

# プロテオーム解析によるウシ特定危険部位特異的蛋白質の 検出とその応用

福田 健二

畜産衛生学専攻食肉乳衛生学講座助手

## 1. 目 的

BSE が大きな社会問題となっているが、屠畜場における最も大きな問題は、ウシの脳組織など特定危険部位の枝肉への混入である。これまで開発されてきた BSE 検出キットは、すべてプリオン蛋白質あるいはそのペプチド断片をもとに作成した抗体を用いた ELISA 法によるものである。しかしながら、従来のキットでは枝肉に微量混入した異常プリオン蛋白質の検出には限界がある。また、ELISA 法の改良や免疫 PCR 法などの開発が進められているが、簡便性や価格など一般に広く普及するためには依然として解決すべき問題が残っている。そこで、プリオン蛋白質ではなく法令で定められた特定危険部位に特異的に発現している蛋白質に着目し、これを指標とすることで枝肉への特定危険部位の混入そのものの検出を試みる。本研究では、ウシあるいはブタを材料として実験を行ない、各特定危険部位特異的に発現している蛋白質、あるいは特定危険部位に共通して発現している蛋白質をプロテオーム解析により検出し、簡易、迅速、安価な BSE 検出キットの開発をめざす。

## 2. 方 法

### (1) 試料調製

まず、入手の容易なブタの脳組織を試料として用い、以下の方法に従い蛋白質の抽出を行なった。凍結保存 (-30℃) したブタの脳組織 400mg に boiling lysis buffer (60 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol) 2 ml と哺乳類組織用プロテアーゼインヒビターカクテル (SIGMA) を加えよく攪拌し、超音波破碎 (30W, 30sec, on ice) により細胞を破壊した。その後、70℃で10分間インキュベーションを行ない、室温に戻してから 15,000rpm で 2 時間遠心分離し、上清を回収した。QIAshredder (QIAGEN) を用いて同溶液の粘性を低下し、PD-10 カラム (Amersham Biosciences) による脱塩操作を行ない、これを試料溶液として使用した。BSA を標準物質として用い、試料溶液の蛋白質濃度を Bradford 法により比色定量した。なお、試料溶液は使用時まで -20℃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。Lysis buffer (5 M Urea, 2 M Thiourea, 0.25% (w/v) CHAPS, 0.25% (v/v) Triton X-100, 2 mM 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) と試料 (蛋白質量50 $\mu$ g) を混合し, IEF ゲルストリップの再膨潤を行なった (20 $^{\circ}$ C, 15h)。等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) の泳動条件は, 150V, 1時間, 250V, 1時間, 400V, 1時間, 400V – 4000V (直線勾配), 10時間 (計 18,800Vhrs) とした。IEF 終了後, DTT ならびに Iodoacetamide を用い, 定法に従いゲル中試料の還元アルキル化を行なった。還元アルキル化後の IEF ゲルストリップを SDS-PAGE (200V, voltage constant, 40min) に供した。なお, SDS-PAGE は12.5% スラブゲル (80x 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) を用いてゲルの銀染色を行なった。

### (3) 蛋白質スポットの検出

銀染色した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。

## 3. 結 果

上述の蛋白質抽出法を用い, ブタ脳組織400mg から3.5ml の蛋白質溶液 (4.65mg/ml) を得ることができた。また, 上述の条件で行なった二次元電気泳動ならびに得られたゲルの画像解析の結果, 約130個の蛋白質スポットを検出した (右図)。特に, 分子量25kDa 以下 pH4.5から8.5の範囲に明瞭なスポット群を検出することができた。

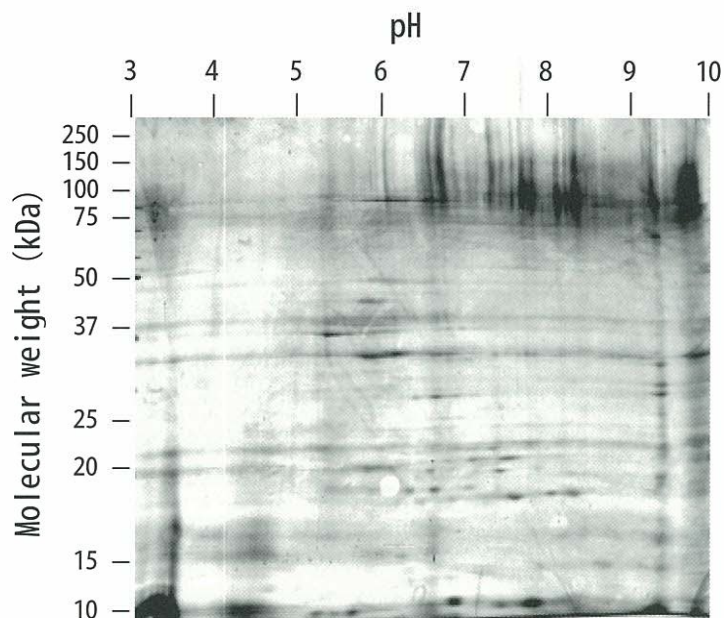


図 ブタ脳組織から抽出した蛋白質の二次元電気泳動パターン

## 4. 考 察

二次元電気泳動法を利用したプロテオーム解析では, 泳動条件の最適化が最も重要なステップである。全体にわたるラテラルストリーキング, 高分子領域でのパーティカルストリーキングが認められ, 試料として用いる蛋白質量を減らす, あるいは蛋白質可溶化に用いたバッファの組成を再検討するなど, さらなる分離条件の改善が必要である。ここには示していないが, カップローディング法による塩基性領域のストリーキング改善効果は認められなかった。

本実験により得られた結果から, 分子量の比較的小さな蛋白質群の分離が良好であることが明らかとなった。従って, 狭域 pH ゲルストリップを用いた IEF ならびに高濃度ゲルを用いた SDS-PAGE を行ない, これら低分子領域に観察される蛋白質群のさらに詳細なマッピングを行なう予定である。

今後は, 本実験で用いた方法をウシ枝肉ならびに各ウシ特定危険部位に適用し, ゲルマップの作成および特異的に発現している蛋白質の検出を試みる。また, 質量分析器やマイクロシーケンシング等の手法を用いた発現蛋白質の同定にも着手する。

## 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。