〔原 著〕

ミクロ 2 次元電気泳動法を用いた補体第 3 成分 (C3) 断片化酵素の検討

島崎洋次・室 征芳・真鍋 敬

SUMMARY

After the albumin content of human plasma proteins was decreased by the addition of polyethylene glycol, the plasma proteins were separated in non-denaturing isoelectric focusing (IEF) gel. The separated proteins in the IEF gel were digested with one of three enzymes; trypsin, *Achromobacter* protease I (API) or *Staphylococcus aureus* V8 protease (V8). Proteins in the gel were boiled in the presence of mercaptoethanol/SDS, and constituent polypeptides of proteins were separated by SDS-PAGE. The electrophoretic pattern of polypeptide spots were compared to that of non-denaturing IEF/SDS-PAGE. The α chain of the third component of complement (C3 α) was effectively digested with trypsin, but albumin and IgG were not effectively fragmented with trypsin. On the other hand, albumin was digested with API and V8 protease, but C3 α was not effectively fragmented with these enzymes. These results indicate that trypsin is the most effective enzyme for the fragmentation of C3 in the IEF gel.

Key words: fragmentation, trypsin, *Achromobacter* protease I, *Staphylococcus aureus* V8 protease, complement.

はじめに

補体の活性化の過程で補体第 3 成分 (C3) からアナフィラトキシン活性をもつ断片 C3a が生成することが知られている¹⁾。この C3 からアナフィラトキシン活性をもつ断片の生成は、精製した C3 に酵素を反応させることによって起こり、その断片化産物がアナフィラトキシン活性を示すことが知られている²⁾。変性剤を用いない条件 (未変性条件) でのミクロ 2 次元電気泳動法を用いてヒト血漿タンパク質を分離されること、および、これら分離されたタンパク質が酵素活性などの生理活性を保持していることが報告されている³⁻⁵⁾。また、近年、このミクロ 2 次元電気泳動法を用いて、未変性状態の C3 を簡便に分離、同定できることを報告してきた⁶⁾。

一方、分離されたタンパク質の内部アミノ酸配列を調べるために、トリプシン、*Staphylococcus aureus* V8 protease (V8) や *Achromobacter* protease I (API) などの酵

素が利用されている⁷⁻⁹⁾。

本研究では、ゲル内で未変性状態で分離された C3 を断片化し、アナフィラトキシン活性をもつ断片化産物を効率よく生成する酵素の選択を行うために、未変性条件の等電点電気泳動法により分離されたタンパク質に、トリプシン、V8、API を等電点ゲル内で作用させ、変性・還元後、SDS-PAGE による 2 次元目の分離を行った。得られたタンパク質スポットの比較により、C3 を効率よくゲル内で断片化する酵素の検討を行った。

材料および方法

1. 試薬と試料の調製

酵素は API (*Achromobacter* protease I) として和光純薬から市販されているもの、ウシ脾臓由来のトリプシンや V8 (*Staphylococcus aureus* V8 protease) はシグマ社のものを用いた。アンフォライン pH 3.5~10 と pH 3.5~5.0 はアマシャム-ファルマシア社のもの、アクリルアミドは

Determination of the enzyme for the fragmentation of the third component of complement using two-dimensional electrophoresis.

Youji Shimazaki, Masayoshi Muro, Takashi Manabe; 愛媛大学理学部物質理学科

Correspondence address: Youji Shimazaki, Department of Material Science, Faculty of Science, Ehime University, Matsuyama 790-8577, Japan.

(受付 2000 年 10 月 4 日, 受理 2000 年 12 月 26 日, 刊行 2001 年 3 月 15 日)

第一化学のもの、ポリエチレングリコール#4000 (PEG) やクーマシーブリアントブルー R 250 (CBB) は半井化学のものをを用いた。また、他の電気泳動関連の試薬は和光純薬のものをを用いた。

