

粘液多糖類を含む単細胞生物 *Colpoda cucullus* タンパク質の解析

—SDS を含むサンプルの二次元電気泳動—

十亀陽一郎¹・松岡達臣²

(¹高知大学大学院総合人間自然科学研究科・²高知大学自然科学系理学部門)

Protein Analyses in Mucopolysaccharide-Containing Unicellular *Colpoda cucullus*: Two-Dimensional Electrophoresis of SDS-Containing Samples

Yoichiro Sogame¹ and Tatsuomi Matsuoka²

¹Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University; ²Sciences Unit, Natural Sciences Cluster, Kochi University

Abstract: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) of *Colpoda cucullus* components failed to result in focusing any proteins into the spots. The 2-D PAGE of bacterial (*Klebsiella pneumoniae*) proteins mixed with *Colpoda* cell components also failed to result in focusing the proteins. On the other hand, 2-D PAGE of bacterial proteins mixed with lysozyme-treated *C. cucullus* components resulted in focused protein spots. This result implies that protein aggregation through mucopolysaccharides may prevent proteins from focusing under isoelectric focusing (IEF) conditions. When *C. cucullus* samples (without lysozyme treatment) were treated with a sample buffer for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed on 2-D PAGE, the spot resolution had quite improved. It is likely that a strong negative charge of proteins brought about by SDS binding may allow the proteins to dissociate from the mucopolysaccharides and migrate in the IEF gel.

キーワード：ムコ多糖類，二次元電気泳動，コルポータ

Keywords: mucopolysaccharide, two-dimensional electrophoresis, *Colpoda*

1. はじめに

多くのモデル生物のゲノム解析が完了した現在、生命科学領域の重要な課題の1つは、生命活動を直接担うタンパク質の同定と機能解析である。最近、タンパク質を二次元電気泳動法によりフォーカシングし、そのスポットに含まれるタンパク質断片のアミノ酸配列をマススペクトル解析によって同定する方法が採用される。ポストゲノム研究以前は、1つのタンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定した後、それをコードする遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行うことにより、目的タンパク質のアミノ酸配列を推定することによりそのタンパク質を同定するという、かなりの時間と労力を必要とする作業を行っていた。多くのモデル生物においてゲノム情報が解読されている現在では、マススペクトル解析によるタンパク質の部分的アミノ酸配列の情報が得られれば、その全アミノ酸配列をデータベースから即座に取得できる。ゲノム情報が解読されていない生物のタンパク質の場合でも、部分アミノ酸配列情報をもとに、ゲノム情報が解読されている生物の情報を検索することにより、目的タンパク質の同定が可能である。したがって、タンパク質を分離するための二次元電気泳動法は新しい技術ではないが、現在のポストゲノム研究を支える非常に重要な分析技法の1つである。

ところが、二次元電気泳動法がすべてのサンプルにおいてうまくいくとは限らない。たとえば、単細胞生物のボルボータ (*Colpoda cucullus*) に含まれるある種の成分は、二次元電気泳動における一次目の泳動 (等電点電気泳動; IEF) を著しく妨害する。本研究では、二次元電気泳動を妨害している因子がムコ多糖類であることを明らかにした。SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 処理したサンプルでは、二次元電気泳動におけるタンパク質のフォーカシングが改善されることが報告されている¹⁾。そこで、本研究においても、SDS 処理したボルボータサンプルを用いた二次元電気泳動により、タンパク質のフォーカシングの改善を試みた。

