N-27

膜マイクロドメイン画分からの複合糖質の構造解析法の確立

Detergent removal from glycoconjugates in detergent-resistant membrane microdomain fraction

○勝田沙織 1)、鈴木佑典 2) 、樺山一哉 3) 、岩田祐仁 1) 、上宮　悠 4) 、櫛泰典 2)

○Saori Katsuda1), Yusuke Suzuki1), Kazuya Kabayama2), Yujin Iwata1), Yu Kamimiya1), and Yasunori Kushi1)

Abstract: Various kinds of detergents have been used in biochemical experiments. Non-ionic detergents, such as Triton X-100, NP-40 or Briji 58/97, have commonly been used for the extraction of membrane microdomain from cells. In the membrane microdomain, glycoproteins and glycolipids play important roles in the crucial cellular processes, including proliferation, migration, apoptosis, and fluid environment. To elucidate their functions, detergent removal is essential because the residual detergents often complicate further biochemical analysis, especially mass spectrometric analysis. We previously established 1,2-dichloroethane (DCE) extraction method for detergent removal from glycolipids. The DCE extraction effectively removed interference of non-ionic, zwitterionic, or ionic detergents in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight quadrupole ion trap mass spectrometry (MALDI-QIT-TOF MS) analysis. In this study, we applied the established DCE method to the detergent removal from glycoprotein.

1. 目的

細胞膜に埋め込まれている糖脂質の脂質部分はスフィンゴミエリン、コレステロール等と疎水性相互作用に基づいて互いに会合し、生体膜を構成する脂質分子の不均一性を生み出し、微小領域(膜マイクロドメイン/脂質ラフト)の形成に重要な役割を果たしていると考えられている[1,2]。この糖脂質に富んだ膜マイクロドメインには、様々な受容体、Src ファミリーキナーゼや p38MAPK 等の細胞内情報伝達分子が含まれており、様々な情報伝達、免疫応答、及び特異的部位への膜輸送調節等、膜マイクロドメインを介した細胞内外を繋ぐ生命現象の制御に関与していることが明らかになりつつある[3]。さらに近年、2 型糖尿病やアルツハイマー病等において、膜マイクロドメインの機能異常が疾患を惹起している可能性が示唆されつつある[4, 5]。この膜マイクロドメインは、非イオン性界面活性剤存在下、ショ糖密度勾配超遠心により生化学的に分離されることが多いが、その後の詳細な分子の構造解析には界面活性剤の除去が必須であるものの、簡便な操作で完全に界面活性剤を除去できる方法は報告されていない。我々はこの問題を解決するため、新たな界面活性剤除去法の確立を目的とし、研究を開始した。

2. 方法

3T3-L1 脂肪前駆細胞培養条件

3T3-L1 脂肪前駆細胞は 10% BSA を含む DMEM 培養液中、80%コンフルエントで培養した。

RNase B 由来糖ペプチド作製

RNase B (500 μg)を還元アルキル化及びトリプシン消化後、Sepharose CL4B により糖ペプチドを精製した。

1, 2-ジクロロエタン抽出

複合糖質－Triton X-100 混合溶液を作製し、ガラスチューブ内に乾固した後、1,2-ジクロロエタンにより界面活性剤を抽出した。

1: 日大理工・学部・応化　2: 日大理工・教員・応化　3: 東海大学糖鎖科学研究所　4: 日大理工・院(後)・応化

MALDI-TOF MS スペクトル測定条件

マススペクトル測定はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI- TOF)質量分析計(Voyager RP-Pro, ABI) を用いて行った。マトリックスは、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)の水溶液(10 mg/mL)を用い、ポジティブイオンモードにて測定を行った。

3．結果・考察

これまで、ショ糖密度勾配により分画した膜マイクロドメインに含まれる非イオン性界面活性剤の影響により、その後の各種分析機器による糖脂質の構造解析が困難であるという問題があったが、我々は 1, 2-ジクロロエタン(DCE)抽出法を確立し、簡便且つ迅速に界面活性剤の完全な除去が可能であることを確認した(Fig. 1)。 本研究では、確立した DCE 抽出法が糖ペプチドの精製に応用可能であるかの検討を行った。その結果、RNase B 由来糖ペプチドからの Triton X-100 の除去においても、有用な方法であることが解った(Fig. 2)。しかし、本法による糖鎖及び糖脂質の希釈倍列の回収率を確認した結果と同様に、糖ペプチドの濃度が希薄な場合(150 pmol 以下)では、回収率が著しく減少することが確認された(Fig. 2)。この問題を改善するため、現在、ガラス表面をコーティングする条件を検討している。また、並行して、膜マイクロドメインに存在する複合糖質の自動微量分析システムの確立を検討している。さらに、膜マイクロドメインを介して生じている病態解明等に本法を応用し、関連する幅広い医療分野の発展に貢献するべく、分子生物学的アプローチからの検討も進めている。

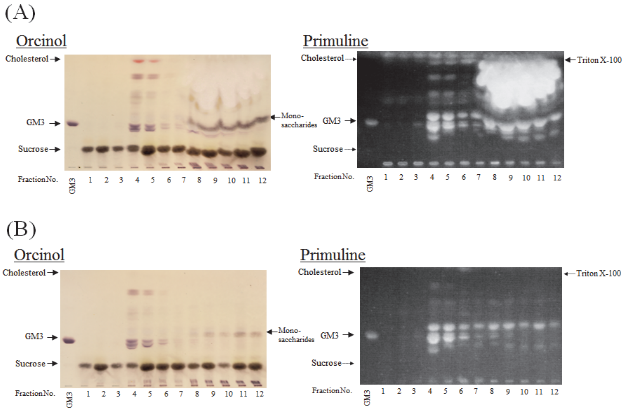

Fig.1. High performance thin-layer chromatographic (HPTLC) analyses of cholesterol, glycosphingolipids, and residual Triton X-100 in sucrose gradient fractions isolated from 3T3L-1 preadipocytes before (A) and after DCE extraction(B).

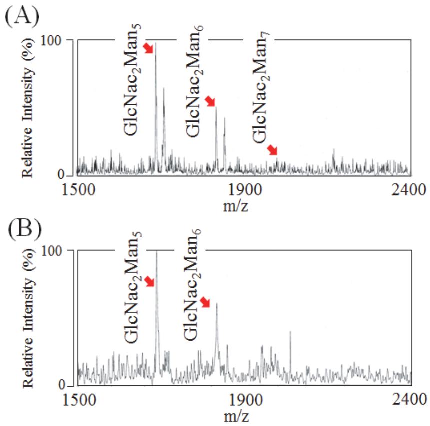

Fig.2. MALDI-TOF MS spectra of RNase B glycopeptide before (A) and after DCE extraction (B).

4．参考文献

[1]. Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. *Glycobiology* **8**, xi-xix (1998).

[2]. Simons, K. and Ikonen, E. Nature **387**, 569-572 (1997).

[3]. Simons, K. and Toomre, D. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).

[4]. Kabayama, K., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13678-13683 (2007).

[5]. Ohmi, Y., et al. *J Neurochem* **116**, 926-935 (2011).