東海大農紀要 38：1 －11（2019）

アミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定手法の検討

菊地亜里沙[1]・熊本紗也加[1]・細澤知香[1]・芝田猛[2]・荒木朋洋[3]

Protein identification using amino acid composition analysis

Arisa KIKUCHI, Sayaka KUMAMOTO, Chika HOSOZAWA, Takeshi SHIBATA and Tomohiro ARAKI

（Received 3 December 2018; accepted 28 January 2019）

ABSTRACT

Currently, identification of proteins is carried out by using partial sequence information in peptides obtained by enzymatic digestion using mass spectrometry. This study examined a new protein identification method using amino acid composition analysis. Since identifying a protein from the amino acid composition ratio of the whole protein use the information different from the conventional method, new identification results may be obtained. First, proteins in beef meat were identified, and the results were compared with conventional methods. Next, in order to evaluate the identification accuracy of this method, lysozymes carrying amino acid substitution with 1 to several residues were identified. Pigeon milk, protein components are unknown, was subjected to SDS-PAGE, and some proteins were identified by amino acid composition analysis and determined keratin as major component. From these results, it was considered that the amino acid composition analysis could identify the sample separated by SDS-PAGE.

緒言

ゲノムはスプライシングを経てmRNAとなり，転写や翻訳を経て最終的にタンパク質になる．生体内に存在する非常に多種多様なタンパク質はスプライシングによりタンパク質をコードする遺伝子の組み合わせを多種多様に変化させることで可能となる（1）．すなわち全てのタンパク質はゲノム情報から作られており，タンパク質はゲノムから作られる唯一の物質である．このゲノムから作られる全てのタンパク質はプロテオームといい，生体内で発現しているタンパク質を網羅的に解析することをプロテオーム解析という（2）．タンパク質は時期や場所など条件によって発現するタンパク質の構造や機能が変化するためプロテオーム解析では非常に多種類のタンパク質を網羅的かつ迅速に同定することが重要である（3）．

プロテオーム解析は通常，生物の組織を2次元電気泳動によって分離し，ディファレンシャルディスプレイによって検出された特異的なタンパク質を質量分析によって同定するもののほか（4），翻訳後修飾を解析するためのmodificomics（5），および定量を目的としたquantitative proteomics（6）がある．Quantitative proteomicsはシステイン残基に特異的に結合する同位体コードアフィニティータグ（ICAT）法（6）やアミン特異的タグを使用するiTRAC法（7）などがありこれらを用いた研究が近年盛んにおこなわれている．

質量分析は分離・検出したタンパク質を酵素消化後，得られたペプチド断片をペプチドマスフィンガープリント法（PMF解析）（3，5），シークエンスタグ法（8），あるいはデノボシークエンス法（9）により分析し同定する．最もハイスループットなPMF解析はタンパク質の酵素消化後，得られたペプチド混合物の質量スペクトルをデータベース上に存在する理論的なペプチドの質量パターンと比較する方法である． PMF解析はマススペクトルを理論値と比較する方法であるため，ゲノム未知生物種由来タンパク質のようなデータベース上に存在しないタンパク質は同定が困難な場合がある．また近年は

[1] 東海大学大学院農学研究科
[2] 東海大学農学部総合農学研究所
[3] 東海大学農学部バイオサイエンス学科
連絡先：荒木朋洋　e-mail:araki@agri.u-tokai.ac.jp

質量分析で得られたMS/MSスペクトルからSEQUESTやMascotを用いて検索し，理論値と比較して同定する手法が用いられる（10）．このように質量分析はゲノム既知生物のプロテオミクスにおいて汎用的に使用されているが，ゲノム未知生物に対して精度が落ちる点に加えて，前処理が煩雑であることや，機器やその維持費が高額であり，分析機の種類によって熟練した操作を必要とするといった問題点がある．そこで本研究ではアミノ酸を正確に定量できるアミノ酸組成分析を用いてタンパク質の同定を試みた．アミノ酸組成分析によるタンパク質同定手法はタンパク質を加水分解しそのアミノ酸組成比を使用し同定する方法である．プロテインシークエンサーや質量分析を用いたタンパク質同定はタンパク質の部分配列情報を基にタンパク質を同定するため，アミノ酸組成分析はこれらの手法とは全く異なるアプローチの手法である．プロテオーム解析手法としてのアミノ酸組成分析の利用はExPASyのAACompIdent（11）や本研究室で開発した同定ソフト（12）などがあるが，本研究室で開発されたソフトは独自のアルゴリズムで設計しており，さらにアミノ酸組成分析で得られたデータをダイレクトにソフトに読み込むことが可能であることに加え生物種の指定や特定のアミノ酸を除く細かい補正が可能であるという優位性がある．AACompIdentは質量分析やアミノ酸配列分析手法であるプロテインシークエンサーとの比較検討や他手法と組み合わせて同定を行い精度の向上が見られた報告（13,14）があるが，本研究室で開発したソフトは他手法との比較検討は行われていない．本研究は牛肉中に含まれるタンパク質をプロテインシークエンサー，質量分析，およびアミノ酸組成分析の3手法を用いてタンパク質を同定し，アミノ酸組成分析による同定の特性を検討した．次に配列相同性が高いキジ目近縁10種の卵白リゾチームをアミノ酸組成分析を用いて同定することでアミノ酸置換と同定精度の関係を調べた．さらにタンパク質成分が不明であるピジョンミルクを試料としてアミノ酸組成分析を用いて同定を行い，未知試料に対してもアミノ酸組成分析が有効であることを明らかにした．

材料および方法

材料

本研究に用いたニワトリ卵白由来C-type lysozyme（HEL ; Hen egg lysozyme Code No. 100940）は生化学工業株式会社から購入したものを使用した．キジ科鳥類卵白由来リゾチームは陽イオン交換クロマトグラフィーにて卵白から精製した凍結乾燥物を使用した（15）．リゾチームは凍結乾燥物または精製標品を1 mg/mlまたは2 mg/mlになるように蒸留水に溶解し，調製した．牛肉はサーロインを用いた．ピジョンミルクは２～６歳のドバト個体がヒナに排出したものを採取した．

