



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



水産系廃棄物ホタテガイ貝殻から単離した90kDaタンパク質の生理活性作用と構造

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福田, 学 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/00005117

平成 25 年度
博士学位論文

水産系廃棄物ホタテガイ貝殻から単離した
90kDa タンパク質の生理活性と構造

2014 年 3 月
福田 学

目次

1 章 序論	3
2 章 ホタテガイ貝殻有機成分に含まれる食物繊維様物質の同定	6
2-1 実験方法	7
2-2 結果	50
2-3 考察	66
3 章 90kDa タンパク質の活性酸素消去活性作用	68
3-1 実験方法	69
3-2 結果	72
3-3 考察	79
4 章 90kDa タンパク質のプロテアーゼ活性作用	81
4-1 実験方法	82
4-1 結果	97
4-3 考察	109
5 章 総括・結論	110
参考文献	112
謝辞	116

1 章 序論

1 章 序論

ホタテガイ (*patinopecten yessoensis*) は、北海道において水揚げ量が年間約 40 万トンにも上る重要な海産物のひとつである。しかし、ホタテガイ重量の約 50% にあたる貝殻約 20 万トンが水産系廃棄物として廃棄されている。これは水産系廃棄物全体の約 45% にものぼるため、廃棄物処理の観点からホタテガイ貝殻の処理は急務とされている。さらに、貝殻は焼却等の処理や運搬に要するコストが高く、また埋立て処理の用地が不足していることから一部が投棄されており、社会的に問題とされている。ホタテガイ貝殻は、カキ等の養殖資材、土壌改良資材や暗渠資材といった農業資材、道路舗装材や凍上抑制材といった建設資材などとして多くがリサイクルされている。しかしながら、本来工業用炭酸カルシウムは安価であるため、貝殻をより効率的に利用するためには高い付加価値を見出し、差別化を図る必要がある。

ホタテガイの貝殻は、骨や歯、卵殻などと同様に生物が作り出す鉱物、バイオミネラルのひとつであり、主に外敵からの防御に機能している。成分は約 99% の炭酸カルシウム結晶と約 1% の有機成分から成る。有機成分はコンキオリンと総称されるタンパク質を主とする。これは外套膜上皮組織より合成・分泌され、貝殻の形成に重要な役割を果たしているといわれている。本研究室の劉らは、貝殻と同じ機構で形成する真珠が漢方薬や化粧品素材などとして利用されていることに着目して、ホタテガイ貝殻の有機成分について生理活性作用の探索を試み、貝殻有機成分が活性酸素消去活性、皮膚線維芽細胞増殖促進活性などいくつかの生理活性作用を持つことを明らかにしてきた [24]。本研究においても、貝殻有機成分の生理活性作用に注目してホタテガイ貝殻の有効利用の検討を試みた。

生活習慣病の 1 つである脂質異常症は、近年増加傾向にあるメタボリック症候群の原因となっており問題視されている。その要因の 1 つであるコレステロールは、体内で過剰に増加することでメタボリック症候群のほか、動脈硬化の原因であるアテロームの主成分であることや心筋梗塞を引き起こす原因となるため、体内コレステロール量の正常化が必要である。

コレステロールはステロイドに分類され、-OH 基が結合していることからステロールに分類される有機化合物の一種である。コレステロールはヒトを始め、動物の形質膜の主成分の 1 つであり、-OH 基が存在するため僅かに両親媒性で OLC 細胞膜中に存在し、細胞膜の強度を上げている。ヒトを始めとした哺乳類は、コレステロールを生体内でスクアレンからラノステロールを経て生合成し、血漿に含まれるリポタンパク質と呼ばれる粒子を媒体として輸送する。このコレステロールとリポタンパク質の複合体が LDL または HDL と呼ばれるものであり、食生活や運動不足などでこの LDL と HDL のバランスが崩れることにより、動脈硬化などの脂質異常症に因む病気を発症する可能性を高くする。

本研究室では以前、高脂肪食及びホタテガイ貝殻有機成分添加食をそれぞれラットに食餌させ、ラットの血中コレステロール量及びふん中の胆汁酸量を測定した。その結果、貝殻有機成分を食餌させたラットではコントロールと比べて血中コレステロール量の減少及びふん中の胆汁酸量の増加が起こることを明らかにした。私は、貝殻有機成分中に食物繊維様活性物質が存在すると推測し、食物繊維様物質の同定と、その物質が持つ複数の生理活性作用の検討を行った。

2章 ホタテガイ貝殻有機成分に含まれる食物繊維様物質の同定

2-1 実験方法

2-1-1 ホタテガイ貝殻有機成分の調製

[使用器具]

半透膜 Dialysis Membrane, Size 36
1000 mL 容メスシリンダー
攪拌子
スターラー
1 L 容メディウムビン
50 mL 容ファルコンチューブ
ガラス棒
コンセントレーター
遠心分離機

[使用試薬]

5 % 酢酸

[方法]

- 1, ホタテガイ貝殻約 200 g の表面に付着している藻や汚れをドライバーを用いて除去した。
- 2, 貝殻をハンマーで粉碎し、二重にした半透膜に入れて 5 % 酢酸溶液にて透析し、炭酸カルシウムを完全に除去した。
- 3, 炭酸カルシウム除去後、脱イオン水に対して透析を行い、酢酸を除去した。
- 4, 酢酸を除去後、1 L 容メディウムビンに移し、濃縮乾固した。
- 5, 乾固物を 50 mL 容ファルコンチューブに移し、少量の脱イオン水に懸濁し、ガラス棒で 30 分 ~ 1 時間混和した。
- 6, 12,000 r.p.m、10 分間で遠心分離し、上澄みをエッペンチューブに分注し、コンセントレーターにて濃縮乾固した。
- 7, 乾固後、これを貝殻有機成分とし、適量の脱イオン水に溶かして実験に用いた。

2-1-2 貝殻有機成分中に含まれる食物繊維様物質の単離

[使用器具]

50 mL ファルコンチューブ
恒温槽
pH メーター
半透膜 Dialysis membrane size 20 (Wako)
遠心分離機

[使用試薬]

ペプシン (Wako)
パンクレアチン (Wako)
 α -アミラーゼ (MP Biomedicals)
アミログリコシダーゼ (Sigma)
HCl-KCl 緩衝液 (pH 1.5)
リン酸緩衝液 (pH 7.2)
酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.75)
塩酸
水酸化ナトリウム

[試薬調整]

・ 0.2 M HCl-KCl 緩衝液

KCl	5.96 g
-----	--------

超純水 900 mL に溶かし、HCl で pH 1.5 に調整後、超純水で 1 L にメスアップした

・ 0.1 M リン酸緩衝液

NaH ₂ PO ₄	13.8 g
----------------------------------	--------

超純水 900 mL に溶かし、NaOH で pH 7.2 に調整後、超純水で 1L にメスアップした

・ 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液

酢酸ナトリウム	33.16 g
---------	---------

超純水 900 mL の溶かし、酢酸で pH 4.75 に調整後、超純水で 1 L にメスアップした

・ ペプシン溶液

ペプシン	60 mg
------	-------

0.08 M HCl-KCl 緩衝液(pH 1.5) 0.2 mL に溶かした

・パンクレアチン溶液

パンクレアチン	5 mg
---------	------

0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 1 mL に溶かした

・ α -アミラーゼ溶液

α -アミラーゼ	120 mg
-----------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

- 1, 貝殻有機成分 1.0 g を 20 mM 磷酸緩衝液 10 mL に溶かした。
- 2, 塩酸を用いて pH 1.5 に調整した。
- 3, 作製したペプシン溶液 0.2mL を添加し、混合した。
- 4, 40 °C で 1 時間攪拌しながらインキュベートした。
- 5, 水酸化ナトリウムを用い、pH 7.2 に調製した。
- 6, 作製したパンクレアチン 1 mL を添加し、混合した。
- 7, 37 °C で 6 時間攪拌しながらインキュベートした。
- 8, 作製した α -アミラーゼ溶液 1 mL を添加し、混合した。
- 9, 37 °C で 16 時間攪拌しながらインキュベートした。
- 10, 12,000 r.p.m、15 min で遠心分離し、沈殿と上澄みとに分離した。
- 11, 沈殿を超純水で洗浄し、不溶性食物繊維様物質として使用した。
- 12, 上澄みを酢酸ナトリウム緩衝液で pH 4.75 に調製し、アミログリコシダーゼ 0.1 mL 添加後、混合した。
- 13, 60 °C で 45 分間攪拌しながらインキュベートした。
- 14, 半透膜に移し、24 時間透析を行った。
- 15, 透析後、サンプルを凍結乾固したものを水溶性食物繊維様物質として使用した。

2-1-3 Sephacryl S - 300 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

[使用器具]

Sephacryl S - 300 カラム (GE Healthcare Life Sciences)
ポンプ
フラクションコレクター
試験管
分光光度計 (SMART SPEC 3000 BIO-RAD)

[方法]

- 1, Sephacryl S - 300 カラム (1.2cm × 32cm) をガラス管に充填し、超純水で平衡化した。
- 2, ホタテガイ貝殻有機成分を超純水に溶かし、カラム上に静かに加えた。
- 3, ホタテガイ貝殻有機成分が完全に浸透した後、超純水を 1 mL 静かに加えた。
- 4, ポンプに繋げ、フラクションコレクターを用いて試験管 30 本、1 mL の条件で分画した。
- 5, 分画後、吸光度 (280 nm) を測定した。

2-1-4 DEAE セルロースイオン交換カラムクロマトグラフィー

[使用器具]

DEAE セルロースカラム
ポンプ
フラクションコレクター
試験管
分光光度計
10 mL シリンジ

[使用試薬]

塩化ナトリウム
Tris - HCl (pH 7.5)

[試薬調整]

・ 1M Tris - HCl

Tris	30.25 g
------	---------

超純水 400 mL に溶かし、HCl で pH 7.5 に調整後、超純水で 500 mL にメスアップし、これを 50 倍希釈して使用した

[方法]

- 1, DEAE セルロースカラムを 10 mL シリンジに充填し、超純水で平衡化した。
- 2, S - 300 ゲルろ過カラムで集めた画分を添加し、タンパク質をカラムに吸着させた。
- 3, 20 mM Tris - HCl を流し、カラムを洗浄した。
- 4, 塩化ナトリウム溶液 0.1 ~ 0.6 M の濃度勾配で吸着したタンパク質を溶出させ、フラクションコレクターを用いて 2 mL ずつ 50 本分画した。
- 5, カラムに 0.6 M 塩化ナトリウムを流して洗浄した。
- 6, 洗浄後、超純水を流して平衡化した。

2-1-5 タンパク質の定量

紫外吸光法

[使用器具]

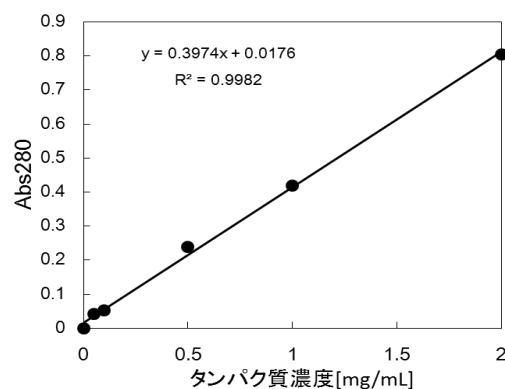
分光光度計

[方法]

- 1, サンプルの溶媒 (通常は水) を Blank とし、サンプルの吸光度 280 nm の波長を測定した。

[検量線]

BSA 濃度 [mg / mL]	Abs 280 nm
0	0
0.05	0.041
0.1	0.053
0.5	0.238
1	0.419
2	0.805



BCA 法

[使用器具]

分光光度計

[使用試薬]

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific)

BCA Reagent A

BCA Reagent B

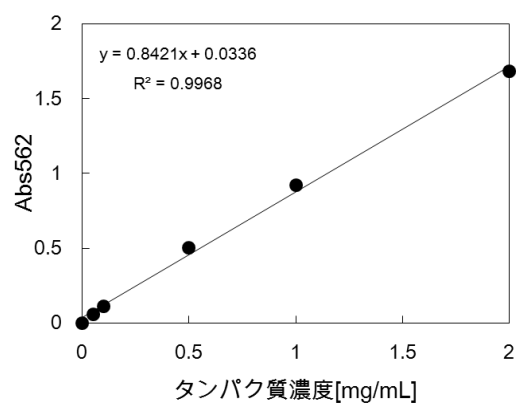
Albumin Standard Ampules (2mg / mL)

[方法]

- 1, Albumin Standard Ampules を希釈し、濃度 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg / mL 溶液を作製した。
- 2, BCA Reagent A 及び B を 50:1 で混合した BCA Working Reagent 200 μ L と各 BSA 溶液 10 μ L を混合した。
- 3, 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。
- 4, 吸光度 562 nm を測定し、検量線を作製した。
- 5, 検量線を元にサンプルのタンパク質濃度を定量した。

[検量線]

BSA 濃度[mg/mL]	Abs562nm
0	0
0.05	0.058
0.1	0.11
0.5	0.502
1	0.921
2	1.684



2-1-6 HCl を用いたタンパク質の酸加水分解とアミノ酸組成分析

[使用器具]

パスツールピペット
ガスバーナー
アスピレーター
ガラスカッター

[使用試薬]

6 N HCl

[方法]

- 1, 乾燥させたタンパク質に 6 N HCl を 100 μ L 添加した。
- 2, パスツールピペットの細い側をガスバーナーで溶かして塞ぎ、1 で作製した溶液を添加した。
- 3, パスツールピペットの入り口にアスピレーターを繋ぎ、液を吸わないように注意しながら吸引し、減圧した状態を保ちながらガスバーナーでパスツールピペットを溶かして密封した。
- 4, 前もって 110 $^{\circ}$ C にしておいた乾熱滅菌機に密封したパスツールピペットを入れ、24 時間インキュベートした。
- 5, パスツールピペットをガラスカッターで切断し、中身をエッペンチューブに移して濃縮乾固させ、アミノ酸組成分析装置を用いて組成を調べた (本研究では北海道大学共用機器管理センター委託分析部門に依頼した)。

2-1-7 SDS 電気泳動

[使用器具]

泳動槽
泳動板
泳動板用パッキン
クリップ
ゲタ
電源 (Power Supply)

[使用試薬]

2-メルカプトエタノール

N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)

20 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

30 % アクリルアミド・ビス

Lower Buffer

Upper Buffer

10% 過硫酸アンモニウム(APS)

10 × Running Buffer

Sample 処理液

[試薬調整]

・ 20 % SDS

SDS	20 g
-----	------

超純水 100 mL に溶かした

・ アクリルアミド-ビス

アクリルアミド	150 g
N,N'-メチレンビスアクリルアミド	4 g

超純水 500 mL に溶かした

・ Lower buffer

Tris	90.75 g
------	---------

超純水 450 mL に溶かし、HCl で pH 8.8 に調整後、超純水で 500 mL にメスアップした

・ Upper buffer

Tris	30.25 g
------	---------

超純水 450 mL に溶かし、HCl で pH 6.8 に調整後、超純水で 500 mL にメスアップした

・ 10 × Running buffer

Tris	1.21 g
グリシン	7.5 g
20 % SDS	2.5 mL

超純水 500 mL に溶かした

・ 10 % APS

APS	1 g
-----	-----

超純水 10 mL に溶かした

・ Sample 処理液

Tris	6.06 g
20 % SDS	1 mL
グリセロール	50 mL
ブロモフェノールブルー (BPB)	微量

超純水で 100 mL にメスアップした

[方法]

ゲルの作製

- 1, 2 枚のガラスプレートとゴムをクリップで挟んだ。
- 2, 以下の組成でゲルを作製した。

	Lower Gel	Upper Gel
アクリルアミド-ビス	2.4 mL	0.47 mL
Lower Buffer	1.5 mL	-
Upper Buffer	-	0.83 mL
超純水	2.0 mL	1.98 mL
20% SDS	30 μ L	17 μ L
APS	60 μ L	30 μ L

- 3, Lower に TEMED 10 ~ 18 μ L を加え攪拌し、即座に適量をプレートに入れ、静かに超純水を重層した。
- 4, Lower ゲルが固まり重層した水との境界がはっきり確認できるようになってから、上層の水を捨てた。
- 5, Upper に TEMED 3 ~ 6 μ L を加えて攪拌し、Lower ゲルの上に重層してコームを挿入した。
- 6, Upper ゲルが固まったらコームを抜き、超純水で well の中に残留したバッファを除き、プレートからゴムをはずした。

サンプル作製

- 1, サンプルを Sample 処理液で希釈し、2-メルカプトエタノール 1 μ L を加え、混合した。

- 2, 遠心して液を落とした後、100 °Cで 5 分間加熱処理した。
- 3, 再度遠心して液を落とし、泳動に使用した。

電気泳動

- 1, プレートを泳動槽にセットした後、1 × Running buffer 200 ~ 300 mL を調製し、泳動槽に入れた。
- 2, パワーサプライにセットし、サンプルを well にアプライして定電流 (C.C) 10 ~ 15 mA で泳動を開始した。
- 3, BPB の青い線の位置を目安に、最後まで流れたら電源を止め泳動を終了した。
- 4, 最後まで流れたら電源を止め泳動を終了した。

2-1-8 CBB 染色

[使用器具]

振とう機
タッパ

[使用試薬]

CBB 染色液
脱染液

[試薬調整]

・ CBB 染色液

CBB R - 250 or CBB G - 250	1.25 g
メタノール	225 mL
酢酸	50 mL

超純水で 500 mL にメスアップした

・ 脱染液

メタノール	25 mL
酢酸	35.25 mL

超純水で 500 mL にメスアップした

[方法]

- 1, 泳動後のゲルを CBB 染色液に浸して一晩振とうした。
- 2, CBB 染色液は容器へ戻し、ゲルは脱染液に浸して振とうした。
- 3, 脱染液が CBB の青色に染まったら、脱染液を交換した。バックグラウンドが脱色されて適度なバンドが検出できるまでこれを繰り返した。

2-1-9 Stains all 染色

[使用器具]

振とう機
タッパ

[使用試薬]

Stains all
2-プロパノール
1 M Tris - HCl (pH 7.5)
ホルムアミド

[試薬調整]

・ Stains all 染色液

stains all	1 mg
2-プロパノール	5 mL
1M Tris - HCl	0.3 mL
ホルムアミド	2 mL
超純水	20 mL

[方法]

- 1, タッパに 25% 2-プロパノール水溶液を 20 mL 加えた。
- 2, 泳動後のゲルを 2-プロパノール水溶液に浸し、10 分間振とうし、この操作を 3 回行った。
- 3, 25 % 2-プロパノール水溶液を捨て、超純水 20 mL 加えて 10 分間振とうし、この操作を 3 回行った。
- 4, 超純水を捨て、作製した stains all 染色液を加え、遮光して 1 ~ 3 時間振とうし、染色した (染色されたバンドが薄い場合、染色時間を延ばす)。

2-1-10 プロテアーゼによる分解で生じた遊離アミノ酸の定量 (TNBS 法)

[使用器具]

遠心分離機
分光光度計

[使用試薬]

アセトン
0.1 % [w/v] トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) (Wako)
4 % [w/v] 炭酸水素ナトリウム

[試薬調整]

・ 0.1 % トリニトロベンゼンスルホン酸

TNBS ナトリウム 2 水和水	10 mg
------------------	-------

超純水 10 mL に溶かした

・ 4% 炭酸水素ナトリウム

炭酸水素ナトリウム	400 mg
-----------	--------

超純水 10 mL に溶かした

[方法]

- 1, プロテアーゼ処理したサンプルを回収し、アセトンを 67 % [v/v] となるように添加し、-20 °C で冷却することで不完全消化タンパク質及びペプチドを沈殿させた。
- 2, 14,000 r.p.m で遠心分離して上清を回収後、0.1 % TNBS 溶液及び 4 % 炭酸水素ナトリウム溶液をそれぞれ 500 μ L ずつ添加、混合した。
- 3, 40 °C で 2 時間インキュベートした。
- 4, 吸光度 420 nm を測定することで遊離アミノ酸を定量した。

2-1-11 食物繊維様物質のタウロコール酸結合能の測定

[使用器具]

恒温槽

[使用試薬]

400 $\mu\text{mol/L}$ タウロコール酸 (Wako)

リン酸緩衝液 (pH 7.2)

エタノール (Wako)

総胆汁酸テストワコーキット (Wako)

(緩衝液、酵素剤、盲試験用酵素剤、反応停止液、標準液)

[試薬調整]

・タウロコール酸溶液

タウロコール酸ナトリウム	2.15 mg
--------------	---------

20 mM リン酸緩衝液 10 mL に溶かした

[方法]

- 1, タウロコール酸溶液 10 μL と濃度調整した食物繊維様物質溶液 90 μL を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間攪拌しながらタウロコール酸を吸結合させた(不溶性食物繊維様物質は懸濁液として用いた)。
- 2, 不溶性食物繊維様物質を用いた系は、遠心分離して上清を回収し、水溶性食物繊維様物質及び 90kDa タンパク質を用いた系は、エタノールを 300 μL 添加し、タンパク質を沈殿させ、遠心分離後上清を回収した。
- 3, 回収した上清に対し、総胆汁酸テストワコーキットを用いて食物繊維様物質と結合しなかったタウロコール酸量を測定し、食物繊維様物質に結合したタウロコール酸量を定量した。

2-1-12 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色

[使用機器]

振とう機
タッパ

[使用試薬]

12.5 % トリクロロ酢酸
1 % オルト過ヨウ素酸
フクシン染色液
0.5 % 亜硫酸水素ナトリウム

[試薬調整]

・ 12.5 % トリクロロ酢酸

トリクロロ酢酸	12.5 mg
---------	---------

超純水 100 mL に溶かした

・ 1 % 過ヨウ素酸

オルト過ヨウ素酸	2 g
----------	-----

3 % 酢酸水溶液 200 mL に溶かした

・ フクシン染色液

- 1, 塩基性フクシン 1 g を 60 °C に温めた超純水 200 mL に溶かした。
- 2, 亜硫酸水素ナトリウム 1 g を添加した。
- 3, 1 N HCl 20 mL を添加してろ過し、冷暗所に保存した。

・ 0.5 % 亜硫酸水素ナトリウム

10 % 亜硫酸ナトリウム	10 mL
1 N HCl	10 mL

超純水で 200 mL にメスアップした

[方法]

- 1, SDS 電気泳動後のゲルを 12.5 % トリクロロ酢酸に浸し 30 分間振とうした。
- 2, 12.5 % トリクロロ酢酸を廃棄し、超純水で 30 秒軽く洗浄した。
- 3, 超純水を捨て、1 % 過ヨウ素酸に浸して 50 分間振とうした。
- 4, 1 % 過ヨウ素酸を廃棄し、超純水で浸し振とうした。この操作を数回繰り返して

十分に洗浄した。

- 5, 超純水を捨て、フクシン染色液に浸し、暗所で 50 分間振とうし、染色を行った。
- 6, フクシン染色液を廃棄し、0.5 % 亜硫酸水素ナトリウム溶液に浸し、10 分間振とうした。これを 3 回もしくはバンドが見えるまで繰り返した。
- 7, 明瞭なバンドが確認できたら 0.5 % 亜硫酸水素ナトリウム溶液を廃棄し、超純水に浸しよく洗浄した。

2-1-13 糖タンパク質糖鎖の ABEE 単糖組成分析

[使用器具]

乾熱滅菌機

HPLC

Honopak C 18 (75 mm × 4.6 mm I.D.)

