

活 用 技 術

平成 2 1 年度

リバーズザイモグラフィ - を利用した高感度プロテアーゼ阻害因子の網羅的同定方法		
[要約] <u>二次元電気泳動</u> を行ったタンパク質試料から、 <u>リバーズザイモグラフィ</u> にて <u>プロテアーゼ阻害活性</u> を高感度に検出し、 <u>質量分析装置</u> を用いたタンパク質同定によって微量に含まれる <u>新規プロテアーゼ阻害因子</u> を同定できる。		
農業総合研究所食品研究センター 食品工学科	連絡先	TEL 0256-52-3267 FAX 0256-52-6634

[背景・ねらい]

歯周病菌や植物病原菌のタンパク質分解酵素であるシステインプロテアーゼは、生育や病原性の発現に重要な役割を果たしているが、このプロテアーゼ活性を抑制するシステインプロテアーゼ阻害因子も生体内で恒常性の維持や感染防御で重要な役割を果たしており、微生物制御などの生物農薬や新規機能性食品素材としての応用が期待される。しかしながらタンパク質性の当該阻害因子は一般的に極めて微量にしか存在しないためこの同定は困難を極めている。そこで、リバーズザイモグラフィ - を利用して高感度でタンパク質性の新規システインプロテアーゼ阻害因子を網羅的に検出し、成分を同定する方法を提供する。

[成果の内容・特徴]

1. タンパク質試料を二次元電気泳動にて分離し、タンパク質を染色する(図 1)。それと平行して、標的とするシステインプロテアーゼ溶液中に電気泳動したゲルを浸した後、基質を染みこませた膜と貼り合わせてインキュベートし、活性染色を行う(リバーズザイモグラフィ -、図 2)。基質の分解を抑制したスポットをプロテアーゼ阻害因子として検出できる。
2. 検出したスポットをゲルから切り出し、質量分析計とデータベース検索によってタンパク質を同定できる(表 1)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本技術の実施には、タンパク質電気泳動および質量分析計を使用できる技術が必要である。
2. 用いる酵素や基質等を違えることにより、システインプロテアーゼ以外のプロテアーゼ阻害因子やプロテアーゼ自体の検出にも広く使用できる。
3. 質量分析計によるタンパク質の同定は、ゲノム配列データベースに基づいた同定方法であるため、配列情報のないタンパク質については同定できない。

[具体的データ]

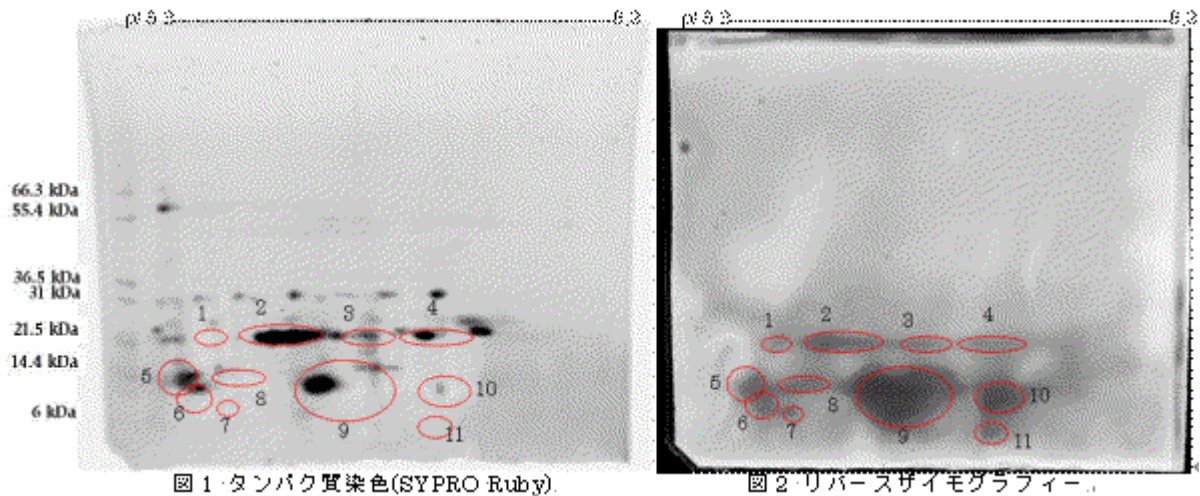


図1・タンパク質染色(SYPRO Ruby).

図2・リバースサイモグラフィー。

測定条件例

- ・タンパク質染色： 活性染色後のゲルを Sypro Ruby にて染色し、落射青色 LED460nm で撮影
- ・リバースサイモグラフィー：
 - SDS 除去したゲルを歯周病菌システインプロテアーゼ 0.2mg/ml 溶液中(100mM HEPES/150mM NaCl/ 5mM CaCl₂/ 0.05%CHAPS(pH7.5)) で 30min(4)振とう後、水を切り、100mM Z-Phe-Arg-MCA を浸漬したセルロースアセテート膜を重ね、37 °60min 反応。遊離した AMC を UV365nm で検出。

表1 質量分析計によるタンパク質の同定

スポットNo.	同定されたタンパク質		
	コメント	分子量(kDa)	pI
2	19 kDa globulin precursor	18.90	6.47
4	19 kDa globulin precursor	18.90	6.47
5	19 kDa globulin precursor	18.90	6.47
9	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor	13.00	5.30
10	Seed allergen RA17	15.13	6.54
	Alpha-amylase/trypsin inhibitor	13.16	6.80

測定条件例

- ・タンパク質染色したゲルから、目的スポットの切り出し
- ・ゲルスポットを、還元・アルキル化処理し、トリプシン消化
- ・MALDI-TOF/TOF にて分析し、データベース(MASCOT)検索にて同定

[その他]

- 研究課題名： イネシステインプロテアーゼ阻害因子を機能性成分とする食品素材の研究・開発
- 予算区分： 県単特別
- 研究期間： 平成 17～20 年度
- 発表論文等： Analytical Chemistry Insights, 2, 51-59 (2007)