試薬

還元剤 β-メルカプトエタノール（β-ME）はGEヘルスケアから購入した．そのほかの試薬は市販の特級または生化学用試薬を用いた．

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

SDS-PAGEはLaemmliらの方法にしたがって行った（16）．すなわち，分離ゲル用緩衝液は，トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン18.2 g，1 M塩酸24 ml，ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）0.4 gを蒸留水に溶解した後，pHを8.8に調整後，全容を100 mlにフィルアップした．濃縮ゲル用緩衝液は，トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン6.0 g，1 M塩酸48 ml，SDS 0.4 gを蒸留水に溶解し，pH6.8に調整後，全容を100 mlにフィルアップした．アクリルアミド/ビス混合酸はアクリルアミド（モノマー）30 g，N,N-メチレンビスアクリルアミド0.8 gを蒸留水に溶解後，全容を100 mlにフィルアップした．10%（w/v）過硫酸アンモニウム（APS）溶液は過硫酸アンモニウム0.1 gを蒸留水1 mlで溶解した．SDS試料調製溶液はグリセリン2.0 ml，濃縮ゲル用緩衝液2.5 ml，β-ME 1 ml，SDS 0.4 gを加え，更に0.2 %ブロモフェノールブルー（BPB）を含むメタノール溶液を0.1 ml加え，蒸留水で10 mlにフィルアップした．電気泳動用緩衝液はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン6.0 g，SDS 1 g，Gly 28.8 gを蒸留水に溶解し，0.2 %ブロモフェノールブルー（BPB）を含むメタノール溶液0.1 mlを加え蒸留水で1000 mlにフィルアップした．タンパク質試料は材料および方法に述べたタンパク質溶液とSDS試料調製液を1 : 1で混合し，100℃で2 minのSDS化を行った．電気泳動は濃縮ゲルで15 mA，分離ゲルで20 mAで通電した．

トランスブロッティング

トランスブロッティングはセミドライ式で行った．ブロッティング緩衝液はCAPS緩衝液を用いた．まず，3-シクロヘキシル-1-プロパンスルホン酸（CAPS）11.1 gで調製後，蒸留水で550 mlにフィルアップし保存溶液とした．ブロッティング緩衝液は，CAPS保存溶液（pH 11.0）：メタノール：蒸留水（1：1：8）の溶液に0.1 %

になるようにSDSを加えたものを調製した．膜は，Poly Vinilidene Difluoride（PVDF膜，Bio-Rad製）を使用した．ブロッティングはセミドライ式ブロッティング装置（ホライズブロット4 M-R WSE-4040・M型，ATTO製）を用い，120 mA，2時間ブロッティングした．ブロッティング後，染色前のPVDF膜は蒸留水で５分間振盪・洗浄を計４回行った．洗浄後，Coomassie Brilliant Blue （CBB）で10秒間染色し，その後，15分間脱色した．さらに脱色後，蒸留水で５分間振盪・洗浄を計４回行い，20% メタノールにより５分間振盪・洗浄を計２回，50% メタノールにより５分間振盪・洗浄した．

アミノ酸組成分析

PVDF膜に転写したタンパク質バンドは12 mm試験管内で十分に乾燥させた後，0.05% β-MEを含む混合酸（6 M HCl：トリフルオロ酢酸（TFA）=2：1）500 μlを加え，減圧下で封管後，110℃で24時間加水分解を行った．加水分解物は減圧乾固した後，100～200 μlの0.02 M HClに溶解し，0.45 μmのメンブレンフィルター（日本ミリポア製Cosmonice Filter ϕ 2 mm）で濾過した．

試料は高速アミノ分析計L-8900（日立製作所製）を用いてアミノ酸組成分析を行った．定量は外部標準法により加水分解の影響により脱アミド化されそれぞれAspとGluになるAsnやGln，その構造が破壊されるCysやTrpを除く，全20種類中16種類のアミノ酸で行った．

N 末端配列分析

N末端配列分析は，PVDF膜からタンパク質バンドを切り取り，PPSQ-21Aプロテインシークエンサー（島津製作所製）を用いて行った．

質量分析

SDS電気泳動後のゲルはタンパク質バンドを切り取り，チューブ内で0.06 μgのトリプシンを加え，37℃で8時間トリプシン分解を行った．トリプシンペプチドは，50 μlの0.1% ギ酸/アセトニトリルで抽出し，減圧濃縮機で5 μlまで濃縮した．試料はZip Tipによる前処理を行い，Electro Spray Ionization（ESI），Quadrupole（Q）－Time Of Flight（TOF）（API QSTER Pulsar i : AB SCIEX製）を用いてMS/MS（デノボシークエンス）による質量分析を行い，フラグメントイオンの間隔から目視で配列を読んだ．質量校正方法はチューニングソリューションキット（AB SCIEX製）を用いた．

BLAST 解析

Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）解析は，データベース上に登録されている配列と，質量分析で得られたMS / MS解析の配列（デノボシークエンス）を相同性検索して同定した（17）．すなわち，National Center for Biotechnology Information（NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）内のBLASTを用いて解析を行った．データベースは，Non-redundant protein sequence（nr）を選択した．アルゴリズムはblastp（protein － protein blast）を選択した．

牛肉タンパク質の粗抽出液の調製

牛肉は脂肪や筋を切り分け，乳鉢でホモジナイズし1 g測り取った．試料は重量の10倍量の蒸留水を加えホモジナイズし4000 g，15 min，4℃で遠心分離を行った．上清を回収し，粗抽出液とした．

