

松寿仙長期投与により増減するラット血清中タンパク質の解析

○山中 秀徳¹, 前田洋祐¹, 屋形直明¹, 美濃部 安史¹, 小屋 佐久次²
 (1 一般財団法人化学物質評価研究機構, 2 株式会社和漢薬研究所)



概要

【目的】生薬製剤である滋養強壯薬松寿仙（クマザサ葉、アカマツ葉、オタネニンジン）の抽出液の内用分服液剤を長期間（3ヶ月間）飲用させたラットの血清中タンパク質の変動を解析した。

近年、血液中の疾患、薬効、毒性等のマーカータンパク質の探索が活発に行われ、有用なマーカー候補が多数報告されている。特に血液中のタンパク質の中でも分子量5万以下の低分子量タンパク質には、未発見のマーカーが埋もれている可能性が高く近年注目されている。

【方法】血液中にはアルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリンなどのmajor proteinsの合計が全体の99%を占めるため、血中のマーカー探索においてはこれらを除去することが必須となっている。今回、抗体カラムによるmajor proteinsの除去および分子量分画による分子量5万以上のタンパク質を除去したサンプルに対して、Proteo Miner™（パイオラッド社）処理を行うことにより、さらに微量なタンパク質の定量比較解析を可能にした。今回、一連の前処理（抗体カラム、分子量分画およびProteo Miner™ビーズ処理）を、松寿仙を長期間（3ヶ月間）飲用させたラット血清に適用し、血清中で変動するタンパク質を2D-DIGE（2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis：蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動）を用いて定量比較解析した。長期間服用により変動が見られたスポットは、質量分析装置（nanoLC-ESI-Q-TOF）を用いて同定した。

【結果及び考察】統計的に有意な変動の見られたスポット中（増加 4スポット、減少 6スポット）のタンパク質の質量分析装置による解析から、飲用により増加、減少したタンパク質を同定した。増減が確認されたタンパク質は、今回の一連の前処理によりはじめて定量解析が可能になったタンパク質であった。同定されたタンパク質から松寿仙の長期飲用の効果を明らかにすることが期待される。

実験

・松寿仙投与の条件

SD ラット(n=3) に、50mg/kg/dayで松寿仙を3ヶ月継続で経口投与した。

・血清の前処理

血清は、マルチプルアフィニティームーバールスピナーカートリッジ（MS-3,0.45 mLpack, アジレント・テクノロジー社）を用いて、サンプル中のアルブミン、IgGおよびトランスフェリンを除去した後に、アジレント社のSpin Concentrators：50K MWCO, 4ml; Part No.5188-5202、5K MWCO, 4ml; Part No.5185-5991 を使用して、4℃で60min x 7000 g (MX160, TOMY社製) 遠心して分画した。

分画したタンパク質サンプルは、Proteo Miner™キット中のビーズによる処理を3回繰り返して実施した。処理後のタンパク質溶液に対して2倍量の冷アセトンを添加した後にディーフリーザー（-80℃）で1時間保持し、析出したタンパク質を20,000 x gで20min遠心した。プロテアーゼインヒビターを添加したLysis Buffer (LB) (4% (w/v) CHAPS, 2 M thiourea, 8 M urea, 10 mM Tris-HCl pH 8.8)で沈降物を溶解したものを解析用サンプルとした。

・一次元電気泳動

一次元電気泳動は、Multiphore II 及び IPG (Immobilized pH Gradient) Strips (24cm, pI3-10, GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用い、サンプルはカップローディングホルダーから添加した。フォーカシングは、トータルで40kVh行った。泳動後、平衡化溶液（50mM Tris, pH8.8, 6Mウレア, 30%グリセロール, 2%SDS）に0.25% (w/v) DTTを添加したA液及び同様に4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを添加したB液に対して各々10分間ずつ平衡化を行った。

・二次元電気泳動

平衡化終了後、Ettan DALT IIシステム（GEヘルスケアバイオサイエンス社）及び12%均一ゲル（自作）を用いて二次元目のSDS-PAGEゲル電気泳動を行った。泳動は、3Ω（15℃）一定で泳動先端が完全に溶出するまで（約15時間）行った。

