

## 超遠心機による G タンパク質と共役受容体の分離

### CP-WX シリーズ形超遠心機 / P40ST 形スイングロータ

G タンパク質共役型受容体 G protein-coupled receptor (GPCR)は主に細胞膜に存在し、細胞外の光や匂い、神経伝達物質、ホルモンといった多様な情報を受容して、その信号を G タンパク質を介して細胞内に伝える働きをします。そして GPCR とその関連タンパク質は多くの疾患に関与することが知られており、創薬研究のターゲットとして重要な位置を占めています。また、過去に2度もノーベル賞に関連し(1994年ノーベル生理学医学賞、2012年ノーベル化学賞)、世界で最も注目されているタンパク質のひとつでもあります。

ここでは、脂質ラフト画分に含まれる G タンパク質の分離例を紹介します。脂質ラフトは界面活性剤に対して耐性があるため、界面活性剤で可溶化しシヨ糖密度勾配液を用いた遠心法で密度の違いにより、他の膜画分とは異なる画分として分離することができます。<sup>\*1,2</sup>

#### 内容

##### 1. サンプル

初代培養ラット小脳顆粒細胞

##### 2. サンプルの調製

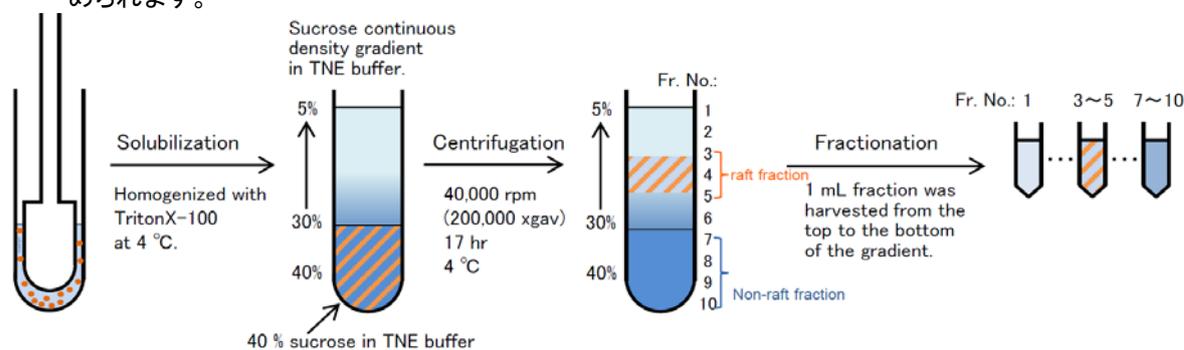
初代培養ラット小脳顆粒細胞を 1% (w/v) TritonX-100 を含む TNE buffer 2 mL に懸濁し、ホモジナイズします。このサンプル調製液に 80% (w/v) シヨ糖を含む TNE buffer を等量 (2 mL) 加え、よくピペティングし、サンプルとしました。

##### 3. 装置・遠心条件

遠心機: 超遠心機(日立 CP-WX series)  
 ロータ: P40ST 形スイングロータ(13 mL x 6 本)  
 遠心管: 13 PA チューブ  
 回転速度: 40,000 rpm (平均遠心加速度: 200,000 xg)  
 遠心時間: 17 時間  
 温度: 4°C  
 加速モード: 8(ややゆっくり加速)、減速モード: 8(ややゆっくり減速)  
 サンプル量: 4 mL  
 密度勾配液量: 6 mL (連続シヨ糖密度勾配液: 5~30% (w/v))  
 (密度勾配作成装置(DGF-U 形日立密度勾配フラクショネータ)を使用すると、連続シヨ糖密度勾配液が効率よく作成できます。)

##### 4. 操作

13PA チューブの底部にサンプルを 4 mL 入れ、その上に TNE buffer を含む連続シヨ糖密度勾配液 (5~30% (w/v)) を 6 mL 重層します。これを超遠心機 CP-WX series に P40ST スイングロータを用い、40,000 rpm (200,000 xg)、4°C、17 時間遠心します。分離終了後、密度勾配液の上部から 1 mL ずつ分画し、上部より Fr. No.: 1~10 としました。この時、G タンパク質を含む脂質ラフト画分 Detergent-Resistant Membrane (DRM) は Fr. No.: 3~5 に認められ、非ラフト画分は Fr. No.: 7~10 に認められます。<sup>\*1,2</sup>



## 5. 試薬

TNE buffer (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EGTA, pH7.5)

TNE buffer + 1% (w/v) Triton X-100

80% (w/v) sucrose in TNE buffer

30% (w/v) sucrose in TNE buffer

5% (w/v) sucrose in TNE buffer

## 6. 参考文献

1) Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Sanai Y, Kasahara K.: J Biol Chem. 282, (2007), 26392-26400.

2) Kasahara K, Watanabe Y, Yamamoto T, Sanai Y.: J Biol Chem. 272, (1997), 29947-29953.

## 装置



CP-WX シリーズ形超遠心機



P40ST 形スイングロータ



DGF-U 形日立密度勾配フラクショネータ

本資料に関するお問い合わせは日立工機(株)のホームページ  
(<http://www.hitachi-koki.co.jp/contact/>) からお願い致します。

【製造・販売・保守】

 日立工機株式会社

**URL** <http://www.hitachi-koki.co.jp/himac/>

首都圏地区 (甲信越を含む)	〒108-6020 東京都港区港南 2-15-1 (品川インターシティ A 棟)	03-5783-0614
北海道地区	〒004-0053 札幌市厚別区厚別中央三條 1-2-20	011-896-1748
東北地区	〒984-0002 仙台市若林区卸町東 3-3-36	022-288-0435
中部地区	〒451-0051 名古屋市西区則武新町 1-32-16	052-533-0522
関西地区 (中国・四国・京都を含む)	〒663-8243 西宮市津門大筒町 10-20	0798-23-4125
九州地区	〒813-0062 福岡市東区松島 4-8-5	092-622-4025