

薬学実習 4 衛生化学教室

10191043 鈴木健一

実習 1 ヒツジ赤血球膜からの膜脂質の単離

目的

ヒツジ赤血球膜から全脂質を抽出、同定し特定のリン脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン) を単離する。

方法

ヒツジ赤血球膜より全脂質の Bligh-Dyer 法による抽出

ヒツジ赤血球膜分画 8ml を 100ml の三角フラスコに移す。ついでメタノール 20ml、クロロホルム 10ml を、この順に加える。クロロホルム/メタノール/水の比は 1:2:0.8(v/v) であり均一になっている。30 分室温にてマグネチックスターラーで攪拌し抽出を行う。次に 10ml のクロロホルム、10ml のイオン交換水を加え 5 分間激しく攪拌する。この時点で、クロロホルム/メタノール/水の比は 1:1:0.9 になっており、2 層に分離する。これを遠沈管 2 本に移し、2,500rpm で 5 分間遠心する。遠心終了後、下層のみをパスツールピペットと安全ピペッターを用いて 100ml の三角フラスコに移す。このとき中間層を取らないように注意する。下層をひだ折り濾紙を用いて濾過し、エバポレーター用 50ml 丸底フラスコに取る。エバポレーターにて溶媒を除去する。このとき水浴の温度が 35℃ 以上にならないように注意する。ほとんど溶媒がなくなったら、0.1ml 未満ベンゼンを加え (1 滴で十分)、水を共沸させて除く。次に 5ml のクロロホルムにとかし、先細スクリリユーキャップチューブに保存する (過酸化を防止するためにまわりをアルミホイルで包む)。

薄層クロマトグラフィー (Thin Layer chromatography, TLC)

展開溶媒 (クロロホルム:メタノール:酢酸:水=60:30:10:5) を 50ml 程度作り、展開槽に充填しておく。三角フラスコにクロロホルム → メタノール → 酢酸 → 水の順番に加え、それぞれを加えた後によく攪拌して混ぜる。展開槽のなかに濾紙をたてて、槽中に溶媒の蒸気が飽和するようにする。なるべく早めにつくり、溶媒の蒸気を飽和させておく。展開中はできるだけふたを開けないようにする。

ヒツジ赤血球膜脂質 0.1ml およびホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM) の各標品 (5mM) をシリカゲルプレート (10×5cm) 2 枚にスポットする。ヒツジ赤血球膜脂質は 0.1ml を小試に計り取り、全量をスポットする。スポットがあまり大きく広がらないように少しずつ乾かしながら行う。標品は 2-3 回のスポットでよい。クロロホルム/メタノール/酢酸/水

(60:30:10:5) の溶媒系にて展開する。展開後、風乾し、1 枚はヨード、もう 1 枚はニンヒドリン発色を行い、各スポットの同定を行う。

薄層クロマトグラフィー

展開溶媒 (クロロホルム/メタノール/酢酸/水=60:30:10:5) を 50ml 程度作り、展開槽に充填する。展開槽のなかには濾紙をたてる。なるべく早めにつくり、30 分以上溶媒の蒸気を飽和させる。昨日得たヒツジ赤血球膜全脂質分画が入った先細スクリーキャップチューブをエバポレーターにかけ、溶媒を留去する (接続には白いコネクターを用いる)。クロロホルムを 0.5ml 加え良くボルテックスし、全量をシリカゲルプレート (10×10cm) に 5cm 幅でスポットする。スポットがあまり大きく広がらないように少しずつ乾かしながら行う。両端に PE と PS の標品を 2-3 回スポットし、展開する。展開後、風乾し、ヨード発色によりみられた PE と PS のスポットを鉛筆でマークする。

PE と PS のスポットのかき取り

アルミホイルを敷き、PE のスポット部分のシリカゲルをクロロホルムで良く洗浄したスパーテルを用いてかき取る。かき取ったシリカゲルは薬包紙に集め、5ml のメタノールが入った遠沈管 (50ml) に入れる。PE と同様に PS もかき取り、PE とは別の遠沈管に回収する。