2. 材料と方法

ボルボータ (*Colpoda cucullus*) の培養では、0.05% (w/v) 乾燥麦葉浸出液に、餌であるバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) を植え付けた培養液を用いた。バクテリアの培養は、0.5% (w/v) ポリペプトン、1% (w/v) 肉エキス、0.5% (w/v) NaCl を含む 1.5% (w/v) 寒天で行った。1~2 日間培養したボルボータは遠心して集めた (1500 ×g, 1 分, 室温)。等電点電気泳動 (IEF) に先立ってまず、ボルボータとバクテリアを凍結解凍した後、超音波破砕機 (Bioruptor UCD-200, CosmoBio) を用いて破砕処理を行った (20 秒間の破砕処理を 12 回)。破砕サンプルは、以下に記述する (a)、(b) の 2 通りの方法で処理した。(a) 破砕サンプルと IEF 用サンプル処理液 [8 M 尿素, 1.9% (v/v) Nonidet P-40, 2% (v/v) Pharmalyte (GE Healthcare), 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] をおよそ 1 : 10 の割合で混合し 4 °C で 12 時間放置した。(b) 破砕サンプルと 2×SDS-PAGE 用サンプル処理液 [2% SDS, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] を等量混合し 3 分間煮沸し、さました後、このサンプルと IEF 用サンプル処理液 [8 M 尿素, 2% (v/v) 界面活性剤, 2% (v/v) Pharmalyte (GE Healthcare), 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] を 1 : 5 の割合で混合し 4 °C で 2 時間放置した。この場合、IEF 用サンプル処理液に含まれる界面活性剤は、1.9% Nonidet P-40, 1.9% Tween 80, 60 mM デオキシコール酸ナトリウム, 60 mM コール酸ナトリウムのいずれか (あるいは 2 つの組み合わせ; デオキシコール酸ナトリウム, コール酸ナトリウムの場合は Nonidet P-40 と併用) を用いた (各濃度は最終濃度)。IEF 用ゲルは、4.0% (w/v) (図 2c のみ) もしくは 4.5% (w/v) アクリルアミド, 8 M 尿素, 0.2% (w/v) N,N'-メチレンビスアクリルアミド, 界面活性剤, 4.7% (v/v) Pharmalyte, 0.07% (w/v) 過硫酸アンモニウム, 0.01% (v/v) TEMED を調合することにより作成した (各濃度は最終濃度)。この場合、ゲルに含まれる界面活性剤は、IEF 用サンプル処理液に含まれる界面活性剤と同じものを用い、1.9% Nonidet P-40, 1.9% Tween 80, 15 mM デオキシコール酸ナトリウム, 60 mM コール酸ナトリウムのいずれか (あるいは 2 つの組み合わせ; デオキシコール酸ナトリウム, コール酸ナトリウムの場合は Nonidet P-40 と併用) を用いた。ボルボータサンプルの解析では、図 1 の場合、150,000 細胞 (6 mg)、図 2 の場合 600,000 細胞の非水溶性成分を、バクテリアサンプルの解析では 0.2-0.6 mg 細胞ペレットに相当するサンプルを IEF ゲルにアプライし、100 V で 2 時間泳動した後、400 V で 4 時間室温で泳動した。1 次元目の泳動後、ゲルを 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% グリセロールを含む緩衝液に 30 分間ほど浸し、液を新鮮なものにかえてさらに 30 分間浸した後、2 次元目の SDS-PAGE を 10% もしくは 12.5% ゲルを用いて行った。ゲルは 0.2% Coomassie brilliant blue R250, 45% (v/v) メタノール, 10% 酢酸を含む染色液 (CBB 染色液) で染色後、27% (v/v) メタノール, 9% 酢酸を含む脱色液で脱色した。

図 2 の解析に用いたサンプルの調整は次のような手順で行った。まず、600,000 細胞のボルボータを遠心 (1500 ×g, 1 分, 室温) によ

り 1 mM Tris-HCl (pH 7.2) で 2 回洗った後、50,000 cells/ml まで濃縮し、最終濃度が 0.1 mM になるように CaCl₂ を添加して Ca²⁺/高密度シスト誘導を 1 時間行った。このサンプルを凍結融解により破碎した後、純水で 3 回洗って (17,000 × g, 20 分, 4°C) 水溶性分画を取り除き、さらに超音波破碎を行った。

