

プロテオミクスの手法による ウシホエイ蛋白質の品種間比較

福 田 健 二

畜産衛生学専攻食品衛生学講座助教

1. 目 的

ウシの乳中蛋白質に関する研究の歴史は古く、ホエイに含まれる蛋白質成分に関する知見も数多い。免疫グロブリン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンといったホエイの主要成分以外に、酸化還元酵素、加水分解酵素をはじめ数十種類に及ぶ酵素の存在も明らかとなっている。しかし、これら微量蛋白質が品種間でどのように異なるのか比較検討した研究はあまり知られていない。そこで、プロテオミクスの手法を用いてウシホエイ蛋白質の品種間比較を行ない、品種間差の有無ならびにその生理的意義について明らかにすることを目的として実験を行なった。

2. 方 法

(1) 試料調製

スイスベルン大学にて採取された Angus, Eringer, Limousin, F1 (Limousin \times Red Holstein) および帯広畜産大学フィールド科学センターにて採取された Holstein-Friesian の常乳を試料として用いた ($n = 5$)。採取した乳にプロテアーゼ阻害剤を加え、遠心分離 (500 $\times g$, 10min, 20 $^{\circ}C$) により脱脂および細胞の除去を行なった。さらに遠心分離 (4,000 $\times g$, 30min, 20 $^{\circ}C$) を数回繰り返し完全に脂肪を除去した後、酢酸で pH を 4.6 に調整し、遠心分離 (41,000 $\times g$, 4 $^{\circ}C$, 1 h) によりカゼインを除去した。次に核酸を QIAshredder (QIAGEN) により低分子化し、PD-10 カラム (Amersham Biosciences) を用いて脱塩操作を行なった。脱塩後、YM-3 および YM-30 を用いた限外ろ過により粗分画したものを試料として二次元電気泳動に供した。なお、試料溶液の蛋白質濃度は Bradford 法により、ウシ血清アルブミンを標準物質として比色定量した。試料溶液は使用時まで $-20^{\circ}C$ にて保存した。

(2) 二次元電気泳動

以下の手順に従い、二次元電気泳動法による蛋白質スポットの分離を行なった。可溶化バッファー (5M Urea, 2M Thiourea, 0.25% (w/v) CHAPS, 0.25% (v/v) Triton X-100, 2mM TBP, 5% (v/v) glycerol, protease inhibitor cocktail, Bio-lite 3/10, 0.002% (w/v) BPB, 10% (v/v) isopropanol, 12.5% (v/v) water-saturated isobutanol) 500 μ l を用い、IEF ゲルストリップの膨潤を行なった (20 $^{\circ}C$, 15h)。膨潤したゲルにサンプルローディングカップを用いて試料 (蛋白質量 100 μ g) を添加し、等電点電気泳動を行なった。泳動条件は、150V, 1 時間, 250V, 1 時間, 400V, 1 時間, 400V \rightarrow 4000V (直線勾配), 10 時間 (計 18,800Vhrs) とした。次に, dithiothreitol

ならびに iodoacetamide を用いて、定法に従い還元アルキル化を行ない、SDS-PAGE (200V, voltage constant, 40min) に供した。なお、SDS-PAGE は12.5% スラブゲル (80×73mm mini-gel, BioRad) を用いて行なった。泳動終了後、シルバーステインキット (BioRad) を用いてゲルの染色を行なった。

(3) 蛋白質スポットの検出ならびにペプチドマスフィンガープリンティング

ゲルの画像解析ならびに蛋白質スポットの検出には、PDQuest version 7.3.1 (BioRad) を使用した。蛋白質スポットを切り出し、30mM potassium ferricyanide/100mM sodium thiosulfate により脱銀後、トリプシンによるゲル内消化を行なった。消化ペプチド断片を抽出し、autoflex II (Bruker Daltonics) による質量分析に供した。マトリクスは α -cyano-4-hydroxycinnamic acid または 2,5-dihydroxybenzoic acid を用いた。得られたマスリストを元に、database は NCBI nr, taxonomy は other mammalia, fixed modification は cystein carbamidomethylation, missed cleavage は 1 または 2, mass tolerance は100から500ppm の条件で MASCOT 検索を行なった。なお、variable modification は適宜変更した。

