

日本の気候勾配に沿ったオナシカワゲラ (Nemoura sp.) のタンパク質 発現パターンの多様性

愛媛大学大学院理工学研究科 学生会員 ○山野俊介
愛媛大学大学院理工学研究科 非会員 Maribet Gamboa
愛媛大学大学院理工学研究科 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

今日、河川管理において生物多様性保全は重要な課題となっている。しかし、近年の急速な気温上昇や気候変動は、水温や流量などの河川環境条件を変化させる可能性がある。環境の変化に応答したタンパク質からは、生物がその環境に対してどのように応答し適応するかを知ることができる。そのためタンパク質を対象にした研究は、特定の環境における生物への影響を評価する手段として利用されている。本研究の対象生物であるカワゲラは幼虫の間河川で生息する水生昆虫で、指標生物としても利用されている。しかし、環境の変化に敏感であることから絶滅する可能性が高い分類群といわれている(Figueroa *et al.* 2009)。カワゲラなどの底生動物は河川の生態系の維持に重要な役割を果たしていることから、気候変動に対するカワゲラの応答を理解することは重要である。

本研究は多様な気候環境に生息するカワゲラが持つ機能を把握するため、日本の気候環境勾配に沿ったカワゲラ地域個体群間のタンパク質発現パターンを比較し、地域特異的なタンパク質を調査した。

2. 方法

札幌、仙台、岐阜、松山の4地域でサンプリングを行い、採取したカワゲラはペッスルですりつぶした。その後 TRIzol Reagent(Life Technologies)のマニュアルに従いタンパク質を抽出、精製した後、タンパク質の濃度を蛍光マイクロプレートリーダー(SPECTRA Fluor Plus, TECAN)で測定し、2.0-3.0mg/mlになるように希釈もしくは濃縮した。抽出したサンプルを ULTRA SONIC cleaner (EYELA)を用いて超音波破碎処理し、2次元電気泳動を行うことでタンパク質を分離した。2次元電気泳動は2段階の電気泳動によりタンパク質を2次元に分離する手法で、1次元目はpH勾配上で等電点の違いによって分離し、2次元目は分子量の違いによってタンパク質を分離する。本研究では、1次元目においては1次元電気泳動用ゲル (Immobiline DryStrip) のpH勾配 3-11 のゲルを用い、マニュアルに従い4段階に電圧と流す時間を変えて行った。2次元目においては NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Life Technology) のゲルを用い、電圧と電流をそれぞれ 120V, 60mA に設定し、時間は約1時間45分で行った。その後 Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO RAD) を用いてゲルを染色し、タンパク質を可視化できるようにした。ゲルの画像はソフトウェア PDQuest ver 8.0(BIO RAD)を用いて画像解析を行った。ここで、タンパク質の発現パターンを地域間で比較することで地域特異的なタンパク質と、4地域で共通に発現しているタンパク質を特定した。これらのタンパク質について質量分析を行い、同定を行った。また、共通タンパク質については地域間における発現量の比較を行った。

特定した調べたいタンパク質はゲルから切り取られ、In-Gel Tryptic Digestion Kit (Thermo SCIENTIFIC) のマニュアルに従いゲル内消化を行った。タンパク質は分子量が大きすぎて質量分析で正確に測定できないため、ゲル内消化でタンパク質を消化分解する。さらに、Pierce® C18 Spin Columns (Thermo SCIENTIFIC) のマニュアルに従って脱塩を行い、遠心エバポレーターで 5µl 程度まで濃縮した。質量分析は MALDI TOF-TOF タンデム質量分析計の TOF/TOF 5800 System (ABSCIEX) を用いて行った。消化分解したサンプルと CHCA を MALDI metal plate 384 opti tof 123×01mm RevA のプレート上で乾燥させた後、質量分析計で測定した。最初に、消化分解されたペプチド断片のイオンを検出するために MS Reflector Positive モードで測定を行った (図1)。ここで得られたマススペクトルの中から検出強度の強いピークを選択し、より詳細なマススペクトル

を得るため MS-MS1kVPositive モードで測定を行った。2 段階目で得られた詳細なマスペクトルのデータを用いて MS/MS Ions Search (MIS)によるタンパク質の同定を行った。なお、設定において参照データベースにカワゲラがなかったため、ショウジョウバエのデータベースに対して検索を行った。