3. 結果と考察

まず、SDS 処理しない通常の方法で IEF 用サンプルを調整した (図 1)。すなわち、破碎したサンプルは、IEF 用サンプル処理液 [8 M 尿素, 1.9% (v/v), Nonidet P-40, 2% (v/v) Pharmalyte (GE Healthcare), 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] とおよそ 1 : 10 の割合で混合し、4 °C で 12 時間放置した。この方法によってコルポーダサンプルを二次元電気泳動した場合、全くタンパク質のスポットは得られなかった (図 1a)。これは、IEF において、ゲルの塩基性側にアプライしたタンパク質が全くゲルに入らないことが原因であると考えられる。全く同じ方法でバクテリアサンプルを分析すると、正常にタンパク質スポットが分離することから (図 1b)、原因はコルポーダに含まれる成分であることが推察される。これを確かめるために、バクテリアサンプルにコルポーダサンプルを混ぜて二次元電気泳動を行ってみた。この結果、スポットはほとんど得られなかった (図 1c)。コルポーダは細胞内外にムコ多糖類を有するため²⁾、これが IEF を妨害している可能性がある。そこで、コルポーダサンプルをリゾチーム処理することによって、ムコ多糖類を分解することを試みた。この場合、6 mg コルポーダ細胞を凍結融解し、10 mg/ml リゾチームを含む 1 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁して 37°C で 2 時間処理した。その後、純水で 3 回洗浄した (17,000 × g, 20 分, 4°C)。このサンプルとバクテリアサンプル (0.6 mg) と混合し、IEF 処理液に懸濁後、超音波破碎装置 (Bioruptor UCD-200, CosmoBio) を用いて破碎処理を行った (20 秒間の破碎処理を 12 回)。このサンプルを 4°C で 12 時間インキュベートした後、二次元電気泳動を行った (図 1d)。この場合、バクテリアサンプルは、ほぼ正常に電気泳動された。この結果から、コルポーダのムコ多糖類が IEF におけるタンパク質の移動を妨害していることが示唆される。次に、バクテリアサンプルとコルポーダサンプルを混合した後にリゾチーム処理すると、二次元電気泳動による正常なスポットは得られなかった (図 1e)。この結果は、タンパク質がムコ多糖類に結合した状態でリゾチーム処理したのでは、タンパク質からムコ多糖類を切り離すことができないことを示唆している。

遠心により (17,000 × g, 20 分, 4°C) 分画して得たコルポーダ非水溶性成分のみを、図 1 の方法で二次元電気泳動した場合も明瞭なスポットを得ることはできなかった。しかし、このサンプルをあらかじめ SDS-PAGE 用サンプル処理液 [2% SDS, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] と等量混合後ボイルして二次元電気泳動を行うと、ある程度良好なスポットが得られることがわかった (図 2)。図 2 は、IEF サンプル処理液と IEF ゲルに含まれる界面活性剤の種類 (Nonidet P-40, Tween 80, デオキシコール酸ナトリウム, コール酸ナトリウム) をかえて二次元電気泳動を試みた結果である [この場合、IEF サンプル処理液と IEF ゲルに含まれる界面活性剤は同一のものを使用]。もっとも良好な結果が得られたのは Tween 80 を用いた場合であった (図 2c)。

では、なぜ SDS を含むサンプルでは、IEF が改善されるのであろうか？まず考えられるのが、SDS のタンパク質への付加によりタンパク質のコンフォメーションがくずれると同時に負電荷の増加により、ムコ多糖類に絡んでいても移動しやすくなることが予想される。このため、IEF 用ゲル中をタンパク質が移動し、等電点にフォーカシングしたと考えることができる。しかし、SDS がタンパク質に多量に付加したままだと、タンパク質分子は著しく負に荷電しているため、固有の等電点で移動が停止せず、陽極 (酸性側) へ移動し続けるはずである。等電点にタンパク質がフォーカシングした理由は、ゲル中で SDS がタンパク質から離れたためであると考えられる¹⁾。等電点を過ぎて酸性側に泳動されていても、SDS がはずれることにより、タンパク質は逆方向 (塩基性側) に移動して等電点にフォーカシングすることが予想される。ムコ多糖類の大部分は、タンパク質と一緒にゲルに入りこまない可能性が高く、ゲル中でのタンパク質の移動は、SDS がはずれても阻害されないと考えられる。