ヘパリン存在下で採取した血液を $1,200 \times g$ で遠心し、上清を得、これを血漿とした。この血漿タンパク質を直接 2 次元電気泳動法 (未変性条件の等電点電気泳動法と変性条件の SDS-PAGE を組み合わせた分離法) により分離した時には、C3 β などのタンパク質スポットがアルブミンにより隠れてしまうため⁶⁾、本研究ではアルブミン量を減少させるための処理を施した。まず、血漿 100 μ l に 16% (w/v) PEG を加え、最終濃度 4% にし、4°C で 30 分間攪拌後、20 分間 $10,000 \times g$ で遠心し、上清を得た。この上清に 22% (w/v) PEG を最終濃度 16% にし、4°C で 30 分間攪拌後、20 分間 $10,000 \times g$ で遠心し、上清と沈殿を得た。沈殿は 100 μ l の 5 mM トリス-塩酸緩衝溶液 pH 7.2 に溶き、これを 4~16% PEG 画分とした。この PEG 画分にショ糖を 40% (w/v) になるように加え、溶液中のタンパク質濃度を、波長 280 nm の吸光度 1.0 の時 1 mg/ml として見積もった⁶⁾。

2. ミクロ 2 次元電気泳動と酵素処理法

未変性条件の等電点電気泳動 (長さ 35 mm, 直径 1.3 mm) をを用いた。等電点ゲルには 4% アクリルアミド、0.2% ビスアクリルアミド、pH 3.5~10 アンフォラインを 2%, pH 3.5~5 アンフォラインを 1%, 0.05% 過硫酸アンモニウム、0.029% N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンが含まれている。この等電点ゲルを用いて、4~16% PEG 画分中のタンパク質 (100 μ g) を分離した。この時、陽極槽液には 0.01 M リン酸溶液を、陰極槽液には 0.04 M 水酸化ナトリウム溶液を用いた。

等電点電気泳動後、等電点ゲルを真空乾燥機 (Vacuum desiccator VS, 井内) を用いて乾燥させた後、すぐに変性・還元溶液 (4% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 5% 2-メルカプトエタノール (2-ME), 40% ショ糖溶液) に浸け、5 分間加熱したものを対照とした。また、乾燥後のゲ

ルを、50 μ g/ml トリプシンや V 8 を含んだ 100 μ l の 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液、または、50 μ g/ml API を含んだ 50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 9.0) に浸け、37°C で、30, 60, 90 分反応させた後、すぐに変性・還元溶液に浸け、加熱し酵素反応を止めた。それぞれの処理を行った後の等電点ゲルを、4~17% のポリアクリルアミド密度勾配スラブゲルの上端で、2% SDS, 5% (v/v) 2-ME, 10% グリセロールを含んだ 0.02 M トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 6.8) で平衡化し、0.05 M トリス 0.38 M グリシン, 0.1% SDS (pH 8.3) 緩衝溶液を用いて、SDS-PAGE による分離を行った。泳動後のゲルは、脱色液 (7% 酢酸, 50% メタノール) で 15 分洗った後、染色液 (0.1% CBB, 7% 酢酸, 50% メタノール) で 15 分染色し、再び、脱色液 (7% 酢酸, 20% メタノール) で 30 分脱色し、さらに、脱色液を交換して 90 分脱色した後、保存液 (7% 酢酸) に浸け、スポットの比較を行った。さらに、タンパク質量の相対的な変化を調べるため、染色後のゲル内のスポットを画像処理装置 (透過光ユニットをつけたスキャナー CanoScan 600, IBM 社コンピュータ Aptiva J 3X, 2 次元ゲル画像処理ソフト 2-D Full) により、定量した¹⁰⁾。

結果と考察

ヒト血漿の 4~16% PEG 画分を、未変性条件の等電点電気泳動で分離し、その等電点ゲルをトリプシン溶液で未処理 (a, 0 分), 30 分 (b), 60 分 (c), 90 分 (d) 処理した後、変性・還元後、SDS-PAGE による分離を行った電気泳動パターンを Fig. 1 に示す。等電点ゲルの酵素溶液の吸収量は 40 μ l であったため、酵素は全体で 2 μ g 吸収されたものと考えられるが、酵素のスポットは検出されなかった。したがって、この等電点ゲル内では、100 μ g のタンパク質に対して、2 μ g の酵素が反応しているものと考えられる。また、酵素反応時の溶液内の pH の差は陽極側と陰極側で 1.4 以内に保たれていたため、溶出したアンフォラインによる pH 変化の影響は少ないものと考えられ

Fig. 1. Non-denaturing IEF/reduced SDS-PAGE patterns of human plasma proteins in the 4-16% PEG fraction after the IEF gel was incubated in the presence of trypsin for 0 (a), 30 (b), 60 (c) and 90 (d) min.

