とうを行い、振とう後すぐに冷凍した後、再度融解させてビーズビーターに投じた。この一連の操作を繰り返すことによって乳酸菌を物理的に破碎し、遠心後の破碎液上清にキット中の抽出助剤を加えたものを本研究用試料とした。ビフィズス菌の培養はGAM培地（ニッスイ製薬）を用いて37℃で一晩静置培養を行った。また、嫌気培養にはアネロパック（三菱ガス化学）を用いた。培養後は遠心分離機で50ml遠沈管（IWAKI）に集菌し、少量の20mMリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁させ2mlチューブ数本に均等に分注し、破碎処理は乳酸菌と同様の操作を行った。

2.2 二次元電気泳動

2.2.1 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。別々に破碎した乳酸菌及びビフィズス菌破碎液上清をそれぞれ80 μ lと100 μ lずつ添加し、その上にサンプルキャッピング溶液20 μ lを重層した。等

電点電気泳動の通電条件は200V 1時間、400V16時間、800V 1時間とした。

2.2.2 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。

2.2.3 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。

2.3 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 Stein 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（富士フイルム）で読み取り二次元電気泳動画像とした。

2.4 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（富士フイルム）を用いてスポット強度（Intensity）を数値化して定量を行った。

2.5 再現性の確認

図1に示すように、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。乳酸菌及びビフィズス菌の破碎、サンプルの前処理、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）、タンパク質スポットの検出（ゲル染色）を独立して行った結果を目視で比較した。また、画像解析ソフトウェア

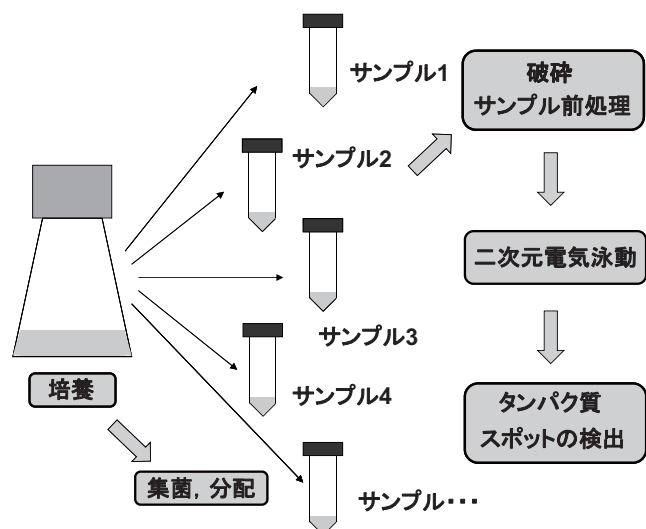


図1 実験方法（再現性の確認）
細菌を培養後、均等に分配して、以降の操作はそれぞれ同様に行った。

アで数値化したタンパク質スポット強度を用いてサンプル間におけるばらつきを相関係数及びCV値を算出して考察を行った。

3. 結果と考察

3.1 サンプル調製及び電気泳動結果

乳酸菌及びビフィズス菌の破碎液上清を用いて二次元電気泳動法によるタンパク質分離を行い、電気泳動後のゲルをCBB Stein Oneで染色してタンパク質スポットを検出した。本研究は酵母や大腸菌を対象試料とした研究^{3,4)}に引き続いて行った研究である。乳酸菌やビフィズス菌は酵母と比較して細胞サイズが小さい（およそ1/2～1/10）ため、酵母由来サンプルの調製には直径0.5mmのガラスビーズを用いるが、0.1mmのガラスビーズを用いてサンプル調製を行った。その結果、両細菌群ともに良好な抽出及び分離をすることができた。両細菌群はグラム陽性細菌に分類されておりグラム陰性細菌の大腸菌と比べて細胞壁のペプチドグリカン層が厚いために菌体が良好に破碎されないことが危惧されたが、二次元電気泳動の結果から問題なく破碎されてタンパク質が抽出されたことが判明した。さらに、図2及び図4に示すように、サンプルの投入量の調製と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エイドC溶液）を用いることによって良好な分離スポットが得られた。