ピジョンミルクの脱脂

試料は0.2 ～ 0.5 g計りとり，その重量の2.5倍量の蒸留水を加えて乳鉢でホモジナイズした．ホモジナイズ後溶液と等量のヘキサンを加えて激しく振った後，室温で8000 g 10 min遠心分離後凍結乾燥し脱脂試料とした．脱脂試料はその重量に対して10倍量の蒸留水を加えホモジナイズした．試料溶液は11200 g 4℃ 10 min遠心分離し，上清を可溶性画分，沈殿を不溶性画分とした．不溶性画分は重量に対して15倍量のSDS試料調製溶液または膨潤緩衝液を加えホモジナイズした．SDS試料調製溶液を加えた試料は8000 g，10 min室温で遠心分離し，上清をSDS-PAGE用試料とした．膨潤緩衝液を加えた試料は固形分を取り除き，２次元電気泳動用試料とした．

アミノ酸組成分析によるタンパク質同定

アミノ酸組成情報を用いたタンパク質の同定はアミノ酸組成分析による同定システム（特開2010-96501）を使用した．本システムは未知のタンパク質のアミノ酸組成クロマトファイルデータ（アミノ酸組成分析計より得られたデータのESDファイル）を読み込ませることにより，アミノ酸組成比（mol%）を求め，データベース上に存在するタンパク質のアミノ酸組成比の理論値との比較からタンパク質を検索する．同定用データベースはUni-Prot上に登録されている全タンパク質アミノ酸配列情報を利用し，20種類のアミノ酸のアミノ酸組成比（mol%）として作成した組成比データベースを用いた．タンパク質の同定において，AsnおよびGlnは加水分解

により脱アミド化されそれぞれ Asp と Glu になることから，同定に用いるデータベースでは Asn と Gln の量をそれぞれ Asp と Glu に残基数を合算して使用した．スコアは理論アミノ酸組成比（mol%）と実験によって得られたアミノ酸組成比（mol%）とのマッチングにより算出した．理論値－実験値 =0（完全一致）である場合，スコア100となる．

同定システムの検索条件は牛肉とキジ科 10 種の卵白由来リゾチームで生物種を脊索動物に指定して検索を行った．ピジョンミルクは発酵している可能性があり，微生物由来のタンパク質が含まれる可能性もあるため，生物種の指定を行わなかった．タンパク質同定は Gly，Ser および Tyr のいずれかを除く補正と PVDF 膜のみで加水分解を行ったブランクにおいて検出されたアミノ酸による補正を行った．

結果および考察

牛肉のタンパク質同定

牛肉は可溶性タンパク質試料を SDS-PAGE で分離し，プロテインシークエンサー，質量分析およびアミノ酸組成分析を用いてタンパク質同定を行い，3 手法を比較した．また，アミノ酸組成分析は未知試料に対して対応可能であることを検討した．その比較として質量分析も未知試料を標的としたデノボシークエンスを行った．まず，SDS-PAGE で分離したタンパク質バンド（Fig.1）はプロテインシークエンサーによって全13 バンド中 3 つのバンド（E, G および K）においてアミノ酸配列が得られた（Table 1）．得られた配列は blastp によって配列相同性検索を行った．同定の基準は，E-Value が0.001 以下であること（18）および分子量が電気泳動の結果と矛盾しないこととした．その結果，8 バンド中 2 バンド（E および K）でタンパク質が同定できた（Table 1）．同定できた 2 バンドは16-17残基の配列情報が得られ，

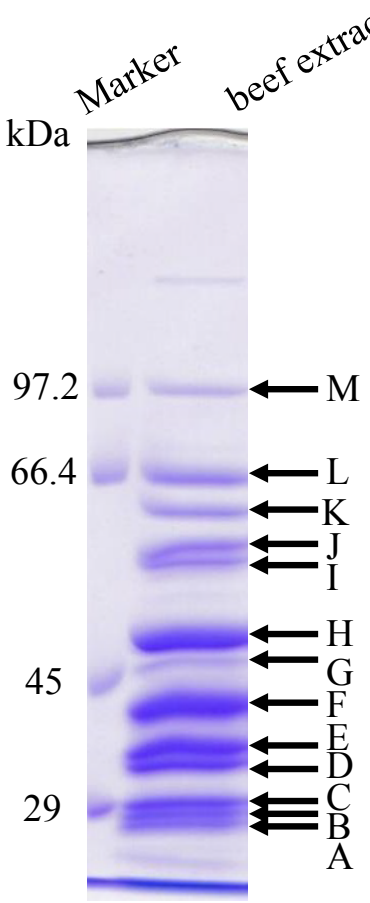

Fig.1　Soluble protein from beef separated by SDS-PAGE.

Table 1　Protein identification by protein sequencer

Band	Sequence	First yields (pmol)	Result	E-value	Accession number
M	-	-	ND	-	
L	DTEKY	5.6	ND	-	
K	VKIVTVKTKAYQDTKQ	9.7	Phosphoglucomutase-1	1.0E-09	Q08DP0.1
J	SQIV	9.1	ND	-	
I	ENGD	1.3	ND	-	
H	-	-	ND	-	
G	PFGNTANLV	3.5	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	0.84	P16068.1
F	ALTPK	13.8	ND	-	
E	VKVGVNGFGRIGAMVTR	15.0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7.0E-09	P10096.4
D	-	-	ND	-	
C	-	-	ND	-	
B	-	-	ND	-	
A	SPK	3.6	ND	-	

E-value が低く高精度の同定が行えた．得られた配列が 6 残基以下だったバンド（I，J および L）は N 末端アミノ酸量が 10 pmol 未満だった．バンド F は N 末端アミノ酸量が13.8 pmol であったが，6残基しか配列が得られなかったため，blastp の E-Value が高く同定ができなかった．また，バンド G は 9 残基の配列が得られたが，E-Value が高く同定できなかった．その原因は N 末端アミノ酸量の収量が少なかったことが原因と考えられ，正確な配列が得られなかったと考えられた．他 5 バンド（B ～ D，H および M）は N 末端の翻訳後修飾が原因であったと考えられた．以上の結果から，プロテインシークエンサーは N 末端が翻訳後修飾を受けておらず，N 末端アミノ酸量質量が10 pmol あれば同定が可能であると考えられる．質量分析はデノボシークエンスにより 6 ～15残基の配列が得られた（Table 2）．得られた配列は blastp により配列相同性検索を行った．同定の基準は E-value の値が0.001 以下とした．その結果全13バンド中 6 バンドを同定した（Table 2）．バンド A および B は2 種類の配列が検出された．これは質量分析が非常に高感度であり試料中に複数のタンパク質が混在すればそれらが同時に検出されることから，SDS-PAGE で分離不十分であった混入タンパク質を同定した可能性が考えられた．また，E-value の値が高く同定できなかったバンドや同定可能な配列が得られなかったバンドは TOF-MS で検出されたペプチドに対する MS/MS を行った際，ペプチドの断片化が不十分でプロダクトイオンが十分に生成せず，信頼性の高い配列情報が得られなかったことが原因であると考えられた．