シリカゲルからの PE、PS の Bligh-Dyer 法による抽出

5ml のメタノールとシリカゲルが入った遠沈管にクロロホルム 2.5ml とイオン交換水 2ml を加え 5 分間ボルテックスする。次にクロロホルム 2.5ml とイオン交換水 2.5ml を追加し、5 分間ボルテックスする。2,500rpm で 5 分間遠心後、下層のみをパスツールピペットと安全ピペッターを用いて 50ml の三角フラスコに移す。このとき中間層を取らないように注意する。下層をひだ折り濾紙を用いて濾過し、エバポレーター用 50ml 丸底フラスコに取る (ひだ折り濾紙の上からクロロホルム 10ml を加え、洗いこむ)。エバポレーターにて溶媒を除去し、ほとんど溶媒がなくなったら、ベンゼンを加え (1 滴で十分)、水を共沸させて除く。5ml のクロロホルムにとかした後、小試に移し、サランラップをまいたゴム栓をはめて保存する (過酸化を防止するために小試のまわりをアルミホイルで包む)。

PS、PE 画分のリン脂質量の定量

PS, PE 画分と PS および PE の標準リン脂質溶液 (0.1mM) を下表のようにクロロホルムで希釈した溶液を作り、塩化鉄-チオシアン酸アンモニウム溶液 (鉄チオシアン酸試薬) を 0.5ml ずつ加える。1 分間よく攪拌 (ボルテックス) したあと、遠心機でスピンドアウンする。クロロホルム層 (下層) をパスツールピペットで抽出し、488nm の吸光度を測定する。標準リン脂質溶液から検量線を作製し、PS、PE 画分のリン脂質量を定量する。

結果

TLC

ニンヒドリン発色では PS と PE のスポットが現れた。

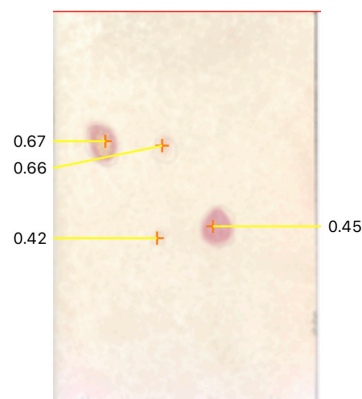


図1 ニンヒドリン発色

ヨード発色ではそれに加えて SM のスポットも見られた。

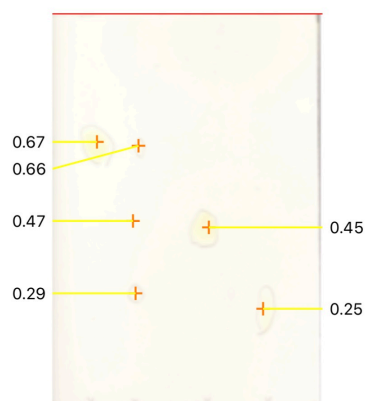
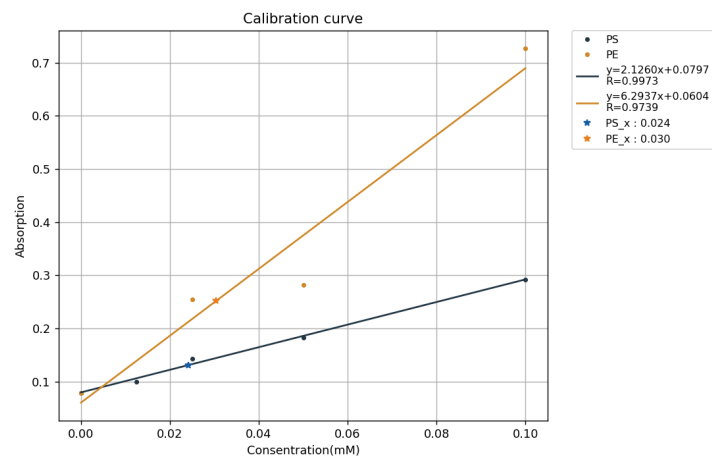