3.2 再現性の検証

3.2.1 乳酸菌を試料とした時の再現性

それぞれ独立して調製した試料を用いて二次元電気泳動を行い、CBB Stein Oneで染色して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2に示すように、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100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た結果を図3に示す。3枚のゲルの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 0.991 ± 0.005 であった。また、CV値3%未満に5.0%の、CV値3%以上5%未満に11.0%の、CV値5%以上10%未満に38.0%の、CV値10%以上20%未満に35.0%の、CV値20%以上30%未満に10.0%の、CV値30%以上40%未満に1.0%のスポットがそれぞれ適合し、89%以上のスポットがCV値20%以下となった。

3.2.2 ビフィズス菌を試料とした時の再現性

乳酸菌を試料として用いた時と同様の実験をビフィズス菌に対しても行ったところ、図4に示すように複数枚のゲル間で再現性の良いスポットパターンが確認

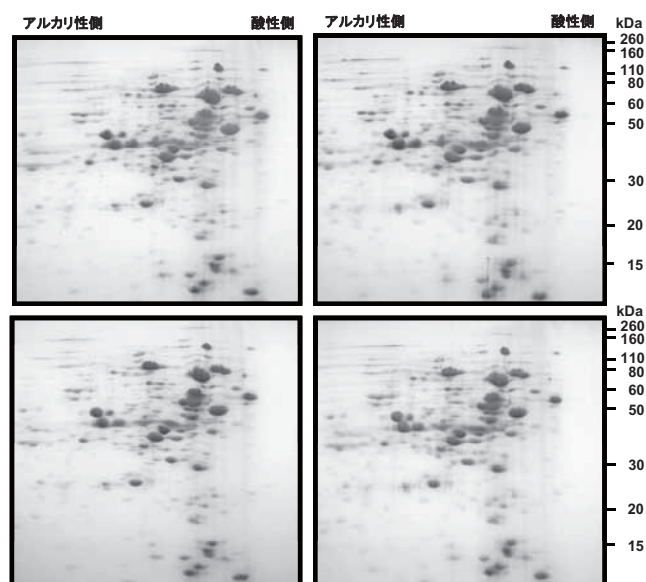


図2 乳酸菌サンプルの二次元電気泳動法によるタンパク質の分離パターン
4枚のゲルはサンプル調製、電気泳動、タンパク質スポットの検出（ゲル染色）などの一連の実験操作をそれぞれ独立して行った。

