

総タンパク質の定量法

鈴木 祥夫

この度、2018年の入門講座として「タンパク質と核酸・遺伝子をはかる」を企画いたしました。

タンパク質と核酸・遺伝子は、言うまでもなく生体の重要な構成成分であり、分析化学における主要なターゲットの一つです。その分析結果は薬学、医学、農学、工学など広範な分野に応用されてきました。タンパク質、核酸・遺伝子の分析は、古くはペーパークロマトグラフィー等の手法を用いて行われてきましたが、昨今の分析機器の進歩に伴い、様々な分析方法が開発・応用されてきています。また、従前から行われている電気泳動等の分析法においても、関連機器の進歩にはめざましいものがあります。

そこで、本入門講座では、学生あるいは分析の初心者はもちろんのこと、他分野（専門外）の分析研究者が、タンパク質および核酸・遺伝子の分析法について、改めて学ぶ機会を設けたいと考えた次第です。本企画が、多くの読者の参考になれば幸いです。〔「ぶんせき」編集委員会〕

1 はじめに

総タンパク質の検出と定量は、クロマトグラフィーによるタンパク質精製、電気泳動、免疫検出などの多岐にわたるタンパク質の分析において必要不可欠であり、これまでに、総タンパク質の定量の必要性に応じて、多種多様な分析方法が開発されてきた。しかし、すべてのタンパク質をあらゆる組成の溶液中で定量できる手法は、現在のところ皆無である。その理由として、1) タンパク質ごとにその化学的構造が異なること、2) タンパク質が溶解している溶液中には、実験の目的に応じて界面活性剤、還元剤、変性剤などの共存物質が含まれており、これらの共存物質が定量分析に影響を与えること、が挙げられる。このため、複数の総タンパク質の定量方法の中から、その原理と特徴を知り、実験の目的に応じて選択する必要がある。ここでは、溶液中の総タンパク質を吸光光度法および蛍光光度法を用いて定量する方法と、ゲル電気泳動を用いてタンパク質を定量する際に必要な染色色素の特性について述べる。

2 溶液中の総タンパク質定量分析に必要な装置

紫外可視分光光度計または分光蛍光光度計を用いて測定する。サンプルは、分光光度計用のセル（光路長は10 mm）に入れる。多検体のサンプルを短時間で測定する場合、マイクロタイタープレートを利用して測定したほうが便利である。この場合、専用のプレートリーダーが必要である。また、極微量サンプルの測定を行う場合、一例として1 μ Lのサンプルを希釈することなく直接測定可能な超微量分光光度計を用いることができる。

3 吸光光度法

吸光光度法を用いて総タンパク質を定量する場合、大きく分けて以下の三つの方法に分類される。

- ① タンパク質自体の紫外光の吸収を利用した方法
- ② タンパク質と発色色素の化学結合を利用した方法
- ③ タンパク質存在下で生じるCu(I) イオンのキレート錯体を利用した方法

以下に各方法について詳述する。

3・1 紫外吸光光度法

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンは、ベンゼン環などの芳香族基を持つアミノ酸のため、280 nm 付近の紫外光を吸収する性質を持つ（図1）。この性質を利用して、280 nm におけるタンパク質の吸光度を測定することによってタンパク質濃度を定量するという方法である。タンパク質の種類によって、タンパク質中のチロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンの含量が異なるため、タンパク質間で280 nm における吸光度の値は変動する。しかし、様々なタンパク質を含んだ粗タンパク質溶液の場合、1 cm の光路長の光学セルを用いて測定した時の吸光度が1のとき、その溶液中のタンパク質濃度はおおむね1 mg/mLとなる。そこで、1 mg/mLのタンパク質濃度の時の吸光度を1として概算し、280 nm における吸光度を測定することによって、試料溶液中のタンパク質濃度を見積もることができる。

この方法の欠点の一つとして、上記芳香族アミノ酸と