



nite


NBRC

バイオ基礎講座2023

# 技術編 3. プロテオーム解析と その事例紹介

2023年12月15日（金）

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）  
バイオテクノロジーセンター  
解析技術課 石村 豊



1. プロテオーム解析とは
2. プロテオーム解析の流れ
3. 事例紹介

# 1. プロテオーム解析とは

## プロテオーム (proteome) とは？

- protein (タンパク質) とgenome (ゲノム) を 組み合わせた造語。
- ゲノムが一個の生物の持つ全ての遺伝情報を指すのに対し、プロテオームは、細胞内で発現している (発現する可能性をもつ) 全タンパク質のことを指す。

## プロテオーム解析



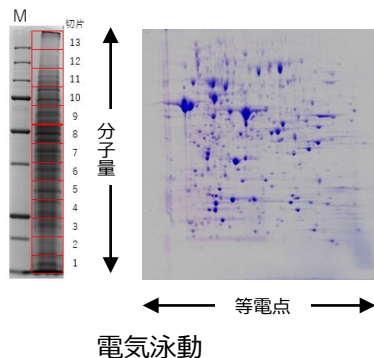
- 生体内では、多数の遺伝子から作られる多様な種類のタンパク質が働いて生命活動を支えています。これらのタンパク質の構造や機能は、これまでは膨大な時間と労力を費やして個別に単離して解析する必要があった。
- 近年の分析機器の高度化により、微量のタンパク質断片の質量を正確に測定することが可能となり、種々の電気泳動やクロマトグラフィーを組み合わせ、分離されたタンパク質を断片化してその質量を測定し、得られたデータをゲノム解析から推定されるタンパク質のアミノ酸配列データと比較して同定することが可能になった。

# 2. 質量分析装置を用いたプロテオーム解析の流れ

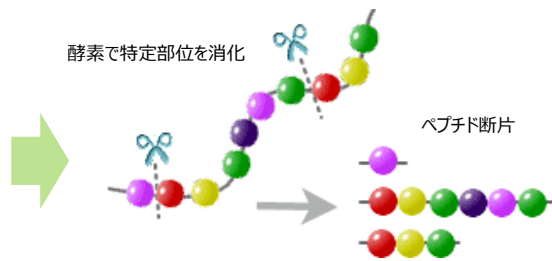
## 培養



## 分離



## 断片化



## 質量分析

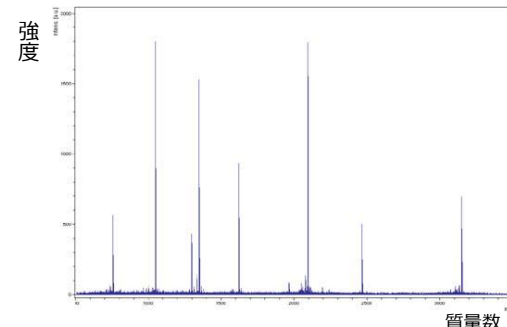
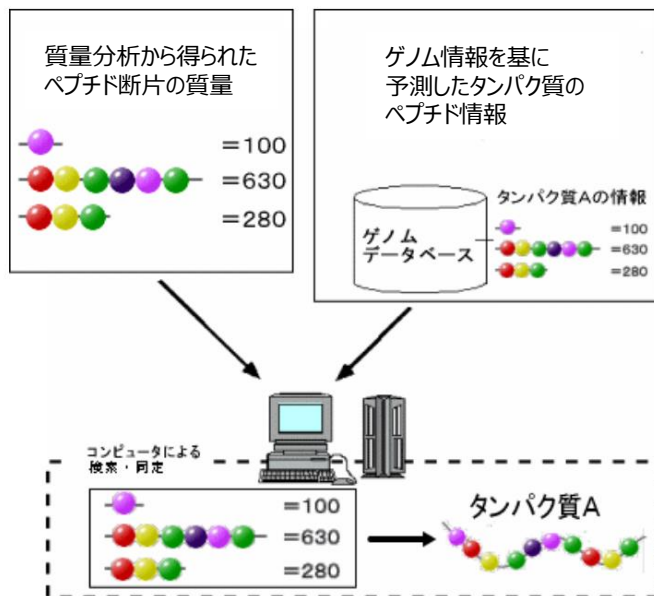