[使用試薬]

ABEE 糖組成分析キット プラス S

酵素溶液 (N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、ノイラミダーゼ)

TFA 溶液 (8 M)

2-プロパノール

N-アセチル化溶媒 (ピリジンを含むメタノール溶液)

無水酢酸

酢酸

還元剤 (ピリジンボランコンプレックス)

ABEE 溶液

クロロホルム

未標識単糖ミクスチャー11

A 液 : 0.2 M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.9) / アセトニトリル (93 : 7)

ホウ酸 12.37 g を超純水 0.9 L に溶解し、水酸化カリウムで pH 8.9 に調整後 1 L にメスアップした。93 : 7 になるようにアセトニトリルを加え、混合した。

B 液 : 0.02 % TFA / アセトニトリル (50 : 50)

TFA 100 μ l と超純水 0.5 L とを混合した後、アセトニトリル 0.5 L と混合した。

[分析条件]

プログラム： 0 ~ 50 min B液 0 %
 50 ~ 55 min B液 100 %
 55 ~ 75 min B液 0 %
流速： 1 mL / min
カラム温度： 30 °C
検出： 蛍光 (Ex. 305 nm、Em. 360 nm)

[方法]

酵素処理(シアル酸の遊離・変換)

- 1, 反应用試験管に糖タンパク質試料を入れ、乾固した。同時に未標識単糖ミクスチャー11についても同じ操作を行った。
- 2, 酵素溶液 10 μ L を入れ攪拌し、45 °Cで 1 時間インキュベートした。

酸加水分解

- 1, 酵素処理した試料 (10 μ L) に TFA 溶液 10 μ L を加え攪拌し、100 °Cで 3 時間インキュベートした。
- 2, 空冷した後、乾固した。
- 3, 2-プロパノールを 40 μ L 加え攪拌し、再度乾固した。

N-アセチル化

- 1, 乾固した試料に N-アセチル化溶媒 40 μ L を加え攪拌した。
- 2, 無水酢酸 10 μ L を加え攪拌し、室温で 30 分間放置した後、乾固した。

ABEE 化試薬の調製 (初回のみ)

- 1, ABEE 溶液に酢酸 170 μ L を加え、40 ~ 50 °Cに湯煎して溶解した。
- 2, 還元剤 145 μ L を加え、混合した。

単糖の ABEE 標識化

- 1, 乾固した試料に超純水 10 μ L、ABEE 化試薬 40 μ L を加え、攪拌した。
- 2, 80 °Cで 1 時間インキュベートした。
- 3, 空冷した後、超純水 200 μ L、クロロホルム 200 μ L を加え、激しく攪拌した。
- 4, 10,000 r.p.m にて 5 分間遠心した後、上層 (水層) を回収し、HPLC 分析に供与した。

HPLC 分析

- 1, 前述の条件で分析を行った。
- 2, ABEE 化した単糖ミクスチャー11 のピークの保持時間とピーク面積と比較することによって、糖タンパク質試料に含まれている単糖の組成を算出した。

2-1-14 糖タンパク質のヒドラジン分解 (N アセチル化) による糖鎖の切り出し

[使用器具]

- ネジ蓋式試験管
- ミニカラム(パスツールピペットと脱脂綿による簡易的なカラム)
- デシケーター

[使用試薬]

- 陽イオン交換樹脂 (Dowex50 W-X2)
- 無水ヒドラジン
- 飽和炭酸水素ナトリウム
- 無水酢酸
- 濃硫酸

[方法]

糖タンパク質のヒドラジン分解

- 1, サンプルをネジ蓋式試験管に入れ凍結乾燥した。
- 2, 試験管に無水ヒドラジンを加え、蓋をした (サンプルの量にあわせてヒドラジン添加量を変更した)。
- 3, 60 °C で 1 時間振とうした。
- 4, 100 °C で 5 ~ 16 時間加熱した(サンプルの種類によって加熱時間を変更した)。
- 5, 加熱後、蓋を開け、濃硫酸トラップを付けたデシケーターを用いてヒドラジンを減圧蒸留した。
- 6, 蒸留後、試験管に 150 μ L のトルエンを加え、減圧蒸留した。これを少なくとも 3 回繰り返した。
- 7, 残留物に飽和炭酸水素ナトリウムを加え混合後、20 μ L の無水酢酸を添加、混合し氷上で 5 分間静置した。

カラムの作製及びカラムによる糖鎖の精製

- 1, Dowex50 W-X2 (H⁺ 型) を約 1 g 量りとり、簡易的カラムに詰め、超純水を流して樹脂の洗浄を行った。
- 2, 樹脂を一度カラムから取り除き、50 mL フェルコンチューブに樹脂を移し、ヒドラジン分解したサンプルを加えて混合し、発砲がおさまるまで静置した。
- 3, カラムに樹脂及び液を注ぎ、フローアウトを回収した。更に樹脂の 5 倍量程度の水で洗浄し、その洗浄液も回収した。このフローアウト画分をコンセンレーターを用いて凍結乾燥し、糖鎖画分とした。

2-1-15 糖鎖画分の脱塩

[使用器具]

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit (TaKaRa)

10 mL 容シリンジ

[使用試薬]

溶媒 1 (1-ブタノール : エタノール : 超純水 = 4 : 1 : 1)

溶媒 2 (エタノール : 超純水 = 1 : 2)

[試薬調整]

・溶媒 1

1-ブタノール	16 mL
エタノール	4 mL
超純水	4 mL

・溶媒 2

エタノール	5 mL
超純水	10 mL

[方法]

- 1, 凍結乾燥させた糖鎖画分に 400 μ L の超純水を添加して溶かし、10,000 r.p.m、2 分間遠心して上清を回収し、エタノール 400 μ L、1-ブタノール 1600 μ L を添加、混合した (タンパク質の沈殿が生じた場合は無視する)。
- 2, カートリッジにアダプターを装着し、シリンジを用いて超純水 10 mL を流して平

平衡化した (2~5 滴 / 秒)。この平衡化を少なくとも 3 回行った。最後に空気を押し込み、超純水を除去した。

- 3, 溶媒 2 を 10 mL 流し (2~5 滴 / 秒)、洗浄した。最後に空気を押し込み、溶媒 2 を除去した。
- 4, 溶媒 1 を 10 mL 流し (2~5 滴 / 秒)、平衡化した (溶媒 1 がカラムより僅かに上になる状態にする)。
- 5, アダプターをはずし、カートリッジにサンプル溶液を添加し、シリンジを用いて空気でゆっくり押し出し(1 滴 / 秒)、サンプル溶液がカラムの上端ぎりぎりのところで止めた。
- 6, サンプル溶液の入っていた容器に溶媒 1 を 1 mL 添加して洗浄し、その洗浄液を 5 の要領で行った。この作業を 2 回行った。
- 7, カートリッジに溶媒 1 を流し、カートリッジを洗浄した。
- 8, アダプターをはずし、カートリッジに溶媒 2 を 2 mL 加え、シリンジを用いて空気でゆっくり押し出し(1 滴 / 秒)、その液を回収した。この操作を 2 回行った。
- 9, 回収した溶液を凍結乾燥し、PA 化用の試料とした。

2-1-16 糖鎖のピリジルアミノ化 (PA 化)

[使用器具]

恒温槽

[使用試薬]

Prydylamination Manual Kit (TaKaRa)

カップリング試薬(アミノピリジン)

還元試薬(ボラン-ジメチルアミン コンプレックス)

酢酸

[試薬調整]

・カップリング溶液

カップリング試薬	300 mg
----------	--------

80°Cで加熱しながら酢酸 100 μ L に溶かした

・還元溶液

還元試薬	4 mg
------	------

酢酸 20 μ L に溶かした

[方法]

- 1, 凍結乾燥したサンプルにカップリング溶液を 20 μ L 添加、混合し、80 $^{\circ}$ C で 1.5 時間インキュベートした。
- 2, 還元溶液を 20 μ L 添加、混合し、80 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。
- 3, PA 化後速やかに脱塩を行った (保存は -20 $^{\circ}$ C で 1 週間程度)。

2-1-17 PA 化した糖鎖の脱塩

[使用器具]

Cellulose Cartridge Glycan preparation kit (TaKaRa)

10 mL 容シリンジ

[使用試薬]

溶媒 1 (1-ブタノール : エタノール : 超純水 : 酢酸 = 4 : 1 : 0.97 : 0.03)

溶媒 2 (エタノール : 75 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 = 1 : 2)

[試薬調整]

・溶媒 1

1-ブタノール	16 mL
エタノール	4 mL
酢酸	120 μ L
超純水	3.88 mL

・溶媒 2

エタノール	5 mL
75 mM 重炭酸アンモニウム水溶液	10 mL

[方法]

「2-1-15 糖鎖の脱塩」と同じ要領で脱塩を行った。

2-1-18 アミドカラムによる糖鎖の分画

[実験器具]

HPLC

TSKgel Amide-80 (250 mm × 4.6 mm I.D. TOSOH)

[使用試薬]

A 液 (アセトニトリル : 500 mM 酢酸トリエチルアミン (pH 7.3) = 9 : 1)

B 液 (アセトニトリル : 500 mM 酢酸トリエチルアミン (pH 7.3) : 超純水 = 5 : 1 : 4)

PA-Glucose Oligomer (DP = 3 ~ 22 TaKaRa)

[試薬調整]

- ・ 酢酸トリエチルアミン

酢酸	5.882 mL
----	----------

超純水 150 mL に溶かしトリエチルアミンで pH を 7.3 に調整後、超純水で 200 mL までメスアップした

- ・ A 液

アセトニトリル	900 mL
500 mM 酢酸トリエチルアミン	100 mL

- ・ B 液

アセトニトリル	500 mL
500 mM 酢酸トリエチルアミン	100 mL
超純水	400 mL

[分析条件]

脱塩

プログラム : 0 ~ 60 min B 液 : 0 %

60 ~ 90 min B 液 : 0 ~ 100%

流量 : 1 mL / min

検出 : 蛍光 (Ex = 310 nm, Em = 380 nm)

分画

プログラム： 0 ~ 15 min B 液：0 %
 15 ~ 110 min B 液：0 ~ 95 %
 110 ~ 120 min B 液：95 ~ 100 %

流速：1 mL / min

検出：蛍光 (Ex = 310 nm, Em = 380 nm)

[方法]

- 1, 上記の分析条件 (脱塩) で脱塩後、糖鎖画分を回収し、コンセントレーターで凍結乾燥した。
- 2, 脱塩後の糖鎖を上記の分析条件 (分画) で糖鎖の分画を行い、検出されたピークを元に糖鎖を回収し、コンセントレーターで凍結乾燥した。

2-1-19 CLC-ODS カラムによる糖鎖の分画

[使用器具]

HPLC

Shim-pack CLC-ODS (M) (150mm×4.6mm I.D SHIMADZU)

[使用試薬]

A 液 (酢酸トリエチルアミン (pH 4))

B 液 (酢酸トリエチルアミン (pH 4), 0.5 % 1-ブタノール)

PA-Glucose Oligmer (DP = 3 ~ 22)

[試薬調整]

・ A 液

酢酸	5.882 mL
----	----------

超純水 900 mL に溶かし、トリエチルアミンで pH 4 に調整後、超純水で 1000 mL にメスアップした

・ B 液

酢酸	5.882 mL
1-ブタノール	5 mL

超純水 900 mL に溶かし、トリエチルアミンで pH 4 に調整後、超純水で 1000 mL にメスアップした

[分析条件]

プログラム : 0 ~ 10 min B 液 : 0 %
 10 ~ 110 min B 液 : 0 ~ 50 %
流量 : 1 mL / min
検出 : 蛍光 (Ex = 320 nm, Em = 400 nm)

[方法]

- 1, 上記の分析条件(分画)で糖鎖の分画を行い、検出されたピークを元に糖鎖を回収し、コンセンレーターで凍結乾燥した。

2-1-14 トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) による糖タンパク質の脱糖鎖

[使用器具]

Dialysis Membrane
ネジ蓋付き試験管
ビーカー

[使用試薬]

トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) (Wako)
アニソール (Wako)
1 M Tris

[試薬調整]

・ 1 M Tris

Tris	121 mg
------	--------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

- 1, 凍結乾燥したサンプルをネジ蓋付き試験管に加え、氷上で TFMS とアニソールを 9:1 になるよう添加し、サンプルを溶解した。
- 2, 氷上で 30 分インキュベートした (同時に作製した 1 M Tris も氷上で冷却しておいた)。
- 3, 1 M Tris を添加し溶液を中和した。
- 4, Dialysis Membrane にサンプルを加え、超純水に対して透析を行った。

2-1-15 Western Blotting 法

[使用器具]

セミドライプロッター
PVDF 膜 (MILLIPORE)
厚紙

[使用試薬]

メタノール
溶液 A
溶液 B
溶液 C
CBB 染色液 (エレクトロブロットイング用)
脱色液 A
脱色液 B

[試薬調整]

・溶液 A

Tris	18.17 g
メタノール	100 mL
20 % SDS	500 μ L

超純水で 400 mL までメスアップし、HCl で pH 9.5 に調整後、超純水で 500 mL までメスアップした

・溶液 B

Tris	1.51 g
メタノール	100 mL
20 % SDS	500 μ L

超純水で 400mL までメスアップし、HCl で pH9.3 に調整後、超純水で 500mL にメスアップした。

・溶液 C

Tris	1.51 g
メタノール	100 mL
20 % SDS	500 μ L
6- アミノ -n- カプロン酸	2.62 g

超純水で 400 mL までメスアップし、HCl で pH 9.5 に調整後、超純水で 500 mL にメスアップした (メスアップした時点で pH 9.5 以下になっていた場合調整の必要なし)。

・CBB 染色液 (エレクトロブロットティング用)

CBB - R 250	500 mg
メタノール	225 mL
酢酸	50 mL

超純水で 500 mL にメスアップした

・脱色液 A

メタノール	225 mL
酢酸	35 mL

超純水で 500 mL までメスアップした

・脱色液 B

メタノール	450 mL
-------	--------

超純水で 500 mL までメスアップした

[方法]

- 1, サンプルを SDS 電気泳動に供している間、ゲルより一回り大きな PVDF 膜及び厚紙 6 枚を用意した。
- 2, PVDF 膜の表面を親水化するため、メタノールで 5 秒ほど浸し、超純水で軽く洗浄した。
- 3, PVDF 膜を C 液に、厚紙をそれぞれ 2 枚ずつ A 液、B 液、C 液に浸し、15

分間浸透した。

- 4, 電気泳動が終わった後のゲルを適当な大きさに切り取り、セミドライプロッターに溶液 C に浸した厚紙 2 枚、泳動後のゲル、PVDF 膜、溶液 B に浸した厚紙 2 枚、溶液 A に浸した厚紙 2 枚の順にセットした。
- 5, 電源装置に繋ぎ、C. V. 10 V に設定してブロッキングした (ブロッキングの時間はゲルのサイズや Sample の種類で任意に決定した)。
- 6, ブロッキング後、PVDF 膜を取り出し、5~10 分間 CBB 染色液に浸した。
- 7, PVDF 膜を脱色液 A に 15 分間浸け、その後更に脱色液 B に 45 秒間浸けて脱色した。
- 8, PVDF 膜を乾燥させ、タンパク質が転写されたかを確認した。

2-1-16 タンパク質のゲル内消化

[使用器具]

恒温槽

[使用試薬]

V8 - endpeptidase (0.7 mg / mL)

洗浄液 (25 mM 重炭酸アンモニウム)

脱色液 / 脱水液 (25 mM 重炭酸アンモニウム / 50 % アセトニトリル)

還元液 (10 mM ジチオトレイトール (DTT) / 25 mM 重炭酸アンモニウム)

アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド / 25 mM 重炭酸アンモニウム)

抽出液 (50 % アセトニトリル / 5 % TFA)

[試薬調整]

・脱色液 / 脱水液

重炭酸アンモニウム	19.5 mg
アセトニトリル	5 mL
超純水	5 mL

・洗浄液

重炭酸アンモニウム	19.5 mg
-----------	---------

超純水 10 mL に溶かした

・還元液

DTT	1.5 mg
-----	--------

洗浄液 1 mL に溶かした

・アルキル化液

ヨードアセトアミド	10.2 mg
-----------	---------

洗浄液 1 mL に溶かした

・抽出液

TFA	500 μ L
アセトニトリル	5 mL
超純水	4.5 mL

[方法]

脱色

- 1, SDS 電気泳動後のゲルから目的のバンドを切り出し、1 mm 角程度にカットした。
- 2, ゲル片をエッペンに移し、100 μ L の脱色液を加え室温で 10 分間振とうした。
- 3, 遠心してゲル片を沈殿させ、脱色液を除去した。2、3 の操作を十分に脱色されるまで繰り返した。
- 4, 完全に脱色したゲル片にアセトニトリルを 200 μ L 加えて収縮させ、遠心してアセトニトリルを除去した。

還元アルキル化

- 1, ゲル片に還元液 100 μ L を加えて 56 $^{\circ}$ C で 45 分間反応させた。
- 2, 遠心して還元液を除去した後、洗浄液 100 μ L を加え室温で 5 分間振とうした。
- 3, 遠心して洗浄液を除去した後、アルキル化液 100 μ L を加え遮光して室温で 30 分間振とうした。
- 4, 遠心してアルキル化液を除去した後、洗浄液 100 μ L を加え室温で 5 分間振とうした。
- 5, 遠心して洗浄液を除去した後、脱水液 100 μ L を加え室温で 5 分間振とうした。
- 6, 遠心して脱色液を除去した後、5、6 の操作を 3 回繰り返し十分に脱水した。
- 7, アセトニトリル 100 μ L を加えて収縮させ、さらに 5 分程度減圧濃縮を行った。

ゲル内消化

- 1, 酵素溶液をゲル片に加え、よく攪拌して十分にゲルに浸透させた。
- 2, 遠心して余分な酵素溶液を除去した後、50 μ L 程度の洗浄液を加え、37 $^{\circ}$ C で約 18

時間反応させた。

抽出

- 1, ゲル片に抽出液 50 μ L を加え、3 分間の超音波処理後、30 分間攪拌した。
- 2, 遠心して溶液を別のチューブに回収した。
- 3, 再度 1 の操作を行い、溶液を回収した。
- 4, 減圧濃縮にて溶液の濃縮を行った。

2-1-17 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI TOF / TOF)

[使用器具]

ZipTip C18 (millipore)
ultrafleXtreme (BRUKER)
MTP 384 target plate ground steel (BRUKER)
MTP target frame (BRUKER)
Peptide Calibration Standard (BRUKER)

[使用試薬]

TA 溶液 (0.1 % TFA / 50 % アセトニトリル)
CCA 飽和溶液
DHB 溶液 (10 mg / mL)

[試薬調整]

・ TA 溶液

TFA	5 mL
アセトニトリル	10 μ L
超純水	4.99 mL

・ CCA 飽和溶液

α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CCA)	過剰量
--------------------------------	-----

TA 溶液に飽和させ、遠心後上清を使用した

・ DHB 溶液

2,5 - ジヒドロキシ安息香酸	5 mg
------------------	------

TA 溶液 500 μ L に溶かした

[方法]

脱塩

- 1, 10 μ L に合わせたピペットマンに ZipTip C18 をセットし、垂直に静かにアセトニトリルを吸引して廃液した。これを再度行った。
- 2, 0.1 % TFA を吸引して廃液した。これを再度行った。
- 3, 0.1 % TFA に溶解したサンプルを静かに 10 回程度ピペッティングした。
- 4, 0.1 % TFA を吸引して廃液した。これを再度行った。
- 5, ZipTip C18 をはずし普通のチップをセットして、1 ~ 4 μ L の TA 溶液を ZipTip C18 にアプライし、その溶出液を別のチューブに回収した。

サンプルのスポット

- 1, ターゲットフレームにターゲットプレートをセットした。
- 2, マトリックス (CCA 飽和溶液または DHB 溶液) とサンプルを 4 : 1 で混合し、1 μ L をターゲットにスポットした。
- 3, サンプルと同様のマトリックスと混合したキャリブレーションスタンダードをサンプルの近くに 1 μ L スポットした。
- 4, スポットした液滴を自然乾燥させた。

キャリブレーション

- 1, ターゲットを ultrafleXtreme に導入した。
- 2, 測定モードを Reflector Positive に設定し、キャリブレーションスタンダードにレーザーを照射してスペクトルを測定した。
- 3, 測定したスペクトルとデータファイルの質量数を比較してその誤差を補正した。

MS 測定・MS / MS 測定

- 1, サンプルにレーザーを照射してスペクトルを測定し、ピークピックを行った。
- 2, 測定モードを Lift (Parent) に変更し、ピックしたピークのうち 1 つをプリカーサーイオンとしてそのスペクトルを測定した。
- 3, 測定モードを Lift (Fragment) に変更して、フラグメントイオンのスペクトルを測定し、ピークピックを行った。
- 4, 得られたスペクトルを MASCOT MS / MS ion Search に供し、配列を推定した。
- 5, マッチングの期待値が低い場合は、ピーク間質量差やピーク強度などを考慮して

配列を推定した。

2-1-18 ホタテガイ外套膜から total RNA の抽出

[使用器具]

ポリトロン
遠心分離機
分光光度計

[使用試薬]

RNA 抽出キット (RNA iso Plus TaKaRa)
クロロホルム
2-プロパノール
エタノール
0.1 % Diethylpyrocarbonate (DEPC) 水

[試薬調整]

・ 0.1% DEPC 水

DEPC	1 mL
------	------

超純水 999 mL に溶解後、常温で 2 時間静置し (時々液を混合する) オートクレーブした

[方法]

- 1, ホタテガイから外套膜を採取し、RNAiso plus 1mL に添加してポリトロンを用いてホモジナイズした。
- 2, 室温で 5 分静置した。
- 3, 12,000 r.p.m、4 °C で 5 分間遠心分離し、沈殿が混入ないように上清を回収した。
- 4, クロロホルム 200 μ L を添加して強く混合し、室温で 5 分間静置した。
- 5, 12,000 r.p.m、4 °C で 5 分間遠心分離し (水層の上層 (RNA を含む)、半固体の中間層 (大部分の DNA)、有機溶媒層の下層の 3 層に分かれる)、中間層に触れないように上層の水層を回収した。
- 6, 回収した水層に 2 - プロパノールを 1 mL 添加して混合し、室温で 10 分間静置した。

- 7, 12,000 r.p.m、4 °Cで 10 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。
- 8, 上清を捨てた後、RNA の洗浄のため、沈殿に 75 % 冷エタノールを 1 mL 添加して混合後、12,000 r.p.m、4 °Cで 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。
- 9, 常温で乾燥させた後、7.5 μ L 添加し、RNA を溶解した。
- 10, RNA の純度を確認するため、9 で作製した RNA 水溶液の内 1 μ L を回収し、DEPC 水で 100 倍希釈した RNA 溶液を作製し、Abs 260 / Abs 280 の比率を求めた (比率 1.7 ~ 2.1 が望ましい)。

2-1-19 逆転写酵素による RNA から DNA の合成

[使用器具]

PCR Thermal Cycler Dice

[使用試薬]

10 mM Origo dT primer

5 \times RT Buffer

100 unit / μ L Reverse Transcriptase

2.5 mM dNTPs Mixture

[方法]

- 1, 2-1-16 で作製した RNA / DEPC 水溶液 6.5 μ L に下記の条件となるよう試薬を添加した。

RNA / DEPC 水溶液	6.5 μ L
10 mM Origo dT primer	1 μ L
5 \times RT Buffer	4 μ L
100 unit / μ L Reverse Transcriptase	0.5 μ L
2.5 mM dNTPs Mixture	8 μ L

- 2, タッピングして溶液を混合後、遠心分離でチューブ側面に付着した液を落とし、PCR 装置で 42 °C、1 時間反応させた。
- 3, 反応後のサンプルを鋳型 DNA とし、-20 °Cで保存した。

2-1-20 PCR 法

[使用機器]

PCR Thermal Cycler Dice

[使用試薬]

10 × conc PCR reaction Buffer

2.5 mM dNTPs Mixture

Taq DNA Polymerase

Sense Primer

Anti Sense Primer

鋳型 DNA

滅菌水

[方法]

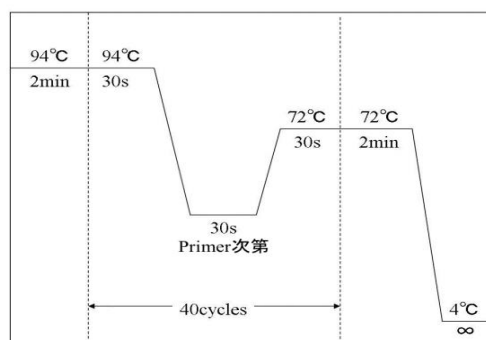
1, MALDI で決定した部分アミノ酸配列を元に下記に示したプライマーを設計した。

	sequence	Tm[°C]
90kDa 1	GARWSNMARAAYGAYMARTT	50.2
90kDa 2	GGNWSRAARTTNACNGGAA	54.3
90kDa 3	GGNWSNAAYGGNGGNACNAC	60.4
90kDa 4	GAYGGNCARCCNGARATGGA	59.4
90kDa 5	TTYCCIGTIAAYTTYWSIGGIWSIAAYGG	55.4
90kDa 6	AAYWSIGGIWSIAAYGGIGGIACIAC	55.5
90kDa anti 1	AATTKYTCRTTYTKNSYTT	50.2
90kDa anti 2	AANGGNACRTTRAANWSNCC	54.3
90kDa anti 3	CCNWSRTTNCCNCCNGTNGT	60.4
90kDa anti 4	TCCATYTCNGGYTGNCRTC	59.4
90kDa anti 5	CCRTTISWICCISWRAARTTIACIGGAA	55.4
90kDa anti 6	GTIGTICCICRTTISWICCISWRTT	55.5

2, 下記の条件で PCR 反応液を作製した。

	Sample	Negative control 1	Negative control 2	Negative control 3
10 × conc PCR reaction Buffer	2 μL			
2.5 mM dNTPs Mixture	2.4 μL			
Taq DNA Polymerase	0.5 μL			
Sense Primer	1 μL	-	1 μL	1 μL
Anti Sense Primer	1 μL	1 μL	-	1 μL
鋳型 DNA	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL	-
滅菌水	12.6 μL	13.6 μL	13.6 μL	13.1 μL

3, PCR Thermal Cycler Dice にチューブをセットし、下記の条件で PCR 反応を行った。



熱変性 : 94 °C、30 秒
 アニール : Primer による、30 秒
 伸長 : 72 °C、30 秒



サイクル数 : 40 サイクル

2-1-21 アガロース電気泳動

[使用器具]

泳動槽

Transilluminator SCOPE WD (TaKaRa)

[使用試薬]

Agarose S

10 mg / mL Ethidium Bromide (EtBr)

0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA (pH8.0))

20 × TAE Buffer
100 bp DNA ladder (TaKaRa)
6 × Loading Buffer

[試薬調整]

• 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA · 2Na	18.61 g
------------	---------

超純水 80 mL に溶解し、NaOH で pH 8.0 に調整後 100 mL にメスアップした

• 20 × TAE Buffer

Tris	48.4 g
酢酸	11.4 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL

超純水で 500 mL にメスアップした

[方法]

- 1, Agarose S 0.4 g を 1 × TAE buffer 20 mL に懸濁し、電子レンジで加熱して溶解させた。
- 2, 10 mg / mL EtBr を約 0.8 μL 加え混合し、再度一度だけ電子レンジで加熱した。
- 3, 手で触れるくらいの温度 (50 °C くらい) まで放冷した後、型の流し入れコームを挿入した。
- 4, アガロースゲルが固まったら静かにコームを引き抜き、泳動槽にセットした。
- 5, 泳動槽にゲルが十分に浸る量の 1 × TAE buffer を入れた。
- 6, サンプルと 6 × Loading buffer を 6 : 1 で混合し軽く遠心してゲルの well に静かにアプライした
- 7, 100 V で泳動を行い、BPB の線がゲルの 2/3 に来たところで泳動を終了した。
- 8, ゲルを静かに取り出し、UV ランプにあてて EtBr の蛍光を観察した。

