

NVoy を使用した膜タンパク質の可溶化検討

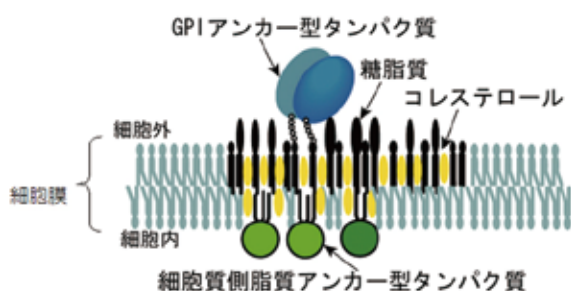
データご提供：東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻

准教授 林 宣宏先生、大学院生 大澤 剛氏

1. 概要

脂質ラフトの構成タンパク質を網羅的に同定するため、NVoy を使用したトリプシン消化の条件検討を行った。

▷ ラフトとは？

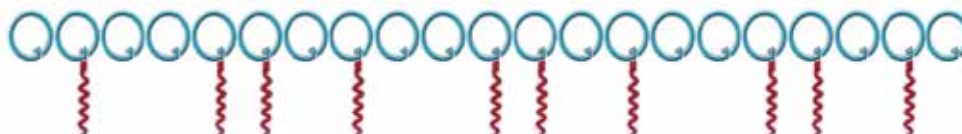


ラフト = 生体膜のマイクロドメイン

特徴

コレステロール・飽和脂肪酸（スフィンゴ脂質等）に富む。
細胞内輸送、免疫応答、軸策伸長、アポトーシスなど様々な生体内イベントに関わる。

▷ NVoy とは？



- 疎水性側鎖を有する炭化水素骨格
- Mw = 5kDa
- サンプルからの除去が容易 (kd = 28mM (GFP) & 12mM (Hexokinase))
- 非荷電、UV 透過性、pH2-11 安定
- 実験操作に影響しません。

タンパク質の疎水部位に結合し、タンパク質立体構造、活性を残したまま凝集を抑制。
膜タンパク質の可溶化が可能。

2. 方法

使用した細胞：ヒト T 細胞由来の細胞株である Jurkat 細胞

ラフトの精製：細胞密度約 3x10E6 cell/ml Jurkat 細胞を 50ml 分回収し、界面活性剤 (Brij 98) で溶解した。
ホモジナイズのあと、シヨ糖密度勾配 (40%-30%-5%) で超遠心 (37k rpm x 16hrs @ 4°C) した。

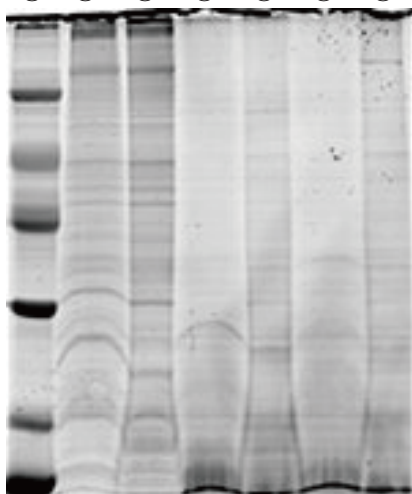
トリプシン消化：ラフトペレット 10ug を 100mM Ammonium bicarbonate ± NVoy で再溶解し、DTT 溶液を用いて還元、IAA 溶液を用いてアルキル化したのち、トリプシン溶液で消化した。

3. 結果

(1) トリプシン消化に与える影響

NVoy 無添加 (⑤,⑦) において確認できる未消化のバンドが同条件の NVoy 添加 (④,⑦) では減少していることより、NVoy の添加によってトリプシン消化の効率が上昇することが示された。

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦



①	MW marker
②	0 min (NV+)
③	0 min (NV-)
④	60 min (NV+)
⑤	60 min (NV-)
⑥	18 hrs (NV+)
⑦	18 hrs (NV-)

(2) LC-MS によるタンパク質の同定数と種類に与える影響

NVoy 添加量はサンプル重量に対し、0(無添加), 1/100, 1/10, 1/2, 1, および 2 倍量で検討した。

NVoy を添加することで、タンパク質量の 1/10 倍量まで同定数が上昇し、それ以上添加すると同定数が減少することが示唆された。また NVoy の添加によって LC から溶出する際の前半部が抜けることが確認された。

また NVoy の添加によって同定数は減少しても膜局在のタンパク質の同定数はむしろ上昇し、全タンパク質のスペクトル数に占める膜局在タンパク質の総スペクトル数 (PSM) の割合は NVoy 添加によって上昇がみられた。

これにより、ラフト画分のショットガンプロテオミクスに適する NVoy 量はサンプル重量の 1/10 倍量 (w/w) であるとした。

Nvoyの添加量 (w/w)	同定数	膜局在タンパク質の 同定数	総PSM	膜局在タンパク質の 総PSM
Nvoy (-)	511	312	8544	7319
Nvoy (1/100倍)	517	303	8453	6849
Nvoy (1/10倍)	600	359	11283	10064
Nvoy (1/2倍)	589	346	11035	9905
Nvoy (1倍)	572	344	9797	8836
Nvoy (2倍)	372	210	4245	2956

同定された 600 種類のタンパク質の分子量分布

二次元電気泳動では同定が難しかった 100kDa 以上のタンパク質を多く同定することが出来ていた。

100kDa以上	57
100kDa未満30kDa以上	255
30kDa未満	288