一方，アミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定は，同定したスコアが 60 以上であること，分子量が泳動結果と一致すること，および生物種が近いまたは一致していることとした．その結果，全13バンドすべてを同定することができた（Table 3）また，全 13 バンド中 11 バンドでウシ由来のタンパク質を同定した．ウシのタンパク質を同定できなかったバンド J および F はデータベース上にウシのタンパク質が登録されていなかった．このことから，データベース上に登録されていれば，分析サンプルの生物種を含めて同定できる可能性が考えられる．

以上の 3 手法による牛肉のタンパク質同定結果を比較した．その結果，3 手法全ての同定結果で一致するものはなかった（Table 1～3）．プロテインシークエンサーと質量分析の同定結果を比較した結果，両手法で同定できたバンドはなかった．プロテインシークエンサーとアミノ酸組成分析の同定結果を比較した結果，2 バンドが一致した（K，E）．この 2 バンドは質量分析では同定可能な配列が得られなかった．アミノ酸組成分析と質量分析では，4 バンドが一致した（D，F，G および L）．この 4 バンドの N 末端は翻訳後修飾を受けていることが考えられ，ヒトやシロイヌナズナのタンパク質でほとんどのタンパク質の N 末端が修飾を受けている報告がある

Table 2　Protein identification of beef meat extract by de novo sequence

Band	Sequence	Protein name	E-value	Accession number
M	V I/L A I/L HNA I/L VSVP	AP-5 complex subunit beta-1	0.540	G3MZC5.1
L	GEYGFQNAA I/L VR	Serum albumin	2.0E-04	P02769.4
K		ND		
J	YVDDG I/L I/L S I/L I/L VK	BPI fold-containing family B member 1	0.380	Q8SPF8.1
I		ND		
H		ND		
G	GSSEVEQVQ I/L	Creatine kinase M-type	6.0E-05	Q9XSC6.2
F	DWTTTQG I/L DG I/L SER	Fructose-bisphosphate aldolase B	3.0E-05	Q3T0S5.1
E		ND		
D	VVSNPVD I/L I/L TYVAWK	L-lactate dehydrogenase A chain	6.0E-10	P19858.2
C		ND		
B	PFWNDE I/L APQ I/L K	Phosphoglycerate mutase 2	3.0E-06	Q32KV0.1
	AAHGGG I/L DR	Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial	5.0	A6QPU5.1
A	HG I/L I/L VDE I/L I/L GQK	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2	0.380	Q2KHX4.3
	I/L W I/L I/L NT I/L NNR	Chitinase-3-like protein 1	0.740	P30922.3

Table 3　Protein identification of beef meat extract by amino acid analysis

Band	protein name	Species	Score	kDa	Accession number
M	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	*Bos taurus* (Bovine)	69	96	Q3ZBT1
L	Serum albumin	*Bos taurus* (Bovine)	68	67	P02769
K	Phosphoglucomutase-1	*Bos taurus* (Bovine)	63	62	Q08DP0
J	Pyruvate kinase isozyme M1	*Pongo abelii* (Smatran orangutan)	78	58	Q5NVN0
I	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	*Bos taurus* (Bovine)	63	55	Q2HJF7
H	Beta-enolase	*Bos taurus* (Bovine)	71	47	Q3ZC09
G	Creatine kinase M-type	*Bos taurus* (Bovine)	66	43	Q9XSC6
F	Fructose-bisphosphate aldolase A	*Rattus norvegicus* (Rat)	78	40	P05065
E	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*Bos taurus* (Bovine)	63	36	P10096
D	L-lactate dehydrogenase A chain	*Bos taurus* (Bovine)	62	36	P19858
C	Carbonic anhydrase 3	*Bos taurus* (Bovine)	73	29	Q3SZX4
B	Phosphoglycerate mutase 2	*Bos taurus* (Bovine)	70	29	Q32KV0
A	Triosephosphate isomerase	*Bos taurus* (Bovine)	77	27	Q5E956

(19)．ヒトと同じ哺乳類であるウシのタンパク質のほとんどが同様に修飾を受けている可能性が考えられる．そのためプロテインシークエンサーでは同定ができなかったと考えられた．また，アミノ酸組成分析と質量分析で同定結果が異なったバンドAは，SDS-PAGEで複数のバンドが重なっている可能性が考えられた．バンドBは質量分析で2つのタンパク質を同定したがE-Valueの低かった方のタンパク質がアミノ酸組成分析の同定結果と一致した．したがって，アミノ酸組成分析ではメインバンドのみを同定した可能性が考えられた．このように質量分析は高感度であるため微量のタンパク質が混ざって存在する場合，コンタミネーションの判別が難しいと考えられるが，アミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定は微量なコンタミは同定に影響せず，主要タンパク質を同定するためSDS-PAGEのような簡便なタンパク質分離手法を用いた場合でも同定可能であることが明らかとなった．質量分析は通常2次元電気泳動を用いてタンパク質を同定するがアミノ酸組成分析では簡便な分離手法であるSDS-PAGEで十分なタンパク質同定が可能であると考えられる．

以上の結果から，N末端の翻訳後修飾を受けていてもタンパク質の同定が可能である点，微量のコンタミであれば主要タンパク質を同定することが可能である点およびSDS-PAGEで分離したタンパク質を簡便に同定できる点はアミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定の利点であると考えられる．