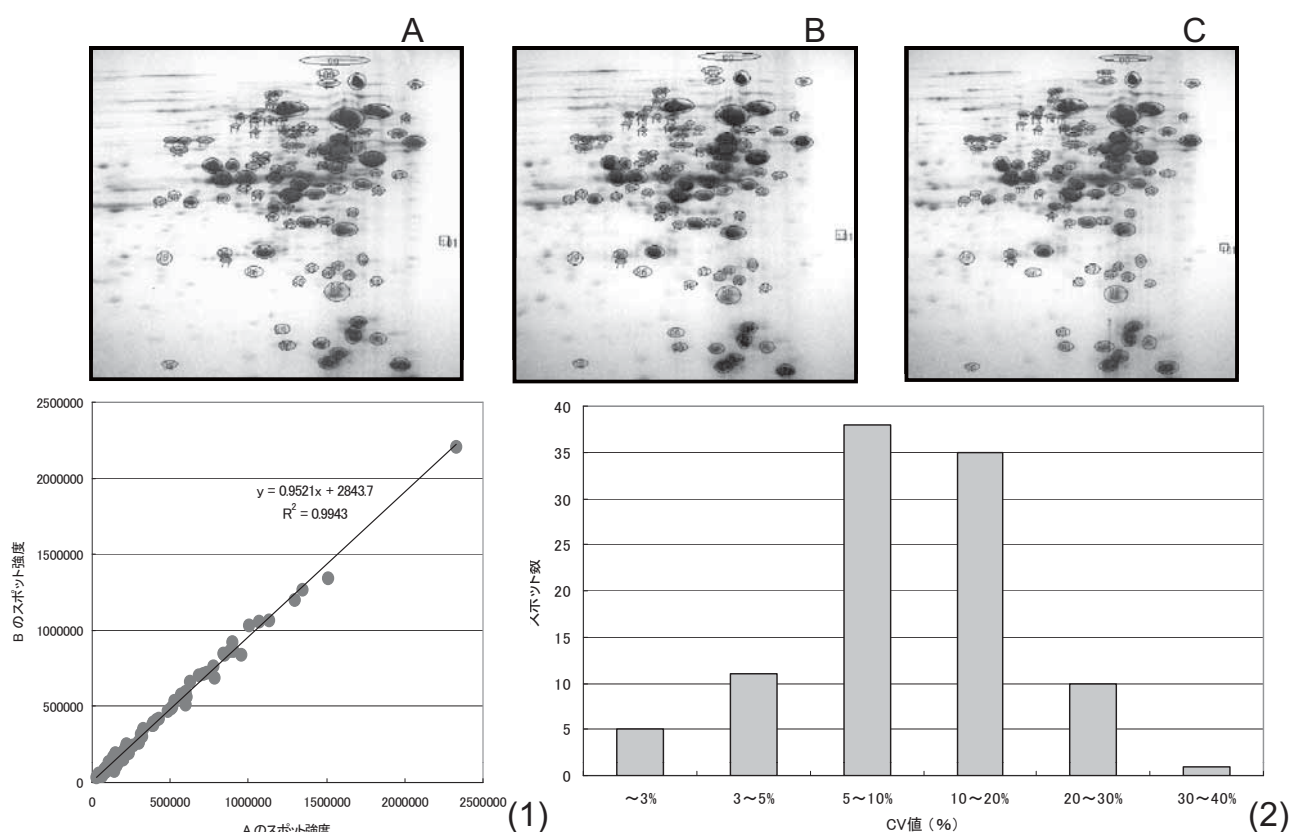


図3 乳酸菌由来タンパク質スポット定量値の相関係数とCV値分布
画像解析ソフトウェアを用いてゲル間で対応するタンパク質スポットを数値化した。(1) AとBのゲルの対応するタンパク質スポットの数値間での相関係数を算出した。(2) A, B, C 3枚のゲル間でのCV値を計算し、分布を調べた。

できた。さらに、図5に示すように画像解析ソフトウェアによって算出したスポット強度を基に相関係数を求めたところ、相関係数の平均値は 0.997 ± 0.001 であった。また、この時CV値3%未満に6.0%の、CV値3%以上5%未満に14.0%の、CV値5%以上10%未満に43.0%の、CV値10%以上20%未満に27.0%の、CV値20%以上30%未満に10.0%のスポットがそれぞれ適合し、90%以上のスポットがCV値20%以下となった。

網羅的解析は主に異なった表現型を有するサンプル間の比較を行って特定因子を絞り込む手法でもあるので、本研究で一連の操作により得られた結果が高い再現性を持つ必要がある。乳酸菌及びビフィズス菌を試料として用いたこれらの結果から本研究で行った二次元電気泳動法が高い再現性を有していることが分かり、サンプルが対照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。

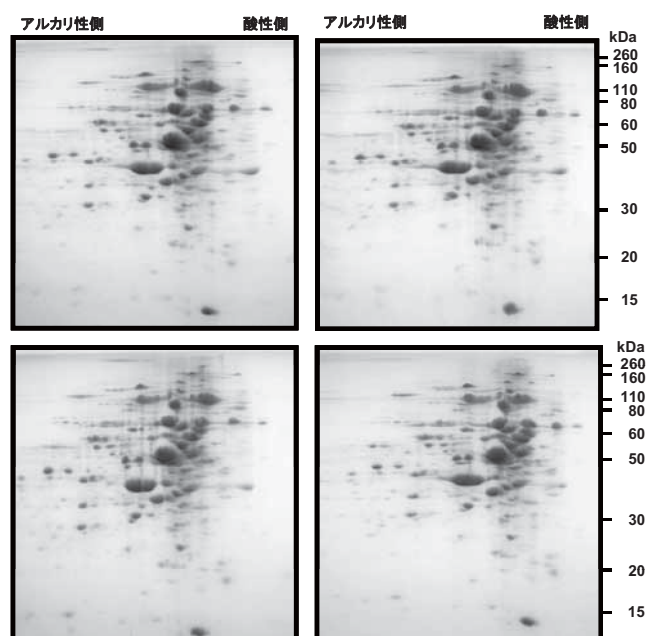


図4 ビフィズス菌サンプルの二次元電気泳動法によるタンパク質の分離パターン
4枚のゲルはサンプル調製、電気泳動、タンパク質スポットの検出（ゲル染色）などの一連の実験操作をそれぞれ独立して行った。

