

3-1-3 タンパク質を識る

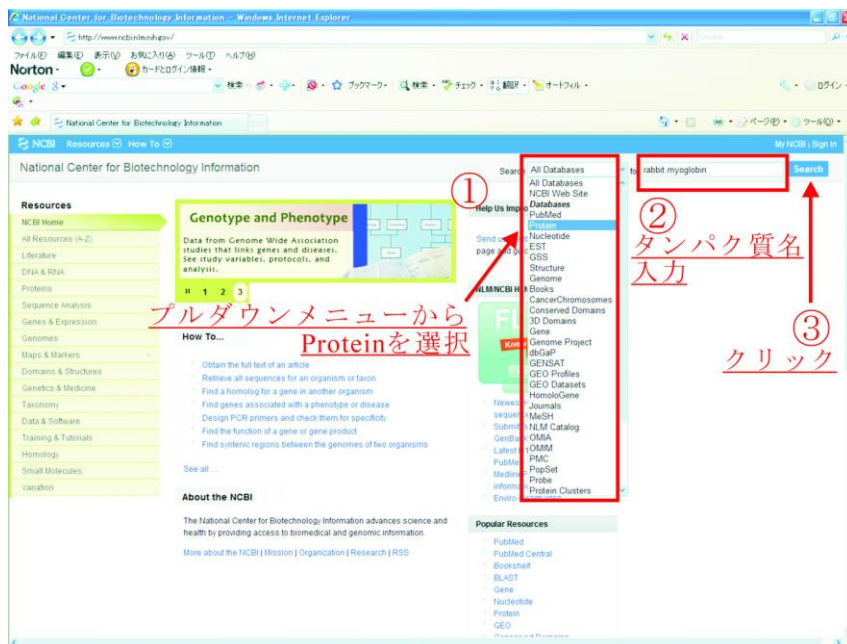
1. はじめに

タンパク質のアミノ酸配列（一次配列）情報は、ゲノム解析を含めた一連の研究成果により多くが判明しており、そのデータを Web サイトから自由に得ることが出来る。また、得られた配列を用いて、相同性検索や二次構造予測などへの活用が可能である。今回は、主に筋肉組織で酸素を貯蔵する役割を持つ「ウサギのミオグロビン」を例題とし、Web サイトからアミノ酸配列を取得し、フリーソフトを用いた簡単なパラメーター解析を解説したい。

2. タンパク質データベースの利用法

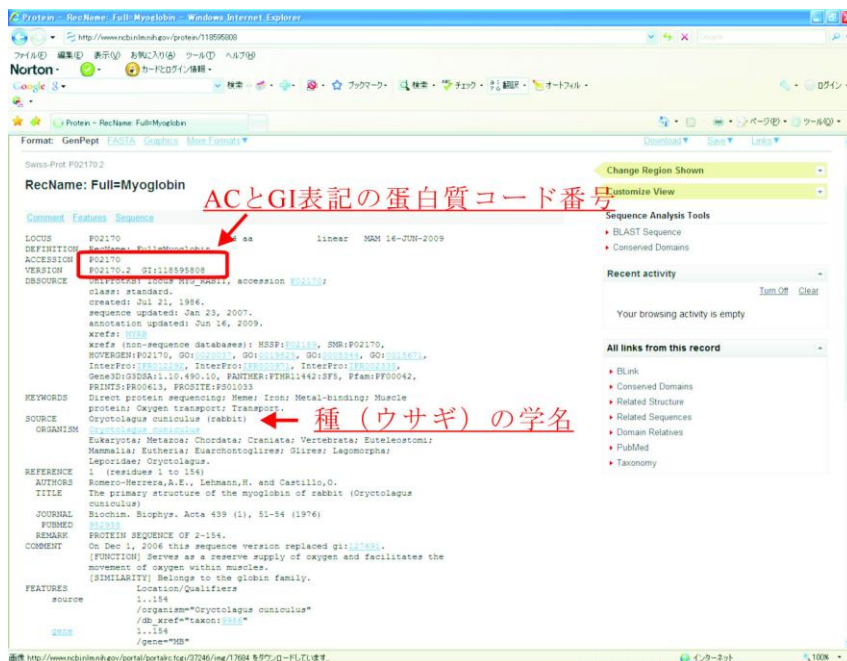
2.1 タンパク質一次配列の取得方法

インターネットに接続しているパソコンを利用して、NCBI のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) にアクセスする。下図①、プルダウンメニューから「protein」を選択する。ここで「gene」を選択すれば遺伝子配列も得ることが出来る。下図②に検索したいキーワード（タンパク質名）を入力する。今回は、例題としてウサギのミオグロビンを検索するので、「rabbit」と「myoglobin」の2文字を英語で入力する。下図③をクリックすると、検索が始まる。