図2 ヨード発色

翌日は赤血球膜全脂質分画について TLC を行 PS と PE の画分をそれぞれ取り出した。その後標準液の濃度をもとに検量線を求め、それぞれの分画に含まれる PE,PS の濃度と物質量を求めた。



検量線より PS の濃度は 0.0483mM、PE は 0.1015mM と求められ、これをもとに Tube B に 0.23ml、Tube D に 0.47ml の PE を分注した。

考察

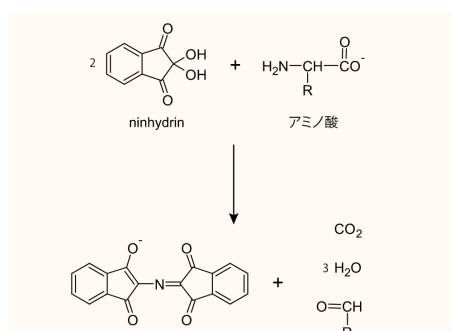
我々の TLC では見られなかったが、ヨード発色では PE のスポットよりもさらに上にコレステロールのスポットが見られるらしい。また、検量線を作る際に用いた PE 標準液の Tube 8 が操作中に一部失われてしまったため、PE の検量線が必ずしも正確であるとは言い切れない。

課題

ヨード発色とニンヒドリン発色の原理

- ニンヒドリン発色

ニンヒドリンがアミノ酸やタンパク質が持つアミノ基と以下のように反応することで青紫～赤紫色に呈色する。



- ヨード発色ヨウ素がヨウ素昇華することで有機化合物に物理的に吸着することで呈色される。特に不飽和結合と相互作用しやすく有機化合物全般に対応している。呈色後の TLC を放置するとヨウ素が抜けていくので、素早く印をつけておく必要がある。

実習 2 LysoPS によるマスト細胞の活性化

目的

マウスからマスト細胞を抽出し立つ顆粒反応によってヒスタミンの定量を行う。

方法

PLA2 反応

前日に調製した A,B のスクリーキャップチューブをエバポレーターにかけ、クロロホルムを完全に留去する (接続には白いネクターを用いる)。A,B のチューブに 750 μ l 反応バッファー (0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.1M CaCl₂) を入れ、蓋をしたあと、ソニケーターで超音波処理する (1 分前後、超音波処理の掛かり具合に注意する)。ピペットマンで A,B のチューブに PLA2 溶液 50unit (約 10 μ l) を加える (スタッフが行なう)。さらにミリ Q240 vi を加え、蓋をして軽くボルテックスし、37 °C で振りながら 1 時間インキュベートする。待ち時間に展開溶媒 (クロロホルム/メタノール/酢酸/水=50:30:8:4) 50ml を作り、展開槽に充填しておく。展開槽の内側にはろ紙を入れる。

反応液からの脂質抽出

インキュベーション後、メスピペットで A,B のチューブにメタノール 2ml, クロロホルム 1ml を入れてボルテックスする。さらに、3N 塩酸 900 μ l, クロロホルム 1ml を加えて 5 分間ボルテックスする。蓋を外し 2500rpm 室温で 5 分間遠心した後、パスツールピペットを用いて下層を丁寧にとり (安全ピペッターを用い、界面を乱さないように注意する)、新しいスクリーキャップチューブに回収する。残った上層にクロロホルム 1ml を入れて、5 分間ボルテックスし、蓋を外し 2500rpm 室温で 5 分間遠心する。下層を抽出し、1 回目の下層を回収したチューブに回収する。下層を集めたチューブをエバポレーターにかけ、溶媒を留去したあと、パスツールピペット、ベンゼンを 1 滴入れて、再びエバポレーターにかける。溶媒を再び留去した後、メスピペットでメタノールとクロロホルムを 100 μ l ずつ入れ、30 秒ボルテックスする。