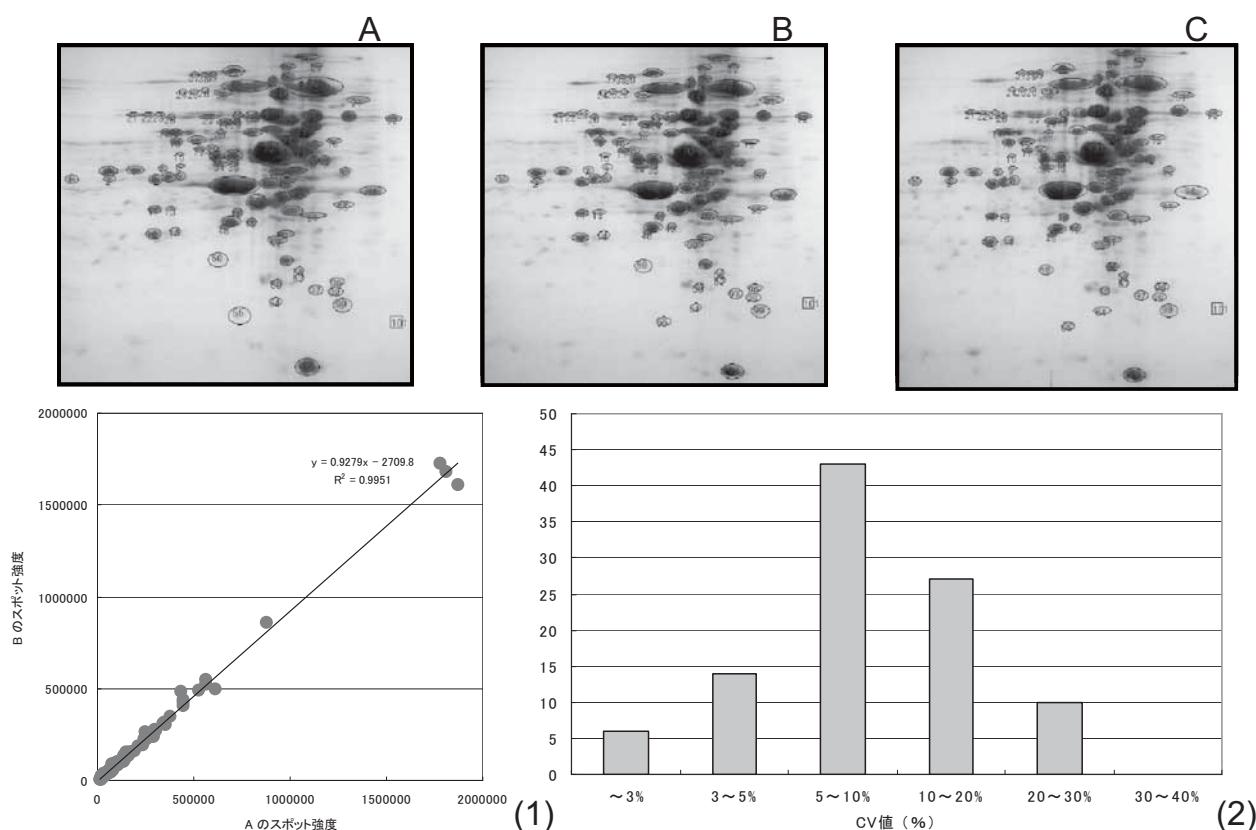


図5 ビフィズス菌由来タンパク質スポット 定量値の相関係数とCV値分布

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, C 3枚のゲル間でのCV値を計算し, 分布を調べた。

4. まとめ

本研究によって, 細胞サイズが数 μm で細胞壁に厚いペプチドグリカン層を有する乳酸菌やビフィズス菌などのグラム陽性細菌のタンパク質でも酵母やグラム陰性細菌の大腸菌のサンプルと同様に安定して抽出が可能であることが分かった。さらに, 調製したサンプルを用いた二次元電気泳動において再現性の高い結果を得ることができた。菌体サンプルの微量な変動を基に重要因子を検出するために十分な性能値を出すことができ, プロテオーム解析の力強いツールに成り得ることと, 微生物全般において二次元電気泳動法による安定した分離分析ができることが示唆された。

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.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (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, pp.39-44 (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, pp.83-85 (2011) .