2-1-22 アガロースゲルからの DNA 抽出

[使用試薬]

GENE CLEAN III KIT (Q・BIOgene)

NaI

EZ-Glass milk

New Wash

[方法]

- 1, 切り出したゲル重量の約 3 倍量の NaI を加え、よく混和した。
- 2, 55 °C で 5 分間インキュベートし、ゲルを完全に融解した。
- 3, EZ-Glass milk をよく懸濁した後、そのうちの 5 μ L 程度をゲル溶液へ添加し、10 分間室温で振とうした。
- 4, 12,000 r.p.m で 5 秒程度遠心し、上清を廃液した。
- 5, New Wash 1 mL を加えて沈殿を再懸濁した。
- 6, 12,000 r.p.m で 5 秒程度遠心し、上清を廃液した。
- 7, 5, 6 の操作を繰り返した後、New Wash は完全に取り除いた。
- 8, 滅菌水 10 μ L を沈殿に添加し、よく混和した。
- 9, 12,000 r.p.m で 1 分間遠心し、上清を DNA 溶液として回収した。

2-1-23 ライゲーション

[使用器具]

e-Cooling Bucket (TAITEC)

[使用試薬]

pT7blue T-vector (Novagen)

DNA Ligation kit v2.1 (TaKaRa)

I 液 : Enzyme solution (-20 °C)

III 液 : Transformation Enhancer (室温)

[方法]

- 1, DNA 溶液 2.5 μ L と pT7blue T-vector 0.5 μ L を混合した。
- 2, I 液を 3 μ L (DNA 溶液と等量) 加え、チップの先でよく混合した。

- 3, 16 °Cで 30 分 ~ 一晩インキュベートした (1 時間以内推奨)。
- 4, 反応液にⅢ液を 0.6 μL (反応液の 1/10 量) 加え、形質転換に使用した。

2-1-22 コンピテントセルの作製

[使用器具]

恒温槽
液体窒素
滅菌シャーレ

[使用試薬]

XL1 - Blue
LB
LB 寒天培地
TfbI
TfbII

[試薬調整]

・ LB

Bacto Tryptone	1 g
Yeast extract	0.5 g
塩化ナトリウム	1 g

超純水 100 mL に溶解し、メディウムビンに移しオートクレーブした

・ LB 寒天培地

Bacto Tryptone	1 g
Yeast extract	0.5 g
塩化ナトリウム	1 g

- 1, 超純水 100 mL に溶解し Bacto Agar を 1.5 g 加えて懸濁後オートクレーブした
- 2, 滅菌シャーレに 20 mL ずつ分注した
- 3, 放冷し固まったら 4 °C で保存し、使用前に 37 °C に加温した

・ TfbI

酢酸カリウム	0.295 g
塩化ルビジウム	1.21 g
塩化カルシウム	0.147 g
塩化マンガン	1 g
グリセロール	15 mL

- 1, 超純水 80 mL に溶解し、酢酸で pH 5.8 に調整後、100 mL にメスアップした
- 2, 4 °C に保存した

・ TfbII

3 - (N-morpholino) propanesulphonnic acid (MOPS)	0.21 g
塩化ルビジウム	0.121 g
塩化カルシウム	1.1 g
グリセロール	15 mL

- 1, 超純水 90 mL に溶解し、1 N KOH で pH 6.5 に調整後、100 mL にメスアップした
- 2, 4 °C に保存した

[方法]

- 1, XL1 - blue を LB プレートに播種し、37 °C で一晩インキュベートした。
- 2, ファルコンチューブに LB を 2 ~ 3 mL 入れ、プレートからコロニーをピックアップして 37 °C で一晩振とう培養した。
- 3, 三角フラスコに LB を約 50 mL と培養した菌液を入れ、37 °C で 3~4 時間振とう培養した。
- 4, 菌液を全てファルコンチューブに移し、氷上で 5 分間インキュベートした。
- 5, 4 °C にて 3,000 r.p.m で 5 分間遠心し、上清を廃棄した。
- 6, TfbI 20 mL (開始量の 2/5 量) を用いて沈殿を再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートした。
- 7, 4 °C にて 3,000 r.p.m で 5 分間遠心し、上清を廃棄した。
- 8, TfbII 2 mL (開始量の 1/25 量) を用いて沈殿を再懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。
- 9, 菌液を 50 ~ 100 μ L ずつ分注して液体窒素で急速凍結し、- 80 °C で保存した。

2-1-24 形質転換

[使用器具]

滅菌シャーレ
恒温槽

[使用試薬]

LB

1 M グルコース

1 M MgCl₂

1 M MgSO₄

SOC

50 mg / mL アンピシリン

LB / Amp プレート(LB プレートと同様に作製後オートクレーブし、60 °Cまで放冷後最終濃度 50 µg / mL となるようにアンピシリンを添加)

20 % Isopropyl β-D-1-thiogalactoside (IPTG) 溶液

40 mg / mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X - gal) 溶液

[試薬調整]

・ 1 M グルコース

グルコース	1.8 g
-------	-------

滅菌水 10 mL に溶解した後、オートクレーブした

・ 1 M MgCl₂

MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 g
---------------------------------------	-----

滅菌水 10 mL に溶解した後、オートクレーブした

・ 1 M MgSO₄

MgSO ₄	1.2 g
-------------------	-------

滅菌水 10 mL に溶解した後、オートクレーブした

・ SOC

bacto tryptone	0.2 g
yeast extract	0.05 g
NaCl	5 mg

- 1, 滅菌水 10 mL に溶解し、オートクレーブした
- 2, 1 M MgCl₂ 0.1mL、1 M MgSO₄ 0.1mL、1 M グルコース 0.2 mL を無菌的に加えて分注し、-20°Cで保存した

・ 20 % IPTG

IPTG	200 mg
------	--------

滅菌水 10 mL に溶解し、-20 °Cで保存した

・ 40 mg / mL X - gal

X - gal	200 mg
---------	--------

ジメチルホルムアミド 5 mL と混和し、遮光して-20 °Cで保存した

[方法]

- 1, コンピタントセルのストック (50μL) を氷上で融解した。
- 2, Ligation kit III液を添加したライゲーション反応液 5 μL とコンピテントセル 50 μL を混合し、氷上で 15 分間インキュベートした。
- 3, 42 °Cで 30 ~ 60 秒ヒートショックし、その後氷上で 2 分以上インキュベートした。
- 4, 菌液に LB or SOC を約 400 μL 添加し、37 °C or 室温で 1 時間インキュベートした。
- 5, 37 °Cに加温しておいた LB / Amp プレートに IPTG 溶液 10 μL と X-gal 溶液 50 μL を塗布して 37 °Cで 20 分間インキュベートした。
- 6, 菌液の一部をプレートに播種し、37 °Cで一晩インキュベートした。
- 7, できたコロニーを確認した。プレートは 4 °Cで 1~2 週間保存可能。それ以上はアンピシリンが失活しコンタミする。

2-1-25 プラスミド DNA の精製及び分析

[使用器具]

恒温槽

[使用試薬]

DNA-spin plasmid DNA purification kit (iNtRON Biotechnology)

Resuspend buffer

10 mg / mL RNase A (4 °C)

Lysis buffer

Neutralization buffer

カラム

Elution buffer

[方法]

- 1, ファルコンチューブに LB を 3 mL 入れ、プレートから白コロニーをピックアップし、37 °Cで一晩振とう培養した。
- 2, 12,000 r.p.m、室温で 30 秒遠心し、上清を廃棄した。
- 3, Resuspend buffer 250 μ L と 10 mg / mL RNase A 3 μ L を混合した溶液を入れ、攪拌して再懸濁した。
- 4, Lysis buffer を 250 μ L 加え、数回転倒混和した。
- 5, Neutralization buffer を 350 μ L 加え、数回転倒混和した。
- 6, 4 °Cにて 12,000 r.p.m で 10 分間遠心して上清を回収し、再度同じ条件で遠心した。
- 7, 上清をカラムへ移し、12,000 r.p.m で 1 分間遠心した。フロースルーは廃棄した。
- 8, カラムに Washing buffer B 700 μ L を加え、12,000 r.p.m で 1 分間遠心した。フロースルーは廃棄した。
- 9, 再び Washing buffer B 500 μ L を加え、12,000 r.p.m で 1 分間遠心した。フロースルーは廃棄した。
- 10, Elution buffer または滅菌水 50 μ L をカラムへ加え、1 分間室温で放置した。
- 11, 12,000 r.p.m で 1 分間遠心し、プラスミド DNA を回収した。
- 12, DNA の濃度を吸光度 260 nm を測定することで測定した。
- 13, 回収したプラスミド DNA を鋳型として PCR 及びプラスミド DNA そのものを PCR につけて、バンドの確認をした。
- 14, 確認したプラスミド DNA の解析を北海道システムサイエンス受託シーケンスサービスに委託した。

2-1-26 抗体の作製

[使用器具]

針付きシリンジ (1 mL 用)

[使用試薬]

抗原用ペプチド (配列 : SGSNGGTTS)

アジュバンド

[方法]

- 1, 解析した部分アミノ酸配列を元に抗原用ペプチドを Thermo Scientific 社に依頼した。
- 2, 抗原用ペプチド 5 mg を 1 mL の超純水に溶解した。
- 3, アジュバンド 1 mL を添加し、針付きシリンジを用いてエマルジョン化した。
- 4, 500 μ L ずつ 4 回に分け、1~2 週間おきにウサギに皮下注射した。
- 5, ウサギから血清を回収した。

2-1-27 ドットブロット法による抗原抗体反応(AP 発色法)

[使用試薬]

1 \times Burridge Buffer (TBS-T)

Blocking Buffer

1 次抗体 (ウサギ血清)

2 次抗体 (anti rabbit IgG)

50 mg / mL 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate (BCIP)

50 mg / mL Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

発色用緩衝液

[使用器具]

ニトロセルロース膜

タッパ

[試薬調整]

・ TBS - T

Tris	12.1 g
NaCl	29.22 g
Tween - 20	0.5 mL

超純水 500 mL に溶かした

・ Blocking buffer

スキムミルク	0.5 g
--------	-------

TBS-T 10 mL に溶かした

・ 50 mg / mL BCIP

BCTP	50 mg
------	-------

N,N-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶かした

・ 50 mg / mL NBT

NBT	50 mg
-----	-------

N,N-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶かした

・ 発色用緩衝液

Tris	6 g
NaCl	2.92 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.3 g

超純水 400 mL に溶解し、HCl で pH 9.5 に調整後、500 mL にメスアップした

[方法]

- 1, 適等な大きさに切り取ったニトロセルロース膜の上に 90 kDa タンパク質溶液及び抗原用ペプチド溶液を 10 μL ずつスポットした。
- 2, スポットを乾燥させた後、Blocking Buffer を 10 mL 添加し、2 時間振とうした。
- 3, Blocking Buffer を除き、TBS-T を 10 mL 添加し、ニトロセルロース膜を洗浄した。この操作を 3 回行った。
- 4, TBS - T で 100 倍に希釈した 1 次抗体 10 mL を添加し、overnight した。
- 5, 1 次抗体を除き、TBS-T でニトロセルロース膜を 3 回洗浄した。
- 6, TBS - T で 30000 倍に希釈した 2 次抗体を添加し、2 時間振とうした。
- 7, 2 次抗体を除き、TBS - T でニトロセルロース膜を 3 回洗浄した。
- 8, 発色用緩衝液 10 mL、BCIP 10 μL、NBT 33 μL を混合した発色溶液を添加し、遮光

しながら振とうし、発色させた。

2-1-28 蛍光色素の検出

[使用器具]

試験管

Transilluminator SCOPE WD (TaKaRa)

分光蛍光計 (FP - 6200 Jasco)

[使用試薬]

20 mM Tris - HCl (pH 7.5)

[方法]

蛍光色素の存在確認

- 1, サンプルを 20 mM Tris - HCl に溶かし、トランスルミネーターを用いて UV を照射した。

蛍光波長の測定

- 1, サンプルを 20 mM Tris - HCl に溶かし、分光蛍光計を用い、励起波長 325 nm に設定して蛍光波長を測定した。

2-2 結果

in vivo における貝殻有機成分がラットに与える影響

以前の研究で本研究室の大川らは、コントロールとして高脂肪食およびそれに貝殻有機成分を3%含む餌をラットに食餌させ影響を調べた [25]。その結果、貝殻有機成分を食餌したラットはコントロールと比較して鼠径部および後腹膜の内臓脂肪組織重量が有意に減少していることを見出した (図 1 (a) (b))。一方、肝臓・腎臓の重量に有意な差は見られなかった (図 1 (c) (d))。また、貝殻有機成分を食餌したラットの血中コレステロール濃度の低下及びふん中の胆汁酸量が有意に増加していることを見出した (図 2 及び図 3 (b) (c))。

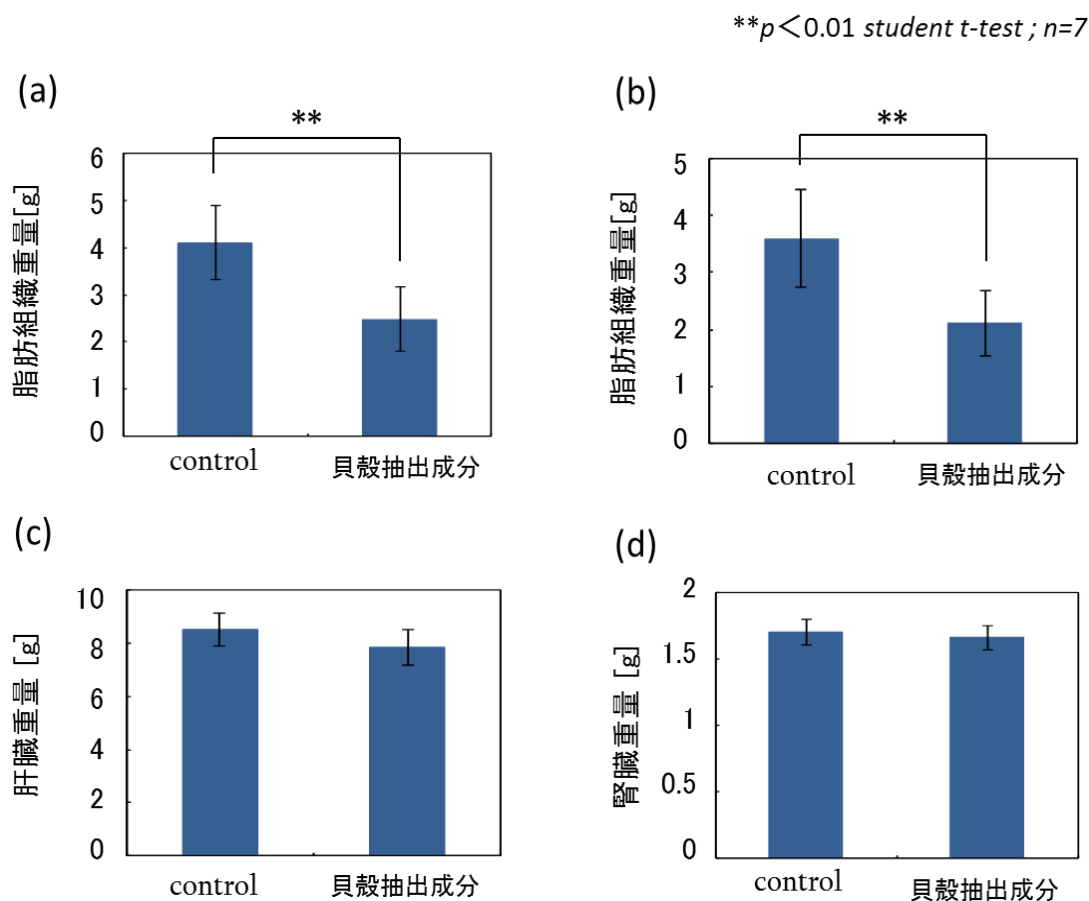


図 1 高脂肪食を食餌したラットの組織に対する貝殻有機成分の影響

(a) 鼠径部脂肪組織重量、(b) 後腹膜脂肪組織重量、(c) 肝臓組織重量、(d) 腎臓組織重量

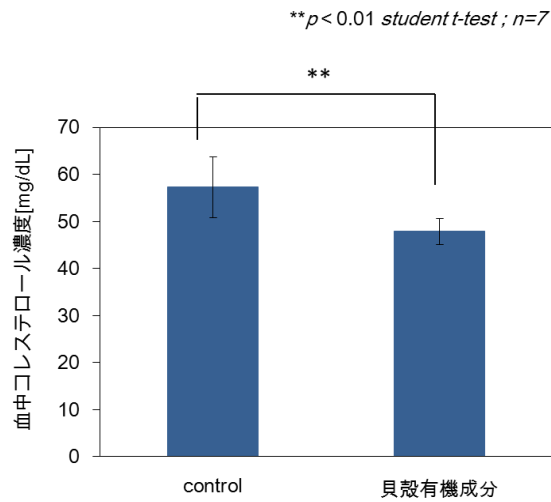


図2 高脂肪食を食餌したラットの血中コレステロール濃度に対する貝殻有機成分の影響

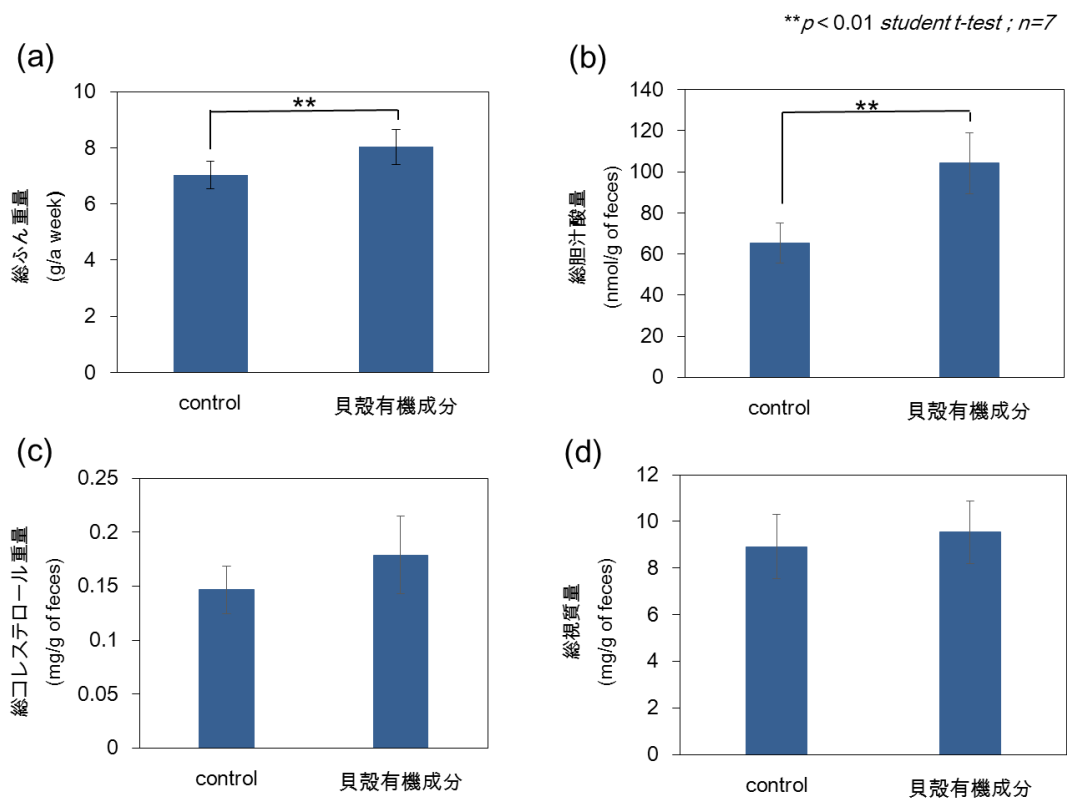


図3 高脂肪食を食餌したラットの貝殻有機成分によるふんの組成の変化

(a) 総ふん重量、(b)ふん中の胆汁酸量、(c) ふん中のコレステロール量、(d) ふん中の総脂質量

血中コレステロール減少のメカニズムの 1 つとして以下の報告がされている (図 4) [15, 16, 17, 18]。脂質の吸収を促進する胆汁酸はコレステロールから合成されている。食餌の際に食物繊維を摂取すると胆汁酸が食物繊維と結合し、ふんと共に排泄される。胆汁酸の排泄により体内の胆汁酸が不足し、コレステロールから胆汁酸を合成するように働く。その結果、血中コレステロール濃度の低下に繋がる。

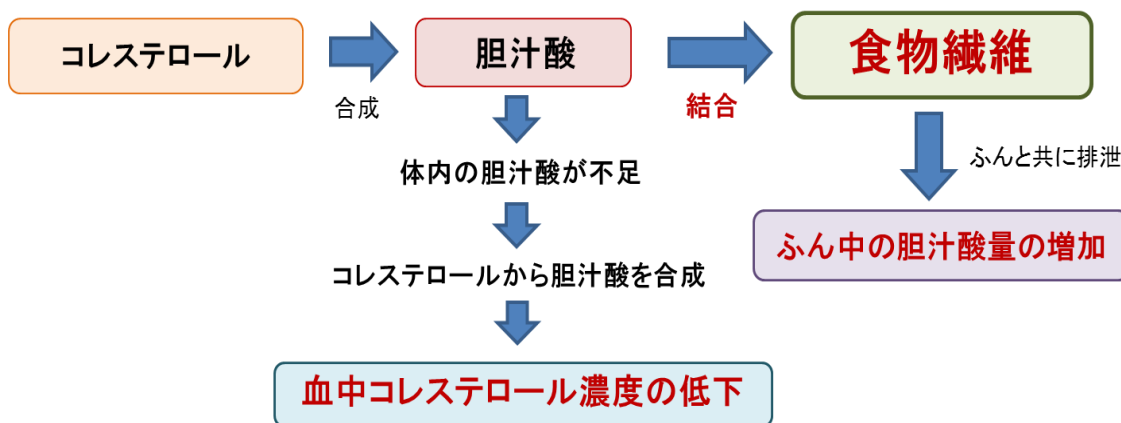


図 4 血中コレステロール濃度低下機構

貝殻有機成分に含まれる食物繊維様物質の同定

○ラットのふんの単糖組成

in vivo の実験によるラットの血中コレステロール濃度の低下及びふん中のタウロコール酸量の増加から貝殻有機成分中に食物繊維様物質が存在すると推定し、貝殻有機成分に含まれる食物繊維様物質の単離を試みた。

食物繊維は食物に含まれている難消化性成分の総称であり、その多くはアガロース、セルロースなどの多糖類である。このことからラットのふんに食物繊維様物質が存在するかを調べるため、単糖組成分析を行った (図 5)。

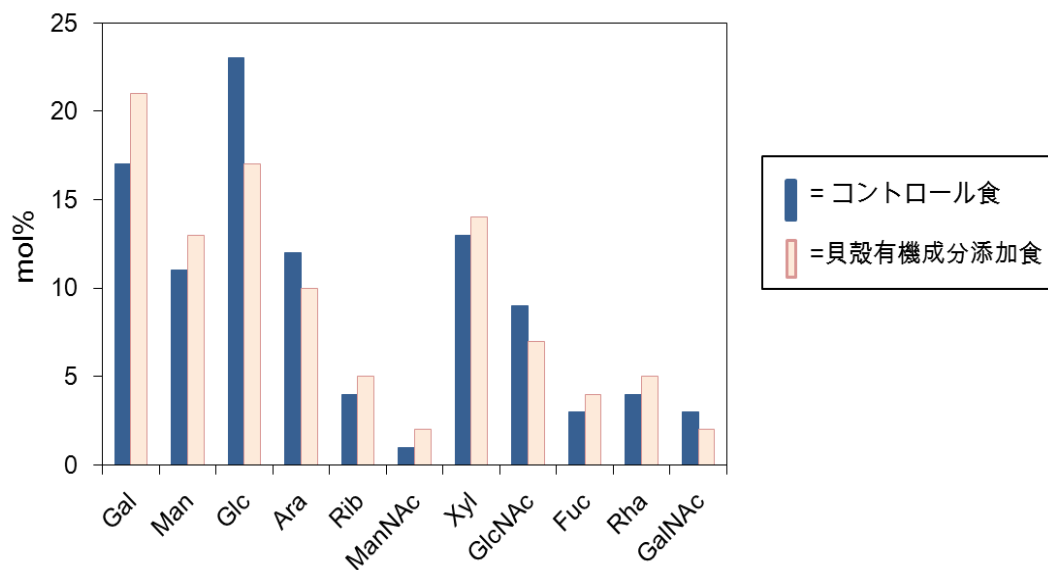


図 5 高脂肪食を食餌したラットのふんの単糖組成の比較

コントロール食を食餌したラットの単糖組成と貝殻有機成分を含む高脂肪食を食餌したラットの担当組成の間に大きな違いが無く、類似していたことから、貝殻有機成分には消化されない多糖類は存在しないものと判断した。