キジ科10種の卵白由来リゾチームを用いた同定精度評価

アミノ酸組成分析は簡便な手法としてタンパク質同定に有用であることを明らかにした．そこで配列相同性と同定精度の相関を明らかにすることを目的としてキジ科10種の卵白由来リゾチームを用いた精度評価を行った．これらのリゾチームは1～数残基のアミノ酸置換を有するため（Fig. 2），アミノ酸組成分析によるタンパク質同定精度が明らかになると期待できる．各リゾチームはSDS-PAGEにより分離しアミノ酸組成分析によるタンパク質同定を行った．その結果，すべてのリゾチームで実際に用いたリゾチームがトップにヒットし，置換のあるものはスコアが低く同定された（Table 4）．このことから，アミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定は1残基の置換があったとしても分別同定可能であることが明らかとなった．すなわちプロテインシークエンサーや質量分析によるタンパク質同定は部分配列情報を基にタンパク質を同定しているため，置換があった配列の情報が得られなければ分別同定を行うことが困難であると考えられる．一方アミノ酸組成分析はタンパク質全体の組成比情報を基にタンパク質を同定しているために置換部位の情報が必ず含まれるため，同定可能であると考えられる．そのためこのような分別同定はアミノ酸組成分析の利点の一つであると考えられる．

ピジョンミルクのタンパク質同定

実際のプロテオーム解析は様々な状態および様々な量のタンパク質を同定する必要がある．そこでタンパク質成分未知であるピジョンミルクを試料として，アミノ酸組成分析を用いて主成分を同定した．ピジョンミルクは脱脂を行った結果，Fig. 3のように4層の画分が得られた．A層は不溶性のワックス様画分で，B層は液体の画分，C層は沈殿の画分として得られた（Fig. 3）．ヘキサン層は除去し，A層はSDS試料調製溶液を用いて溶解し，

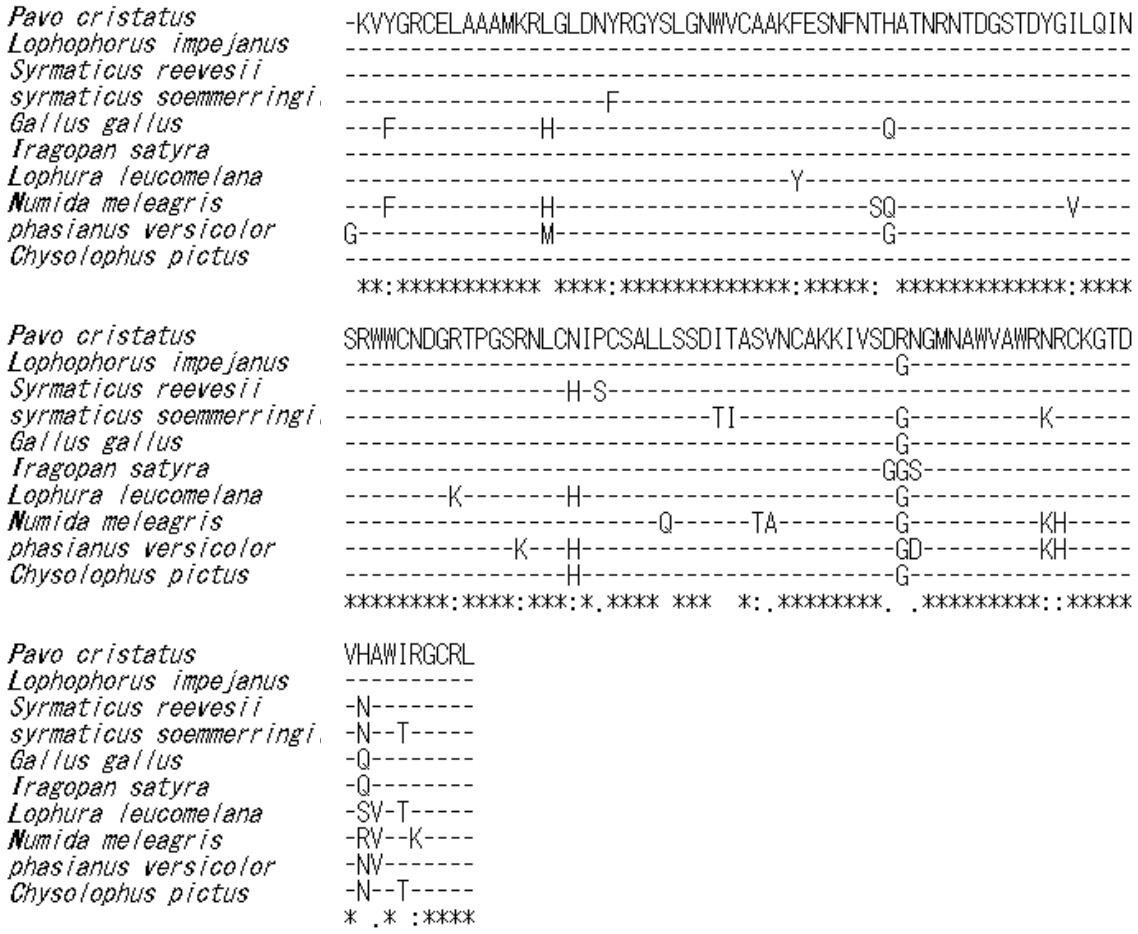

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence of lysozymes from 10 species of Galliformes.
The positions with amino acid substitution compared with *pavo cristetus* lysozyme sequence are indicated by one letter code.
"※" indicates the site preserved in the whole lysozyme. ":" Indicates a site with strong similarity, "." Indicates a site of weak similarity (20).

