

血中におけるトランスサイレチンの分子多様性の解析

近 藤 あかり* 中 村 友 乃* 久保田 亮[§]

I. 研究の概要

【背景・目的】

トランスサイレチン (TTR) は、分子量 14,000 の蛋白であり、通常四量体として血中に存在しレチノール結合蛋白 (RBP) の輸送を行っている。TTR の四量体に RBP の単量体が結合した複合体から構成され、この複合体に 1 モルの retinol (ビタミン A) が空洞構造の中に結合している。TTR は半減期が短く代謝回転が速いので rapid turnover protein と呼ばれる。TTR の半減期は約 48 時間と短く、変動幅も大きいので術前、術後等の栄養状態の把握や、肝の蛋白結合能の把握に有用である。TTR はセルロースアセテート膜 (セア膜) 電気泳動においてアルブミンより陽極に泳動されるため、プレアルブミンとも呼ばれている。

本研究では、血中の TTR がどのような割合で存在するかを解析するため、セア膜電気泳動および SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、蛋白分画を確認した。

【方 法】

試料として蛋白分画コントロール (分画コントロール、常光) を用いた。

1) セア膜電気泳動 (蛋白分画)

セア膜を支持体とし、ペロナル緩衝液 (常光) を用いて 40 分間泳動を行った後、膜をセア膜専用銀染色液 (常光) で染色した。

2) 自然転写法

セア膜電気泳動後に、PVDF 膜に転写し、1 次抗体として Polyclonal Rabbit Anti-Human prealbumin (DAKO) および Polyclonal Rabbit Anti-Human prealbumin Retinol binding protein (DAKO)、2 次抗体として Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP (DAKO) を用い、発色液 (3,3' - ジアミノベンジジン) で TTR と RBP を検出した。

3) 非還元 SDS-PAGE

支持体は自製の 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲル 1 枚当たり 10 mA および 20 mA の電流で泳動を行った。電気泳動後、ゲルを銀染色し、ImageJ にて解析した。

4) ウェスタンブロット (WB) 法

SDS-PAGE 後のゲルを PVDF 膜に転写し、自然転写法と同様の抗体を用いて TTR と RBP を検出した。

5) カラムクロマトグラフィー (TTR 精製)

TTR 抗体を結合させたカラムに試料を 1mL 加え、PBS で洗浄後、Glycine-HCl buffer で TTR を溶出した。

【結果・考察】

1) セア膜電気泳動 + 自然転写法

セア膜電気泳動後、自然転写法で TTR を検出したところ、 α_2 分画に検出された。微量ではあるがプレアルブミン分画にも検出され、それぞれの割合を ImageJ で解析し、 α_2 分画側を分画 A、preAlb 分画側を分画 B とすると、分画 A が

* 埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科検査技術科学専攻 [§] kubota-ryo@spu.ac.jp

94.3%、分画 B が 5.7% であった。また、RBP は α_2 分画に検出された。

2) SDS-PAGE + WB 法

SDS-PAGE 後に WB 法で TTR を検出したところ、高分子領域に多く存在し、低分子領域の TTR は少なかった。

3) カラムクロマトグラフィー (TTR 精製) + SDS-PAGE

TTR の精製を行ったところ、最も TTR が多く溶出されたのが E2 分画であった。E2 分画に溶出された TTR を SDS-PAGE 法で電気泳動したところ、18 kDa、33 kDa、66 kDa 付近に明瞭なバンドが検出された。それぞれの割合は 18 kDa が 3.7%、33 kDa が 30.7%、66 kDa が 12.3% であった。また、18 kDa を分画 2、それ以外の高分子領域のバンドを分画 1 と分け、割合を算出したところ、分画 1 は 96.3%、分画 2 は 3.7% であった。

つまり、その分子量とバンドの割合から、18 kDa は TTR の単量体、33 kDa は 2 量体、66 kDa は 4 量体であると考えられる。またセア膜電気泳動では分画 A が 94.3%、分画 B が 5.7%、精製した TTR の SDS-PAGE では分画 1 が 96.3%、分画 2 が 3.7% であったことから、分画 A と分画 1、分画 B と分画 2 は対応するものと考えられる。よって、セア膜電気泳動で preAlb 分画に泳動されるものは TTR の単量体、 α_2 分画に泳動されるものは単量体以外と考えられる。また、RBP が α_2 分画に泳動されたことから、TTR との複合体も α_2 分画に泳動されることが考えられる (図 1)。

II. 受賞の感想

この度は第 17 回臨床検査学教育学会学術大会において、学生優秀発表賞という荣誉ある賞を頂き、大変光栄に思っています。

今回は私にとって初めての学会発表であり、時間配分や質疑応答に不安があり大変緊張しました。しかし、入念な練習やこれまで蓄積してきた知識を活かしてスムーズに進めることができ、自身の成長を感じました。

また、演題発表の際には貴重なご意見を伺うこともできたため、大変有意義な時間を頂きました。

このような素晴らしい賞を頂いたのは、久保田亮先生のご指導ご鞭撻の賜物だと思っております。また、共同研究者の中村さんや、研究を後押ししてくれた研究室のみなさんにも大変感謝しております。この紙面をお借りして厚く御礼申し上げます。

III. 将来の抱負

今回研究を行ったトランスサイレチンは、肝障害のマーカーや栄養評価の指標として用いられる血清蛋白です。4 量体のものがレチノール結合蛋白を介し、ビタミン A の輸送に関わると言われていますが、その割合等、ビタミン A の輸送のメカニズムは不明な点が多いです。私は 4 月から、埼玉県立大学大学院に進学します。大学院では、レチノール結合蛋白やビタミン A にも焦点を当てつつ、トランスサイレチンの構造解析をより深く研究していきたいと考えています。

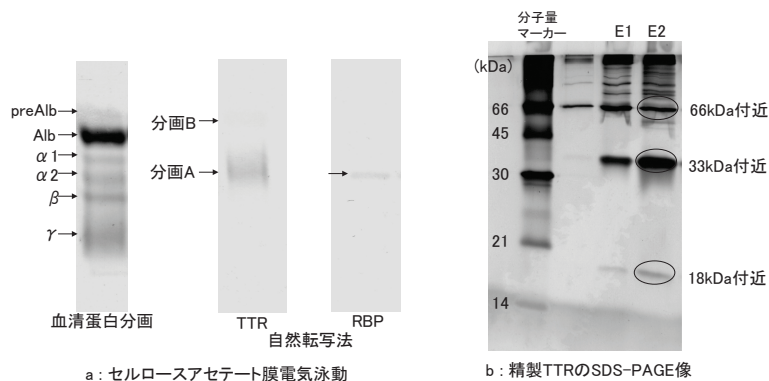


図 1 各種電気泳動法による TTR の解析