

光依存性細菌由来の機能物質のタンパク質解析

Analysis on protein of extracellular material from photosynthetic bacteria

0540404 伊藤瑞希 大瀧雅寛

Mizuki ITO and Masahiro OTAKI

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻

1 はじめに

Rhodobacter sphaeroides は、高い脱色速度を持つ光依存性細菌である。これまでの実験結果からこの光依存性細菌は、可視光照射下において染料の脱色効果を持つことがわかっている。また、光依存性細菌の菌体外に分泌される細胞由来物質にも、染料や一般排水二次処理水の脱色効果を持つことがわかっている。この細胞由来物質による染料の脱色反応は、対象とする染料の反応機構が構造的に依存することもわかっている。¹⁾

本研究では、光依存性細菌細胞由来物質の脱色反応は酵素によるものと仮定し、このタンパク質の解析を検討することとした。この方法としてはプロテオーム解析方法を行う予定であるが、その前段階として、細胞由来物質溶液がどのくらいのタンパク質を含有しているかを調べる必要がある。そこでまずタンパク質の定量実験を行うこととした。

2 タンパク質の検出・定量

タンパク質とは 20 種類のアミノ酸がペプチド結合で直線につながった高分子である。アミノ酸の種類により、物理的・化学的性質に個々の特徴をもっている。このことを利用してタンパク質の検出・定量には様々な方法がある。定量にあたっては最適な測定方法を選択することが重要である。Table.1 に一般的に用いられる測定法の例を示す。今回の定量実験では、タンパク質のおおよその量を知るための定量実験であるため、タンパク質総量を定量でき、感度が最も高く、簡便な方法として色素結合法：Bradford 法を採用した。^{2) 3)}

Table.1 Method for measuring on protein

	測定原理	検出範囲 μg	測定制度	妨害物質
色素結合法 Bradford法	塩基性・芳香性アミノ酸と色素の結合	2~10	タンパク質間のばらつきが大きい	界面活性剤
ピシコニン酸法 BCA法	ペプチド結合によるCu ²⁺ の還元	20~100	タンパク質間のばらつきが少ない	還元性試薬 キレート剤
ピウレット法	ペプチド結合によるCu ²⁺ の還元	1000~5000	タンパク質間のばらつきがほとんどない	妨害物質は少ない
ローリー法	ペプチド結合によるCu ²⁺ の還元	20~100	タンパク質間のばらつきが少ない	還元性試薬 界面活性剤ほか多数
ニンヒドリン法	加水分解後の遊離アミノ酸による発色	20~50	タンパク質間のばらつきが少ない	アンモニウムイオン
ウェスタンブロット法	特異的抗体の結合と抗体の検出	0.00001~	定量性はあまりよくない	抗体と結合する他のタンパク質など
ELISA法	特異的抗体の結合と抗体に結合させた酵素の反応	0.001~0.1	同じタンパク質の標準物質があれば高精度	抗体と結合する他のタンパク質など
紫外吸収法	芳香族アミノ酸の吸収	30~2000	タンパク質間のばらつきが大きい	紫外吸収のある界面活性剤、核酸など
乾燥重量測定法	純粋タンパク質の重量測定	2000~10000	タンパク質が純粋であれば正確	不揮発性のきょう雑物質
ケルダール法	アンモニア性窒素の定量	1000~100000	タンパク質間のばらつきが少ない	核酸 アミノグリコシド、アンモニア

3 実験方法

光依存性細菌を単離培養し、5,800 rpm で約 4 分間遠心分離させ、上澄みだけを分取した。この溶液を濾過（孔径 0.45 μm ）して細胞を完全に除去した濾液を細胞由来物質溶液として各実験を行った。

3.1 Bradford 法原理

クーマシーブリリアントブルー：CBB は、酸性条件下においてアルブミンのような球状タンパク質と結合し、色調が赤紫（吸光波長 465 nm）から青（吸光波長 595 nm）に変化する特性をもつ。結合後の 595 nm の吸光度を測定してタンパク質濃度を定量する。色素の変色は、タンパク質のアルギニンやリシン残基と色素のスルホン酸基の結合、非極性アミノ酸とトリフェニルメチル基の結合に基づいており、