Table 4 Identification of lysozyme isoforms carrying amino acid substitutions

	Peacock[a]	Himalayan monal pheasant	Reeves's pheasant	Copper pheasant	Chicken	Satyr tragopan	Kalij pheasant	Helmeted guineafowl	Japanese pheasant	Golden pheasant
Peacock[b]	87	73(1)	79(1)	65(4)	66(4)	51(4)	64(6)	53(7)	50(7)	74(2)
Himalayan monal pheasant	85[c](1)[d]	79	78(2)	70(3)	70(3)	56(3)	69(5)	57(6)	55(6)	79(1)
Reeves's pheasant	81(1)	68(2)	83	61(5)	61(5)	51(4)	63(6)	49(8)	48(8)	71(3)
Copper pheasant	71(4)	69(3)	66(5)	75	67(3)	51(5)	65(5)	57(5)	50(8)	75(2)
Chicken	69(4)	71(3)	65(5)	68(3)	81	61(4)	57	61(4)	51(8)	72(4)
Satyr tragopan	69(4)	74(3)	69(4)	69(5)	70(4)	71	68(6)	57(7)	57(7)	76(4)
Kalij pheasant	62(6)	61(5)	63(6)	62(5)	51(8)	50(6)	84	58(6)	58(6)	63(4)
Helmeted guineafowl	57(7)	56(6)	52(8)	60(5)	63(4)	52(7)	59(6)	79	61(6)	60(6)
Japanese pheasant	56(7)	57(6)	51(8)	56(8)	53(8)	53(7)	62(6)	62(6)	78	59(7)
Golden pheasant	82(2)	77(1)	75(3)	73(2)	67(4)	55(4)	73(4)	57(6)	52(7)	83

a : Analyzed sample, b : Identified sample, c : Identified score of protein, d : Number of amino acid substitution.
Peacock (*Pavo cristatus*), Himalayan monal pheasant (*Lophophorus impejanus*), Reeves's pheasant (*Syrmaticus reevesii*), Copper pheasant (*syrmaticus soemmerringii*), Chicken (*gallus gallus*), Satyr tragopan (*Iragopan satyra*), Kalij pheasant (*Lophura leucomelana*), Helmeted guineafowl (*Numida meleagris*), Japanese pheasant (*phasianus versicolor*), Golden pheasant (*Chysolophus pictus*)

上清を SDS-PAGE に供した．B 層と C 層は，そのまま凍結乾燥を行い，その凍結乾燥物から蒸留水を用いて可溶性画分を抽出した．可溶性画分の残渣は，SDS 試料調製溶液を用いて溶解し，上清を不溶性画分とした．

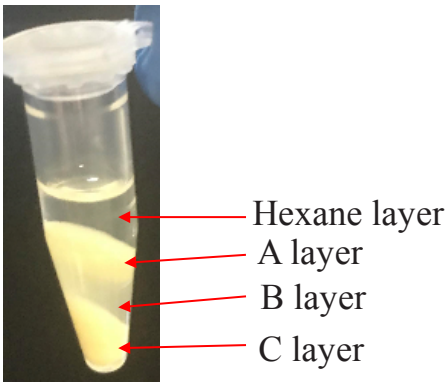

Fig.3　The defatted pigeon milk after centrifugation.

SDS-PAGE の結果，A 層から抽出されたタンパク質は，およそ55 kDa と52 kDa に主要バンドを確認した（Fig. 4-I）．B，C 層由来の可溶性画分は66 kDa 付近に主要バンドを確認した（Fig. 4-II）．B，C 層由来の不溶性画分は，およそ55 kDa と52 kDa に主要バンドを確認した（Fig. 4-III）．

SDS-PAGE で分離したタンパク質は A 層由来のタンパク質画分を 2 バンド（A-1，A-2），B，C 層由来の可溶性タンパク質は1バンド（可溶性バンド A）および不溶性バンドは 2 バンド（不溶性バンド A，B）を同定した（Fig. 4 -I，II，III）．同定の基準は同定ソフトにて同定した時，スコアが 60 以上であること，分子量が泳動結果と一致すること，および生物種が近いまたは一致していることとした． A-1 はケラチンタイプ II を同定し，A-2はケラチンタイプ I を同定した（Table 5，6）．可溶性バンド A は微生物由来の t-RNA リガーゼを同定した