TLC による反応の確認

C,D のチューブの溶媒を除去し、メスピペットでメタノールとクロロホルムを 100 μ l ずつ入れ、30 秒ボルテックスする。A,B のチューブから 40 μ l をキャピラリーでとり、TLC プレート (5cmx10cm) に実習書にあるようにスポットする (キャピラリーで 20 μ l のラインまでとる。それを 2 回繰り返す)。同様に C,D のチューブから、80 μ l をキャピラリーでとり、TLC プレートにスポットする (量が多いので、ドライヤー (冷風) を当てながらスポットする)。リゾ PS, リゾ PE の標品もスポットし (10 μ l)、乾燥させた後、展開槽につけて展開し、ニンヒドリン発色する。リゾ PS, リゾ PE の生成を確認したら、4 本すべてのスクリーキャップチューブの溶媒を除去し、班名、内容物を明記し提出する。

ラット腹腔マスト細胞の調製

Wistar 系雄ラットをイソフルラン麻酔下で頸動脈切断により脱血死させる (大学院生が行う)。腹部の毛を濡らした後、皮膚を切開し、腹筋を露出させる (デモを見て下さい)。約 10ml の氷冷バッファー (0.01%BSA-HBT) を腹腔に注射器で注入する (このとき、胃や腸または腹筋内に打ち込まないように注意する。デモを見て下さい)。腹部を約 2 分間ツサージする。マッサージは、ラットを仰向けに寝かせ、両脇腹に指を当てて軽く揉むように行い、腹腔内のバッファーがよく攪拌されるようにする。あまり強いと肝臓が破れて出血するので注意する。腹筋表面についた毛を除き、腹筋中央部を縦に切開し (この時バッファーが外に漏れないように注意)、ピペットで腹腔内のバッファーを氷上の 15ml tube に回収する。15ml tube を、1,000rpm で 5 分間遠心し、上清をデカントで捨てる。残った細胞に、新たに氷冷バッファー 2ml を加えてピペットマンでサスペンドし、均一になるまでほぐす (あまり激しいと細胞が痛む。また、泡を立てないように注意)

ピペットマンで 50 μ l はかり取り、1.5ml tube に入れる。1.5ml tube にとった細胞懸濁液 50 μ l にトルイジンカレー染色液 50 を加えてサスペンドし、5 分放置する。血球計算盤を用いて顕微鏡下で観察し、マスト細胞の個数を数える (マスト細胞は数分で紫色に染まる)。15ml tubeに残っている細胞懸濁液に、8ml のバッファーを加え、再び 1,000rpm 5 分間遠心する (遠心機待ちをする場合、氷上においておくこと)。上清をデカンテーションで捨て、1ml 中にマスト細胞が 2×10^5 個存在するよう氷冷バッファーを加えてピペットマンでサスペンドする。氷上においておく。

脂質調製

スクリーキャップチューブ中で乾固した A:PS/PLA2 反応後、B:PE/PLA2, 反応後に 600 μ l、C:PS、D:PE に 200 μ l、バッファー (0.01 蓋をして、ソニケーターで約 1 分間超音波処理し、ボルテックスして脂質懸濁液を調製する。1.5ml エッペンドルフチューブに脂質懸濁液の 1/10 希釈液を 1ml 作る (脂質懸濁液 100 μ l、バッファー 900 μ l。できた 1/10 希釈液を A1、B1、C1、D1、とする。新しい 1.5ml エッペンドルフチューブを用意し A2、B2 の 1/10 希釈液を 1ml 作る (1/50 希釈液 100 μ l+ バッファー 900 μ l。できた、1/500 希釈液を A3、B3 とする。

以上の操作で A1:PS/PLA2 反応後 1/10 希釈液、A2:PS/PLA2 反応 1/50 希釈液、A3:PS/PLA2 反応後 1/500 希釈液、B1:PE/PLA2 反応後 1/10 希釈液、B2:PE/PLA2 反応後 1/50 希釈液、B3:PE/PLA2 反応後 1/500 希釈液、C1:PS 1/10 希釈液、D1:PE 1/10 希釈液がエッペンドルフチューブにできる。また、4 μ M リゾ PS 溶液を 1/10 希釈する。これらを次の実験に用いる。