MALDI-TOF/MS



LC-MS/MS

## 同定

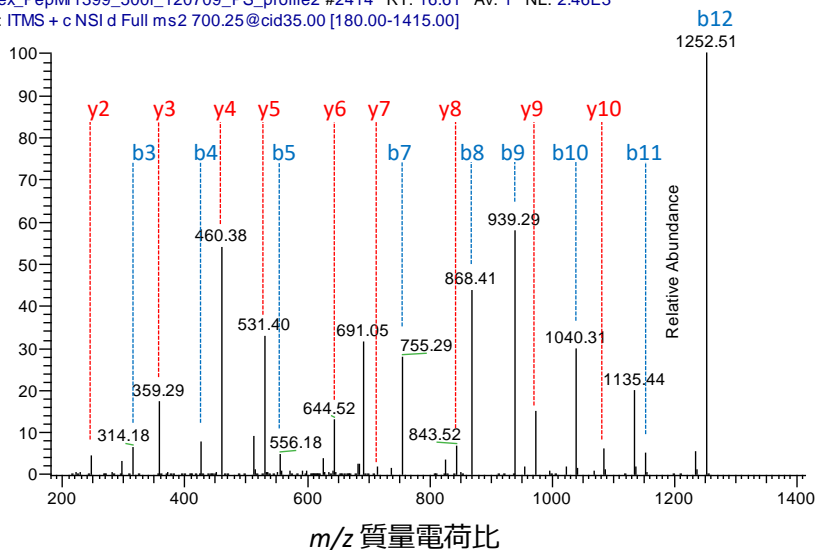


ペプチド断片の質量 (分子量) を測定

## 2. 質量分析装置を用いたプロテオーム解析の流れ

ペプチドの**精密質量**を測定することにより  
**タンパク質のアミノ酸配列**を測定することが可能

Tex\_PepMr1399\_500f\_120709\_PS\_profile2 #2414 RT: 16.61 AV: 1 NL: 2.46E3  
 T: ITMS + c NSI d Full ms2 700.25@cid35.00 [180.00-1415.00]



Acetyl-ASLLEQALATLVK のMS<sup>2</sup>スペクトル  
 (イオントラップ型質量分析計)