○ラットのふんのアミノ酸組成

次にラットのふんのアミノ酸組成分析を行った (図 6 (a) (b))。

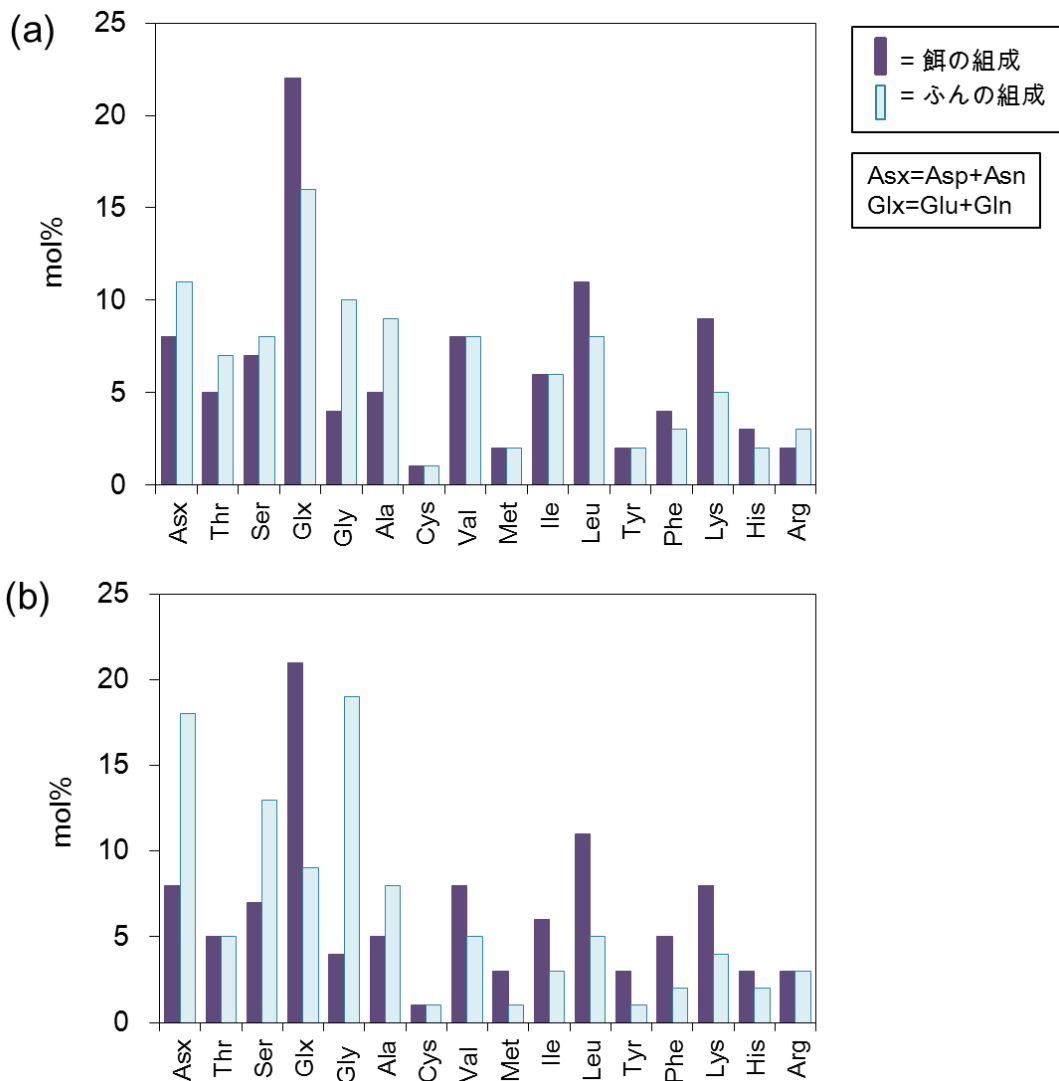


図6 高脂肪食を食餌したラットのふんのアミノ酸組成の比較

(a) 餌 (コントロール食) の組成及びそれを食餌したラットのふんの組成、(b) 餌 (貝殻有機成分添加食) の組成及びそれを食餌したラットのふんの組成

餌 (コントロール食) のアミノ酸組成とそれを食餌したラットのふんのアミノ酸組成が類似しているのに対し、餌 (貝殻有機成分添加食) のアミノ酸組成とそれを食餌したラットのふんのアミノ酸組成の比較ではラットのふん中に Asx (Asp or Asn)、Ser、Gly が多く含まれていることが分かった。このことから貝殻有機成分中に Asx、Ser、Gly を多く含む消化されない食物繊維様タンパク質が存在することが推定された。

貝殻有機成分からこの食物繊維様タンパク質を単離するため、貝殻有機成分を生体内で働く消化酵素であるペプシン、パンクレアチン、 α -アミラーゼ、アミノグリコシ

ダーゼを用いて順次分解を行った。透析により分解されたペプチド断片を除去し、遠心分離して得られた沈殿及び上澄みを不溶性食物繊維様物質、水溶性食物繊維様物質として以下の実験に使用した。作製した食物繊維様物質を SDS 電気泳動に供し、Stains all 染色を行ったところ、水溶性食物繊維様物質に主として分子量 90kDa のタンパク質が存在することが分かった (図 7)。また、データは示していないが、CBB 染色による他のタンパク質は検出されなかった。Stains all 染色とは CBB 染色では染まらない酸性タンパク質を染色する方法である。

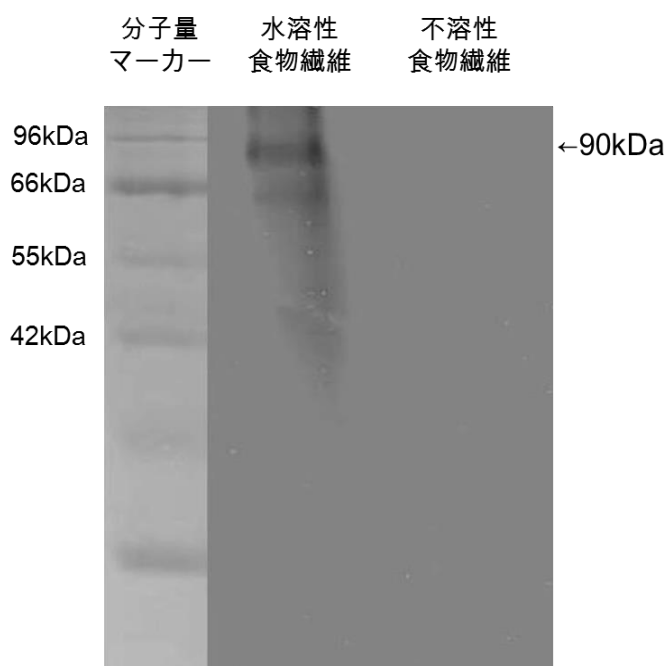


図 7 食物繊維様物質の SDS 電気泳動図 (Stains all 染色)

単離した食物繊維様物質がふん中にみられるタンパク質と類似しているかどうかを調べるため、単離した水溶性食物繊維様物質のアミノ組成分析を行った (図 8)。

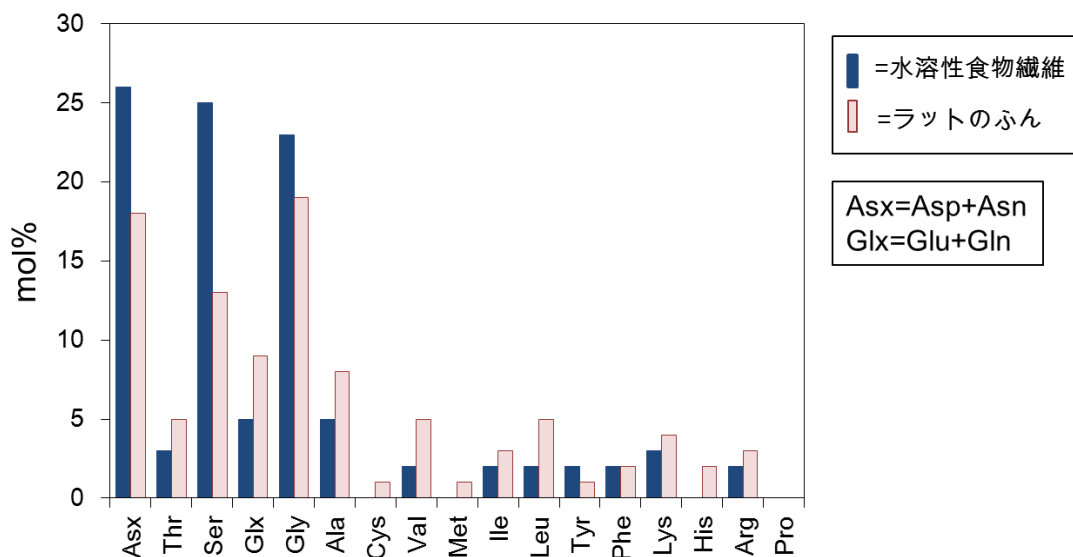


図 8 水溶性食物繊維様物質と貝殻有機成分を食餌したラットのふんのアミノ酸組成の比較

水溶性食物繊維様物質のアミノ酸組成は、ラットのふんのアミノ酸組成と同様に Asx、Ser、Gly を多く含み、類似したアミノ組成を持つことが分かった。このことから、水溶性食物繊維様物質に含まれる分子量 90kDa のタンパク質が消化、吸収されずにふんとして排泄されているものと推定した。

貝殻有機成分から 90kDa タンパク質の単離

水溶性食物繊維様物質から分子量 90kDa のタンパク質の単離を行おうとしたが、水溶性食物繊維様物質に含まれる分子量 90kDa のタンパク質は長時間のプロテアーゼ処理により構造が部分的に切断されている可能性があると考え、貝殻有機成分から分子量 90kDa のタンパク質の単離を試みた。

貝殻有機成分を S - 300 ゲルろ過カラム及び DEAE セルロースイオン交換カラムを用いて分画を行った。S - 300 ゲルろ過カラムによる分画により (図 9 (a))、赤のバーで示した画分に分子量 90kDa のタンパク質を検出したことから、その画分を回収し、DEAE セルロースイオン交換カラムによる更なる精製を行った (図 9 (b))。DEAE セルロースイオン交換カラムによる分画後、各画分を SDS 電気泳動し、Stains all 染色を行ったところ、赤のバーで示した画分に分子量 90kDa のタンパク質 (以降 90kDa タンパク質と呼ぶ) を確認した (図 10)。90kDa タンパク質が単一で存在し、CBB 染色によるほかのタンパク質は検出されなかったことから、貝殻有機成分から 90kDa タンパ

ク質を単離したものと判断した。単離した 90kDa タンパク質の収量を求めたところ、貝殻有機成分約 200 g から 90kDa タンパク質約 1.5 mg 得ることができた。

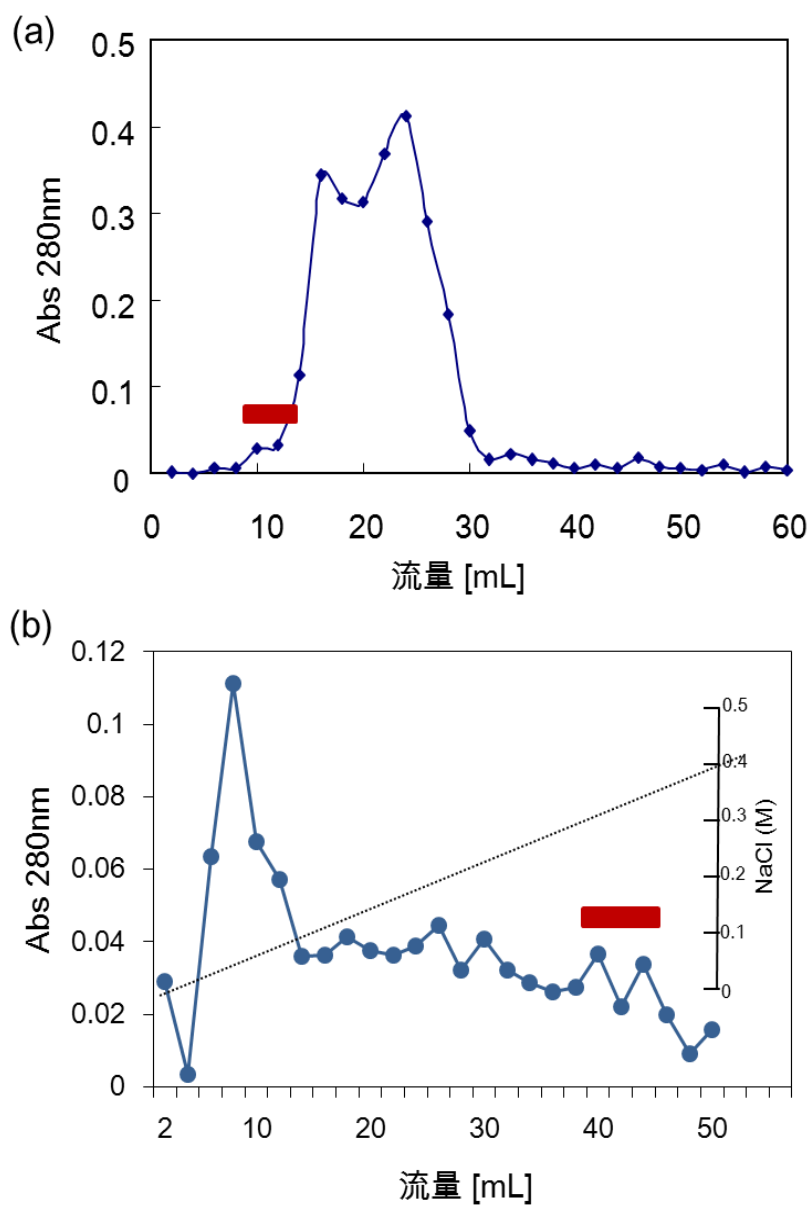


図9 貝殻有機成分に含まれる 90kDa タンパク質の単離

(a) S - 300 ゲルろ過カラムによる分画 (赤のバー (流量 10 ~ 12 mL) の画分に 90kDa タンパク質を確認)、(b) DEAE セルロースイオン交換カラムによる分画 (赤のバー (流量 40 ~ 46 mL NaCl 濃度約 0.35 M) の画分に 90kDa タンパク質を確認)

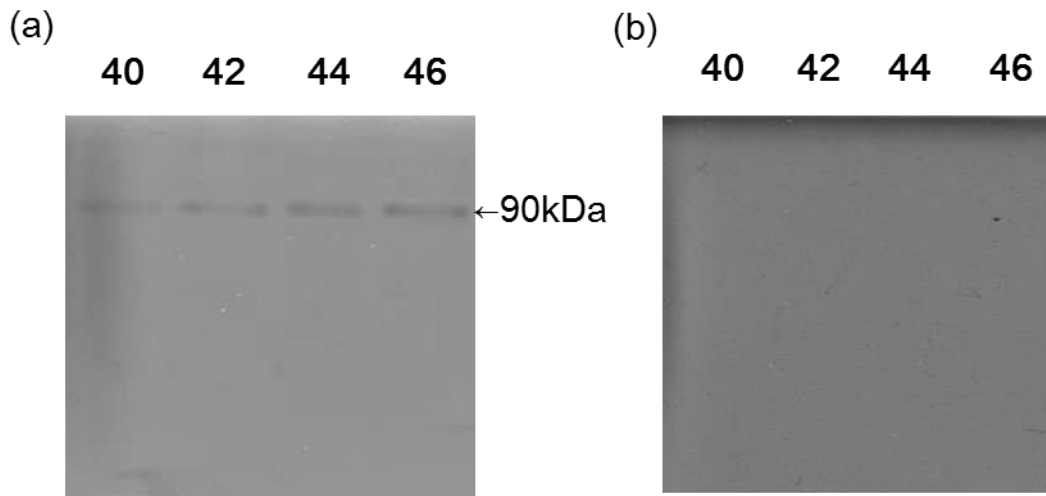


図 10 DEAE セルロースイオン交換カラムによる精製で得られた 90kDa タンパク質
(a) Stains all 染色、(b) CBB 染色 (レーン上の数字は流量 [mL] を示す)

貝殻有機成分から単離した 90kDa タンパク質と水溶性食物繊維様物質に含まれる分子量 90kDa のタンパク質とが同一のものであるかを調べるため、アミノ酸組成の比較及びマトリックス支援レーザー脱離法 (MALDI TOF / TOF) による MS スペクトルの比較を行った (図 11、図 12)。

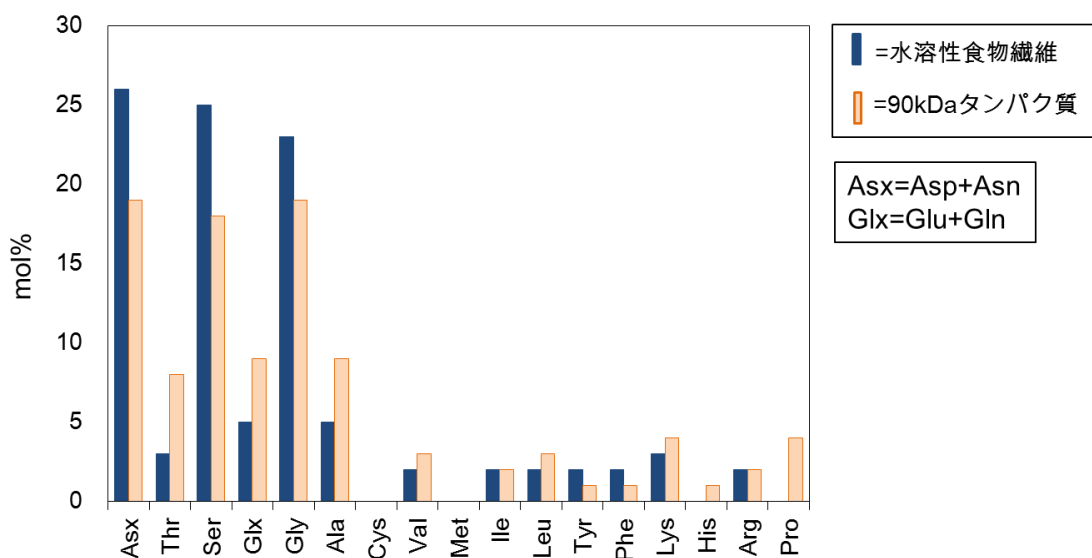


図 11 単離した 90kDa タンパク質と水溶性食物繊維様物質のアミノ酸組成の比較

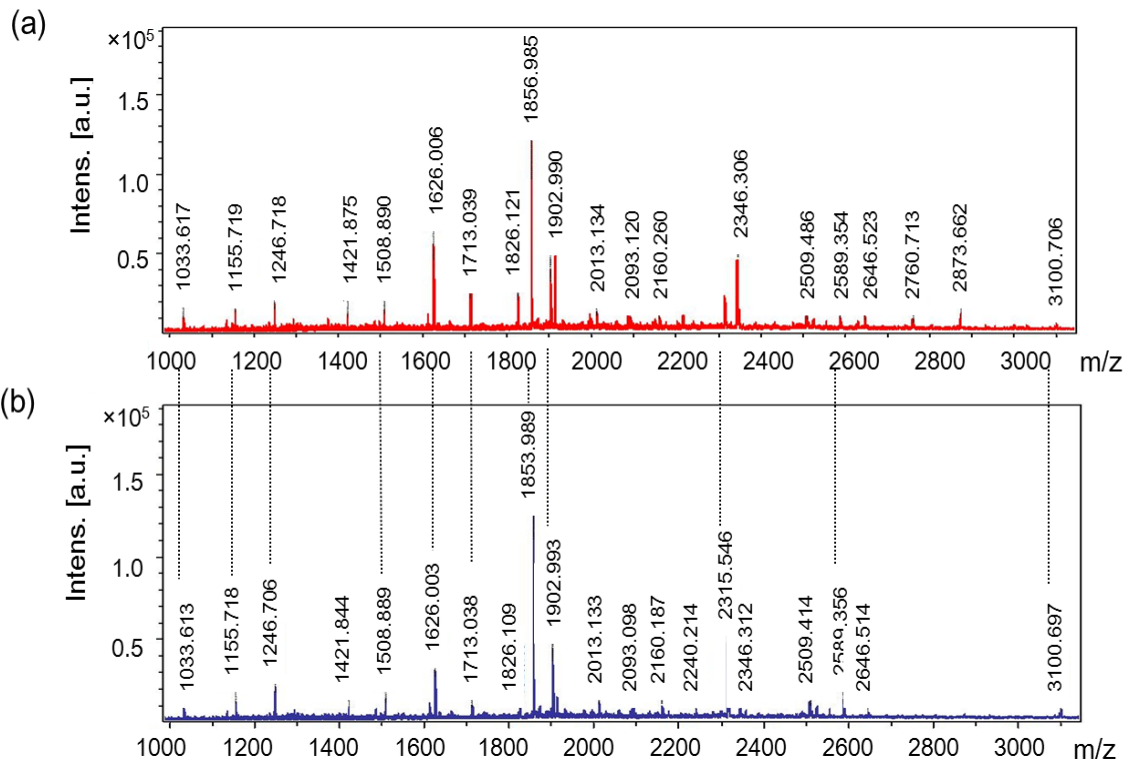


図 12 単離した 90kDa タンパク質と水溶性食物繊維様物質の MALDI TOF / TOF による MS スペクトルの比較

(a) 水溶性食物繊維 (b) 90kDa タンパク質

単離した 90kDa タンパク質のアミノ酸組成は水溶性食物繊維様物質と同様 Asx、Ser、Gly を多く含み、アミノ酸組成が類似していることが分かった。また、MS スペクトルの比較では、類似したメインピークが多数検出された。90kDa タンパク質が食物繊維様物質であることを確かめるため、単離した 90kDa タンパク質がプロテアーゼによって分解されるかどうかを調べた。90kDa タンパク質をペプシン、パンクレアチンを用いて処理を行い、同濃度のカゼインとの比較を行った (図 13)。

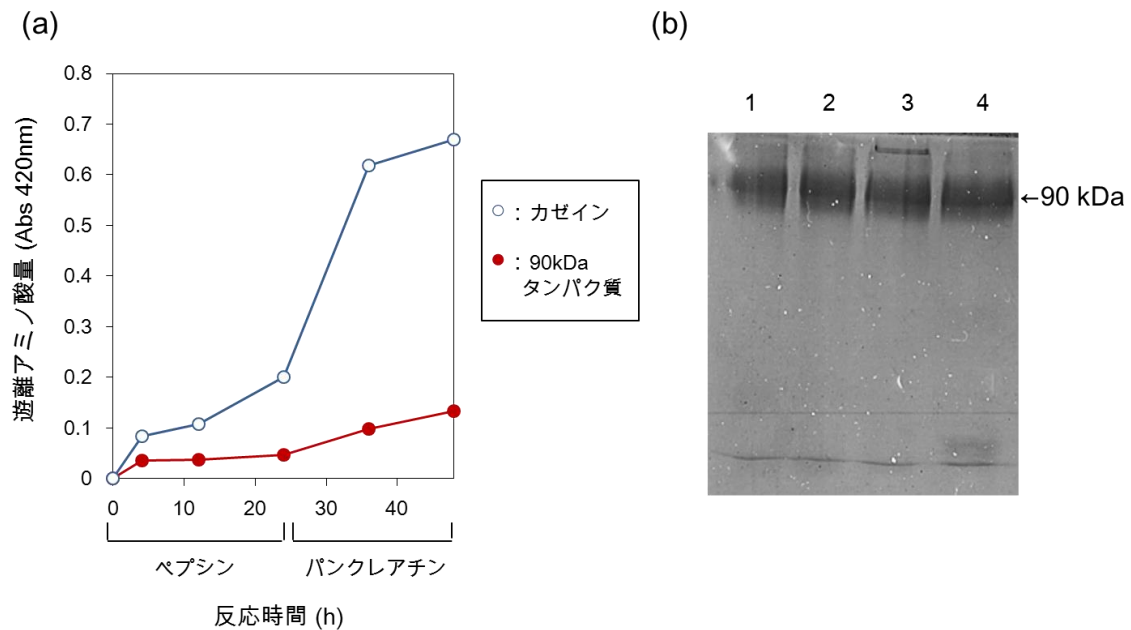


図 13 90kDa タンパク質の酵素処理による影響

(a) 90kDa 及びカゼインのプロテアーゼ処理により遊離したアミノ酸量を TNBT 法により定量した結果 (0~24 時間: ペプシン処理、24~48 時間: パンクレアチン処理)、(b) プロテアーゼ処理後の 90kDa タンパク質の SDS 電気泳動図 (Stains all 染色)、レーン 1: 未消化、レーン 2: ペプシン処理 (100:1, pH 2.0, 37 °C, 24 h)、レーン 3: パンクレアチン処理 (50:1, pH 7.2, 37 °C, 24 h)、レーン 4: トリプシン処理 (50:1, pH 8.0, 37 °C, 24 h))

カゼインはペプシン及びパンクレアチンにより分解され、アミノ酸が遊離しているのに対し、90kDa タンパク質はプロテアーゼによる分解を殆ど受けておらず、遊離アミノ酸量が殆ど増加しなかった。また、SDS 電気泳動の写真からも 90kDa タンパク質のバンドに変化が無く、プロテアーゼにより殆ど分解されていないことが分かった。アミノ酸組成の比較、MS 測定によるスペクトルの比較、そしてプロテアーゼにより殆ど分解されないという共通の特徴から、水溶性食物繊維様物質中に確認した分子量 90kDa のタンパク質と単離した 90kDa タンパク質は同一のタンパク質であると判断した。

食物繊維様物質及び90kDaタンパク質の胆汁酸結合能

図4に示した血中コレステロール濃度の低下のメカニズムでは、食物繊維が胆汁酸と結合することにより、血中コレステロール濃度の低下が起これらとされている。貝殻有機成分に含まれる食物繊維様物質及び貝殻有機成分から単離した90kDaタンパク質の胆汁酸結合能を調べるため、胆汁酸の1つであるタウロコール酸を用いて測定した(図14)。