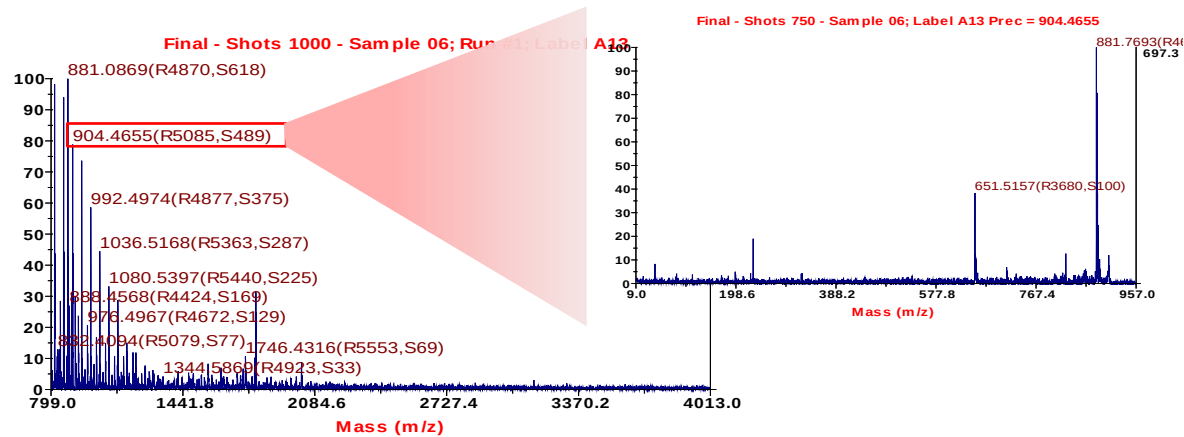


図 1 質量分析で得られるマスペクトルの例。横軸が質量電荷比 (m/z)，縦軸が相対強度を表す。左が MS Reflector Positive モードで測定したペプチド断片のマスペクトル，右が赤枠で示した質量ピークから生じたイオンを MS-MS1kVPositive モードで測定したマスペクトル。

3. 結果と考察

地域間でタンパク質の発現パターンを比較した結果，札幌で 16 個，仙台で 19 個，岐阜で 9 個，松山で 49 個の地域特異的なタンパク質が見つかった。また，4 地域で共通して発現したタンパク質が 18 個見つかった。ゲルの損傷により切り取ることができなかった 2 つを除く合計 109 個のタンパク質を質量分析し，MIS によって 99 個同定できた。

同定した地域特異的なタンパク質を機能ごとに分類し，地域間でその割合を比較した。札幌で発現したタンパク質では，エネルギーに関するものが多く見られた。寒冷な環境下で生息する昆虫は生体内の機能を維持するために多くのエネルギーを必要とすることが知られている。また，温暖な松山ではエネルギーに関係するタンパク質の割合が小さいことから，寒冷な気候条件ほどエネルギーに関係したタンパク質が発現する傾向にあると考えられる。一方松山では，代謝機能に関係するタンパク質が多く見られた。これは，高い温度においてより多くの代謝機能タンパク質が発現することから，温暖な松山で発現量が多くなったといえる。

同定できた共通タンパク質 16 個の内，Probable cytochrome P450 4aa1 のみ地域間で有意な差が見られ札幌でやや多い発現量を示した。このタンパク質は寒冷環境への順応に関係するホルモンに作用することが知られていることから，サンプリングした全地域で発現し，特に気候環境が寒冷な札幌では発現量が多い傾向になったと考えられる。

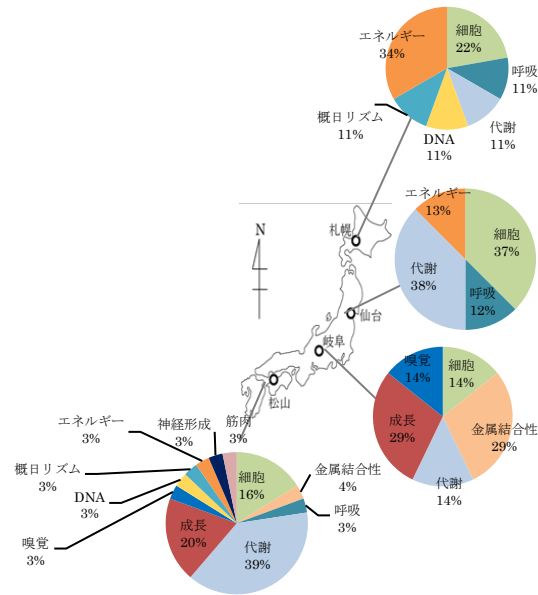


図 2 MIS で同定した地域特異的なタンパク質の機能

4. 謝辞

本研究は，科学研究費補助金・特別研究員奨励費（13F03366）の資金援助を受けて行った。