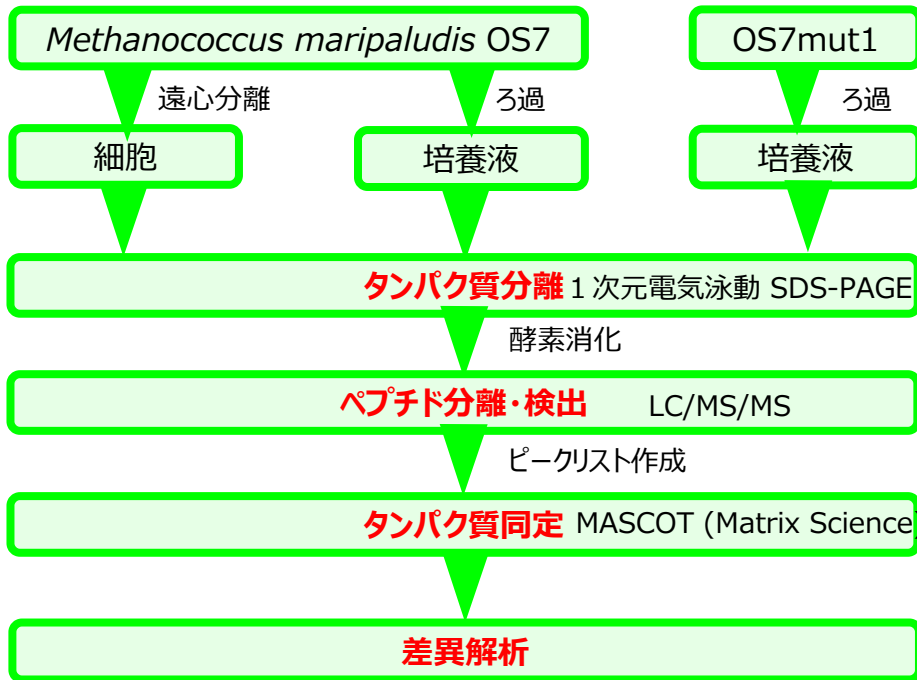
タンパク質断片

**MASLLEQALATLVK**TFQEYSQFSGNSLCQAKFK  
 ELLEKELPTWAPTTLRECDYKQFISALDTNKDG  
 QVDFVEYMRLLACLICCHEYLKDSPLKPCSQ

アミノ酸残基	略号	一文字表記	組成式	平均質量(u)	単同位体精密質量(u)
グリシン	Gly	G	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO	57.051	57.02146372
アラニン	Ala	A	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71.078	71.03711378
セリン	Ser	S	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	87.077	87.03202840
プロリン	Pro	P	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO	97.115	97.05276385
バリン	Val	V	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	99.131	99.06841391
トレオニン	Thr	T	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101.104	101.04767847
システイン	Cys	C	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NOS	103.143	103.00918478
イソロイシン	Ile	I	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.158	113.08406398
ロイシン	Leu	L	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.158	113.08406398
アスパラギン	Asn	N	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.103	114.04292744
アスパラギン酸	Asp	D	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115.087	115.02694302
グルタミン	Gln	Q	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	128.129	128.05857751
リジン	Lys	K	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	128.172	128.09496301
グルタミン酸	Glu	E	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129.114	129.04259309
メチオニン	Met	M	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS	131.196	131.04048491
ヒスチジン	His	H	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	137.139	137.05891186
フェニルアラニン	Phe	F	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	147.174	147.06841391
アルギニン	Arg	R	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	156.186	156.10111102
チロシン	Tyr	Y	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	163.173	163.06332853
トリプトファン	Trp	W	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	186.210	186.07931295

# 3. 事例紹介：メタン生成古細菌

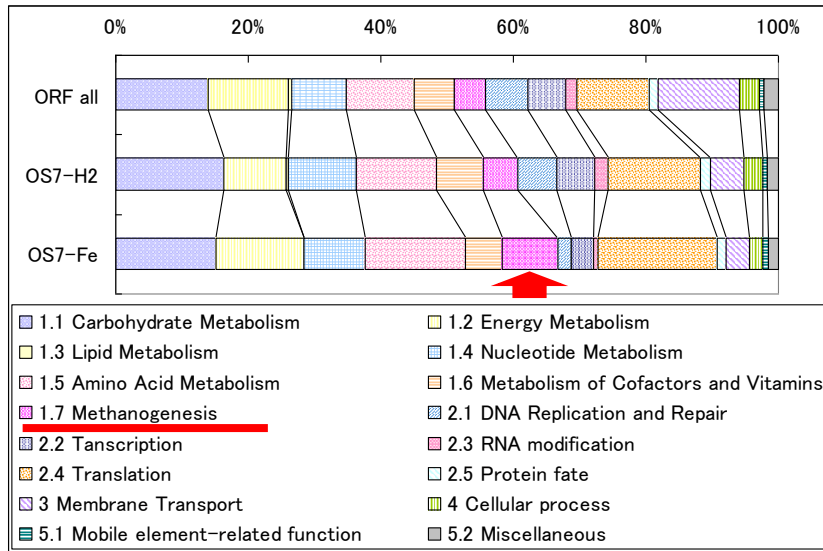
石油関連施設における金属腐食は漏洩事故の主な原因であり、微生物が関与した金属腐食が知られている。そのメカニズムを解明するため、[メタン生成古細菌](#) *Methanococcus maripaludis* について、鉄腐食能のあるOS7株 ([NBRC 103642](#) ) および鉄腐食能を欠失したOS7mut1株 ([NBRC 105638](#) ) のプロテオーム解析を実施した。



腐食した金属

### 3. 事例紹介：メタン生成古細菌

#### *Methanococcus maripaludis* OS7についてプロテオーム解析

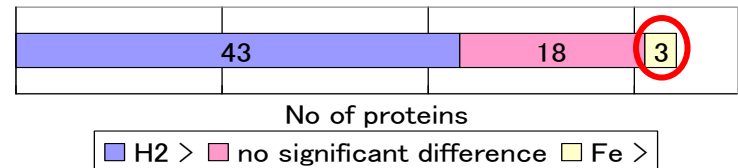


#### 検出タンパク数の機能分類別内訳

1.7 Methanogenesis関連遺伝子が比較的数多く検出された



腐食能を持つOS7株に特異的な遺伝子の中で、水素培養に対して鉄培養で発現量が増加したタンパクは、培養液中へ分泌されるhydrogenaseおよびcarbonic anhydraseであった。