タンパク質のアミノ酸組成によって呈色強度が大きく変わる。

3.2 タンパク質の定量実験

培養時間の異なる3種類の細胞由来物質溶液を使用した。それぞれ溶液A, B, Cとした。各細胞由来物質溶液1 mLにCBB試薬5 mLを加えて攪拌した。室温で5分間放置し、分光光度計で595 nmの吸光度を測定した。タンパク質定量の検量線作成のため、標準タンパク質溶液として、ウシ血清アルブミン(BSA)溶液を使用した。

4 実験結果及び考察

Fig.1にCBB試薬を用いたBSA溶液から作成した検量線を示す。

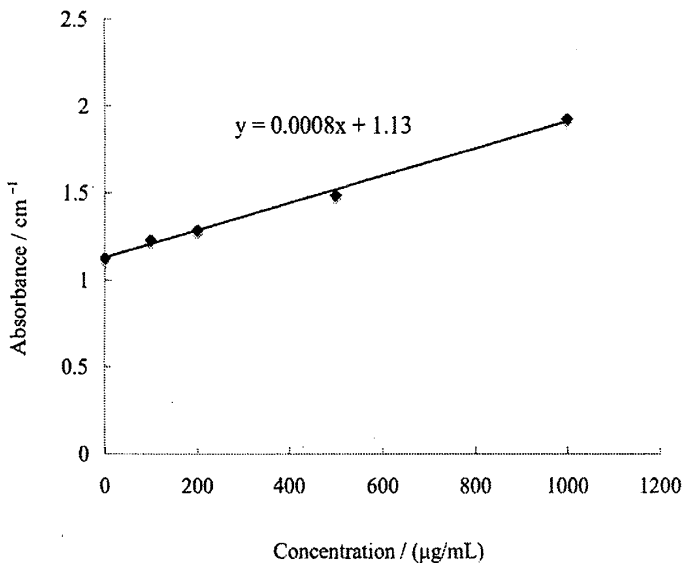


Fig.1 Standard curve for determining bovine serum albumin using Coomassie Brilliant Blue G-250

元の試薬の色は赤紫色であったが、MilliQ水で希釈を行ったところ、深緑色に変化した。原因の一つとして、MilliQ水の容器であるポリ容器から溶出物質との反応の可能性が考えられるが良くわかっていない。しかし、Fig.1に示す検量線の直線性が良いことから、このままタンパク質の定量に用いることとした。

Table.2に、光依存性細胞由来物質溶液に適用したときの、595 nmの吸光度および、検量線より求めたアルブミン換算のタンパク質量測定の結果を示す。

Table.2 Absorbance and Concentration of extracellular material solution

	A	B	C
Absorbance (595nm) cm ⁻¹	1.2	1.219	1.24
Concentration of bovine serum albumin µg/mL	94.75	116.75	138.13

この結果、いずれの細胞由来物質溶液においてもタンパク質がアルブミン換算で、約100 µg/mL含まれることがわかった。

また、細胞由来物質の他に溶液に含まれると考えられる細菌培養用の培地溶液を用いてコントロール実験を同様に行ったが、タンパク質は検出されなかった。このことより、溶液中には細胞由来物質のみで、100 µg/mL (アルブミン換算) が存在することがわかった。

しかし、色素結合法ではウシ血清アルブミンの発色強度が高いため、多くのタンパク質の測定値が実際の濃度より3-7割低い値になると言われている。従って実際は100 µg/mL以上の値であることも考えられる。

5 まとめ

光依存性細菌の細胞由来物質溶液には、少量ではあるが、タンパク質(アルブミン換算)を100 µg/mL以上含むことがわかった。細胞由来物質の構造解析のプロテオーム解析を行うためには、タンパク質が370 µg/mL以上必要であるため、この溶液をさらに濃縮する必要がある。

6 参考文献

- 1) 伊藤瑞希 平成16年度卒業論文 光依存性細菌の細胞由来物質による排水の光脱色反応
- 2) 堀尾武一 蛋白質・酵素の基礎実験法
- 3) 日本生化学会 編 基礎生化学実験法3 (タンパク質I) 東京化学同人
- 4) ヴォート基礎生化学 東京化学同人