・画像解析

Typhoon（GEヘルスケア バイオサイエンス社）を用いてSypro® Rubyの励起波長(480nm)および蛍光波長(620nm)で画像を取得した。染色後に解析用のゲルに対してDecyder™ BVAソフト（GEヘルスケア バイオサイエンス社）を用いてマッチングし、相当するスポットをスポットピッカー（GEヘルスケア バイオサイエンス社、Ettan Spot Picker）でピックアップした。

・LC条件

カラム：L column Micro (75µmID x 15cm, 3µm, 100 Å)
 カラム温度：室温
 移動相：A液 95/5 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
 B液 5/95 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
 流速：2.5µL/min

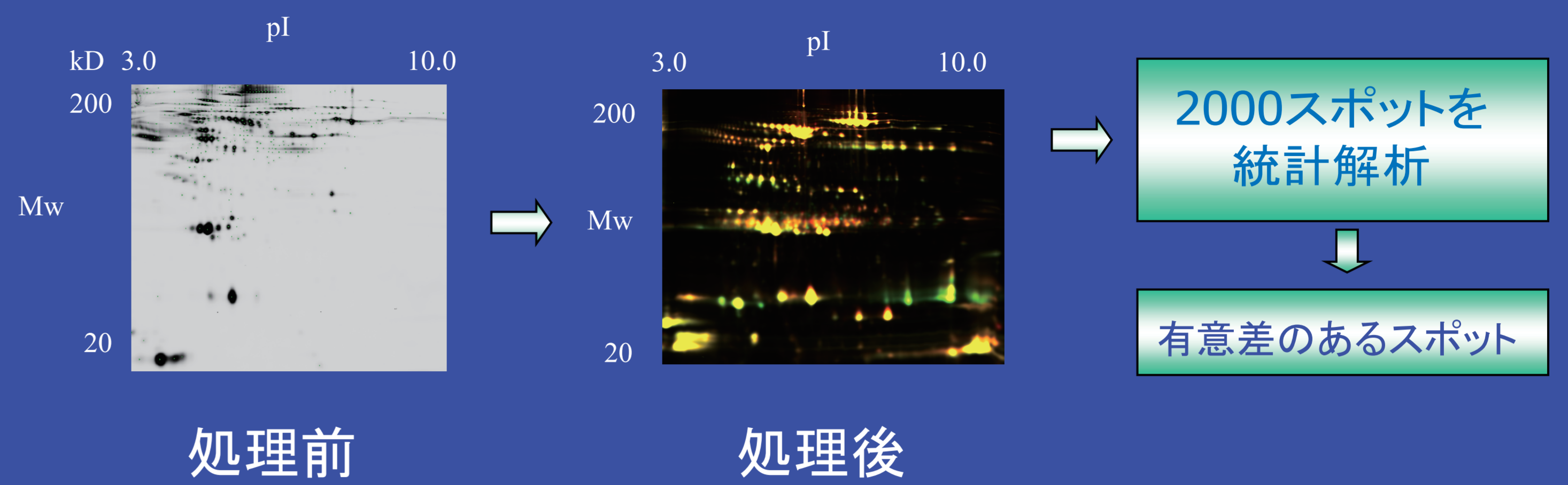
・酵素（トリプシン）消化条件

分画後の血清蛋白質は、DTT溶液、ヨドアセトアミド溶液で還元処理後に、0.1µgのトリプシン（プロメカ社）で酵素消化（30℃、一晚）した。