脱顆粒反応

2ml チューブ (底が丸い) に、氷上で表 5 の通り試薬を入れる。水浴に入れる直前に No.1 13 にマスト細胞懸濁液を 50 μ l ずつ加える。(マスト細胞は加える直前に転倒混和して均一にすること) チューブホルダーに No.1 14 をセットし、37℃の水浴に入れ、15 分間インキュベーション後、ホルダーごと氷上に回収し、素早くそれぞれのチューブに氷冷したバッファー (0.01 遠心機まで氷上で運び、No.1 12 を冷却遠心機にセットし 3000rpm、4℃で 5 分間遠心する。(遠心機待ちの場合は氷上のまま待機)。No.13,14 は遠心せず氷上に置いておく。

ヒスタミンの定量

No.1 12 については、ピペットマンのチップを液面近くに保ちながら (なるべく細胞をとらないように) 上清を 700 μ l ずつ取り、新しい 1.5ml チューブに移す。No.13,14 はしつかりサスペンド (ピペッティング) してから 700 μ l 取り、新しい 1.5ml チューブに移す。各チューブに 1N HCl 50 μ l を加えて、ボルテックスし、さらに 1N NaOH 250 μ l を加えて、ボルテックスする。o-Phthaldialdehyde(OPA)50 μ l を加えて、ボルテックスした後、正確に 4 分間、室温に静置する (表 6 のタイムコースを参照)。3N HCl 100 μ l を加えて、ボルテックスし、15000rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心する。ピペットマンのチップを液面近くに保ちながら遠心後の上清を 1ml ずつ取り、新しい 1.5ml エッペンドルフチューブに移す。200 μ l を 96 well plate に移し、プレートリーダーで蛍光を測定する (励起波長:360nm、測定波長:450nm) No.14 をバックグラウンド、No.13 の蛍光値をマスト細胞中の全てのヒスタミンによる蛍光と考え、各サンプルではマスト細胞中のヒスタミンのうち何 % が放出されたか算出し、棒グラフを作成する。

結果

血球計算盤を用いて顕微鏡で染色されたマスト細胞の数を数えたところ 173 個であった。したがって、1ml あたりのマスト細胞の個数は 8.65×10^5 cells/ml となった。

ヒスタミンの定量の結果は以下のグラフのようになった。

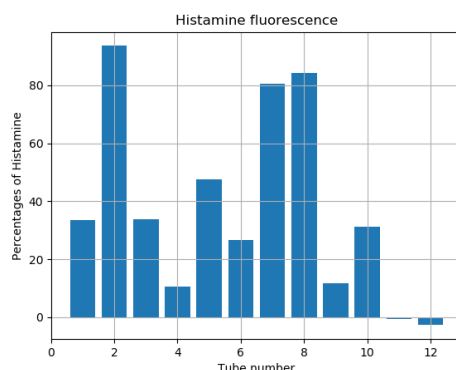


図3 ヒスタミンの定量

考察

LysoPS については濃度の比例して蛍光度が観測されたことから正しく定量が行われたと考えられる。一方 LysoPE については濃度と蛍光度に相関がない上に割合が大きすぎることから、マスト細胞が混入していたことが想定される。また、標品の LysoPS の反応が悪かった。