4. まとめ

コルポーダタンパク質の二次元電気泳動による分離が困難な原因は、細胞に含まれるムコ多糖類であることが、本研究において明らかになった。おそらく、タンパク質とムコ多糖類が絡みついた状態で存在するため、タンパク質が IEF ゲル中を移動して等電点にフォーカシングできないことが主な要因であろう。タンパク質を SDS-PAGE 用サンプル処理液で処理してから二次元電気泳動した場合、タンパ

ク質のフォーカシングが改善される理由は、負電荷をもつ SDS を多量に結合することにより、IEF 開始時にタンパク質がムコ多糖類から離れやすくなるためであろう。多量にタンパク質に結合した SDS は、タンパク質が IEF ゲル中を移動中にタンパク質から離れるため、タンパク質は固有の等電点にフォーカシングすると考えられる。

引用文献

1. 深尾陽一郎, 脱塩いらずの等電点電気泳動法, *Plant Organelles News Letter*, 8, 10-13 (2008).
2. FUNATANI, R., KIDA, A., WATOH, T., and MATSUOKA, T., Morphological events during resting cyst formation (encystment) in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*, *Protoistology*, 6, 204–217 (2010).

図1. バクテリアタンパク質の二次元電気泳動におけるコルポーダ成分の影響. IEF 用サンプル処理液とゲルに含まれる界面活性剤は1.9% (v/v) Nonidet P-40 を用いた. (a)~(e)は、それぞれコルポーダ (*Colpoda cucullus*) (a), バクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) (b), コルポーダ成分とバクテリアの混合物 (c), バクテリアとリゾチーム処理したコルポーダ成分の混合物 (d), バクテリアとコルポーダの混合物をリゾチーム処理したもの (e) の二次元電気泳動である。

図2. SDS-PAGE 用サンプル処理液で処理したコルポーダ非水溶性成分の二次元電気泳動. ゲルおよびIEF サンプル処理液に含まれる界面活性剤として、Nonidet P-40 (a), Nonidet P-40/SDS (b), Tween 80/SDS (c), Nonidet P-40/デオキシコール酸ナトリウム/SDS (d), Nonidet P-40/コール酸ナトリウム/SDS (e) を用いた。