・質量分析の条件

MS測定：Q-TOFmicro (マイクロマ社)
 キャピラリー電圧：3300V、コーン電圧：45V
 CIDガス：アルゴン、コリジョンエネルギー：25eV

Proteo Miner™ 処理によるマイナー成分の解析



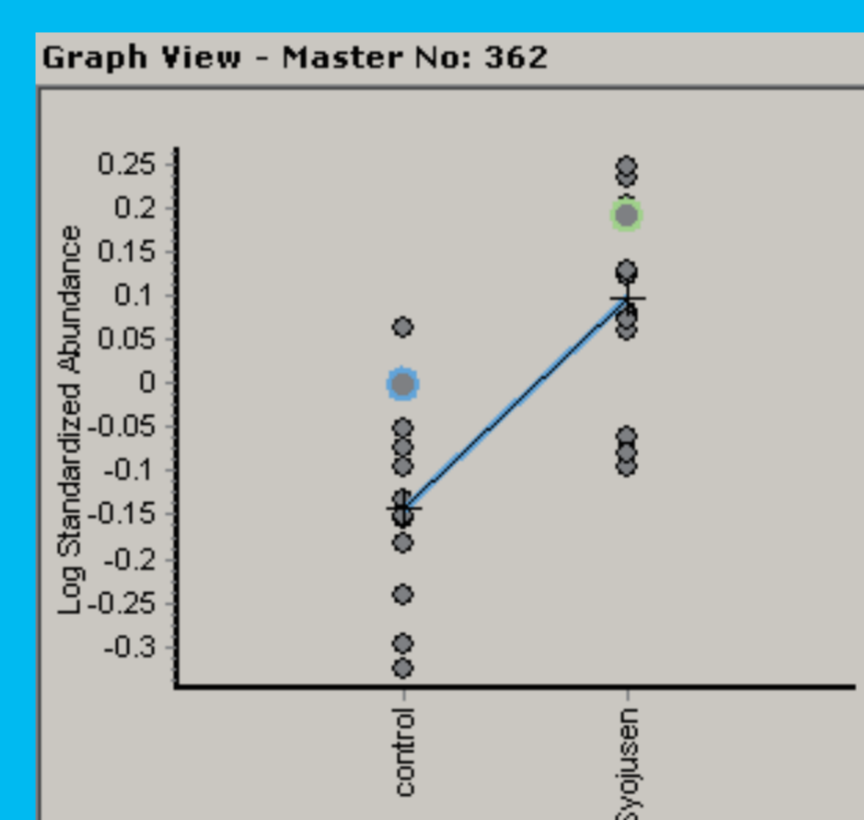
松寿仙投与により増減したタンパク質

統計的に有意な変動 (P -value < 0.01, |Av. Ratio| > 1.3) の見られたスポットを表1に示した。

表1. 発現量の変動が確認されたスポット

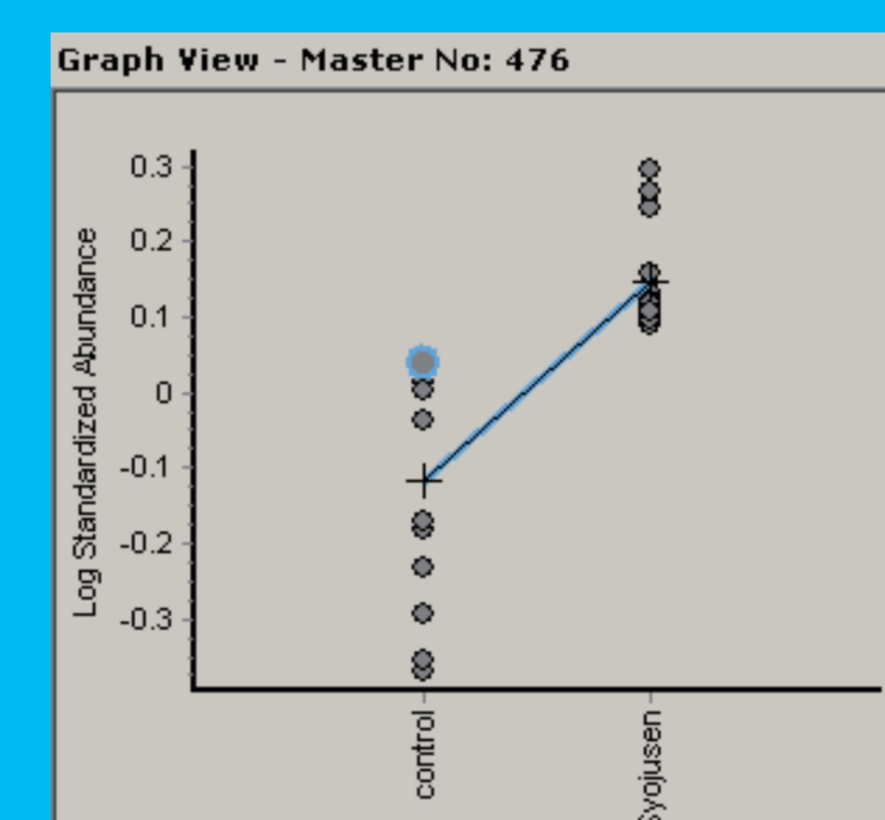
Pos.	Master No.	P-value *1	Av. Ratio*2
1	1121	0.00088	-1.32
2	759	0.00088	1.45
3	476	0.0011	1.78
4	641	0.0014	-1.35
5	362	0.0015	1.72
6	411	0.0032	-1.35
7	1003	0.004	-1.40
8	639	0.004	-1.41
9	626	0.004	-1.42
10	485	0.004	1.68