The major protein spots were marked as P1-P6. These spots were identified as follows; P1: α_2 -macroglobulin, P2: C3 α , P3: C3 β , P4: albumin, P5: IgG heavy chain, P6: IgG light chain.

Fig. 2. Non-denaturing IEF/reduced SDS-PAGE patterns of human plasma proteins in the 4-16% PEG fraction after the IEF gel was incubated in the presence of *Achromobacter* protease I (API) for 0 (a), 30 (b), 60 (c) and 90 (d).

The major protein spots were marked as P1-P6. These spots were identified as follows; P1: α_2 -macroglobulin, P2: C3 α , P3: C3 β , P4: albumin, P5: IgG heavy chain, P6: IgG light chain.

Fig. 3. Non-denaturing IEF/reduced SDS-PAGE patterns of human plasma proteins in the 4-16% PEG fraction after the IEF gel was incubated in the presence of *Staphylococcus aureus* V8 for 0 (a), 30 (b), 60 (c) and 90 (d) min.

The major protein spots were marked as P1-P6. These spots were identified as follows; P1: α_2 -macroglobulin, P2: C3 α , P3: C3 β , P4: albumin, P5: IgG heavy chain, P6: IgG light chain.

る。Fig. 1 a に示したように、N-末アミノ酸配列や抗原-抗体反応から、P1 (α_2 -マクログロブリン)、P2 (C3 α)、P3 (C3 β)、P4 (アルブミン)、P5 (IgG 重鎖)、P6 (IgG 軽鎖) と同定されている¹¹⁾。これらのタンパク質スポットのうち、失われたものはトリプシンにより、等電点ゲル内で消化されたものと考えられる。30 分の反応では、P1 から P6 までのスポット量が、0 分の時の約 62% 以内の減少に抑えられていたため、P1 から P6 までのスポットが検出された (Fig. 1 b)。60 分反応では、P2 の C3 α 鎖のスポットが失われているが、他のスポットは検出されている (Fig. 1 c)。90 分反応では、C3 α 鎖のほかに、P3 の C3 β 鎖が失われていることがわかる (Fig. 1 d)。補体活性化の過程で C3 α 鎖由来の断片である C3a、アナフィラトキシンが一番最初に生成されることから、C3 α 鎖が酵素により消化されやすいのではないかと考えられる。

Fig. 2 に、ヒト血漿の 4~16% PEG 画分を未変性条件の等電点電気泳動で分離し、その等電点ゲルを API 溶液で未処理 (a, 0 分)、30 分 (b)、60 分 (c)、90 分 (d) 処理した後、変性・還元後、SDS-PAGE による分離を行った電気泳動パターンを示す。P2 (C3 α)、P3 (C3 β)、P5 (IgG 重鎖)、P6 (IgG 軽鎖) のスポットは API 溶液

で 30~90 分処理しても検出された。しかしながら、これらのスポット量は、反応 30 分で、0 分の時の約 20~38% にまで減少していた。また、P1 (α_2 -マクログロブリン) のスポットは、30 分反応ただけで失われていた。さらに、P4 (アルブミン) は時間経過とともに徐々に断片化されていることがわかった (Fig. 2 b~d)。

ヒト血漿の 4~16% PEG 画分を、未変性条件の等電点電気泳動で分離し、その等電点ゲルを V8 溶液で未処理 (a, 0 分)、30 分 (b)、60 分 (c)、90 分 (d) 処理した後、変性・還元後、SDS-PAGE による分離を行った電気泳動パターンを Fig. 3 に示す。30 分、60 分、90 分反応させたもので、P3 (C3 β) のスポット量は、90 分反応させても、0 分の 90% 以内の減少に抑えられていたため、スポットが明瞭に検出された (Fig. 3 b~d)。また、反応 60 分および 90 分の時の P2 (C3 α) のスポット量は、0 分の時の 44~47% にまで減少していた (Fig. 3 b~d)。一方、P5 や P6 の IgG が反応後 60 分以内に明らかに断片化されていることがわかる。さらに、P4 (アルブミン) は時間経過とともに断片化されていることがわかる (Fig. 3 b~d)。