3. 結 果

蛋白質スポットが多く観察された pI 5 から 8 の範囲に絞り、二次元ゲルの比較を行なった (図1)。Holstein-Friesian は限外ろ過未処理の試料, Limousin および Angus は限外ろ過済みの試料を用いて得られた結果を示した。限外ろ過により、ホエイ中の主要蛋白質である IgG およびトランスフェリンが効率的に除去された。ゲルの比較および質量分析器を用いたペプチドマスフィンガープリンティングによる蛋白質スポットの同定結果から、以下のことが明らかとなった。すなわち、カゼイン、免疫グロブリン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンなどホエイ中で多くの割合を占める蛋白質には品種間での差異は認められないが、pI 6 から 7 かつ分子量20kDa 付近の微量蛋白質スポット群に明らかな品種間差が認められた (図1, 枠内)。この領域において、Angus では明瞭なスポットがまったく検出されなかったのに対し、Friesian-Holstein では2個程度、Limousin では10個程度のスポットが検出された。なお、今回使用した試料では、明瞭な個体間差は認められなかった。また、Eringer ならびに F1 (Limousin × Red Holstein) は試料量が少なく、十分な解析を行なうことはできなかった。

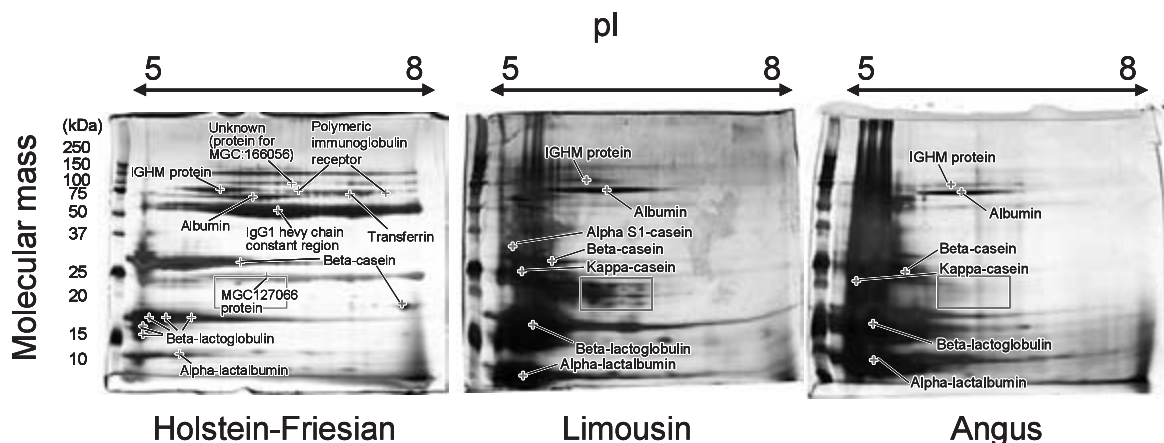


図1. 異なる品種から調製したホエイ蛋白質の二次元電気泳動パターン比較

4. 考 察

本研究の結果、ウシホエイに含まれる蛋白質のうち、主要成分に大きな差異はないが微量成分には明瞭な品種間差のあることが明らかとなった。これら微量成分の同定はこれからの課題であり、その品種独自の蛋白質成分であるのか、あるいは品種間で共通に見出されるが異なる翻訳後修飾や断片化などにより生じたアイソフォームであるのかなど興味を持たれる。また、詳細に調べていない酸性および塩基性蛋白質群にも何らかの差異を見出す可能性がある。さらに詳細に微量蛋白質の比較を行なうには、前処理により試料から α -ラクトアルブミンおよび β -ラクトグロブリンを除去することが必要である。

5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました財団法人帯広畜産大学後援会に、厚く御礼申し上げます。乳試料の提供に尽力して下さいましたスイスベルン大学の Rupert M. Bruckmaier 教授に感謝いたします。また、本研究を行なうにあたり帯広畜産大学原虫病センターの所有する質量分析器を使用させていただきましたことに感謝申し上げます。

キーワード：ホエイ，プロテオーム解析，品種間差