Spot No.362 Fumarylacetoacetase



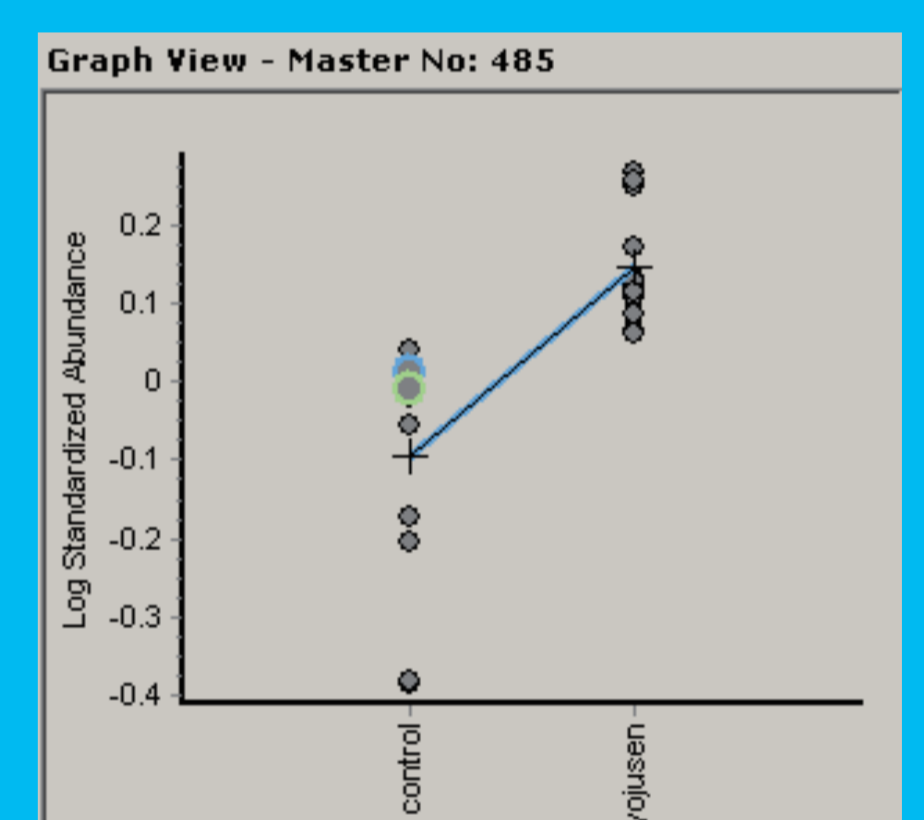
Phenylalanine catabolism
Tyrosine catabolism