今回用いた 3 種類の酵素では、ヒト血漿タンパク質の種類により、異なった断片化反応を示している。この断片化

反応の違いは、ゲル内で保持されているタンパク質の立体構造、外部に露出しているアミノ酸配列、また、酵素により断片化された後における立体構造の変化などによるものと考えられる。例えば、C3 α 鎖はトリプシンにより他の酵素に比べて効率よく切断化されていることがわかる (Fig. 1)。これはトリプシンにより、C3 α 鎖の 77 残基目のアルギニンの C 末側が切断された後、立体構造が変化し、よりトリプシンで切断されやすい状態になったためと考えられる。他の酵素では、この部位の切断が起こらないため、C3 α がより断片化されにくい状態にあったものと考えられる。

以上、本研究により、未変性条件下で C3 をゲル内消化させるには、トリプシンが妥当であることがわかった。また、本方法を用いることにより、未変性条件で分離されたタンパク質を効率よく消化させるための酵素選択を行うことができると思われる。

文 献

- 1) Dodds AW, Law SKA. The phylogeny and evolution of the thioester bondcontaining proteins C3, C4 and α_2 -macroglobulin. *Immunol Rev* 1998; 166: 15-26.
- 2) Bokisch VA, Müller-Eberhard HJ, Cochrane CG. Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J Exp Med* 1969; 129: 1109-30.
- 3) Manabe T, Hayama E, Okuyama T. Microscale multisample two-dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 1982; 28: 824-7.
- 4) Manabe T, Takahashi Y, Okuyama T. Analysis of human haptoglobin-hemoglobin complexes by micro two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1983; 4: 359-62.
- 5) Manabe T, Takahashi Y, Higuchi N, Okuyama T. Identification map of human plasma proteins: Micro two-dimensional electrophoresis followed by multiple immunoreplica technique. *Electrophoresis* 1985; 6: 462-7.
- 6) Shimazaki Y, Fujiwara M, Manabe T. Detection and identification of constitutive polypeptides of the third component of complement using microscale two-dimensional electrophoresis: Correlated with

the separation by non-denaturing microscale two-dimensional electrophoresis. *Jpn J Electroph* 2000; 44: 21-5.

- 7) Masaki T, Fujihashi T, Nakamura K, Soejima M. Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M 497-1, II specificity and inhibition studies of *Achromobacter* protease I *Biochem Biophys Acta* 1981; 660: 51-5.
- 8) Drapeau GR. Protease from *Staphylococcus aureus*. In: Perlmann GE, Lorand L, editors. *Methods in enzymology* Vol. 45. New York: Academic Press, 1976: 469-475.
- 9) Drapeau GR. Cleavage at glutamic acid with *Staphylococcal* protease. In: Jakoby WB, Wilchek M, editors. *Methods in enzymology* Vol. 46. New York: Academic Press, 1977: 189-191.
- 10) 水摩仁美, 山口奈緒, 真鍋 敬. 2次元電気泳動で分離された未変性ヒト血漿タンパク質の画像処理による定量法の検討. *生物物理化学* 2000; 44: 1-7.
- 11) Shimazaki Y, Muro M, Manabe T. Simple selection of an effective enzyme for digestion of non-denaturing proteins using microscale two-dimensional electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2000; 302: 221-4.

要 旨

ポリエチレングリコール分画法によりアルブミン量を減らしたヒト血漿タンパク質を未変性条件の等電点電気泳動法 (IEF) により分離した。この等電点ゲル内で分離されているタンパク質を、トリプシン、*Achromobacter* protease I (API) または、*Staphylococcus aureus* V8 protease (V8) で酵素処理した後、SDS-メルカプトエタノール存在下で、変性還元させ、タンパク質を構成するポリペプチドを SDS-PAGE で分離した。酵素未処理やそれぞれの酵素処理をしたもので、得られたポリペプチドスポットの IEF-SDS-PAGE パターンを比較した。補体第 3 成分の α 鎖 (C3 α) がトリプシンにより効率よく断片化されているのに対し、アルブミンや IgG などはこの酵素では断片化されにくいことがわかった。一方、API や V8 では、アルブミンが効率よく断片化されているのに対し、C3 α が断片化されにくいことがわかった。これらの結果から、未変性条件の IEF 内で、トリプシンは C3 を効率よく断片化する酵素であることがわかった。