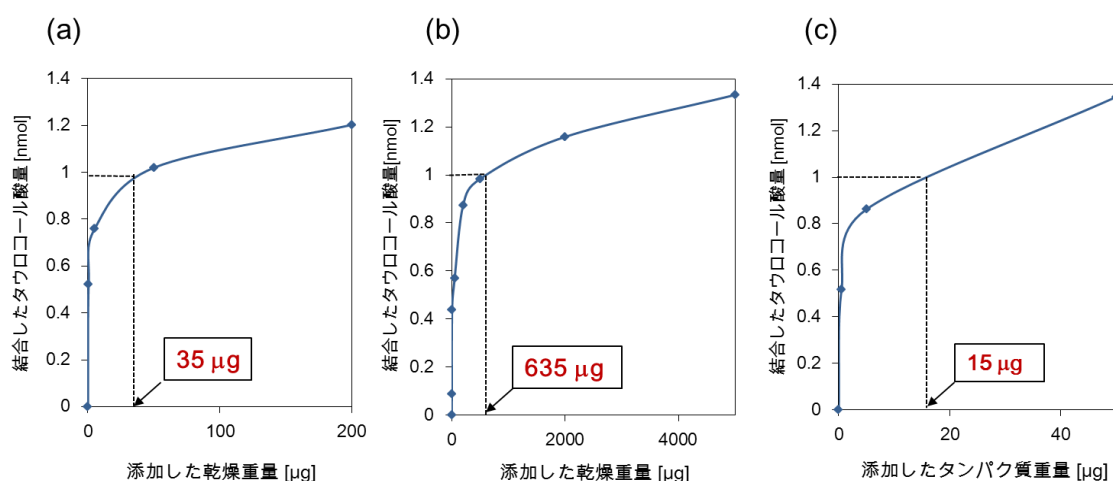


図14 食物繊維様物質のタウロコール酸結合能

(a) 水溶性食物繊維、(b) 不溶性食物繊維様物質、(c) 90kDa タンパク質

タウロコール酸 1 nmol と結合するタンパク質量は水溶性食物繊維様物質で 35 μg、不溶性食物繊維様物質で 635 μg、90kDa タンパク質で 15 μg となり、90kDa タンパク質及び水溶性食物繊維様物質のタウロコール酸結合能が不溶性食物繊維様物質に比べ、強いことが分かった。このことから主として水溶性食物繊維様物質に含まれる 90kDa タンパク質が胆汁酸と結合し、ふんとして排泄されることでラット体内の胆汁酸が減少し、結果として血中コレステロール濃度の低下を引き起こしたものと推定した。

単離した 90kDa タンパク質の構造解析

胆汁酸結合能を示し、プロテアーゼに切断されない 90kDa タンパク質の構造を明らかにするため、構造解析を行った。

○糖鎖解析

単離した 90kDa タンパク質に糖鎖が結合しているかを確認するため、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色による糖鎖の検出を試みた (図 15)。

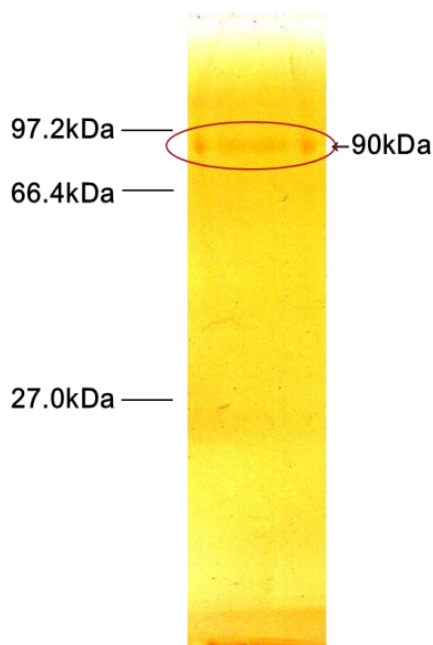


図 15 90kDa タンパク質の PAS 染色

90kDa タンパク質が PAS 染色で染色されたことから 90kDa タンパク質は糖タンパク質であることが分かった。

次に、90kDa タンパク質に結合する糖鎖の単糖組成分析を行った (表 1)。

単糖	mol%
Glucose	25.8
Mannose	18.9
Galactose	11.4
N-Acetylglucosamine	10.9
N-Acetylgalactosamine	10.7
Fucose	9.7
Arabinose	7.7
Rhamnose	4.9
Total	100.0

表 1 90kDa タンパク質の単糖組成

90kDa タンパク質に結合した糖鎖は Glucose 及び Mannose を多く含む。Glucose を多く含む糖鎖は過去に報告されていないことから、非常に特徴的な構造を持つ糖鎖であると推定された。90kDa タンパク質に結合する糖鎖の解析を行うため、90kDa タンパク質をヒドラジン分解により糖鎖を回収し、PA 化による糖鎖のラベリング後、液体クロマトグラフィーによる分析を行った。しかし、Amide 80 カラムによる精製過程において、主としてグルコースユニット 3 以下のピークしか検出されなかった (PA - Glucose Oligomer (DP = 3 ~ 22) による比較から)。また、それぞれのメインピークを回収し、ODS カラムによる精製を行ったが、回収した糖鎖が不溶化してしまい、糖鎖の分析を行うことができなかった。

○90kDa タンパク質の部分アミノ酸配列分析

90kDa タンパク質の部分アミノ酸配列分析を行うため、90kDa タンパク質をトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) で処理し、糖鎖の切断を行った。90kDa タンパク質は脱糖鎖されることにより、CBB 染色や銀染色で染色させるようになるため、脱糖鎖した 90kDa タンパク質を Western Blotting 法による PVDF 膜への転写を試みた。しかし、90kDa タンパク質は脱糖鎖すると大部分が不溶化してしまい、PVDF 膜上に 90kDa タンパク質を確認できなかった。

脱糖鎖した 90kDa タンパク質を SDS 電気泳動後、バンドを切り出し、V8-エンドペプチダーゼを用いてゲル内消化を行った。分解され生じたペプチド断片を回収し、マト

リックス支援レーザー脱離法 (MALDI TOF / TOF) を用いてアミノ酸配列を決定した (図 16)。



図 16 MALDI TOF / TOF で決定した 90kDa タンパク質の部分アミノ酸配列

(1) 及び (3) の部分アミノ酸配列では Ser 及び Gly が多く含まれており、90kDa タンパク質のアミノ酸組成分析の結果 (図 11) と類似していることから信憑性が高いものと判断した。また、(1) 及び (3) の部分アミノ酸配列にみられた配列 SGSNGGTTS が共通に存在することから、この SGSNGGTTS という配列は 90kDa タンパク質内において繰り返し配列であると考えられた。決定した部分アミノ酸配列を MS Blast 検索をしたところ、この配列が新規のタンパク質であることが分かった。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のホタテガイ (*Patinopecten yessoensis* 及び *Chlamys farreri*) のトランスクリプトーム研究において決定された mRNA データベースと比較を試みたが、ホタテガイの配列解析が十分に行われておらず一致する配列を見つけないことができなかった。

そこで、90kDa タンパク質の全一次構造を決定するために、決定した部分アミノ酸配列を元にプライマーを設定し、PCR に供したが、増幅することができなかった。また、繰り返し配列と考えられる SGSNGGTTS を抗原とし、ウサギに抗体を作らせることを試みたが、抗体を作製するに至らなかった。

○90kDa タンパク質に結合する蛍光色素

90kDa タンパク質には黄色の色素が結合している。この色素に UV -B (320 nm) の光を照射すると淡緑色の蛍光を発することが分かった (図 17)。また、この蛍光色素の蛍光スペクトルを分光蛍光計で測定したところ、約 410 nm に最大蛍光波長を示すことが分かった (図 18)。

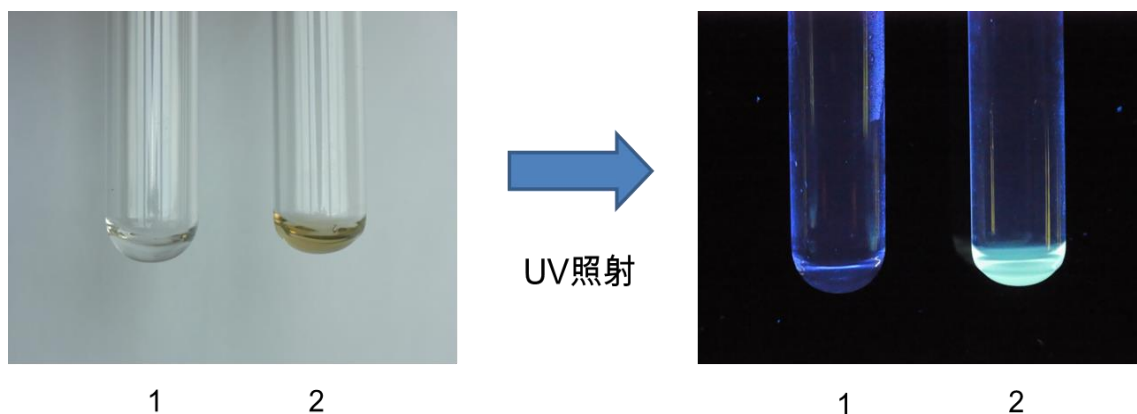


図 17 90kDa タンパク質に結合する色素の UV 照射による発光
試験管 1：超純水、試験管 2：90kDa タンパク質水溶液

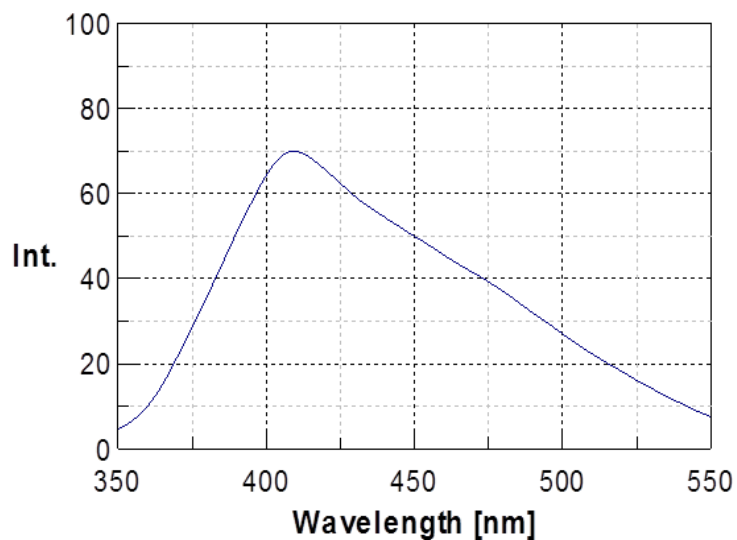


図 18 90kDa タンパク質に結合する蛍光色素の蛍光強度 (Ex = 325nm)

2-3 考察

当研究室では以前、ラットに対するホタテガイ貝殻有機成分による影響を調べるため、ホタテガイ貝殻粉末を含む高脂肪食をラットに食餌させた。しかし、過去に炭酸カルシウムが、ラットの体脂肪量を減少させるという報告がされていることから、この研究では、炭酸カルシウムを除いたホタテガイ貝殻有機成分を含む高脂肪食をラットに食餌させ、その影響を調べた。そして、ホタテガイ貝殻有機成分を食餌させたラットの脂肪組織重量が減少することが分かった。

過去に絹に含まれるセリシンと呼ばれる食物繊維様タンパク質を含む高脂肪食をラットに食餌させることで、ラットの血中コレステロール値が大きく減少することが報告されている [15]。セリシンによる血中コレステロール濃度低下作用は、胆汁酸結合能によって説明されている。胆汁酸はコレステロールを原料に合成され、腸肝循環しており、体内の総胆汁酸量は一定に保たれている。セリシンが胆汁酸と結合することで、図 4 に示した血中コレステロール濃度低下のメカニズムが作用していると考えられている。ラットがホタテガイ貝殻有機成分を含む餌を食餌することで、ふん中の胆汁酸量が増加し、ホタテガイ貝殻有機成分に含まれる 90kDa タンパク質が胆汁酸の結合能を示した。従って、90kDa タンパク質がセリシンと同様のメカニズムで血中コレステロール濃度を低下させるものと考えられる。セリシン以外の食物繊維様タンパク質も幾つか研究され、セリシンと同様のメカニズムにより血中コレステロール濃度を低下させることが報告されている [16, 17, 18]。研究された食物繊維様タンパク質を用いた *in vivo* の実験報告によると、ホタテガイ貝殻有機成分を餌全体の 3% 添加することにより、効果をj確認している当研究室の結果と比べ、より多くの食物繊維様タンパク質が必要とされている。更に、90kDa タンパク質は報告された食物繊維様タンパク質と比べ、プロテアーゼにより分解されにくい。このことから、90kDa タンパク質の有効活用ができるのではないかと考えている。

過去にグリシニンと呼ばれる大豆に含まれる食物繊維様タンパク質が持つ胆汁酸結合能を示すアミノ酸領域が特定され、高い疎水性部位を持つ 6 つのアミノ酸残基 (VAWWMY) が胆汁酸結合能に重要であることが報告されている [22]。食物繊維様タンパク質による胆汁酸結合能は、アミノ酸領域の疎水性部分に関連していると説明されている。90kDa タンパク質は、アミノ酸組成から Asx や Ser など親水性のアミノ酸が豊富なタンパク質であるが、胆汁酸結合能を示すことから 90kDa タンパク質に高い疎水性を持つ領域が存在するのではないかと考えられる。90kDa タンパク質の構造は明らかにできなかったが、90kDa タンパク質の構造を決定することによって、タンパク質の胆汁酸結合領域を特定する必要がある。

単離した 90kDa タンパク質は、種々のプロテアーゼにより殆ど分解されないことを明らかにした。この研究で使用したペプシン、パンクレアチン、トリプシンに加え、

キモトリプシン、プロナーゼ、Asp-N による処理においても殆ど分解されなかった。同研究室の佐々木らは以前、TFMS の処理により脱糖鎖した 90kDa タンパク質がペプシン及びパンクレアチンにより分解されることを明らかにしており [26]、タンパク質に結合した糖鎖がプロテアーゼに対し、タンパク質を保護しているのではないかと考えられる。

90kDa タンパク質の構造解析から 90kDa タンパク質が糖鎖、蛍光色素を含む新規のタンパク質であることを明らかにした。90kDa タンパク質は TFMS により脱糖鎖されると Stains all 染色によって染色されなくなることから、結合した糖鎖が酸性であると考えられる。過去に炭酸カルシウム結晶構造の構成に関与する MSP-1 (ホタテガイ貝殻中で特定されたタンパク質) は、硫酸基を持つ糖鎖が結合していることが報告されている [11]。このことから、90kDa タンパク質に結合した糖鎖は、硫酸基を持つかもしれない。90kDa タンパク質の単糖組成分析から、糖鎖が主にグルコースで構成されていることを明らかにした。当研究室では 90kDa タンパク質以外に、ホタテガイ貝殻中にグルコースを多く含む糖鎖が結合した糖タンパク質の存在を明らかにしていることから [28]、グルコースを多く含む糖鎖の構造は、ホタテガイ貝殻に含まれるタンパク質の特性であると考えられる。90kDa タンパク質は黄色い色素が結合したタンパク質であり、その色素は蛍光色素であることを明らかにした。90kDa タンパク質は、ホタテガイ貝殻中に含まれるタンパク質の中で初めて見出した色素タンパク質である。

90kDa タンパク質が胆汁酸結合能を示す理由を調べるため、90kDa タンパク質の構造解析を試みたが、以下の理由から 90kDa タンパク質の構造を決定が困難であった：

- (1) 90kDa タンパク質は糖鎖、蛍光色素が結合した複合タンパク質である。
- (2) 90kDa タンパク質は、トリプシンなど種々のプロテアーゼにより殆ど分解されない。
- (3) 90kDa タンパク質は SDS 電気泳動後、CBB 染色及び銀染色によって染色されない。
- (4) 90kDa タンパク質は TFMS による脱糖鎖後に大部分が不溶化し、解析できなくなる。
- (5) 90kDa タンパク質に結合する糖鎖は、グリコシダーゼ処理により脱糖鎖されない。

今後、90kDa タンパク質のアミノ酸配列、糖鎖の構造、及び蛍光色素を解明し、90kDa タンパク質が持つ胆汁酸結合能の活性部位を特定する必要がある。

3章 90kDa タンパク質の活性酸素消去活性作用

3-1 実験方法

3-1-1 キサンチン/キサンチンオキシダーゼを用いた活性酸素消去活性の測定

[使用器具]

96 穴プレート

マイクロプレートリーダー (Labsystems Multiskan Biochromatic)

分光光度計

[使用試薬]

1.7 mM キサンチン

3.2 mM ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)

1 M Tris - HCl (pH 7.5)

8 mg / mL キサンチンオキシダーゼ (XOD)

ジメチルスルホキシド (DMSO)

[試薬調整]

・ 1.7 mM キサンチン

キサンチン	2.58 mg
-------	---------

DMSO 10 mL に溶かした

・ 3.2 mM NBT

NBT	2.626 mg
-----	----------

超純水 1 mL に溶かした

・ 8 mg / mL XOD

XOD	8 mg
-----	------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

活性酸素消去活性の測定

1, 反応液を以下の条件で 96 穴プレートに添加した。

1.7 mM キサンチン	50 μ L
3.2 mM NBT	25 μ L
Tris - HCl	4 μ L
サンプル	適量
超純水	195 μ L になるように調整

2, 測定する直前に XOD を 5 μ L 加え、吸光度 560 nm で 1 分おきに 15 分間測定した。

キサンチンオキシダーゼ活性の測定

1, エッペンチューブに以下の条件でそれぞれ添加した

1.7 mM キサンチン	50 μ L
Tris - HCl	4 μ L
サンプル	適量
超純水	195 μ L になるように調整

2, XOD を 5 μ L 添加、混合し、速やかに石英セルに加えて吸光度 290 nm を 1 分おきに 15 分間測定した。

3-1-2 DPPH ラジカル消去活性の測定

[使用器具]

分光光度計

[使用試薬]

0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical

0.1 mM Tris - HCl (pH 7.4)

[試薬調整]

・ 0.5 mM DPPH radical

DPPH radical	1.9 mg
--------------	--------

エタノール 10 mL に溶かした

[方法]

- 1, サンプル 100 μ L をエッペンチューブに加えた。
- 2, 0.5 mM DPPH radical を 50 μ L、0.1 mM Tris - HCl を 100 μ L 添加した。
- 3, 暗所で 30 分間静置後、吸光度 517 nm を測定した。

3-1-3 鉄イオン(III)還元活性の測定

[使用器具]

分光光度計

[使用試薬]

- 0.1 M 塩化鉄 (III)
- 1 M Tris - HCl (pH 7.0)
- 5 mM フェロジン

[試薬調整]

- ・ 0.1 M 塩化鉄 (III)

塩化鉄 (III)	0.27 g
-----------	--------

超純水 10mL に溶かした

- ・ 5 mM フェロジン

フェロジン	2.46 mg
-------	---------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

- 1, 反応液を以下の条件になるようエッペンチューブに添加した。

0.1 M 塩化鉄 (III)	5 μ L
1 M Tris - HCl	5 μ L
5 mM フェロジン	50 μ L
サンプル	適量
超純水	500 μ L になるように添加

- 2, 37 $^{\circ}$ C で overnight した。
- 3, 吸光度 540 nm を測定した。

3-2 結果

貝殻有機成分による活性酸素消去活性作用の確認

同研究室の劉らは、貝殻有機成分中に活性酸素消去因子が含まれていることを明らかにした [24]。活性酸素消去因子と単離、同定を目的として実験を行った。キサンチン / キサンチンオキシダーゼを用い、貝殻有機成分による活性酸素消去活性作用を測定した。キサンチンはキサンチンオキシダーゼにより、活性酸素であるヒドロキシラジカルと尿素を生成する。貝殻有機成分の存在下、非存在下においてヒドロキシラジカルの生成量、生成した尿素量を定量することにより活性酸素消去活性を評価した (図 21 (a) (b))。

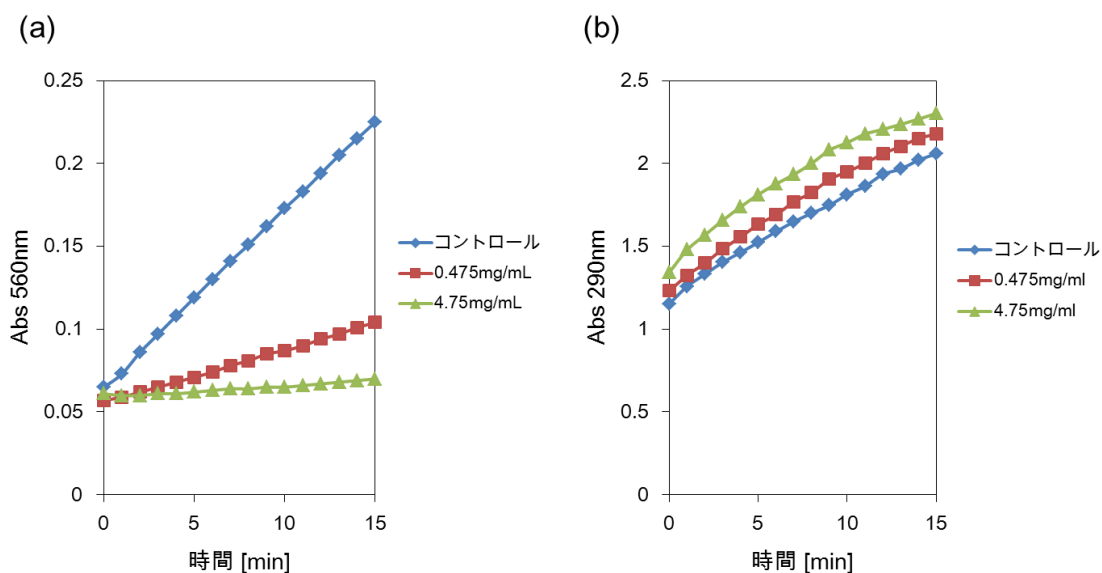


図 21 貝殻有機成分による活性酸素消去活性作用
(a) 生成した活性酸素量、(b) キサンチンオキシダーゼ活性

貝殻有機成分を添加することによって活性酸素生成量が濃度依存的に減少した (a)。一方、尿素生成量は変化しなかった (b)。このことから、貝殻有機成分中に活性酸素を消去する成分が含まれていることを確認した。

活性酸素消去活性因子の単離

貝殻有機成分を S - 300 ゲルろ過カラム及び DEAE セルロースイオン交換カラムを用いて分画を行った (図 22 (a) (b))。

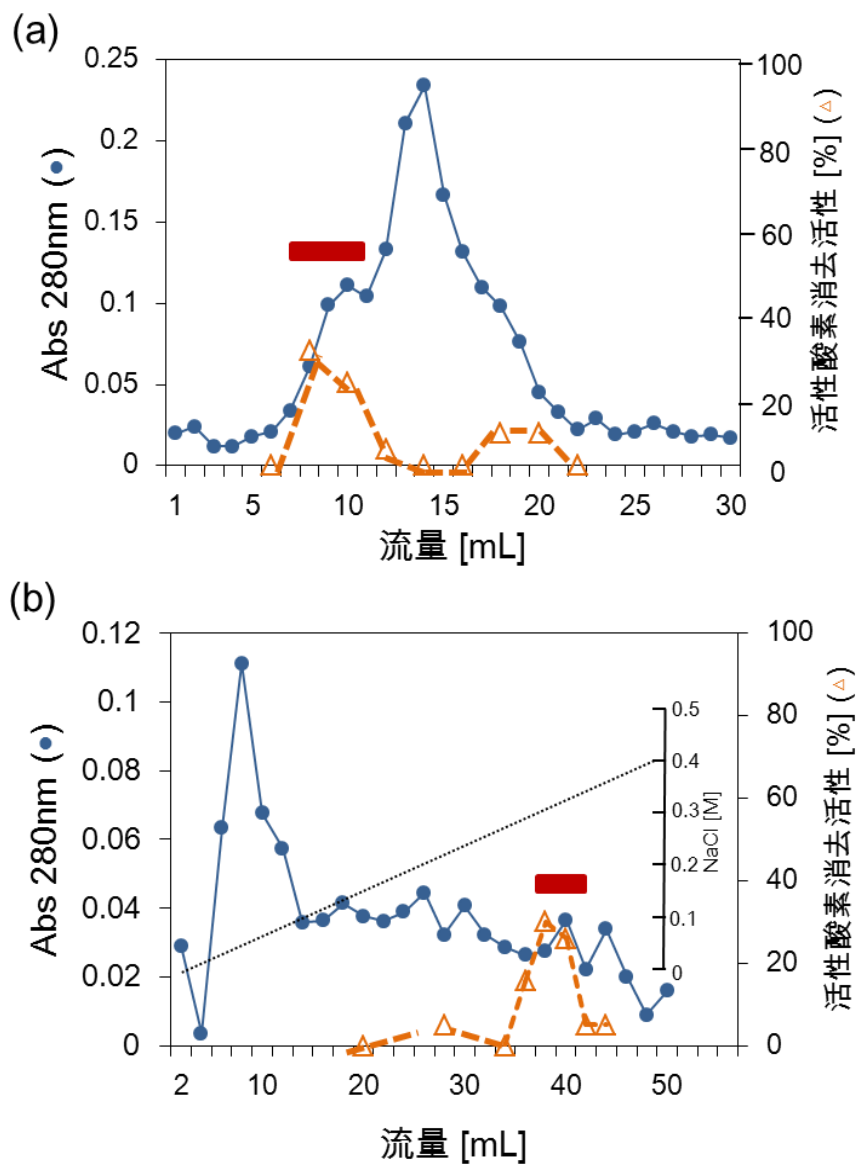


図 22 貝殻有機成分に含まれる活性酸素消去因子の単離

(a) S - 300 ゲルろ過カラムによる分画(△ : 活性酸素消去活性)、(b) DEAE セルロースイオン交換カラムによる分画(△ : 活性酸素消去活性)