課題

生体膜脂質のオルガネラにおける偏在性について調べよ。

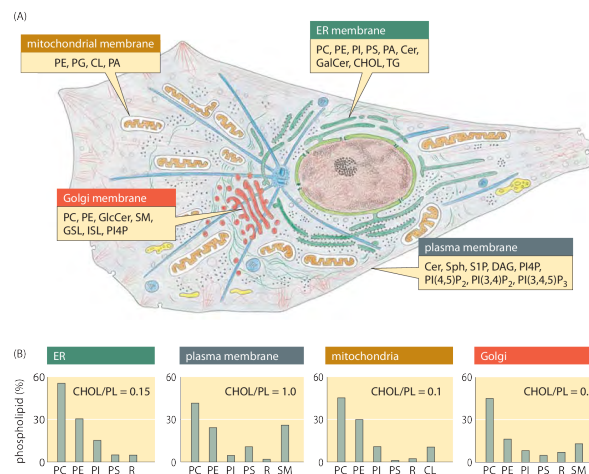


図4 生体脂質膜の組成

*1

- 小胞体 (ER)
PC が全体の半分を占め、ついで PE, PI が多い
- 細胞膜 (plasma membrane)
PC が一番多く、PE, SM がそれに次いでいる
- ミトコンドリア (mitochondria)
PC と PE が多い
- ゴルジ体 (Golgi)
PC が最も多い

リゾリン脂質性メディエーターとその生理作用について調べよ。

リン脂質のうち2本のアシル基から1本が取り除かれたものをリゾリン脂質といい、近年新たな創薬ターゲットとして注目を集めている。例えば、リゾホスファチジン酸は細胞膜上の LPA 受容体に作用することで細胞増殖や抗アポトーシスといった作用をもたらす。リゾホスファチジルセリンは GPR34 受容体に作用しマスト細胞の脱顆粒や細胞の遊走を促進する。^{*2}

*1 出典： <http://book.bionumbers.org/what-lipids-are-most-abundant-in-membranes/>

*2 出典： <http://lifesciencedb.jp/>

OPA によってヒスタミンが定量できる原理を調べよ。

図のように OPA 試薬がチオール化合物の存在下でヒスタミンと結合することで、イソインドール骨格を持った蛍光誘導体となり、定量が可能となる。^{*3}

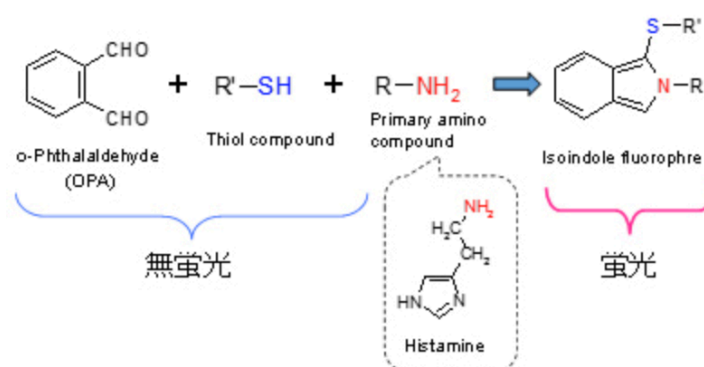


図5 OPA 試薬による蛍光

ConA によってマスト細胞が脱顆粒を起こす理由を調べよ。また IgE で感化されたマスト細胞が抗原により脱顆粒を起こす分子機構について調べよ。

マスト細胞は、細胞表面の IgE 受容体に結合した IgE が抗原により架橋されると脱顆粒し、ヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質を放出する。しかしラット腹腔由来のマスト細胞では、抗原による IgE の架橋だけでは脱顆粒を起こさず、リゾホスファチジルセリン (LysoPS) の添加を必要とする。この反応は他のリゾリン脂質では起こらず、LysoPS に特異性の高い反応である。

マウス腹腔内のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1(PS-PLA1) が ConA 刺激によってラット腹腔細胞の細胞膜上に露出した PS を加水分解して LysoPS を産生してマスト細胞に供与する。供与された LysoPS はその細胞表面に長時間結合し続け、その状態で IgE 受容体が架橋されることが脱顆粒反応が起こるために必須であると参考文献には述べられている。炎症局所においては、PS-PLA1 が存在すると同時に、アポトーシスやサイトカイン刺激により、PS が細胞表面に露出した細胞が多く見出される。このような場所で産生された LysoPS がマスト細胞に作用すると、マスト細胞は IgE 受容体架橋によって極めて脱顆粒しやすくなるとされる。^{*4}

^{*3} 出典 : <https://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/bunseki/research2.html>

^{*4} 出典 : <http://gakui.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/gazo.cgi?no=117433>