#### 発現タンパク量の差異解析

- ・鉄培養で発現量が有意に増加したタンパクは3個あった。
- ・培養液中でもこれら3つのタンパク質が検出されたことから、分泌タンパクと考えられた。
- ・鉄培養で発現量が増加したことに加え、腐食能欠OS7mut1株の培養液中では検出されなかった



### 3. 事例紹介：乳酸菌

*Tetragenococcus halophilus*は醤油もろみから分離された乳酸菌であり、醤油醸造において、もろみのpH低下や風味醸成などに寄与している。

*T. halophilus* NBRC 12172株はNaCl濃度が15%でも増殖できる耐塩性菌である。このNaCl依存性について検討するため、NaClが0%と10%の二条件についてプロテオーム解析を行った。

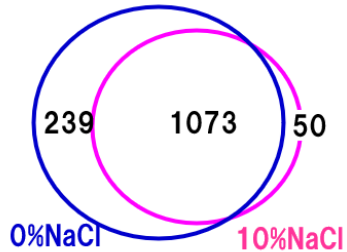
#### <解析方法>

- 1.通常培養：ペプチドマスフィンガープリント法（二次元電気泳動、[MALDI-TOFMS](#)）
- 2.通常培養：ショットガンプロテオーム解析法（SDS-PAGE、[LC/MS/MS](#)）
- 3.通常培養：ホールショットガンプロテオーム解析法（whole、[LC/MS/MS](#)）
- 4.膜リッチ画分（リゾチーム破碎、超遠心）：ショットガンプロテオーム解析法（SDS-PAGE、[LC/MS/MS](#)）
- 5.膜リッチ画分（ドライアイス破碎、超遠心）：カラム内消化法（[LC/MS/MS](#)）
- 6.膜リッチ画分（ドライアイス破碎）：カラム内消化法（[LC/MS/MS](#)）