図 22 (a) より、2 箇所領域 (流量 7~11 mL の画分及び流量 17~21 mL の画分) に活性酸素消去活性作用因子が存在することを確認した。活性酸素消去活性の強い赤のバーで示した画分を、DEAE セルロースイオン交換カラムを用いて更なる精製を行った。図 22 (b) より、流量 38~41 mL (NaCl 濃度約 0.35 M) の画分に活性酸素消去活性因子が存在することを確認し、活性酸素消去活性因子を含む画分を集め、SDS 電気泳動後 CBB 染色及び Stains all 染色を行った (図 23)。Stains all 染色において分子量 90kDa のタンパク質を検出し、CBB 染色による他のタンパク質の存在は検出されなかった。以上の結果から、活性酸素消去活性因子は分子量 90kDa のタンパク質であると判断した。この分子量 90kDa のタンパク質を第 2 章で説明した食物繊維様タンパク質である 90kDa タンパク質と比較したところ、カラムによる分画の溶出位置、及び Stains all 染色での染色という共通の特徴を持ち、更にアミノ酸組成が類似していたことから活性酸素消去活性を示す分子量 90kDa のタンパク質が食物繊維様タンパク質と同一のタンパク質であると判断した。単離した 90kDa タンパク質の活性酸素消去活性を図 24 に示した。

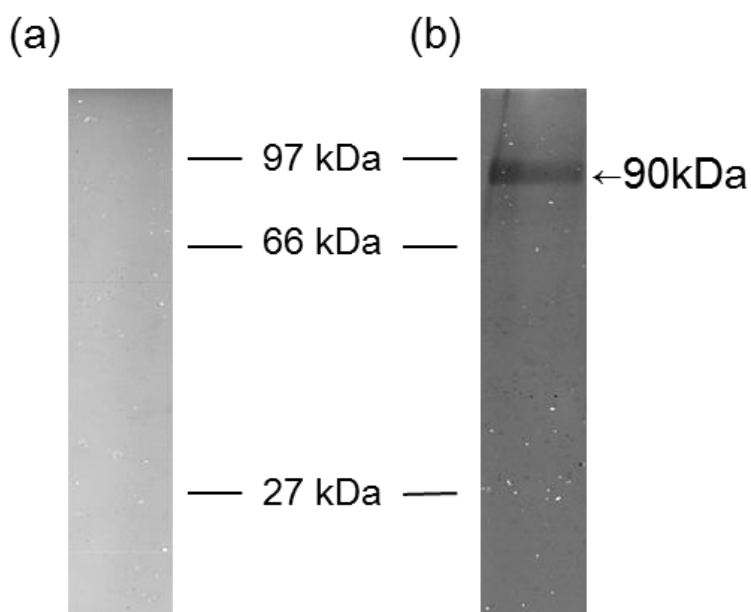


図 23 活性酸素消去活性因子の SDS 電気泳動図
(a) CBB 染色 (b) Stains all 染色

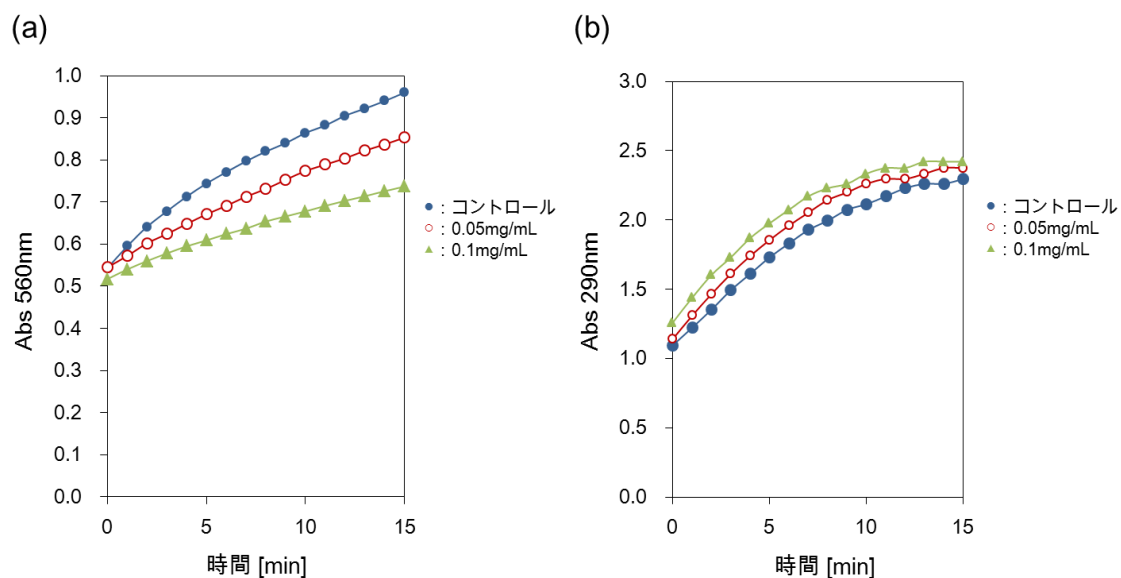


図 24 90kDa タンパク質による活性酸素消去活性

(a) 生成した活性酸素消去量、(b) キサンチンオキシダーゼ活性

90kDa タンパク質による DPPH ラジカル消去活性作用

単離した 90kDa タンパク質による DPPH ラジカル消去活性を調べた。DPPH ラジカルは安定なラジカルを持つ合成物であり、活性酸素消去活性の評価に広く用いられている。図 25 に示したように、DPPH ラジカルは溶媒に溶かすと黒紫色に呈色し、517nm に吸収波長を持つ。この溶液に抗酸化物質を含む成分を加えると、DPPH ラジカルが消去され、無色の DPPH が生成するため、色が薄くなる。この色の変化を吸光度 517nm を測定することで抗酸化力を評価した。

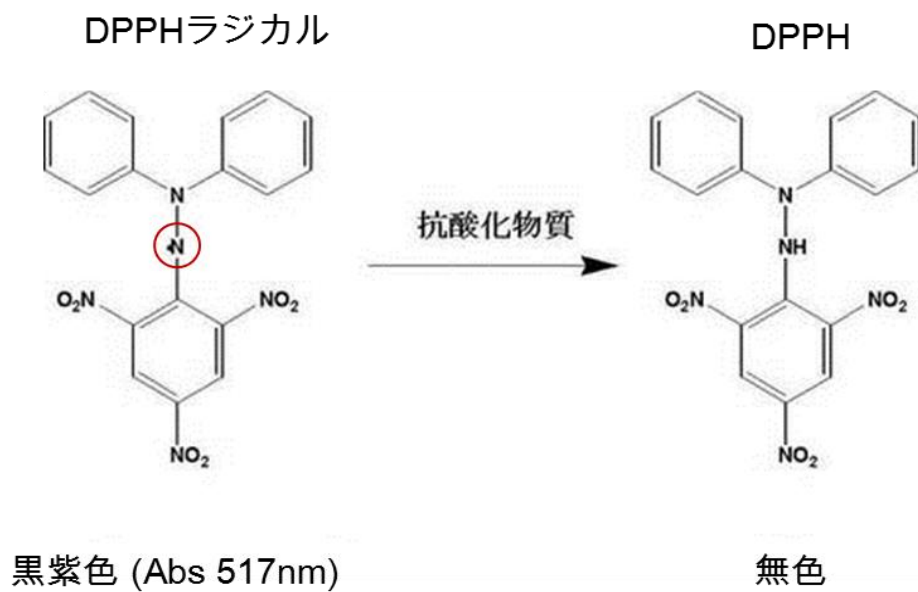


図 25 DPPH ラジカルを用いた抗酸化活性の測定原理

90kDa タンパク質と DPPH ラジカルを混合し、DPPH ラジカル消去活性を測定した (図 26)。90kDa タンパク質には弱いながら DPPH ラジカル消去活性作用を示すことが分かった。

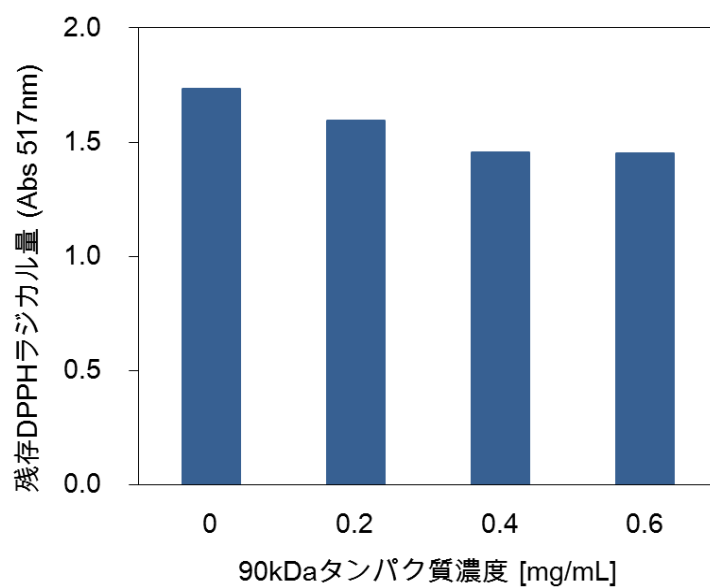


図 26 90kDa タンパク質による DPPH ラジカル消去活性

90kDa タンパク質による鉄イオン還元活性作用

90kDa タンパク質による鉄イオン (III) 還元活性を調べた。鉄イオン (III) は、還元剤の作用により還元され鉄イオン (II) となると、錯体であるフェロジンの赤の矢印に示した箇所に配位し、540 nm に吸収波長を持つフェロジン錯体を形成する (図 27)。形成されたフェロジン錯体量を、吸光度 540 nm を測定することにより、還元された鉄イオン量として定量した。

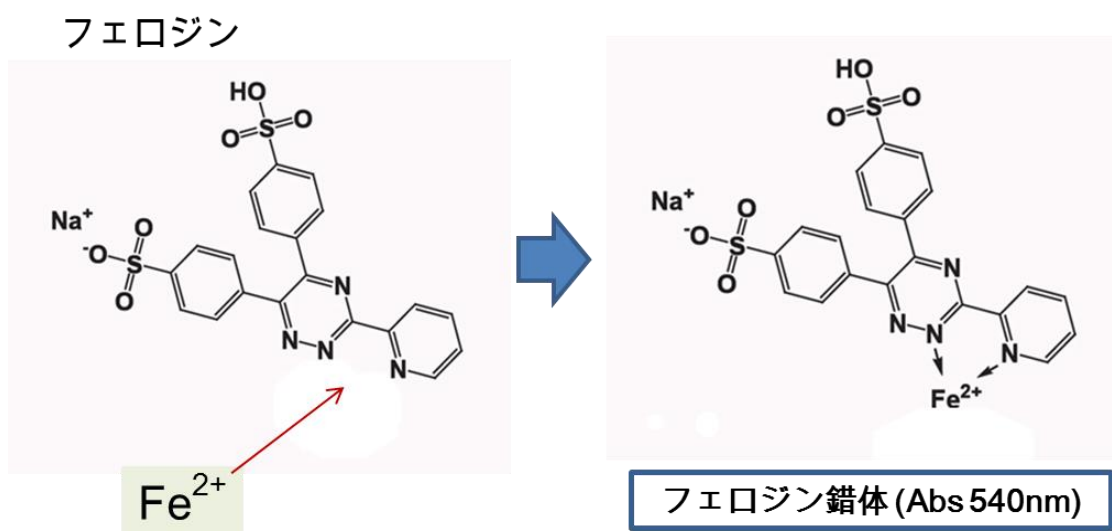


図 27 フェロジンを用いた鉄イオン還元活性の測定原理

鉄イオン (III) と 90kDa タンパク質を混合し、還元された鉄イオン (II) の量を、フェロジン錯体を測定することによって評価した (図 28)。90kDa タンパク質は鉄イオン (III) を鉄イオン (II) に還元する能力を持つことが分かった。

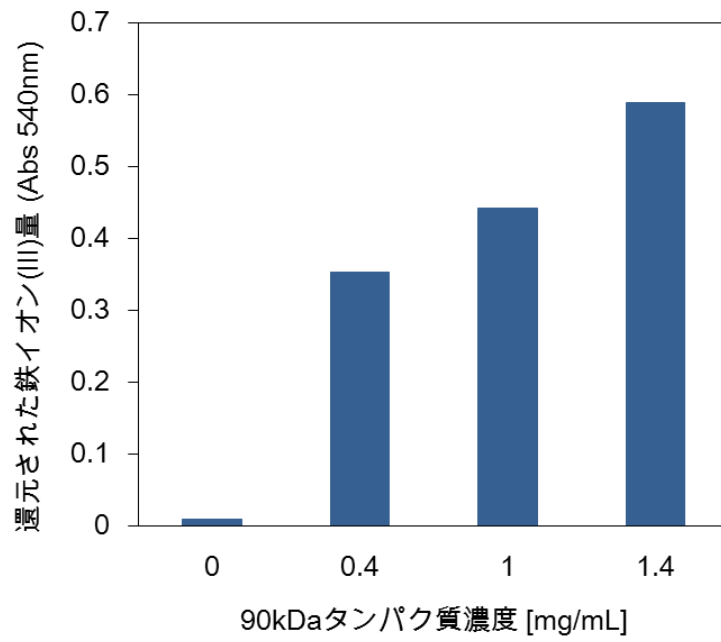


図 28 90kDa タンパク質による鉄イオン (III) 還元活性作用

3-3 考察

ホタテガイ貝殻に含まれる活性酸素消去活性因子を探索し、分子量 90kDa のタンパク質を単離した。そして食物繊維様物質である 90kDa タンパク質と同一のタンパク質であることを明らかにした。S - 300 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによるホタテガイ貝殻有機成分の分画の過程において、90kDa タンパク質を含む画分の他に、低分子量の画分にも活性酸素消去活性が検出された。同研究室の三津橋らは、6 M HCl により加水分解した 90kDa タンパク質の断片を用いた際も、活性酸素消去活性が維持されたことを明らかにしていることから [23, 30]、90kDa タンパク質の断片が低分子画分に含まれているのではないかと推定している。しかし、90kDa タンパク質の低分子断片の存在が確認できておらず、検出された低分子画分の活性酸素消去活性因子が 90kDa タンパク質の断片であるかどうかは明らかではない。

同研究室の部田らはラットを用い、ホタテガイ貝殻有機成分が UV によって誘発された皮膚負傷に対して皮膚を保護することを明らかにした [6]。更に、ホタテガイ貝殻有機成分はラットの皮膚において、過酸化スクワレンにより誘発されたしわ形成を抑制した。in vivo で皮膚に作用するには、分子量 500 Da 以下であることが必要であるとの報告があり [5]、ホタテガイ貝殻中の活性酸素消去因子が皮膚の細胞に作用するためには、低分子量である必要がある。従って、S - 300 ゲルろ過カラムによる分画で検出された低分子量画分の活性酸素消去活性因子が、皮膚における酸化的ストレスに保護的作用を示しているのではないかと考えられる。

単離した 90kDa タンパク質は、スーパーオキシド・アニオンラジカル消去活性、抗酸化活性、および還元活性を示すことを明らかにした。90kDa タンパク質の活性酸素消去活性は精製するたびに異なり、スーパーオキシド・アニオンラジカルを約 50 % 消去するために必要な 90kDa タンパク質濃度が 0.1 ~ 1.0 mg / ml と大きくばらつきが発生した。この活性のばらつきは、精製過程において 90kDa タンパク質が酸化されたのではないかと考えられる。過去に酸化防止剤であるトコフェロール (Vitamin E)、及びブチル化ヒドロキシアニソール (BHA) が、濃度 10 µg / mL でスーパーオキシド・アニオンラジカルを約 75 % 消去することを明らかにしている [9, 10]。一方、90kDa タンパク質は、濃度 0.1 mg / ml でスーパーオキシド・アニオンラジカルを約 50 % 消去した。この違いは 90kDa タンパク質が分子量 90kDa と高分子であるためであり、トコフェロール、BHA、及び 90kDa タンパク質は、約 1 ~ 20 µM と同程度の濃度において同等のスーパーオキシド・アニオンラジカル消去活性を示している。

活性酸素消去活性作用を持つ成分は皮膚保護剤として紫外線からの皮膚損傷を防ぐ役割を担い、化粧品などの応用として近年需要が増えている。しかし、ホタテガイ貝殻に含まれる 90kDa タンパク質は、分子量 90kDa と高分子であることや、90kDa タンパク質の断片と考えられる低分子画分にタンパク質が確認できていないなど不明瞭

な点が多いことから、抗酸化剤として利用できるのかどうかという課題が残っている。

4章 90kDa タンパク質のプロテアーゼ活性作用

4-1 実験方法

4-1-1 プロテアーゼ活性の測定

[使用試薬]

ジメチルスルホキシド (DMSO)

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (キモトリプシン基質)

50 mM Hepes-NaOH (pH 7.5)

[使用器具]

恒温槽

分光光度計

[試薬調整]

・ 10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	6.2 mg
---------------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.5)

Hepes	1.19 g
-------	--------

超純水 80 mL に溶かし、NaOH 溶液で pH 7.5 に調整後、超純水で 100 mL までメスアップした。

[方法]

1, エッペンチューブに下記の条件になるよう各試薬を添加した。

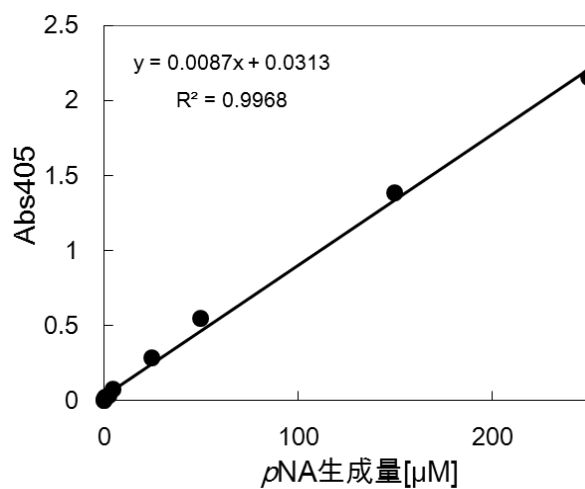
50 mM Hepes-NaOH	40 μ L
サンプル溶液	濃度に合わせて調整
超純水	195 μ L にする

2, 10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を 5 μ L 添加し、速やかに混合し、吸光度 405 nm を測定した。この値を開始 0 分後とした。

3, 37°C で 30 分間インキュベートし、再度吸光度 405 nm を測定した。この値から開始 0 分後の値を差し引いた値を開始 30 分後とし、プロテアーゼ活性とした。

[検量線]

pNA 生成量 [μM]	Abs 405nm
0	0
0.05	0.002
0.25	0.007
0.5	0.024
2.5	0.037
5	0.075
25	0.283
50	0.547
150	1.39
250	2.16



4-1-2 ゼラチンザイモグラフィー

[使用器具]

泳動槽
 泳動板
 泳動板用パッキン
 クリップ
 ゲタ
 電源(Power Supply)

[使用試薬]

ゼラチン
 Plasmin from human plasma (SIGMA)
 2.5 % Triton X-100
 2-メルカプトエタノール
 N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)
 20 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
 30 % アクリルアミド・ビス
 Lower Buffer
 Upper Buffer
 10 % 過硫酸アンモニウム (APS)

10 × Running Buffer

Sample 処理液

[試薬調整]

2.5 % Triton X-100

Triton X-100	1 mL
--------------	------

超純水で 40 mL にメスアップした

[方法]

- 1, 電気泳動用のゲルに最終濃度 2 mg / mL となるようゼラチンを溶かした。
- 2, 「2-1-7 SDS 電気泳動」と同様の操作でサンプルを電気泳動した。
- 3, 電気泳動後のゲルを 2.5 % Triton X-100 溶液 40 mL に浸し、1 時間振とうした。
- 4, 2.5 % Triton X-100 溶液を捨て、50 mM Tris - HCl (pH 7.5) 溶液 40 mL を添加し、37 °C で 12 ~ 24 時間振とう培養した。
- 5, 50 mM Tris - HCl 溶液を捨て、CBB 染色液で染色し、染色されていない部分を確認した。

4-1-3 Native PAGE

[使用器具]

泳動槽

泳動槽 (タンパク質抽出用)

泳動板

泳動板用パッキン

クリップ

電源 (Power Supply)

遠心式フィルターユニット (MILLIPORE)

[使用試薬]

2-メルカプトエタノール

N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)

30 % アクリルアミド・ビス

Lower Buffer

Upper Buffer

- 10 % 過硫酸アンモニウム (APS)
- 10 × Running Buffer (Native PAGE 用)
- Sample 処理液 (Native Page 用)

[試薬調整]

- 10 × Running buffer (Native PACE 用)

Tris	1.21 g
グリシン	7.5 g

超純水 500 mL に溶かした

- Sample 処理液 (Native PAGE 用)

Tris	6.06 g
グリセロール	50 mL
ブROMOFENOLBLUE (BPB)	微量

超純水で 100 mL にメスアップした

[方法]

- 1, 以下の組成でゲルを作製した。

	Lower Gel	Upper Gel
アクリルアミド-ビス	2.4 mL	0.47 mL
Lower Buffer	1.5 mL	-
Upper Buffer	-	0.83 mL
超純水	2.0 mL	1.98 mL
APS	60 μL	30 μL

- 2, Upper Gel を充填する際、ゲタを用いずに平らになるようにした。
- 3, サンプル処理液及び Running Buffer を Native Page 用にし、泳動サンプルを Upper Gel 全体に広がるよう添加し、「2-1-7 SDS 電気泳動」と同様の操作で電気泳動を行った。
- 4, 泳動後、ゲルの両端を縦に切り取り、切り取ったゲルを Stains all 染色した。
- 5, Stains all 染色で染色したゲルを元に残りのゲルからタンパク質のバンドがある箇所を切り取り、回収した。
- 6, 遠心式フィルターユニットに切り取ったゲルを詰め、タンパク質抽出用電気泳動槽にセットし、C.V. 400 V で overnight 泳動してゲルからタンパク質を抽出した。
- 7, 抽出したタンパク質を含む溶液を限外ろ過し、タンパク質の洗浄、濃縮を行った。

4-1-4 90kDa タンパク質が持つプロテアーゼ活性の性質

温度による影響

○至適温度の測定

[使用器具]

恒温槽

分光光度計

[使用試薬]

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)

[方法]

- 1, 「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の方法でインキュベート時の温度を4~80°Cの範囲で設定を変更し、0分後と30分後の吸光度 405 nmの値を測定した。

○温度安定性の測定

[方法]

- 1, 「○至適温度の測定」と同様の条件で系を作製し、4~80°Cの範囲に設定後、インキュベート開始0時間後のプロテアーゼ活性を1とし、指定時間後の吸光度及びその30分後の吸光度を測定し、その差から残存プロテアーゼ活性を評価した。

pHの影響

[使用器具]

恒温槽

分光光度計

[使用試薬]

ジメチルスルホキシド(DMSO)

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

50 mM Gly - HCl (pH 2.5)

50 mM Phosphate Buffer (pH 6.0)

50 mM phosphate buffer (pH 8.0)

50 mM Tris - HCl (pH 10.5)

50 mM Gly - NaOH (pH 12.0)

[試薬調整]

・ 50 mM Gly - HCl

グリシン	187.7 mg
------	----------

超純水 40 mL に溶かし、HCl で pH 2.5 に調整後、超純水で 50 mL までメスアップした

・ 50 mM Phosphate Buffer

- 1, 下記のように 50 mM 磷酸二水素ナトリウム及び 50 mM 磷酸水素二ナトリウムを作製した。

50 mM NaHPO₄ · 2H₂O

NaHPO ₄ · 2H ₂ O	0.7801 g
--	----------

超純水 100 mL に溶かした

50 mM Na₂HPO₄

Na ₂ HPO ₄	0.7098 g
----------------------------------	----------

超純水 100 mL に溶かした

- 2, pH を 6.0 または 8.0 となるよう上記の溶液を混合した。

・ 50 mM Tris - HCl

Tris	302.5mg
------	---------

超純水 40 mL に溶かし、HCl で pH 10.5 に調整後、超純水で 50 mL までメスアップした

・ 50 mM Gly - NaOH

グリシン	187.7 mg
------	----------

超純水 40 mL に溶かし、NaOH 溶液で pH 12 に調整後、超純水で 50 mL までメスアップした

[方法]

- 1, pH 緩衝液を 50mM Hepes NaOH (pH 7.5) から指定の pH 緩衝液に置き換える他は「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の方法で 0 分後と 30 分後の吸光 405 nm の値を測定した。

SDS 存在下による影響

○SDS 存在下初期活性の測定

[使用器具]

恒温槽
分光光度計

[使用試薬]

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
50 mM Hepes - NaOH (pH 7.5)
20 % SDS

[方法]

- 1, 「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の条件に加え、指定濃度になるように SDS を添加して系を作製し、0 分後と 30 分後の吸光度 405 nm を測定することでプロテアーゼ活性とし、SDS を含まない Control と比較した。

○SDS 安定性の測定

[方法]

