

架橋試薬を用いたガレクチンリガンドの分離

○庄司 麻衣子¹, 田村 真由美¹, 武内 智春¹, 笠井 猷一², 荒田 洋一郎¹(¹城西大薬, ²帝京大薬)

【目的】ガレクチンは β -ガラクトシド構造を含む糖鎖を認識し、細胞表面の多様な複合糖質と相互作用することで様々な生命現象に関与する。ガレクチンと糖鎖との結合は比較的弱く、ガレクチンのリガンド糖タンパク質の単離・同定は困難を伴う場合が多い。そのため、ガレクチンの働きの分子メカニズムには未解明な部分が多く残されている。我々はこれまでに、架橋試薬 BPM (benzophenone-4-maleimide) を用いて、ガレクチンとモデル糖タンパク質リガンドを安定な共有結合で架橋する手法を構築した。この手法を発展させることで、生体内においてガレクチンと弱い(速い)相互作用をするリガンド糖タンパク質を効率的に単離・同定できると考えられる。BPM を用いた内在性ガレクチンリガンド糖タンパク質同定の系の確立のためには、生体内に多数存在すると推測されるガレクチンリガンドとガレクチンとの様々な架橋産物を分離する必要がある。そこで本研究では、2次元電気泳動を用い、複数の架橋産物を分離する手法の構築を試みた。

【方法】線虫ガレクチン LEC-1 の Glu³⁸ を Cys に置換した LEC-1 Q38C とモデルリガンド糖タンパク質アシアロフェツイン (ASF) を、BPM を用いて架橋した。まず LEC-1 の Cys 残基の-SH 基に BPM のマレイミド基を反応させ、さらに紫外線照射により BPM のベンゾフェノン基を反応させて ASF 中の炭素原子と共有結合を形成させた。架橋産物を2次元電気泳動にて分離し、ウエスタンブロット法にて検出した。

【結果・考察】2次元電気泳動による分離後、ウエスタンブロット法により架橋産物が LEC-1、ASF に対する抗体いずれによっても認識され、架橋していない LEC-1 や ASF とは明瞭に分離することができた。この手法は、生体内に複数存在すると予想されるガレクチンリガンドの網羅的な単離・同定、さらにはガレクチンの機能解明に貢献できると考えている。