

ペプチドマスフィンガープリンティング法による 組換えタンパク質の同定

化学技術部 生物工学チーム 天谷 努
化学材料チーム 青木 信義

近年、多くの生物のゲノム情報が得られ、細胞や組織に発現しているタンパク質の遺伝子情報に基づく網羅的解析（プロテオーム解析）技術が注目されている。また、タンパク質の機能・構造解析の分野では、組換えタンパク質を用いるのが不可欠の技術である。そこで、大腸菌による組換えタンパク質を誘導し、タンパク質の網羅的発現解析技術の一手法として、ペプチドマスフィンガープリンティング（PMF）法を用い組換えタンパク質を同定した。

キーワード：遺伝子組換え，プロテオミクス，MALDI-TOF-MS，PMF 法

1 はじめに

タンパク質の機能・構造解析では、組換えタンパク質の同定法として、ウエスタンブロッティングなどの手法があるが、近年、網羅的タンパク質発現解析が主流となりつつあり、多種類のタンパク質を解析するには、質量分析法を用いた方が容易で、また、時間・コスト面でも有利である。

そこで、大腸菌を用いて、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現し、発現した β -ガラクトシダーゼを電気泳動法で検出し、さらに、PMF法を用いて同定することを試みた。

2 実験方法

2.1 使用菌株と組換えタンパク質の発現

大腸菌株 BL21star (DE3) に pET101/D/lacZ ベクター（図1）を形質転換し、組換え大腸菌株を得た。アンピシリン 50 μ g/ μ L を含むLB培地に大腸菌を接種し、37 $^{\circ}$ Cで、OD600が0.6になるまで培養し、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを1mM添加し、25 $^{\circ}$ Cで6時間誘導した。

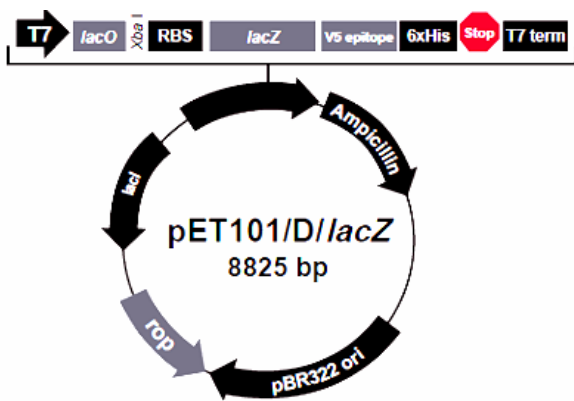


図1 pET101/D/lacZベクターマップ

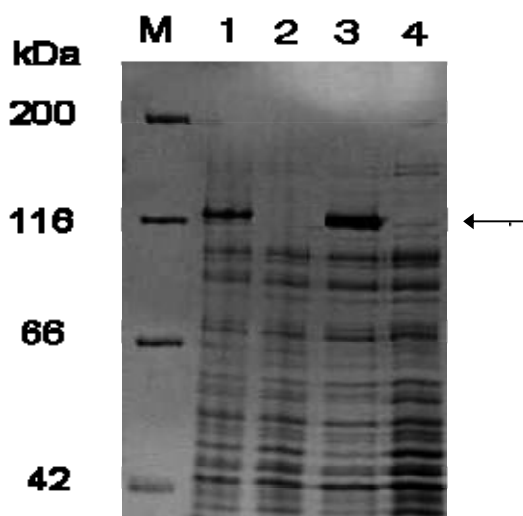
2.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

得られた細胞を20mMリン酸緩衝液（pH7.6）に懸濁し、超音波（20KHz, 4分）処理により細胞を破碎した。遠心分離（5,000G, 10分）し、その上清を菌体内可溶画分、沈殿を菌体内不溶画分とした。それぞれの画分を7.5%濃度のポリアクリルアミドゲルで電気泳動（SDS-PAGE）し、ゲルをクマシーブリリアントブルー（CBB）染色して検出した。

2.3 MALDI-TOF-MSによる組換えタンパク質の同定

電気泳動ゲルから、タンパク質バンドを含むゲルを切り出し、30%アセトニトリル/25mM重炭酸アンモニウムで処理してゲルを脱色した。ゲル片を乾燥後、還元溶液（10mMジチオスレイトール, 25mM重炭酸アンモニウム）で56 $^{\circ}$ C, 1時間処理した後、溶液を捨て、次に、アルキル化溶液（55mMヨードアセトアミド, 25mM重炭酸アンモニウム）で室温で45分処理し、25mM重炭酸アンモニウムで10分間インキュベートしてゲル片を洗浄後、乾燥した。さらに、ゲル片にトリプシン溶液（10 μ g/mL修飾トリプシン, 50mM重炭酸アンモニウム）を添加し、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜トリプシン処理した。トリプシン消化したゲル片にペプチド抽出液（50%アセトニトリル, 5%トリフルオロ酢酸）を添加し、室温で30分間インキュベートした後、液を回収し遠心式真空乾燥機で約10 μ Lに濃縮した。

濃縮液をZip Tipピペットチップ（ミリポア）を用いて、脱塩操作し、0.1%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリルで溶出した液をサンプルとし、MALDI-TOF型質量分析計AUTOFLEX II（ブルカーダルトニクス）でマスペクトルを測定した。マトリックスは、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を用いた。MASCOTプログラム（<http://www.matrixscience.com/>）を用い、得られたマスペクトル（実測値）とデータベースから計算される予測値と



