

カイコ幼虫体液からの lipophorin 高純度精製法の確立

技術部 先端技術支援室 後藤 由佳子

はじめに

Lipophorin (リポホリン) は昆虫の体液中存在する主要なリポタンパク質である。リポタンパク質とは、脂質を含むタンパク質のことである。脂質は水に不溶であり、そのみで体液中を移動することはできない。そのため、タンパク質と結合し、脂質を必要とする組織・器官に輸送されている。ヒトでは善玉・悪玉コレステロールと呼ばれる血液中のタンパク質が同様の働きをしている。

1969年に茅野によって単離・精製されて以来、lipophorinの脂質輸送の役割は広く研究されてきた。Lipophorinの大きな特徴は、タンパク質部分の再利用が可能で、ホルモンの働きによりさらに大量に脂質を輸送することが挙げられる。また、最近になり、lipophorinは昆虫の免疫系にも関与しているという報告があり、新たな機能に注目が集められている。ところが、この議論の前提であるlipophorinの精製度の問題があるのではないかと私たちは考え、カイコの5齢幼虫を用いてlipophorinの精製法を見直した。

精製法について

タンパク質の精製には様々な方法がある。目的のタンパク質の性質によってそれらを組み合わせ、試行錯誤を繰り返して精製を行うことになる。前にも述べたように、lipophorinは脂質を多く含むリポタンパク質であり、他のタンパク質に比べて密度が低い。そのため、これまでは、lipophorinは密度勾配遠心法により1ステップで精製している。しかし、カイコ幼虫体液について、実際に密度勾配遠心法で得たlipophorin画分をSDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) により確認すると、まだ他のタンパク質が混入していることが分かった。また、混入しているタンパク質はlipophorinより小さなものが多いと予想された。そこで、大きさによって分けることのゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、図1(A)に示すようなプロファイルが得られた。このlipophorin標品はSDS-PAGEにより従来よりも高純度であることを確認した。

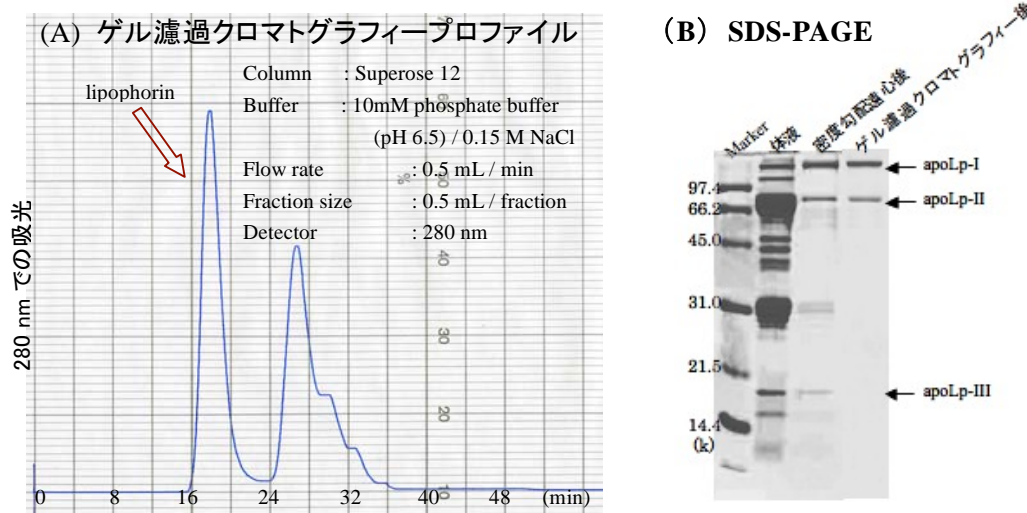


図 1: (A)ゲル濾過クロマトグラフィープロファイルと(B)精製したサンプルの SDS-PAGE

実際に行った実験について以下に詳しく述べる。

○採血法について

雌雄各 3 頭のカイコ (Kinsyu × Showa) 5 齢 6 日目の幼虫の腹肢に切れ目を入れ、緩衝液 (hemolymph buffer) へ体液を滴下、混合した。その後、体液中に含まれる血球を除くために 3,500 rpm で 5 分間遠心し、その上清を精製の出発材料とした。

○密度勾配遠心法による分画

血球を除いた体液 4.2 mL を等量の 44.3 % KBr 溶液に重層し、密度勾配遠心を行った。遠心条件は 62,000 rpm (336,800 × g)、15 時間とした。lipophorin にはカロテノイドが含まれるため、黄色いバンドとしておよそその位置が確認できる。遠心後上層から順に各 500 μL のフラクションに分画し、それぞれのフラクションについて、カロテノイドが吸収する 450 nm の吸光度 (A_{450}) と密度を測定したところ、lipophorin は密度が 1.07~1.12 g/cm³ の範囲で検出された。また、lipophorin を含むフラクションについて SDS-PAGE を行ったところ、lipophorin 以外にもいくつかのタンパク質が含まれていた。

○ゲル濾過クロマトグラフィー

そこで、lipophorin を多く含むフラクションを集めて 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) に対して透析を行い、その後濃縮したものを Superose 12 カラム (Amersham Bioscience) での FPLC によるゲル濾過クロマトグラフィーに供した。10mM phosphate buffer (pH 6.5) / 150 mM NaCl で流速 0.5 mL / min にて溶出したところ、およそ 18 min で lipophorin が溶出された。得られた lipophorin のフラクションについて、SDS-PAGE により高純度に精製されていることを確認した。

まとめ

これまで報告されている体液の密度勾配遠心法だけでは lipophorin の精製度が低いことが明らかになった。しかし、密度勾配遠心後にゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで、lipophorin 以外のタンパク質を容易に取り除くことが出来た。従来よりも精製された lipophorin を用いることで、lipophorin の機能について、今後より正確な実験が行えると期待できる。

終わりに

今年度は実験を通して生化学、特にタンパク質化学の実験技術を習得することを目的として、カイコ幼虫体液の lipophorin に関する実験を行ってきた。今回の発表の内容以外にも、塩析、Western blotting、アミノ酸シーケンス法、イオン交換クロマトグラフィー法、ネガティブ染色法などを学んだ。

尚、本実験について、2005 年 10 月に行われた日本動物学会第 76 回大会でポスターにて発表した。また、論文として投稿準備中である。