- 1, 「○SDS 存在下初期」と同様の系を作製し、インキュベート開始 0 時間後のプロテアーゼ活性を 1 とし、指定時間後の吸光度及びその 30 分後の吸光度を測定し、その差から残存プロテアーゼ活性を評価し、SDS を含まない Control と比較した。

Urea 存在下による影響

[使用器具]

恒温槽
分光光度計

[使用試薬]

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
50 mM Hepes-NaOH (pH 7.5)
20 M Urea

[試薬調整]

・ 20 M Urea

Urea	60.06 g
------	---------

超純水 50 mL に溶解した

[方法]

- 1, 「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の条件に加え、指定濃度になるように Urea を添加して系を作製し、0 分後と 30 分後の吸光度 405 nm を測定することでプロテアーゼ活性とし、Urea を含まない Control と比較した。

界面活性剤存在下による影響

[使用器具]

恒温槽
分光光度計

[使用試薬]

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
50 mM Hepes - NaOH (pH 7.5)
10 % Triton X - 100
10 % Tween 20
10 % Saponin (茶の実製)

[試薬調整]

- ・ 10 % Triton X - 100

Triton X - 100	100 μ L
----------------	-------------

超純水 1 mL に溶かした

- ・ 10 % Tween 20

Tween 20	100 μ L
----------	-------------

超純水 1 mL に溶かした

- ・ 10 % Saponin

Saponin	100 mg
---------	--------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

- 1, 「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の条件に加え、濃度 1 % になるようにそれぞれの界面活性剤を添加して系を作製し、0 分後と 30 分後の吸光度 405 nm を測定することでプロテアーゼ活性とし、界面活性剤を含まない Control と比較した。

プロテアーゼ阻害剤及び金属イオン存在下による影響

[使用器具]

恒温槽
分光光度計

[使用試薬]

2-プロパノール
10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)
10 mM Diisopropylfluorophosphate (DFP)
10 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)
10 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
10 mM Iodoacetamide
10 mM CaCl₂

10 mM MgCl₂

10 mM NiSO₄

10 mM MnCl₂

10 mM CoCl₂

10 mM ZnSO₄

10 mM CuSO₄

10 mM Fe₂Cl₃

[試薬調整]

・ 10 mM DFP

DFP	1.8 mg
-----	--------

2-プロパノール 1 mL に溶かした

・ 10 mM PMSF

PMSF	1.7 mg
------	--------

2-プロパノール 1 mL に溶かした

・ 10 mM EDTA

EDTA・2Na	3.7 mg
----------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM Iodoacetamide

Iodoacetamide	1.8 mg
---------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM CaCl₂

CaCl ₂ ・2H ₂ O	1.5 mg
--------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM MgCl₂

MgCl ₂ ・6H ₂ O	2.0 mg
--------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM NiSO₄

NiSO ₄ ・6H ₂ O	2.6 mg
--------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM MnCl₂

MnCl ₂ · 4H ₂ O	2.0 mg
---------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM CoCl₂

CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.4 mg
---------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM ZnSO₄

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.9 mg
---------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM CuSO₄

CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5 mg
---------------------------------------	--------

超純水 1 mL に溶かした

・ 10 mM Fe₂Cl₃

Fe ₂ Cl ₃ · 6H ₂ O	2.7 mg
---	--------

超純水 1 mL に溶かした

[方法]

- 1, 「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の条件に加え、濃度 1 mM になるようにそれぞれのプロテアーゼ阻害剤または金属イオンを添加して系を作製し、0 分後と 30 分後の吸光度 405 nm を測定することでプロテアーゼ活性とし、プロテアーゼ阻害剤及び金属イオンを含まない Control と比較した。

プロテアーゼの基質特異性 (合成ペプチド)

[使用器具]

恒温槽
分光光度計
分光蛍光計

[使用試薬]

DMSO

合成ペプチド

10 mM N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
10 mM Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNA (トリプシン基質)
10 mM Bz-Tyr-pNA (キモトリプシン基質)
10 mM Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (エラスターゼ基質)
10 mM Bz-DL-Arg-pNA · HCl (トリプシン基質)
10 mM Z-Ala-Ala-Leu-pNA (サブチリシン基質)
10 mM Pyr-Phe-Leu-pNA (システインプロテアーゼ基質)
10 mM Gly-Pro-pNA · Tos (ジペプチジルアミノペプチダーゼ基質)
10 mM Z-His-Clu-Lys-MCA (トリプシン基質)
10 mM Glt-Gly-Arg-MCA (トリプシン基質)
10 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (キモトリプシン基質)
10 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (キモトリプシン基質)
10 mM Suc-Ile-Ile-Trp-MCA (キモトリプシン基質)

50 mM Heps-NaOH (pH 7.5)

[試薬調整]

・ 10 mM Boc-Leu-Thr-Arg-pNA

Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNA	7.0 mg
-------------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Bz-Tyr-pNA

Bz-Tyr-pNA	4.1 mg
------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Suc-Ala-Ala-Ala-pNA

Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	4.5 mg
---------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Bz-DL-Arg-pNA ・ HCl

Bz-DL-Arg-pNA ・ HCl	4.3 mg
---------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Z-Ala-Ala-Leu-pNA

Z-Ala-Ala-Leu-pNA	5.3 mg
-------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Pyr-Phe-Leu-pNA

Pyr-Phe-Leu-pNA	5.1 mg
-----------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Gly-Pro-pNA ・ Tos

Gly-Pro-pNA ・ Tos	4.6 mg
-------------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Z-His-Clu-Lys-MCA

Z-His-Clu-Lys-MCA	5.3 mg
-------------------	--------

DMSO 750 μ L に溶かした

・ 10 mM Glt-Gly-Arg-MCA

Glt-Gly-Arg-MCA	5.2 mg
-----------------	--------

DMSO 1 mL に溶かした

・ 10 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	5.3 mg
-------------------------	--------

DMSO 800 μ L に溶かした

・ 10 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	5.3 mg
-------------------------	--------

DMSO 700 μ L に溶かした

・ 10 mM Suc-Ile-Ile-Tr.p.mCA

Suc-Ile-Ile-Tr.p.mCA	5.3 mg
----------------------	--------

DMSO 770 μ L に溶かした

[方法]

OpNA がラベリングされた合成ペプチドの場合

- 1, 使用する合成ペプチドを変更する以外は「4-1-1 プロテアーゼ活性の測定」と同様の条件で系を作製し、0 分後と 30 分後の吸光度 405 nm を測定することでプロテアーゼ活性とし、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNA を用いた時と比較した。

OMCA がラベリングされた合成ペプチドの場合

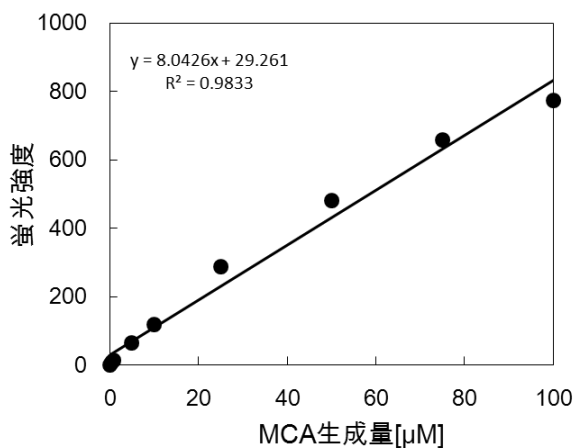
- 1, 下記の条件で系を作製した

HEPES-NaOH (pH7.5)	200 μ L
Sample	濃度に合わせて調整
超純水	975 μ L にする

- 2, 10 mM 合成ペプチドを 25 μ L 添加し、速やかに混合し、分光蛍光計で Ex = 380 nm、Em = 460 nm を測定し、蛍光強度を求めた。この値を開始 0 分後とした。
- 3, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、再度 Ex = 380 nm、Em = 460 nm を測定し、蛍光強度を測定した。この値から開始 0 分後の値を差し引いた値を開始 30 分後としてプロテアーゼ活性とし、Glt-Gly-Arg-MCA を用いた時と比較した。

[検量線]

MCA 生成量[μ M]	蛍光強度
0	0.1302
0.5	7.4063
1	13.8696
5	65.4355
10	118.273
25	287.228
50	481.338
75	658.598
100	774.418



4-1-5 90kDa タンパク質の基質特異性 (カゼイン)

[使用器具]

恒温槽

Zip Tip Pipette Tips (MILLIPORE)

[使用試薬]

5 mg / mL カゼイン

Tris - HCl (pH 10.5)

20 M Urea

[試薬調整]

・ 5 mg / mL カゼイン

カゼイン	5 mg
------	------

50 mM Tris - HCl (pH 10.5) 1 mL に溶かした

[方法]

1, 下記の条件になるよう系を作製した

5 mg / mL カゼイン	100 μ L
Tris - HCl (pH 10.5)	200 μ L
20 M Urea	300 μ L
Sample	濃度によって調整
超純水	1000 μ L にする

2, 37 °C で 16 ~ 24 時間インキュベートした。

3, 分解されたカゼイン断片を Zip Tip Pipette Tips を用いて精製し、MALDI TOF / TOF で解析を行った。

4-2 結果

ホタテガイ貝殻に含まれるプロテアーゼの発見

同研究室の劉らはホタテガイ貝殻有機成分中にプロテアーゼの1つであるキモトリプシン活性促進作用を持つ成分が存在することを明らかにしている [24]。このキモトリプシン活性促進作用を持つ成分を探索するにあたり、弱いながらプロテアーゼ活性を示す成分が存在することを見出した (図 29)。ホタテガイを含め、貝殻中にプロテアーゼが存在するという報告はされていないことから、このプロテアーゼ活性を示す成分の単離、同定を試みた。

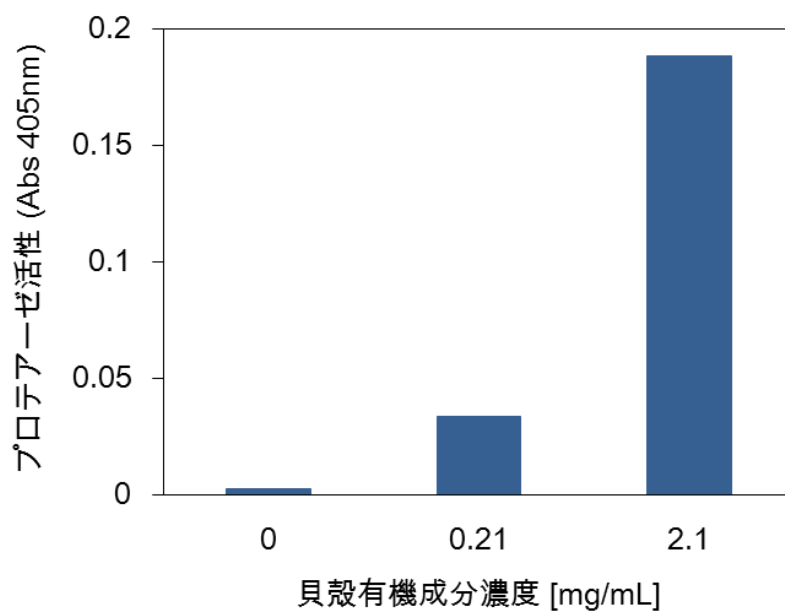


図 29 貝殻有機成分によるプロテアーゼ活性

ホタテガイ貝殻に含まれるプロテアーゼの単離

貝殻有機成分に含まれるプロテアーゼを S - 300 ゲルろ過カラム及び DEAE セルロースイオン交換カラムを用いて分画を行った (図 30 (a) (b))。

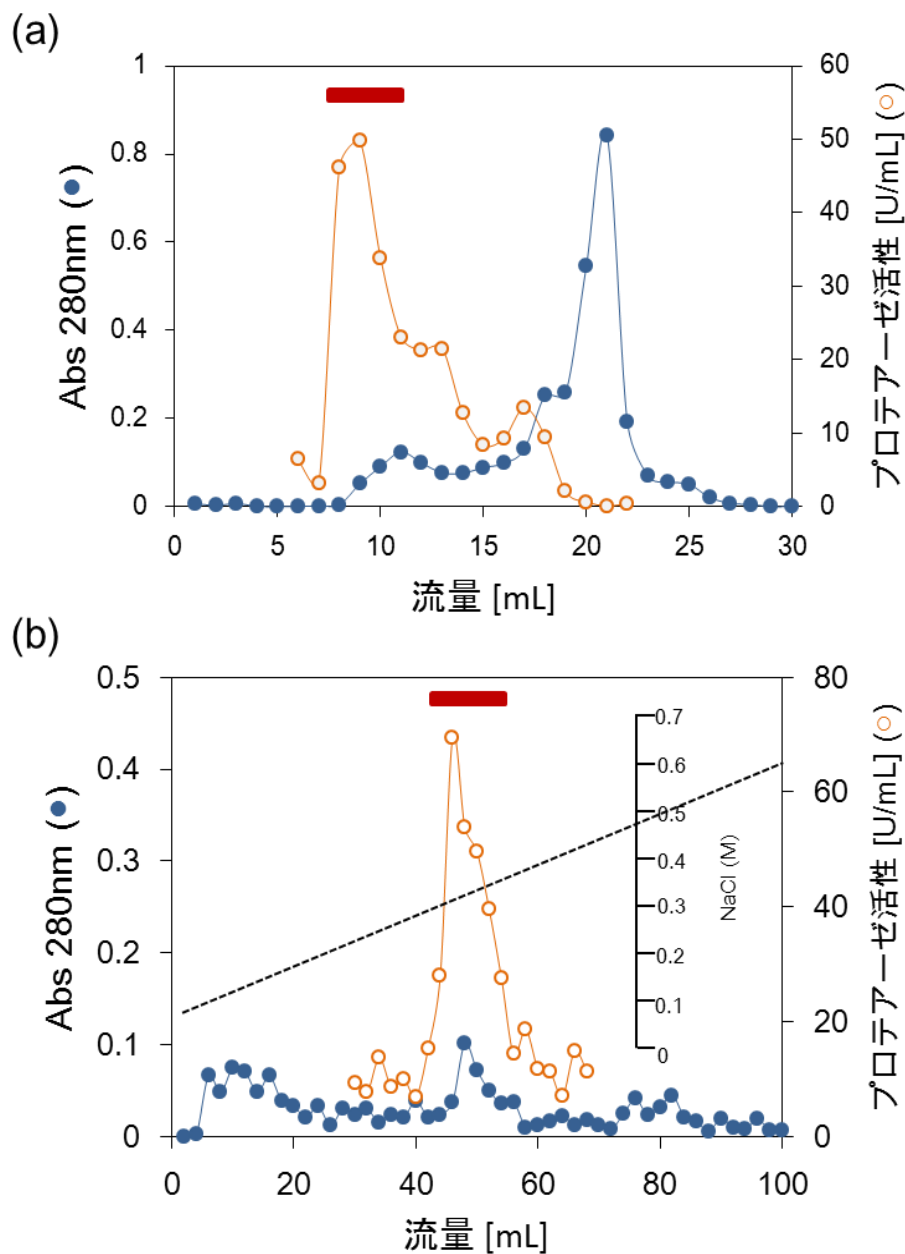


図 30 貝殻有機成分に含まれるプロテアーゼ活性因子の単離

(a) S - 300 ゲルろ過カラムによる分画 (○ : プロテアーゼ活性)、(b) DEAE セルロースイオン交換カラムによる分画 (○ : プロテアーゼ活性)

図 30 (a) より、流量 9 ~ 12mL の画分に強いプロテアーゼの存在を確認した。この画分を回収し、DEAE セルロースイオン交換カラムを用いて更なる精製を行い (図 30 (b))、流量 48 ~ 54 mL (NaCl 濃度約 0.35 M) の画分にプロテアーゼ活性を確認した。プロテアーゼを含む画分を集め、SDS 電気泳動後 CBB 染色及び Stains all 染色を行ったところ、Stains all 染色において主として分子量 90kDa のタンパク質を検出し、CBB 染色による他のタンパク質の存在は検出されなかった (図 31)。DEAE セルロースイオン交換カラムによる精製後も、90kDa タンパク質以外のタンパク質がわずかに検出されたことから、Native PAGE による更なる精製を行った。精製した分子量 90kDa のタンパク質をゼラチンザイモグラフィーにより確認を行ったところ、分子量 90kDa のバンドにプロテアーゼ活性が検出されたことから、貝殻有機成分に含まれるプロテアーゼは分子量 90kDa のタンパク質であると判断した (図 32)。最終的に、貝殻有機成分 19.78 mg から 90kDa タンパク質約 0.11 mg を精製することができた (図 33)。この分子量 90kDa のタンパク質は第 2 章で説明した食物繊維様タンパク質、及び第 3 章で説明した活性酸素消去活性作用を持つ 90kDa タンパク質と同一のタンパク質であることを確認した。

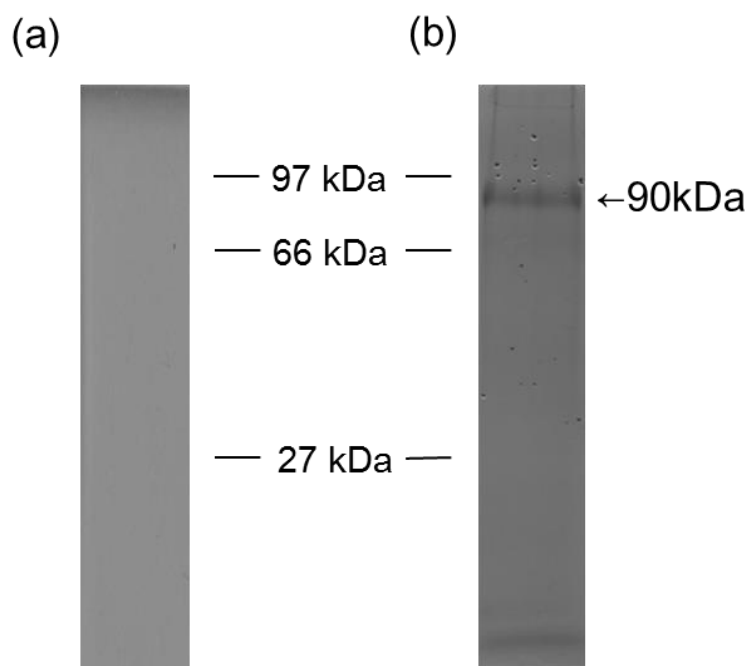


図 31 DEAE セルロースイオン交換カラムによる分画後のプロテアーゼの SDS 電気泳動図
(a) CBB 染色、(b) Stains all 染色

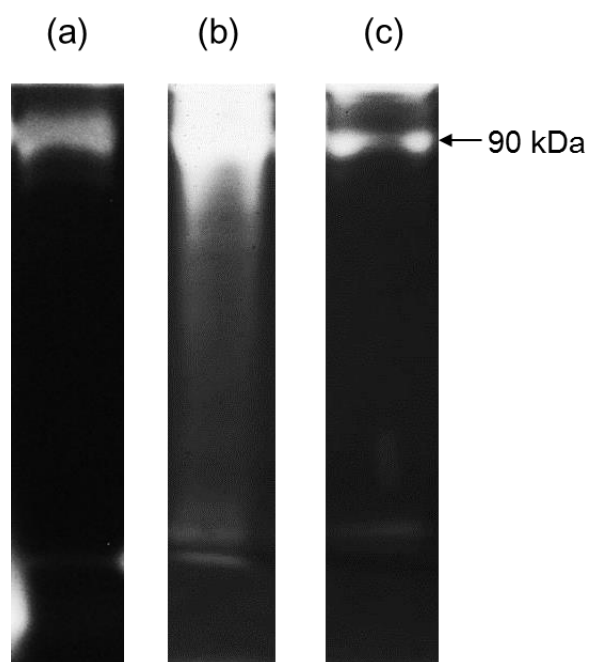


図 32 90kDa タンパク質を用いたゼラチンザイモグラフィー

(a) Plasmin (分子量 91kDa)、(b) 貝殻有機成分、(c) 単離した 90kDa タンパク質

Step	Protein (mg)	Specific activity (U/mg·protein)	Activity (U)	Purification (fold)	Recovery (%)
貝殻有機成分	19.78	7.85	155.3	1	100
S-300 ゲルろ過カラム	1.29	82	105.8	10.4	67.8
DEAE-セルロースイオン交換カラム	0.77	102.7	79.1	13.1	51
Native-PAGE	0.11	131.1	14.4	16.8	9.3

1U=37°C、pH7.5条件下においてタンパク質1mgが1分間あたり Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNAを1μmol加水分解する酵素活性

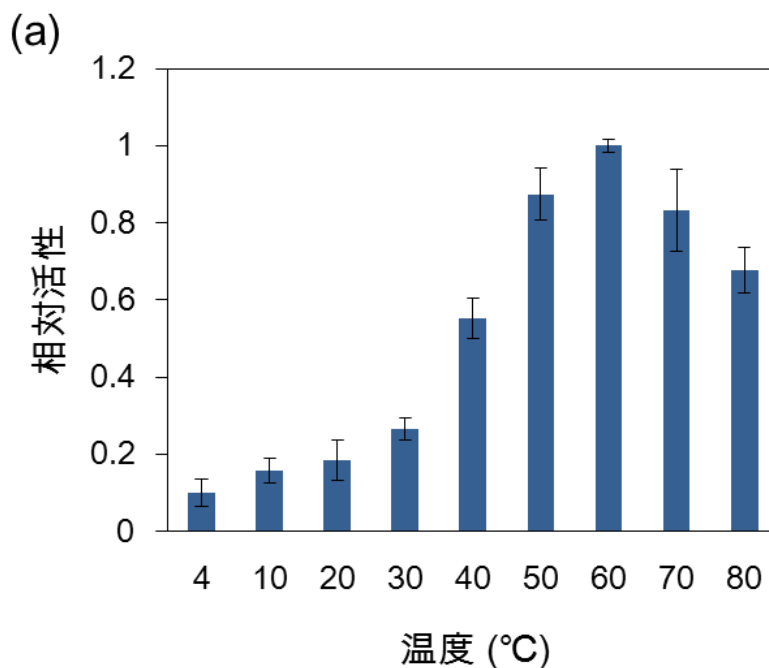
表 2 単離したプロテアーゼの収量

90kDa タンパク質のプロテアーゼ活性の性質

○温度による影響

単離した 90kDa のプロテアーゼ活性の至適温度を測定した (図 33 (a))。プロテアーゼの至適温度は環境に応じて最適化されている場合が多く、ヒト体内に存在するプロテアーゼは 37 °C 付近に至適温度を持ち、好熱菌など高温環境下に生息する生物が持つプロテアーゼの至適温度はより高いものになる。至適温度のグラフの縦軸は、プロテアーゼ活性が一番高い温度条件における活性を 1 とした時の相対活性を表している。プロテアーゼは 60 °C において至適温度となり、37 °C 位に至適温度を持つトリプシン及びキモトリプシンに比べ、至適温度が高いことが分かった。また、70 °C、80 °C 条件下においても高いプロテアーゼ活性を維持した。

次に熱に対する安定性について検討を行った (図 33 (b))。グラフの縦軸はインキュベーション開始 0 時間後のプロテアーゼ活性を 1 とした時の相対活性を表している。プロテアーゼは、50 °C 条件下で 24 時間インキュベーション後もプロテアーゼ活性が約 60 % 維持され、60 °C においても約 25 % 維持されることから 90kDa タンパク質は熱安定性の高いプロテアーゼであることが分かった。



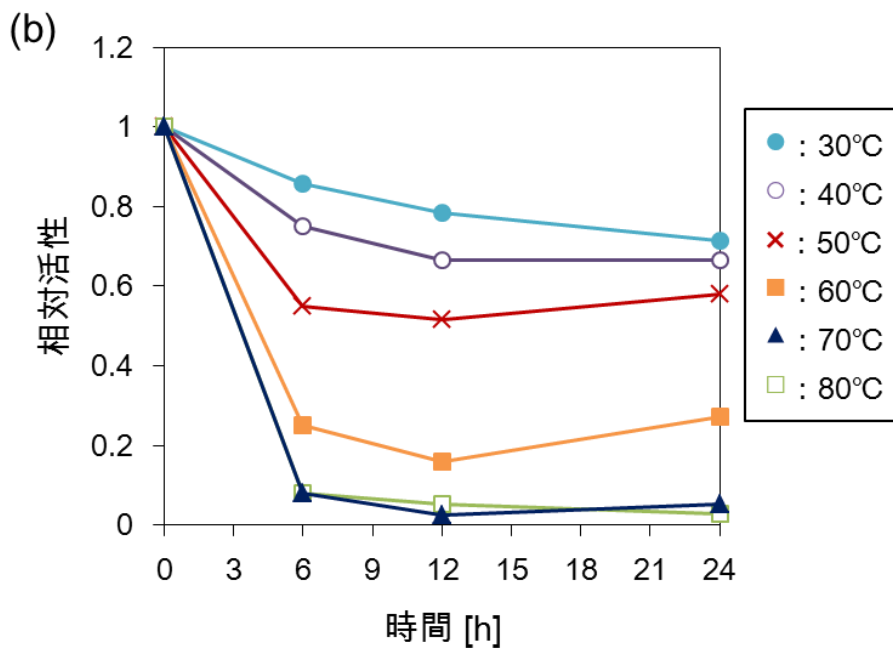


図 33 プロテアーゼの温度による影響
(a) 至適温度、(b) 温度安定性

プロテアーゼ活性の pH による影響

プロテアーゼの至適 pH を調べた (図 34)。プロテアーゼの種類により至適 pH は異なり、ペプシンは pH 2 付近という強酸性条件下で至適 pH となり、トリプシンやキモトリプシンは pH 8 付近の弱アルカリ性条件下で至適 pH となる。90kDa タンパク質はアルカリ性条件下でプロテアーゼ活性が高く、pH 10.5 条件下で至適 pH となることが分かった。このことから 90kDa タンパク質はアルカリ性条件下でプロテアーゼ活性が高くなるアルカリプロテアーゼであることが分かった。