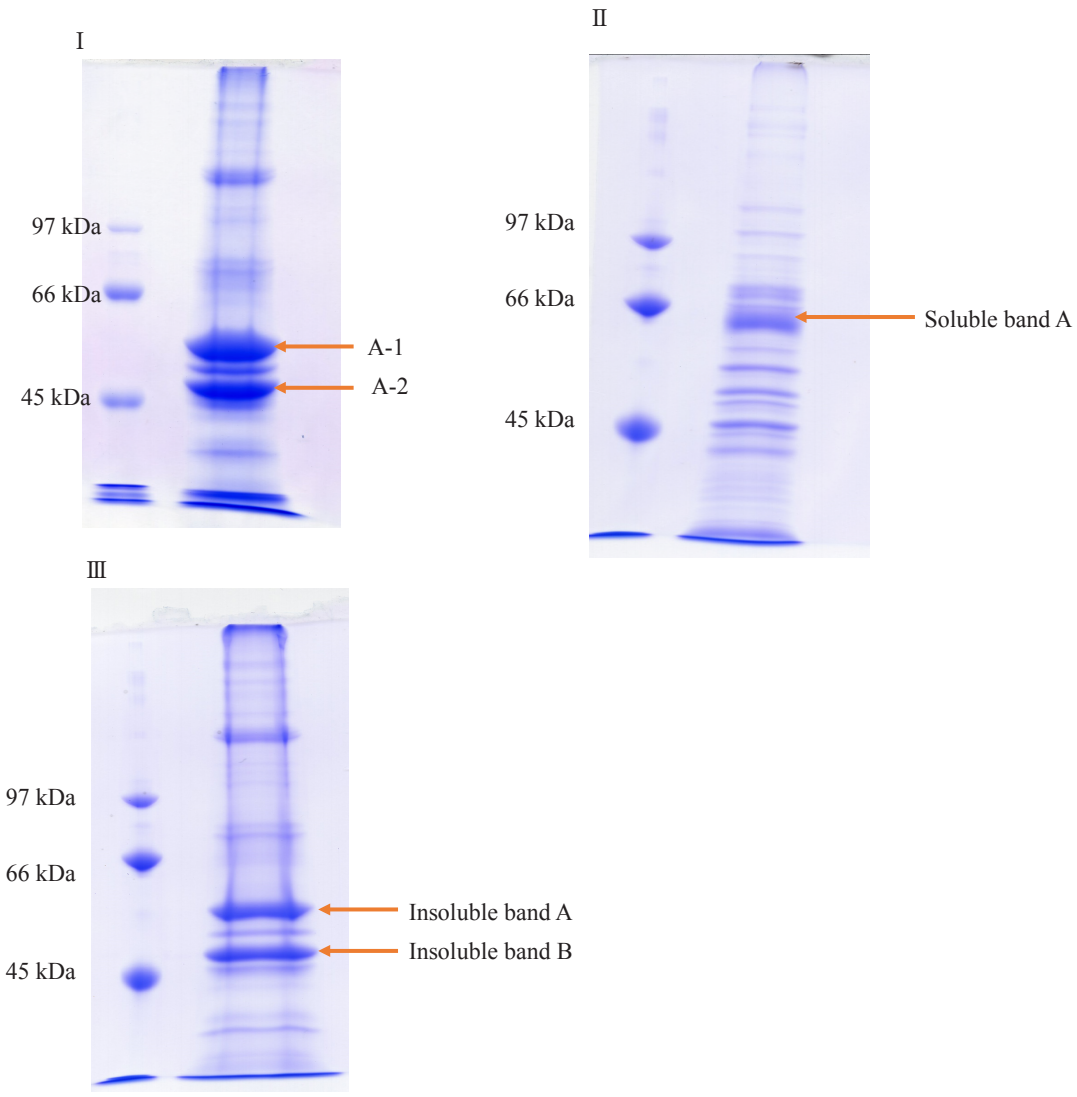

Fig. 4　Result of SDS-PAGE
I : A layer，II : Soluble fraction，III : Insoluble fraction

(Table 7). 不溶性バンドAはケラチンタイプIIを同定した（Table 8). 不溶性バンドBはケラチンタイプIを同定した（Table 9). A-1およびA-2と不溶性バンドAおよびBは同定されたケラチンのタイプが一致した. このことから，A層はヘキサン抽出の際，不溶性タンパク質が沈殿してできたものであると考えられた. 同定されたケラチンはピジョンミルクが嗉嚢の内側の壁が厚くなって剥がれ落ちてできたものという報告と一致した(21). しかし，同定されたタンパク質のスコアは低かった. これはヒットしたケラチンがハトの嗉嚢内でインキュベートされ，プロテアーゼによる分解を受けた可能性があり，分解されたことにより組成比が変わりスコア

Table 5　Protein identification of A-1

Protein name	Species	Score	kDa	Accession number
Keratin, type II cytoskeletal 7	*Bos taurus* (Bovine)	62	52	Q29S21
Keratin, type II cytoskeletal cochleal	*Gallus gallus* (Chicken)	58	54	O93532
Keratin, type II cuticular Hb1	*Bos taurus* (Bovine)	57	55	Q148H4
Keratin, type II cuticular Hb3	*Bos taurus* (Bovine)	56	54	A4FUZ0
Keratin, type II microfibrillar, component 7C	*Ovis aries* (Sheep)	54	54	P15241

Table 6　Protein identification of A-2

Protein name	Species	Score	kDa	Accession number
Keratin, type I cytoskeletal 18	*Homo sapiens* (Human)	59	48	P05783
Keratin, type I cytoskeletal 14	*Gallus gallus* (Chicken)	56	51	Q6PVZ1
Keratin, type I cytoskeletal 19	*Homo sapiens* (Human)	55	44	P08727
Keratin, type I cytoskeletal 19	*Pongo abelii* (Sumatran orangutan)	54	44	Q5R8S9
Keratin, type I cytoskeletal 42	*Rattus norvegicus* (Rat)	53	50	Q6IFU7

Table 7　Protein identification of soluble fraction band A

Species	Score	kDa	Accession number
Bacillus velezensis (Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum)	80	91	A7Z7V7
Bacillus licheniformis (strain ATCC 14580 / DSM 13 / JCM 2505 / NBRC 12200 / NCIMB 9375 / NRRL NRS-1264 / Gibson 46)	75	92	Q65FX8
Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain SK11)	75	94	Q030E7
Ajellomyces capsulatus (Histoplasma capsulatum)	74	69	C0NDZ7
Streptococcus thermophilus (strain CNRZ 1066)	73	94	Q5M1L6

Table 8　Protein identification of insoluble fraction band A

Protein name	Species	Score	kDa	Accession number
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	*Homo sapiens* (Human)	70	66	Q01546
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	*Mus musculus* (Mouse)	66	63	Q3UV17
Keratin, type II cytoskeletal 7	*Bos taurus* (Bovine)	65	52	Q29S21
Protein sey1	*Aspergillus niger* (strain CBS 513.88 / FGSC A1513)	64	96	A2QR20
Keratin, type II cytoskeletal	*Xenopus laevis* (African clawed frog)	63	55	O93532

Table 9　Protein identification of insoluble fraction band B

Protein name	Species	Score	kDa	Accession number
Keratin, type I cytoskeletal 24	*Homo sapiens* (Human)	63	55	Q2M2I5
Keratin, type II cytoskeletal 6A	*Homo sapiens* (Human)	61	60	P02538
Keratin, type II cytoskeletal 6B	*Homo sapiens* (Human)	61	60	P04259
Keratin, type II cytoskeletal 6C	*Homo sapiens* (Human)	60	60	P48668
Keratin, type I cytoskeletal 15	*Ovis aries* (Sheep)	60	49	O77727