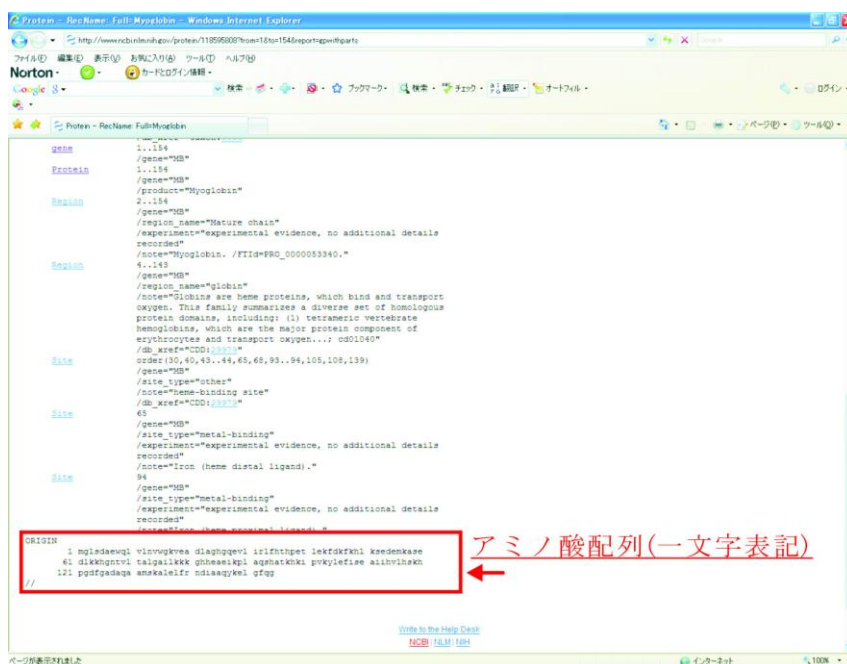


執筆者 生命科学科 教授 小島修一 (shuichi.kojima@gakushuin.ac.jp)
生命科学科 助教 津田岳夫 (takeo.tsuda@gakushuin.ac.jp)

検索結果を下に示す. 今回は, 結果が一つであったので, このように表示された. 検索結果が複数ある場合は, それらに通し番号が振られた一覧表として表示される. それらから得られる情報をもとに目的のタンパク質を探して, クリックすれば良い. あまりにも候補が多い場合は, 他のキーワード (略称なら正式名称の一部など) も加えて検索を絞り込むと良い. Accession ナンバー (AC または GI) は, 他のタンパク質解析ソフトにも利用できるもので, 書き控えることを進める.



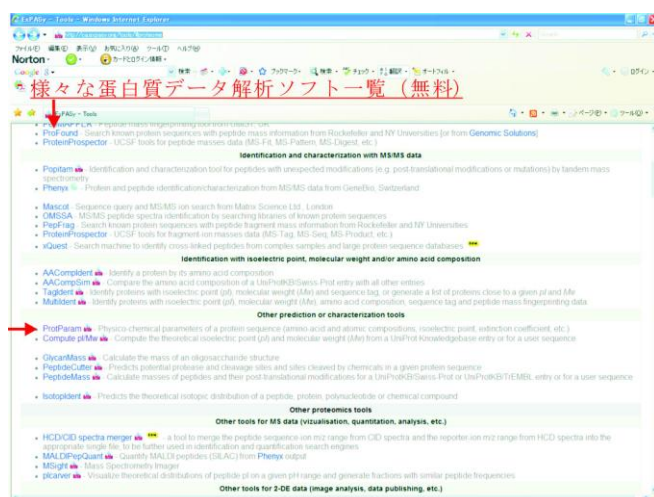
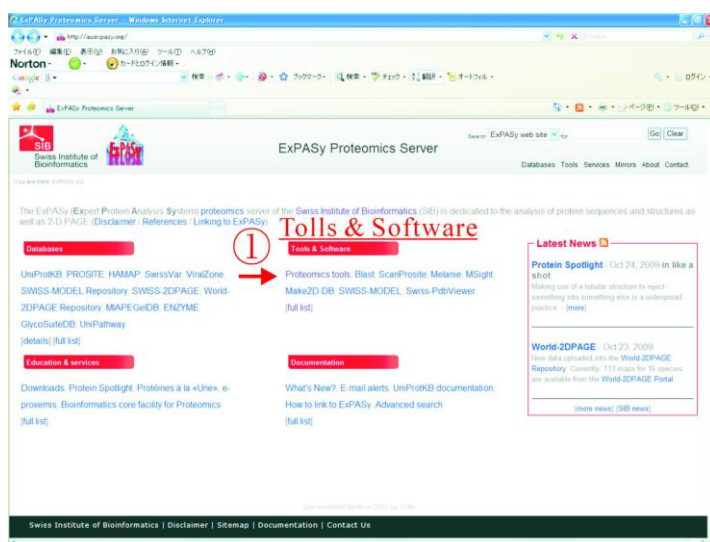
最下部までスクロールすると, アミノ酸配列を表示できる.