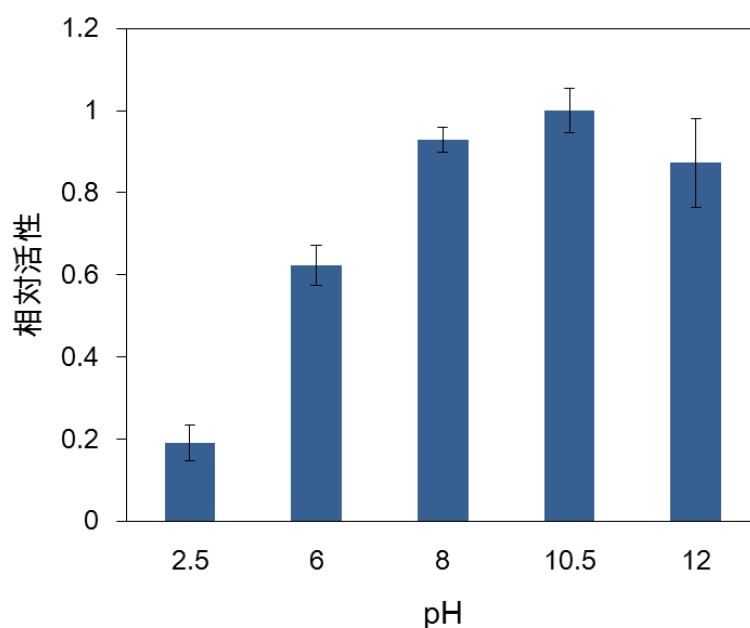


図 34 プロテアーゼの pH による影響

SDS のプロテアーゼ活性への影響

プロテアーゼ活性に対する SDS の影響を調べた (図 35 (a) (b))。SDS はタンパク質変性剤として電気泳動などに広く用いられ、SDS : タンパク質 = 1 : 1.4 (質量比) 程度で混合することにより、殆どのタンパク質を変性させることができる。図 35 (a) に示すように SDS 濃度 1 % 存在下においてもプロテアーゼ活性は殆ど阻害されなかった。また、SDS に対する安定性を測定したところ (図 35 (b))、SDS 濃度 0.5 % 存在下で 24 時間インキュベート後もインキュベート開始 0 時間後のプロテアーゼ活性に比べ、約 50 % プロテアーゼ活性を維持していた。このことから、90kDa タンパク質は SDS によるタンパク質変性作用を受けにくいことが分かった。

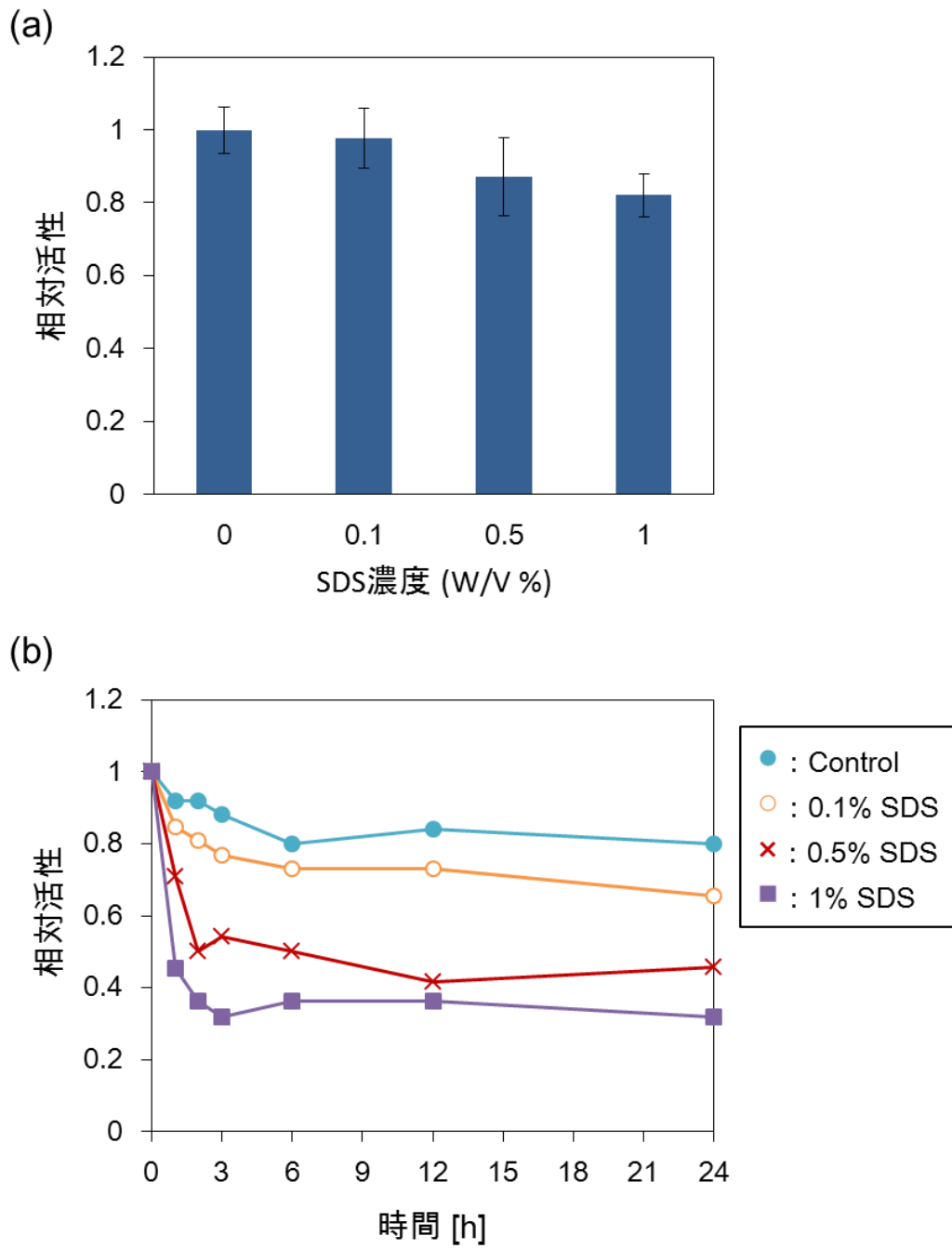


図 35 プロテアーゼの SDS 存在下における影響
 (a) SDS のプロテアーゼ活性への影響、(b) SDS に対する安定性

尿素 (Urea) のプロテアーゼ活性への影響

プロテアーゼ活性に対する Urea の影響を調べた (図 36)。Urea は SDS と同様にタンパク質の変性剤として広く用いられており、Urea 濃度が 8M になるように添加することで大抵のタンパク質を変性させることができる。90kDa タンパク質は Urea 濃度 8M 存在下においてもプロテアーゼ活性が大きく阻害されず、変性されにくいことが分かった。このことから 90kDa タンパク質は SDS に加え、Urea によるタンパク質変性作用にに対しても変性しにくいことが分かった。

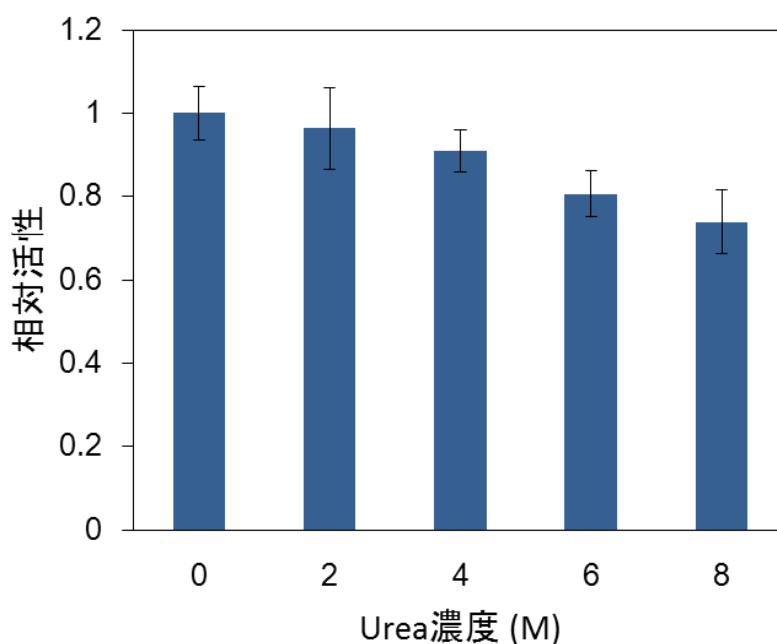


図 36 プロテアーゼの Urea による影響

界面活性剤のプロテアーゼ活性への影響

界面活性剤として Triton X - 100、Tween 20、Saponin を用い、プロテアーゼ活性の影響を調べた (図 37)。これらの界面活性剤 1% 存在下においてもプロテアーゼ活性にほぼ影響されないことが分かった。このことから 90kDa タンパク質は SDS、Urea、及びこれらの界面活性剤による変性を受けにくく、構造の安定性が高いタンパク質であることが分かった。

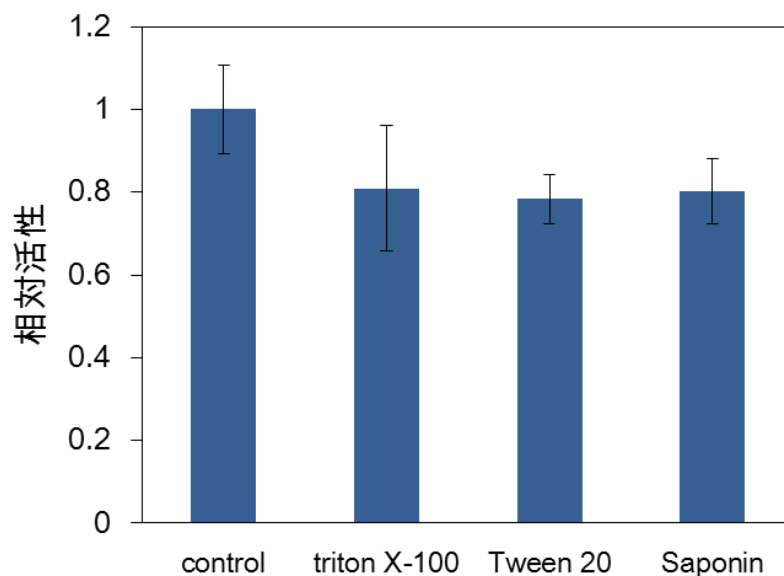


図 37 プロテアーゼの界面活性剤による影響

プロテアーゼ阻害剤及び金属イオンのプロテアーゼ活性への影響

プロテアーゼには酵素活性部位の違いによりセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。90kDa タンパク質はセリンプロテアーゼ阻害剤である DFP 及び PMSF により阻害され、システインプロテアーゼ阻害剤である Iodoacetamide 及び金属プロテアーゼ阻害剤である EDTA による影響は殆どなかった (表 3)。このことから 90kDa タンパク質はセリンプロテアーゼであることが分かった。

更に金属イオンによる影響を調べた (表 3)。金属イオンはタンパク質の構造に影響を与えるものが多く、金属プロテアーゼのように特定の金属イオンがプロテアーゼ活性に必須なタンパク質がある一方、重金属イオンの多くはタンパク質を変性させ、機能を失活させる。90kDa タンパク質は Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} イオンによりプロテアーゼ活性がそれぞれ 27%、67%、49% となり、一部の重金属による変性を受けることが分かった。一方 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} イオン存在下では弱いながらプロテアーゼ活性を促進した。

	相対活性 (control = 1.00)
control	1.00
DFP	0.1
PMSF	0.24
EDTA	0.82
Iodoacetamide	0.85
CaCl ₂	1.16
MgCl ₂	1.14
NiSO ₄	1.00
MnCl ₂	1.11
CoCl ₂	1.04
ZnSO ₄	0.67
CuSO ₄	0.27
Fe ₂ Cl ₃	0.49

表3 プロテアーゼの阻害剤及び金属イオン存在下による影響

プロテアーゼの基質特異性

○合成ペプチドによる評価

プロテアーゼの基質特異性を調べるため、合成ペプチドを用いて評価した (表 4)。基質特異性はプロテアーゼの性質の中で特に重要視されており、トリプシンのような基質特異性の高いプロテアーゼは、タンパク質のアミノ酸配列分析用酵素などに用いられ、ペプシンのような基質特異性の低いプロテアーゼは、洗剤用酵素や肉軟化剤として利用されている。pNA がラベリングされた合成ペプチド においては Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNA に対するプロテアーゼ活性を 1.00 とした時の相対活性、MCA がラベリングされた合成ペプチド においては、Glut-Gly-Arg-MCA に対するプロテアーゼ活性を 1.00 とした時の相対活性を示している。プロテアーゼは主に Arg, Lys, Phe の C 末端を切断していることが分かった。

合成ペプチド名	相対活性	合成ペプチド名	相対活性
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg- <i>p</i> NA	1.00	Glt-Gly-Arg-MCA	1.00
Bz-DL-Arg- <i>p</i> NA	0.36	Z-His-Glu-Lys-MCA	1.64
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> NA	0.63	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0.08
Bz-Tyr- <i>p</i> NA	0.06	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0.05
Z-Ala-Ala-Leu- <i>p</i> NA	0.08	Suc-Ile-Ile-Trp-MCA	0.01
Pyr-Phe-Leu- <i>p</i> NA	0.11		
Gly-Pro- <i>p</i> NA· Tos	0.12		
Suc-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> NA	0.06		

表 4 合成ペプチドを用いたプロテアーゼの基質特異性

○タンパク質 (カゼイン) による評価

プロテアーゼの基質特異性がタンパク質においても認められるかどうかカゼインを用いて評価した (図 38)。90kDa タンパク質によりカゼインを分解後、Zip Tip C18 により精製し、MALDI TOF / TOF で分析した。90kDa タンパク質がどのアミノ酸を認識してカゼインを分解したかを Mascot Search による検索によって調べた。90kDa タンパク質は合成ペプチドを用いた時と同様、Arg, Lys, Phe の C 末端を切断していることが分かった。

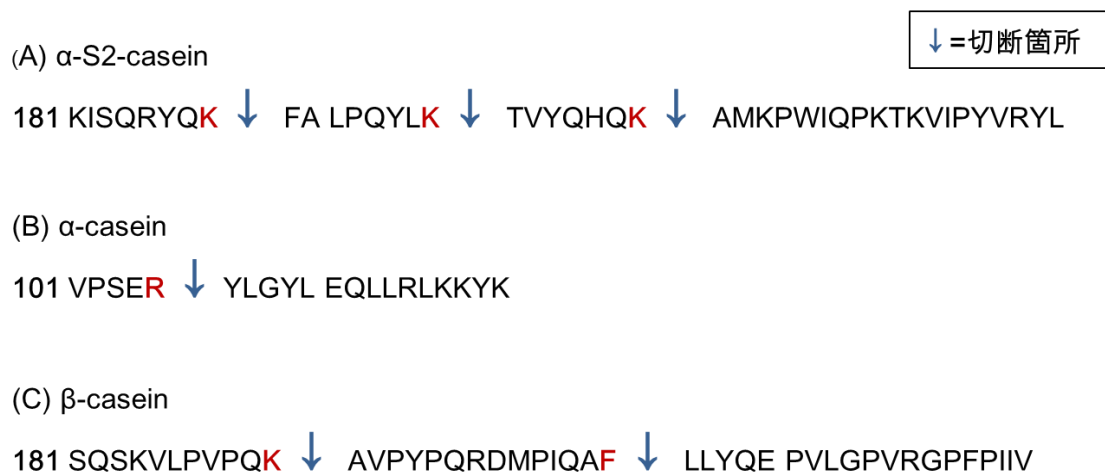


図 38 カゼインを用いたプロテアーゼ活性の基質特異性

4-3 考察

ホタテガイ貝殻中に含まれるプロテアーゼの単離を試み、それが 90kDa タンパク質であることを明らかにした。90kDa タンパク質は、アルカリ pH 条件下で高い活性を示し、セリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF 及び DFP によって活性が阻害された。アルカリプロテアーゼは、アルカリ pH の範囲において至適 pH となるプロテアーゼと定義され、セリンプロテアーゼまたは金属プロテアーゼに分類される [1]。このことから、90kDa タンパク質はアルカリセリンプロテアーゼであることが分かった。

アルカリセリンプロテアーゼはアルカリ pH で安定であるものが多く、多くの産業分野において利用されている。過去に洗剤、食品及び製薬産業用酵素として利用するにあたり、広範囲にわたる温度安定性や金属イオン、界面活性剤または有機溶剤の存在下で活性を示すアルカリプロテアーゼの報告が多くされている [2, 3, 4, 19, 21]。90kDa タンパク質は、1% SDS 存在下において 80% 以上活性を保持し、更に濃度 0.5% の SDS 存在下で 24 時間インキュベート後も約 50% 活性を保持した。SDS に安定な酵素は殆ど報告されておらず [8, 20]、90kDa タンパク質のこの特徴は興味深い。90kDa タンパク質は高温、アルカリ pH による高い活性、及び界面活性剤に対して安定であることから、産業用酵素として魅力的な特徴であると考えられるが、90kDa タンパク質の比活性は、トリプシンと比べて約 1/1706、キモトリプシンと比べて 1/84 と非常に低く、産業用酵素として 90kDa タンパク質の利用は難しいと考えられる。

多くのアルカリプロテアーゼは基質特異性が低いとされている。しかし、90kDa タンパク質は Arg-X, Lys-X, Phe-X 結合を特異的に切断し、比較的高い基質特異性を持つことを明らかにした。90kDa タンパク質によるカゼインの分解実験においても、90kDa タンパク質は Arg-X, Lys-X, Phe-X 結合を切断することが分かった。しかし、90kDa タンパク質は、カゼイン中の全ての Arg-X, Lys-X, Phe-X 結合を切断するわけではなく、また、合成ペプチドを用いた実験においても Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA は切断したが、同じアミノ酸配列を持つ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA を殆ど切断しなかった。これはプロテアーゼ活性が Arg, Lys, Phe の周囲の構造に影響されているものと考えられる。

90kDa タンパク質は SDS 存在下で安定であり、基質特異性を持つことから、プロテオーム分析において役立つ可能性を持つと考えられる。

ホタテガイを含め、貝殻中にプロテアーゼを含むという報告はされていない。過去にニジマス粘液中に含まれるトリプシンに似たプロテアーゼが、抗菌活性を示すことが報告されている [12]。また、日本ウナギの表皮から分泌されるカテプシン L または B に似たプロテアーゼが、主要な免疫システムのメカニズムに関係していることが報告されている [7]。このことから 90kDa タンパク質は、ホタテガイ貝殻に抗菌作用を持たせ、貝殻の保護をしているのかもしれない。

5章 総括・結論

5章 総括・結論

ホタテガイ貝殻に含まれる 90kDa タンパク質は、複雑な構造を持つタンパク質であり、複数の生理活性作用を示した。しかしながら、ホタテガイ貝殻は食用ではないため、精製という操作が必要となり、コストがかかってしまう。また、ホタテガイ貝殻中の 90kDa タンパク質は含有量が少ないため、十分なタンパク質量を集めるために膨大なホタテガイ貝殻が必要になる。このことから、90kDa タンパク質を新規のタンパク質として利用するためには多くの課題が残っており、これらの問題を解決していく必要があると考えている。

参考文献

- [1] A. Anwar, and M. Saleemuddin, Alkaline proteases: a review, *Bioresource Technology* 64 (1998) 175-183.
- [2] A. Haddar, A. Bougatef, R. Agrebi, A. S. Kamoun, and M. Nasri, A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization, *Process Biochemistry* 44 (2009) 29-35.
- [3] A. Haddar, A. S. Kamoun, N. F. Zouari, N. Hmidet, and M. Nasri, Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21, *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 53-63.
- [4] A. Haddar, R. Agrebi, A. Bougatef, N. Hmidet, A. S. Kamoun, and M. Nasri, Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive, *Bioresource Technology* 100 (2009) 3366-3373.
- [5] A. Naik, Y. N. Kalia, and R. H. Guy, Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharmaceutical science & technology today* 3 (2000) 318-326.
- [6] A. Torita, Y. C. Liu, and Y. Hasegawa, Photoprotective activity of scallop shell water-extract in keratinocyte cells, *Fisheries Science* 70 (2004) 910-915.
- [7] F. Aranishi, Lysis of pathogenic bacteria by epidermal cathepsin L and B in the Japanese eel, *Fish Physiology and Biochemistry* 20 (1999) 37-41.
- [8] H. S. Joo, C. G. Kumar, G. C. Park, S. R. Paik, and C. S. Chang, Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52 production and some properties, *Journal of Applied Microbiology* 95 (2002) 267-272.
- [9] İ. Gülçin. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology* 217 (2006) 213-220.

- [10] İ. Gülçin, M. Oktay, E. Kireççi, and Öİ. Küfrevioğlu, Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum L*) seed extracts, *Food Chemistry* 83 (2003) 371–382.
- [11] I. Sarashina, K. Endo, The complete primary structure of molluscan shell protein-1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*, *Marine Biotechnology* 3 (2001) 362-369.
- [12] K. Hjelmeland, M. Christie, and J. Raa, Skin mucus protease from rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and its biological significance, *Journal of Fish Biology* 23 (1983) 13-22.
- [13] K. Iwami, F. Naoto, T. Suzuka, and R. Kanamoto, A Crucial Role of Soybean Resistant Protein in Increased Fecal Steroid Excretion and Structural Peculiarity of Caught Bile Acids, *大豆たん白質研究 Vol.5* (2002).
- [14] K. Iwami, K. Sasaki, and F. Ibuki, Involvement of post-digestion 'hydrophobia' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins, *Agricultural and biological chemistry* 50 (1986) 1217–1222.
- [15] M. Sasaki, H. Yamada, and N. Kato, A Resistant Protein, Sericin Improves Atropine-Induced Constipation in Rats, *Food Science and Technology Research* 6 (4) (2000) 280-283.
- [16] M. Sugano, S. Goto, Steroid-binding peptides from dietary proteins, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 36 (1990) 147–150.
- [17] M. Sugano, Y. Yamada, K. Yoshida, Y. Hashimoto, T. Matsuo, and M. Kimoto, The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats, *Atherosclerosis* 72 (1988) 115–122.
- [18] N. Higaki, K. Sato, H. Suda, T. Suzuka, T. Komori, T. Saeki, Y. Nakamura, K. Ohtsuki, K. Iwami, and R. Kanamoto, Evidence for the Existence of a Soybean Resistant Protein That Captures Bile Acid and Stimulates Its Fecal Excretion, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (12) (2006) 2844-2852.

- [19] R. M. Banika, and M. Prakash, Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*, *Microbiological Research* 159 (2004) 135–140.
- [20] R. Oberoi, Q. K. Beg, S. Puri, R. K. Saxena, and R. Gupta, Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp, *World J. Microbiology and Biotechnology* 17 (2001) 493-497.
- [21] R. Saborowski, G. Sahling, M. A. Navarette del Toro, I. Walter, and F. L. García-Carreño, Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30 (2004) 109–118.
- [22] S. Nagaoka, New Cholesterol-Lowering Peptides with Bile Acids Binding Ability Derived from Soybean Glycinin, *大豆たん白質研究* Vol.8 (2005).
- [23] T. Mitsuhashi, K. Ono, M. Fukuda, and Y. Hasegawa, Free radical scavenging ability and structure of a 90-kDa protein from the scallop shell, *Fisheries Science* 79 (2013) 495-502.
- [24] Y. C. Liu, K. Uchiyama, N. Natsui, and Y. Hasegawa, In vitro activities of components from scallop shells, *Fisheries Science* 68 (2002) 1330-1336.
- [25] 大川 千晴 ホタテガイ貝殻抽出物によるラットの血中コレステロール濃度低下作用 平成 22 年度 卒業論文.
- [26] 小野 裕基 ホタテガイ貝殻に含まれる 90kDa タンパク質の精製とその構造・機能 平成 21 年度 修士学位論文.
- [27] 佐々木 裕哉 ホタテガイ貝殻に含まれる食物繊維様タンパク質の同定 平成 22 年度 修士学位論文.
- [28] 高橋 浩司 ホタテガイ貝殻に含まれる糖タンパク質の脂肪細胞分化抑制作用 平成24年度 博士学位論文.

- [29] 野口 達矢 ホタテガイ貝殻に含まれるタンパク質の単離とその性質, 平成16年度 修士学位論文.
- [30] 三津橋 拓也 ホタテガイ貝殻から単離した活性酸素消去タンパク質の構造と機能 平成 22 年度 修士学位論文.

謝辞

本博士論文は、本学大学院 工学研究科 博士前期課程 応用化学専攻ならびに博士後期課程 創成機能工学専攻在籍中に行った研究をまとめたものです。本研究を行うにあたり、研究内容についてご指導ご鞭撻賜りました長谷川靖教授には心より感謝致します。また、予備審査、本審査におきまして貴重な御助言を頂きましたチャンヨン Chol 教授、澤田研准教授、徳楽清孝准教授に深謝致します。

本研究を行うにあたり、部田茜さんをはじめ多くの卒業研究生、研究室の皆様にご指導ご協力頂きました。また、本論文の執筆にあたり、卒業研究生 である大川千晴さん、小野裕基君、佐々木裕哉君、三津橋拓也君の研究結果を参考にさせて頂きました。皆様に心より感謝の意を表します。

最後に博士後期課程への進学を理解し、精神面、経済面で支えて頂いた両親に心から深謝致します。

福田 学