図3. SDS 付加タンパク質の等電点電気泳動 (IEF) の模式図. P, D はそれぞれタンパク質と非イオン性界面活性剤を示す。

平成24年 (2012) 7月13日受理

平成24年 (2012) 12月31日発行

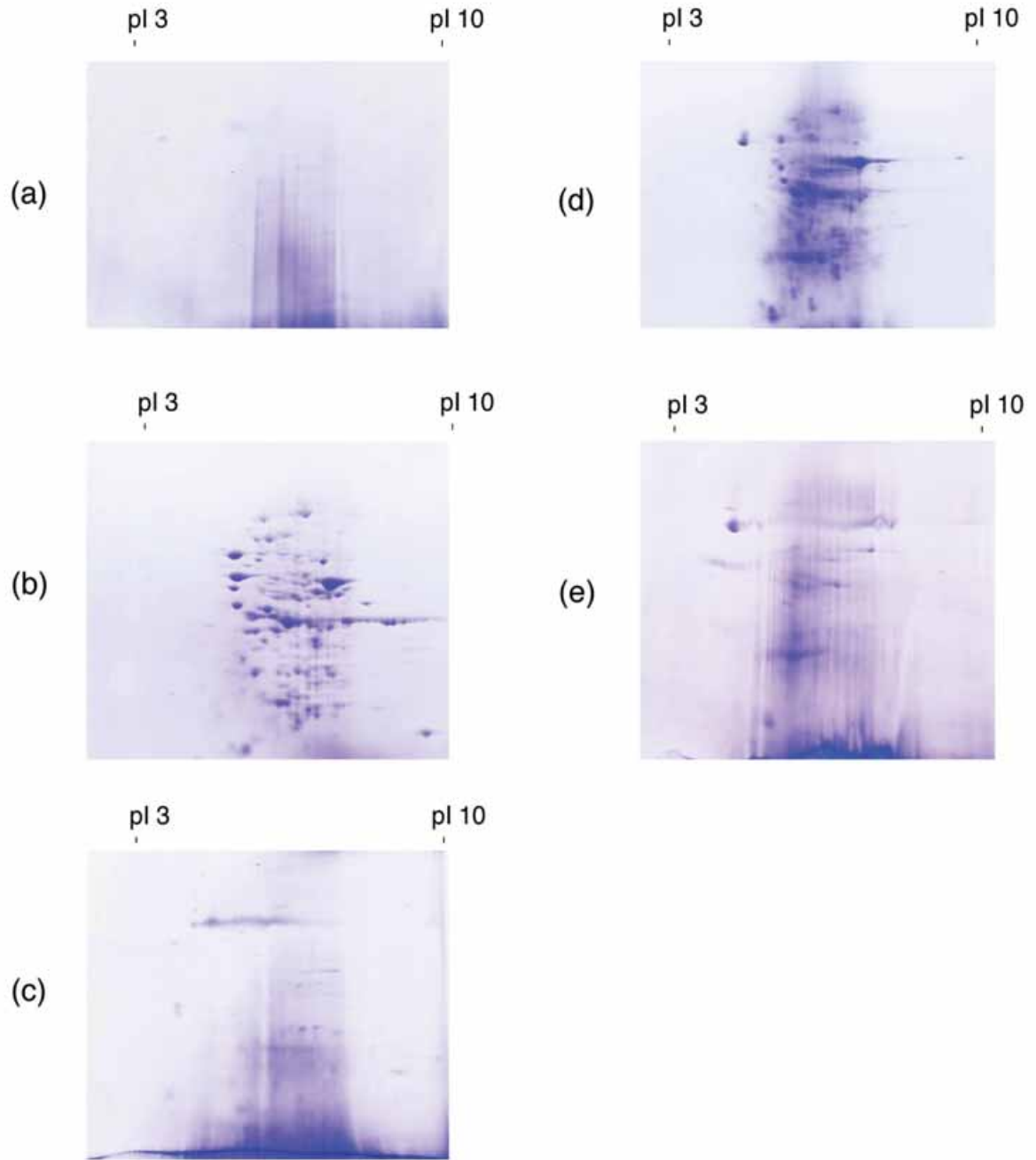


図 1

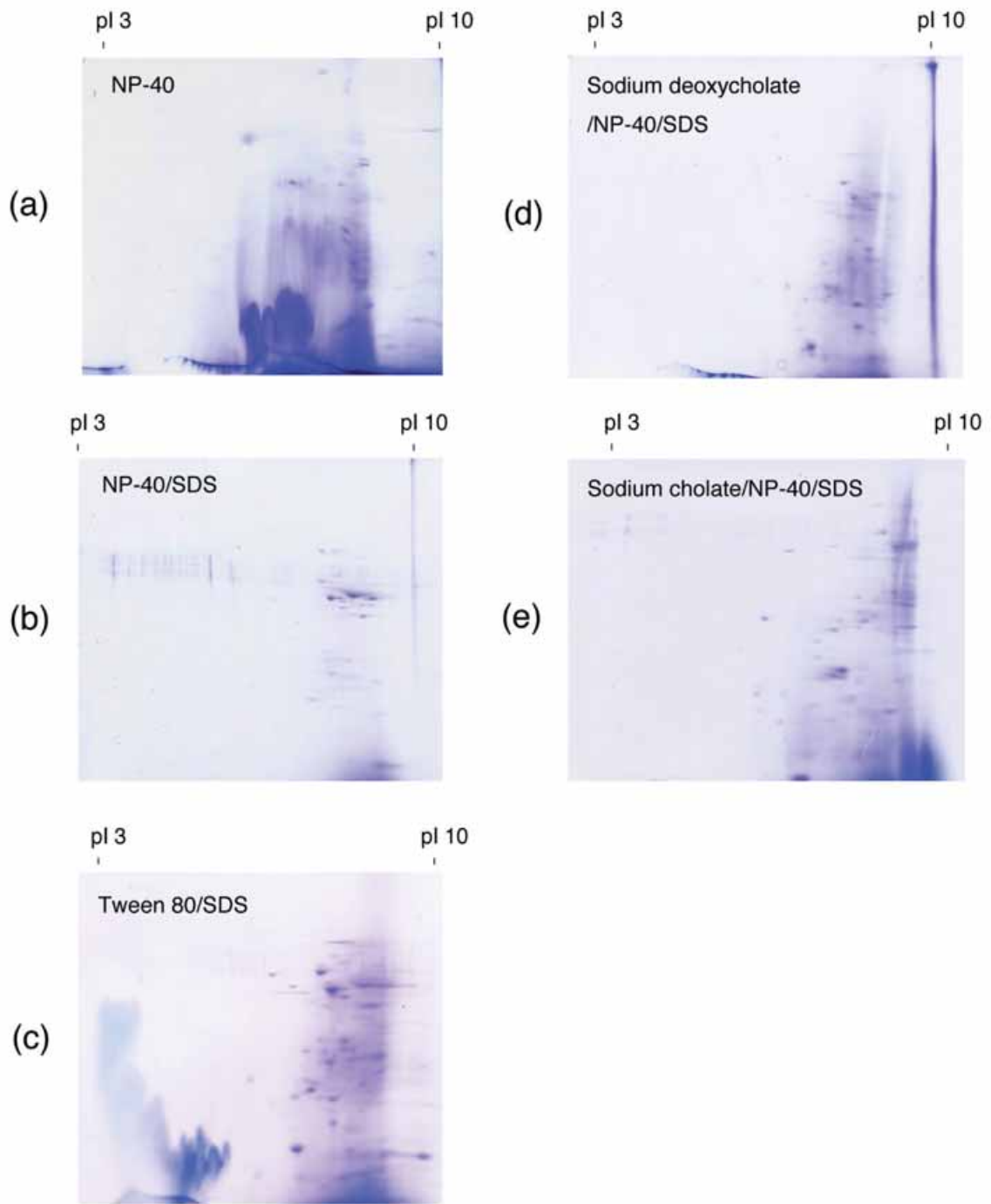


図 2

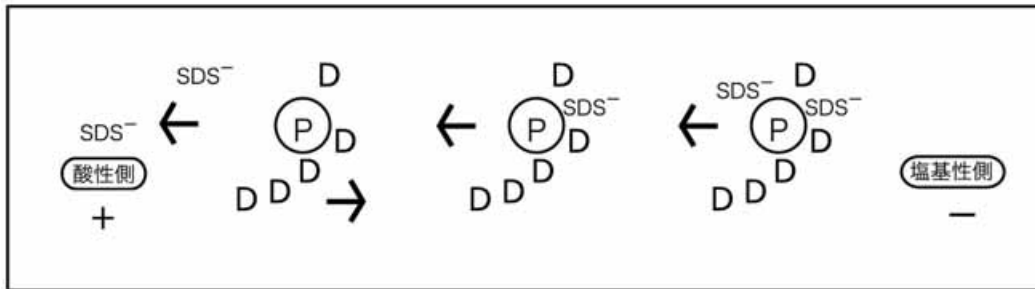


図 3