レーンM：分子量マーカー
 レーン1：菌体内不溶（誘導+）
 レーン2：菌体内不溶（誘導-）
 レーン3：菌体内可溶（誘導+）
 レーン4：菌体内可溶（誘導-）

図2 大腸菌による発現タンパク質のSDS-PAGE分析

比較することにより、全生物種を対象にNCBInrデータベースによる検索をした。

3 結果と考察

3.1 大腸菌による組換えタンパク質の発現

用いた組換え大腸菌により、組換えタンパク質を発現し、SDS-PAGEにより分析した結果を図2に示す。目的の組換えタンパク質は、図中の矢印で示すバンドとして可溶画分、不溶画分の両方の画分として得られた。

このように組換えタンパク質の一部は不溶性の封入体として得られ、組換えタンパク質の機能性を考慮した場合、可溶性タンパク質として得ることが1つの課題である。そのためには、発現をより緩やかな条件（低温発現など）とするなどの方法が有効であると考えられる。

3.2 MALDI-TOF-MSによる組換えタンパク質の同定

大腸菌により発現された組換えタンパク質（図2 矢印由来）部分のゲルを切り出し、トリプシン消化した後、MALDI-TOF-MSにより分析（図3）した。また、MASCOTプログラムにより、タンパク質を同定（図4）した。その結果、β-ガラクトシダーゼであると同定された。全長アミノ酸配列のうち下線に示すペプチド部分について、マススペクトルとデータベースから計算される予測値が一致し、全長アミノ酸配列の32%をカバーした。

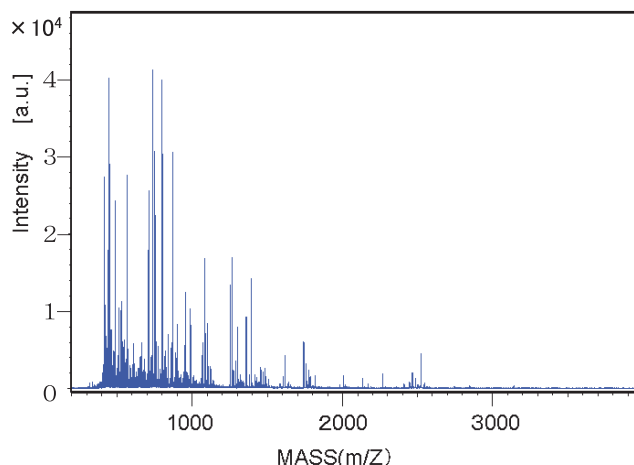


図3 発現タンパク質のトリプシン消化物のマススペクトル

MIDPVLQRR DWENPGVTQL NRLAAHPPFA SWRNSEEART DRPSQQLRSL NGEWRFAWFP
 VPEAVPESWL ECDLPEADTV VVPSNWQMHG YDAPIYTNVT YPIITVNPFFV PTENPTGCYS
 LTFNVDESWL QEGQTRIIFD GVNSAFHLWC NGRWVGYGQD SRLPSEFDLS AFLRAGENRL
AVMVLRWSDG SYLEDQDMWR MSGIFRDVSL LHKPTQISD FHVATRFNDD FSRAVLEAEV
QMCGELRDYL RVTVSLWQGE TQVASGTAPF GGEIIDERGG YADRVTLRNLN VENPKLWSAE
IPNLRYRAVVE LHTADGTLIE AEACDVGFRE VRIENGLLLL NGKPLLIRGV NRHEHPLHG
QVMDEQTMVQ DILLMKQNF NAVRCGHYPN HPLWYTLGDR YGLYVVDEAN IETHGMVPMN
RLTDDPRWLP AMSERVTRMV QRDRNHPSVI IWSLGNESGH GANHDALYRW IKSVDPSPRV
QYEGGGADTT ATDIICPMYA RVDEDQPPFA VPKWSIKKWL SLPGETRPLI LCEYAHAMGN
SLGGFAKYWQ AFRQYPRLQG GFVWDWVDQS LIKYDENGMP WSAYGGDFGD TPNDRQFCMN
GLVFADRTPH PALTEAKHQQ QFFQFRLSGQ TIEVTSEYLE RHSDNELLHW MVALDGKPLA
SGEVPLDVAP QGKQLIELPE LPQESAGQL WLTVRVQPN ATANSEAGHI SAWQQWRLAE
NLSVTLPAAS HAIPLHTTSE MDFCIELGNK RWQFNRSQSF LSQMWIGDKK QLLTPLRQDF
TRAPLDNDIG VSEATRDPN AWVERWKAAG HYQAEALLQ CTADTLADAV LITTAHAWQH
QGKTLFISRK TYRIDGSGQM AITVDVEVAS DTPHPARIGL NCQLAQVAER VNWLGLGPGQ
NYPDRLTAAC FDRWDLPLSD MYTPYVFPSE NGLRCGTREL NYGPHQWRGD QVFNISRYSQ
QQLMETSHRH LLHAEETWL NIDGFHMIG GDDSWSPSVS AEFQLSAGRY HYQLVWCQKA
AARVKGELNS KLEGKPIPNP LLGLDSTRTG HHHHHH

図4 発現タンパク質のトリプシン消化物の同定

4 まとめ

大腸菌により組換えタンパク質を誘導し、SDS-PAGEによりタンパク質を検出した後、ゲルを切り出し、PMF法により組換えタンパク質の同定ができた。

本技術は、他の方法と比較し多種類のタンパク質を網羅的に解析する手法として迅速、平易な手法である。現在、バイオテクノロジー研究はゲノムからポストゲノムへ進行し、研究対象として遺伝子からタンパク質へと移行している。本技術を応用することにより、組織細胞に発現するタンパク質の網羅的解析などにより、医薬系基礎研究、創薬、診断や食品中に含有する有効成分（タンパク質、ペプチド）の探索など、数々の応用が可能である。