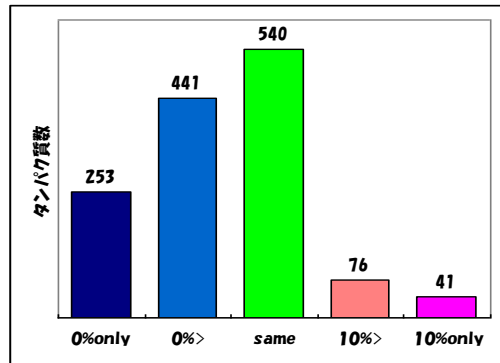
# 3. 事例紹介：乳酸菌

## Tetragenococcus halophilus について、培地NaCl濃度0%と10%での、プロテオーム解析



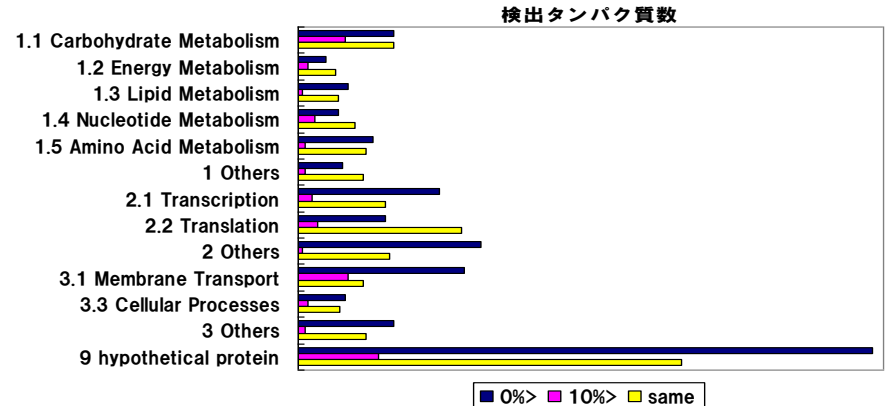
### 培養条件による 検出タンパク質数

・1362個のタンパク質を同定



### 培養条件による 検出タンパク質の増減

塩のない環境はストレス状態であり、生育に必要なタンパク質が必要と考えられる。



### 機能分類別タンパク質の増減

10%NaClで1.1炭水化物代謝系と3.1膜輸送系の割合が相対的に多くなっている



・高塩濃度条件下では、グリシンベタインの取り込み系の1つが高発現していた。塩濃度により取り込み系を使い分けていることが示唆された。

・Tetragenococcus halophilusは、塩濃度0%の方がストレス状態であり、高塩濃度環境を利用し、エネルギーを獲得していることが示唆された。

# 3. 事例紹介： ISO獣毛鑑別法

## <背景>

- ・カシミア偽装問題が顕在化
- ・顕微鏡による目視判定の熟練者の減少
- ・獣毛繊維の加工技術の進歩



**カシミアの鑑別・混用率算定に革新的な技術開発**



**プロテオーム解析法を用いたカシミア繊維の新鑑別法の開発**

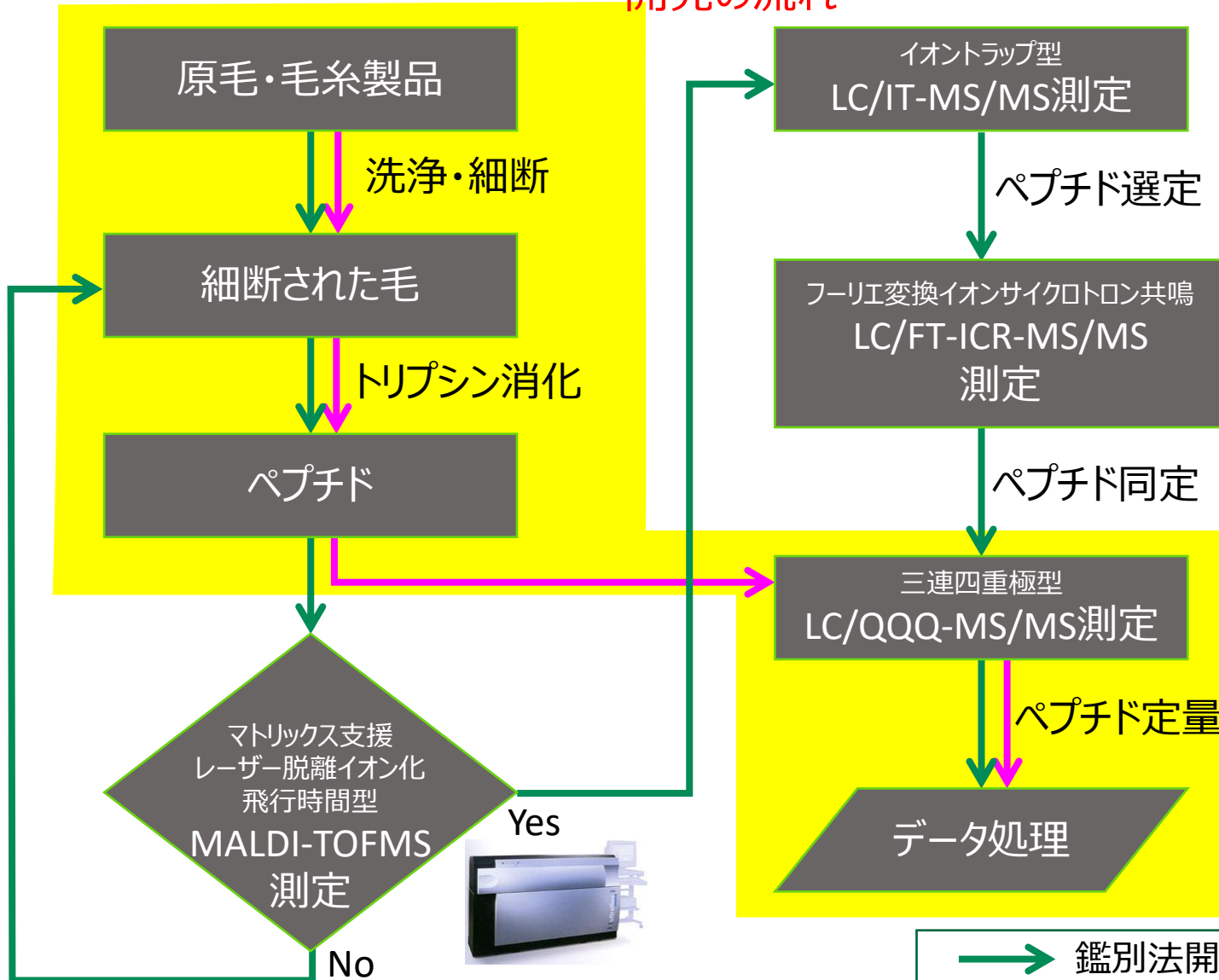
ISO 20418-3:2020 Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres —  
Part 3: Peptide detection using LC-MS without protein reduction