2. 2 タンパク質の解析ソフト集

ExpASY (Expert Protein Analysis System) <http://ca.expasy.org/> の Web サイトには、タンパク質の一次配列を基に解析を行える様々なソフトが公開されている。Tools & Software をクリックすると、ソフトの一覧が表示される。相同配列を検索する BLAST (ブラストと呼ばれる: Basic Local Alignment Search Tool), 予想される二次構造を計算するソフト, そして実際の質量分析 (MS) や 2次元電気泳動の解析結果からタンパク質を推定するツールなどがある。

その中で、筆者らは大腸菌発現系で作製した組換えタンパク質の分子量や等電点などを計算する ProParam と呼ばれる便利なソフトを利用しているので、次の章で使い方を紹介したい。



2. 3 タンパク質のパラメーターの算出方法

ProParam <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html> は、その名が示すとおりタンパク質のパラメーターを計算するソフトである。

下に入力画面を示した。タンパク質の配列情報を入力するだけであるが、その方法には二通りある。ひとつは、①に AC あるいは GI 番号を入力する。もうひとつは、②にアミノ酸配列を一文字あるいは三文字表記（小文字も可）で貼り付ける。前者の場合だと打ち込みの間違いがないので良いが、アフィニティータグを付加またはドメインのみを発現した様な、配列を加工した組換えタンパク質の場合は後者を利用せざるを得ない。下に示したのは、先ほど取得したウサギのミオグロビンの AC 番号（P02170）を入力した。注意すべき点としては、AC 番号の P の次の文字は数字の「ゼロ」であり、アルファベットの「オー」と間違えないようにする。情報を入力後に、③をクリックすると結果がすぐに表示される（次のページに示した）。ただし、①に入力した場合は、次に選択されたタンパク質を確認する画面が現れるので、正しければ最下部のボタンをクリックする必要がある。

ExPASy - ProtParam tool - Windows Internet Explorer

http://ca.expasy.org/tools/protparam.html

Swiss Institute of Bioinformatics

ExPASy Proteomics Server

ProtParam tool

ProtParam (References | Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in Swiss-Prot or TrEMBL or for a user entered sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY). (Disclaimer)

Please note that you may only fill out one of the following fields at a time:

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example P05130) or a sequence identifier (ID) (for example KPC1_DROME)
P02170

Or you can paste your own sequence in the box below.

RESET Compute parameters

① ACかGI番号を入力

または、
② アミノ酸配列をコピーペースト
(1文字、3文字可)

③ クリック

注意！①で入力すると、
もう一度、確認画面がでる

Swiss Institute of Bioinformatics | Disclaimer | Sitemap | Documentation | Contact Us

各パラメーターの計算結果は、下に示すように表示される。

ProtParam
MYG_RABIT (P02170)

← 蛋白質の名前 (コード番号で入力した場合のみ)

Number of amino acids: 154 ← アミノ酸残基数

Molecular weight: 17220.7 ← 分子量

Theoretical pI: 6.63 ← 理論上の pI値 (等電点)

Amino acid composition: CSV format

Residue	Count	Percentage
Arg (R)	2	1.3%
Asn (N)	3	1.9%
Asp (D)	8	5.2%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	3.9%
Glu (E)	14	9.2%
Gly (G)	11	7.1%
His (H)	12	7.8%
Ile (I)	8	5.2%
Leu (L)	18	11.7%
Lys (K)	18	11.7%
Met (M)	3	1.9%
Phe (F)	7	4.5%

← 各アミノ酸の数と割合

下にスクロールすると、280nm の分子吸光係数が計算されており、これを用いて分光学的にタンパク質濃度を算出できる。Cys が 2 残基以上あると、ジスルフィド結合が有無の 2 通りの値が出る。ちなみに、例題として用いたミオグロビンはヘム鉄を含むため、単純に 280 nm の吸収から濃度を見積もれないことを触れておく。

Atomic composition:

Carbon C	779
Hydrogen H	1223
Nitrogen N	213
Oxygen O	222
Sulfur S	3

← 各原子数

Formula: C₇₇₉H₁₂₂₃N₂₁₃O₂₂₂S₃
Total number of atoms: 2440 ← 総原子数

Extinction coefficients:

Ext. coefficient 13980 ← 分子吸光係数(280nm) 見積もり方
The 0.1% (w/v) 0.812, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is N (Met).
The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:
The instability index (II) is computed to be 17.02
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 90.06
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.354

Tyr: 1490
Trp: 5500
Cystine: 125 (S-S結合)