の低下につながったと考えられた．また，ケラチンは多くの種類がありハトのケラチンはαケラチンとβケラチンに大別でき，αケラチンはタイプIが17種とタイプIIが16種そしてβケラチンは羽毛型が14種，ツメ型が５種そしてウロコ型が７種報告されており（21），配列が類似しているものから全く異なるものがある．そのため，嗉嚢内で非常に構造の類似したケラチンが発現しそれが剥がれ落ちて微生物による発酵を受けスコアの低下につながった可能性も考えられる．また，現在 Uni-Prot 上に登録されているトリ由来のケラチンは25件ありそのうちハトのケラチンは５件であった．この５件は全て羽毛型で皮膚型はなく，皮膚型が高分子であるのに対し羽毛型が低分子であり全く異なったタンパク質である．トリ由来の組成比の近いタンパク質データがないことから，生物種の違いに基づくスコアの低下につながった可能性がある．

アミノ酸組成分析を用いたタンパク質同定はスコアの低下が見られたものの十分な精度で同定を行うことが出来た． このことから，アミノ酸組成分析は未知試料に対して主成分の同定が十分な精度で行えると考えられる．

要約

現在，タンパク質の同定は質量分析を用いて酵素消化したペプチド中の部分アミノ酸配列情報を用いて行っていることが多い．本研究はタンパク質のアミノ酸組成を用いる新しいタンパク質同定手法を検討した．タンパク質のアミノ酸組成情報は従来の手法とは異なる情報であるため，新しい同定結果が得られる可能性がある．そこで，SDS-PAGE で分離した牛肉中のタンパク質について同定を行いその結果を従来の手法と比較した．その結果，質量分析は分離不十分なタンパク質は複数同定され，MS/MS で同定可能な配列を得られなかったバンドがあった．プロテインシークエンサーは N 末端がブロックや，収量不足で同定できなかったバンドがあった．一方，アミノ酸組成分析は全てのバンドを同定した．次に本手法の同定精度を調べるため，１から数残基の配列置換があるリゾチームの同定を行った．その結果，すべてのリゾチームで１残基の配列置換を含め，分別同定可能であった．また，タンパク質成分が未知であるピジョンミルクについて SDS-PAGE で分離した主要バンドについて主成分がケラチンであることを明らかにした．以上の結果から，本手法は簡便な SDS-PAGE で分離したタンパク質試料について，その主成分を迅速に同定できる手法であることを明らかにした．

謝辞

タンパク質同定システムの開発にご協力いただいた，株式会社日立ハイテクフィールディングに厚く御礼申し上げます．

参考文献

１）Lander, E.S. et al., Initial sequencing and analysis of the human genome, 2001, Nature, 409, 860-921.

２）Kahn, P., From genome to proteome: looking at a cell's proteins, 1995, Science, 270, 369-370.

３）片山博之，小田吉哉，プロテオミクスの展望：夢物語に終わらないために，2002, J.Mass Spectrom.Soc. Jpn.,50, 126-134.

４）Chevalier1, S., Macdonald, N., Tonge, R., Rayner, S., Rowlinson, R., Shaw, J., Young, J., Davison, M. and Roberts, R.A., Proteomic analysis of differential protein expression in primary hepatocytes induced by EGF, tumor necrosis factor a or the peroxisome proliferator nafenopin, 2000, Eur.J.Biochem., 267, 4624-4634.

５）Reinders, J., Sickmann, A., Modificomics: Posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation, 2007, Biomol. Eng., 24, 169-177.

６）Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, 1999, Nat. Biotechnol., 17, 994-999.

７）Shadforth, I. P., Dunkley, T. P., Lilley, K. S. and Bessant, C., i-Tracker: For quantitative proteomics using iTRAQ, 2005, BMC Genomics, 6, 145.

８）Mann, M. and Wilm, M., Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags, 1994, Anal. Chem., 66, 4390-4309.

９）Seidler, J. et al., De novo sequencing of peptides by MS/MS, 2010, Proteomics, 10, 634-649.

10）Cottrell, J. S., Protein identification using MS/MS data, 2011, J. Proteomics, 74, 1842-1851.

11）SIB, AAcompIdent（protein identification by aa Composition), https://web.expasy.org/aacompident/.

12）細澤知香，荒木朋洋，ゲノム未知生物種の特異的発現タンパク質の同定に関する研究，2015，東海大学大学院修士論文 .

13）Wilkins, M.R., Ou, K., Appel, R.D., Sanchez, J.-C., Yan, J.X., Golaz, O., Farnsworth, V., Cartier, P., Hochstrasser,

D.F, Williams, K.L. and Gooley, A.A. , Rapid protein identification using N-terminal "sequence tag" and amino acid analysis, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun., 221, 609-613.

14）Cordwell, S.J., Wilkins, M.R., Cerpa-Poljak, A., Gooley, A.A., Duncan, M., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I., Cross-sepcies identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry and amino acid composition, 1995, Electrophoresis, 16, 438-443.

15）Araki, T., Kuramoto, M. and Torikata, T., The amino acid sequence of Lady Amherst's pheasant（*Chrysolophus amherstiae*）and golden pheasant（*Chrysolophus pictus*）egg-white lysozymes, 1990, Agric.Biol.Chem., 54, 2299-2308.

16）Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, Nature, 227, 680-685.

17）Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic local alignment search tool, 1990, J. Mol. Biol., 215, 403-410.

18）Friedrich, A., Ripp, R., Garnier, N., Bettler, E., Deléage, G., Pochl, O. and Moulinier, L., Blast sampling for structural and functional analyses, 2007, BMC Bioinformatics, 8, 62.

19）Bienvenut, W. V., Sumpton, D., Martinez, A., Lilla, S., Espagne, C., Meinnel, T. and Giglione, C., Comparative large scale characterization of plant versus mammal proteins reveals similar and idiosyncratic N-α-acetylation features, 2012, Mol. Cell. Proteomics, 11, M111.015131.

20）DDBJ, ClastalW https://www.ddbj.nig.ac.jp/faq/ja/explain-three-symbols.html.

21）Gillespie, M. J., Crowley, T. M., Haring, V. R., Wilson, S. L., Harper, J. A., Payne, J. S., Green, D., Monaghan, P. Donald, J. A., Nicholas, K. R., and Moore, R. J., Transcriptome analysis of pigeon milk production －role of cornification and triglyceride synthesis genes, 2013, BMC Genomics, 14, 169.