Spot No.476 Fructose-bisphosphate aldolase B



Glycolysis
cellular response to extra-cellular stimulus

Spot No.485 Glia-derived nexin



Differentiation
Neurogenesis

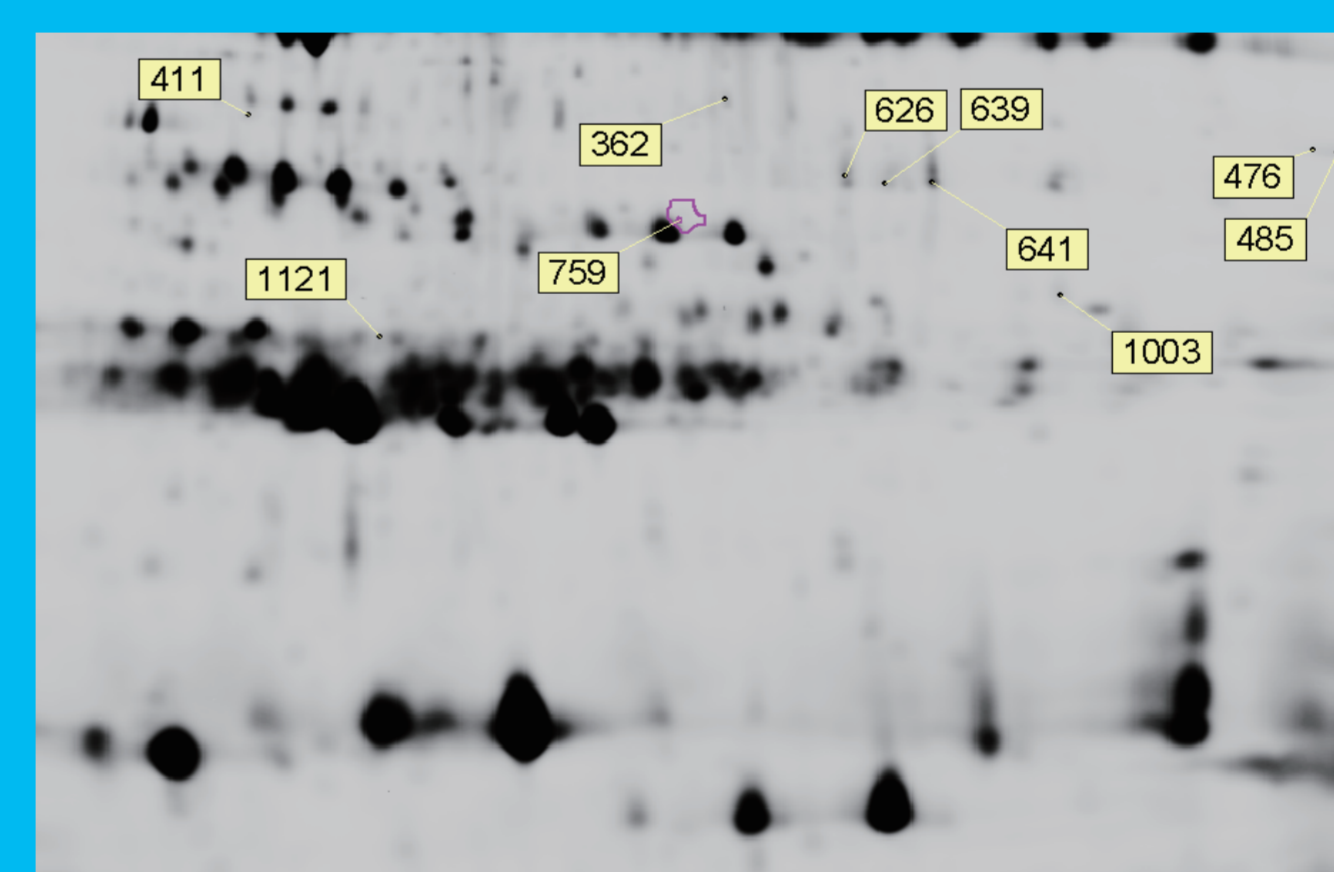
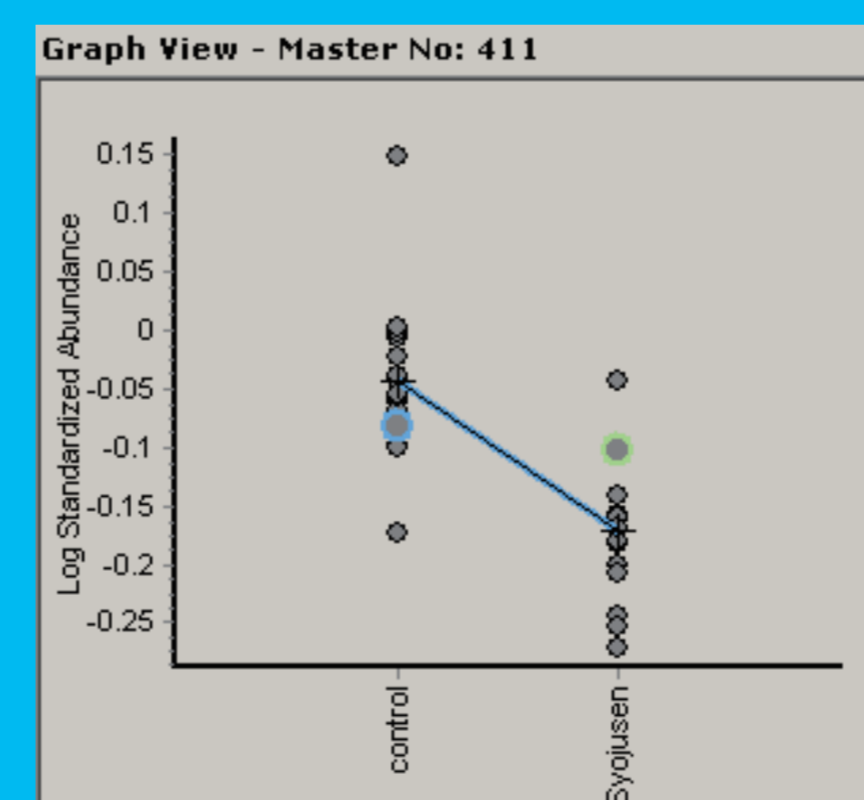


