

26Q-pm001

ヒト組織球性リンパ腫細胞に高発現する Poly lactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析

○田中 佑樹¹, 三ツ井 洋輔¹, 木下 充弘¹, 早川 堯夫², 掛樋 一晃¹(¹近畿大・薬,²近畿大・薬学総合研)

【目的】我々はヒト培養癌細胞表面の糖鎖を指標として癌細胞の個性解析を行う中で、ヒト組織球性リンパ腫細胞 (U937) にポリラクトサミン型糖鎖が豊富に存在することを明らかにした (Naka *et al.* J. Proteome Res. 2006)。本研究では U937 に発現するポリラクトサミン型糖鎖を持つタンパク質をプロテミクス手法と当研究室で開発した糖鎖解析手法を組み合わせ同定法を検討した。

【方法】膜タンパク質調製: U937 を 0.5 M sucrose を含むリン酸緩衝液中でホモジナイズし、得られた上清を 40000 g で 30 分間遠心分離し、得られた沈殿を膜タンパク質とした。膜タンパク質の分画: 膜タンパク質を DEAE-5PW を用い、NaCl の段階的濃度勾配により酸性・中性・塩基性タンパク質に分画した。タンパク質同定: 各タンパク質分画を SDS-PAGE 並びに 2D-PAGE 後、それぞれレクチン染色を行い、ポリラクトサミン型糖鎖を有するタンパク質を ESI-IT-TOF MS を用いて解析した。また、標的タンパク質中の N 結合型糖鎖をキャピラリー電気泳動及び順相 HPLC を用いて分析した。

【結果・考察】陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画したタンパク質分画を SDS-PAGE、2D-PAGE 及びレクチンプロットングにより解析したところ、ポリラクトサミン型糖鎖は中性および酸性領域に等電点を持つ 75 kDa 以上のタンパク質に豊富に存在することが分かった。さらに、レクチンプロットの結果からポリラクトサミン型糖鎖を有すると考えられるタンパク質スポットについてペプチドマスマフィンガープリンティングを行った結果、幾つかの候補タンパク質を同定した。糖鎖を発現するタンパク質を同定する過程で、遭遇した感度上の問題などについても述べる。