日本語訳

ISO 20418-3:2020 繊維—いくつかの獣毛繊維の定性的及び定量的プロテオーム解析—第3部：タンパク質還元を伴わないLC-MSの使用によるペプチド検出

# 3. 事例紹介：ISO獣毛鑑別法

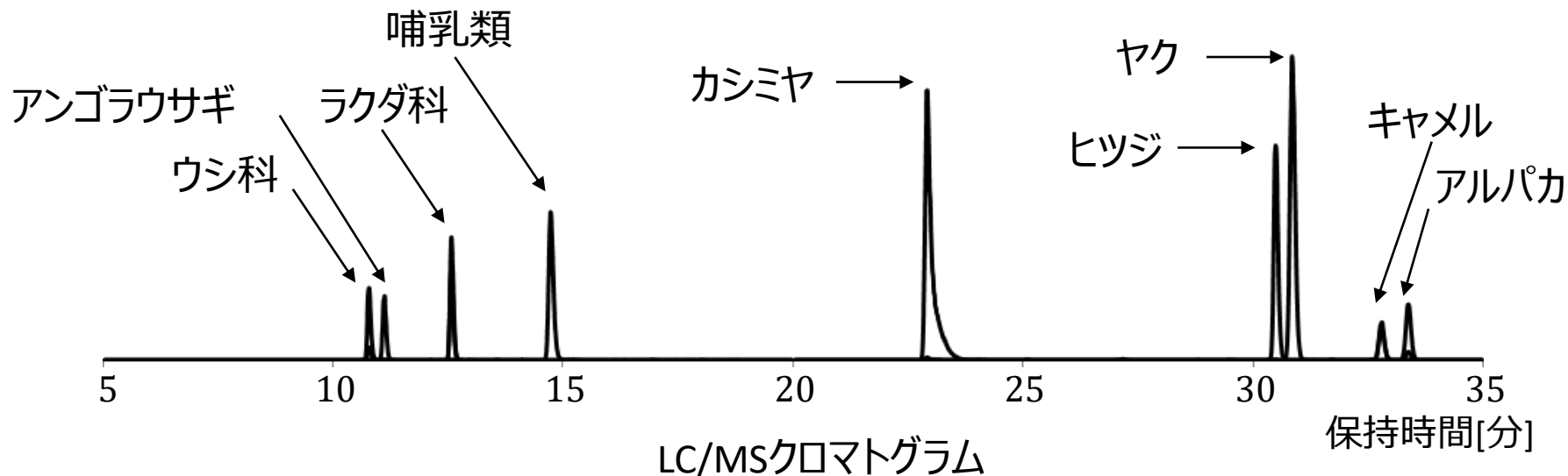
開発の流れ



 鑑別法開発の流れ  
 鑑別法の流れ

### 3. 事例紹介：ISO獣毛鑑別法

#### マーカーペプチド

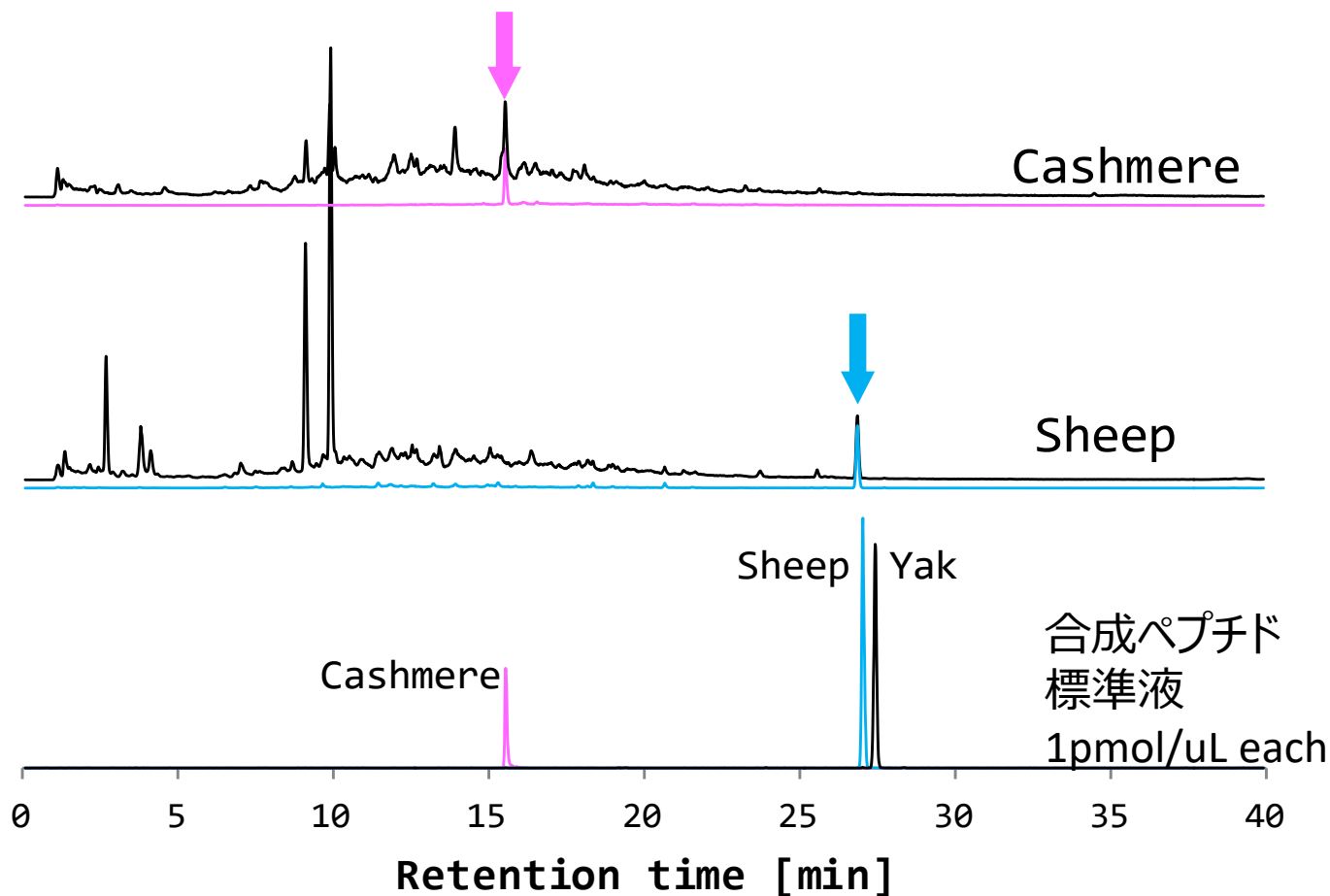


マーカー	$m/z$
ウシ科	519.74
アンゴラウサギ	526.75
ラクダ科	519.25
哺乳類	406.22
カシミア	697.71

マーカー	$m/z$
ヒツジ	699.99
ヤク	713.99
キャメル	952.51
アルパカ	953.00

$m/z$  : 分子の質量/価数

### 3. 事例紹介：ISO獣毛鑑別法



合成ペプチドと繊維製品由来の鑑別用ペプチドの保持時間が一致することを確認

- ・アナフィラキシーショックを引き起こした石臼に含有する加水分解コムギの原因ペプチドの解析

[https://www.nite.go.jp/nbrc/technology/hydrolyzed\\_wheat.html](https://www.nite.go.jp/nbrc/technology/hydrolyzed_wheat.html)

- ・エアコンに繁殖するカビ、キノコによるアレルギー性喘息の原因タンパク質の解析

<https://www.nite.go.jp/nbrc/technology/fungi.html>



**社会問題の解決にプロテオーム解析を利用、貢献**

# ご清聴ありがとうございました

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒151-0066 東京都渋谷区西原 2 - 4 9 - 1 0  
独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE)  
バイオテクノロジーセンター  
解析技術課



**(お問い合わせはこちら)**

E-mail: [bio\\_proteome@nite.go.jp](mailto:bio_proteome@nite.go.jp)

TEL: 03-3481-1936