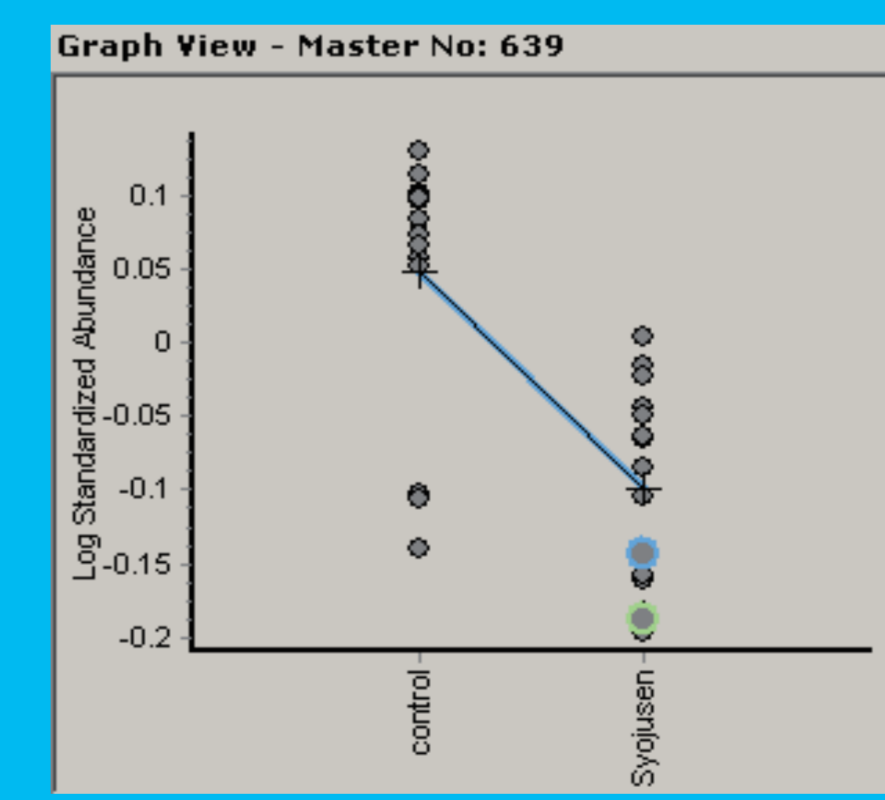
図-2. 松寿仙投与により増減したタンパク質のゲルイメージ

Spot No.411 Zinc-alpha-2-glycoprotein



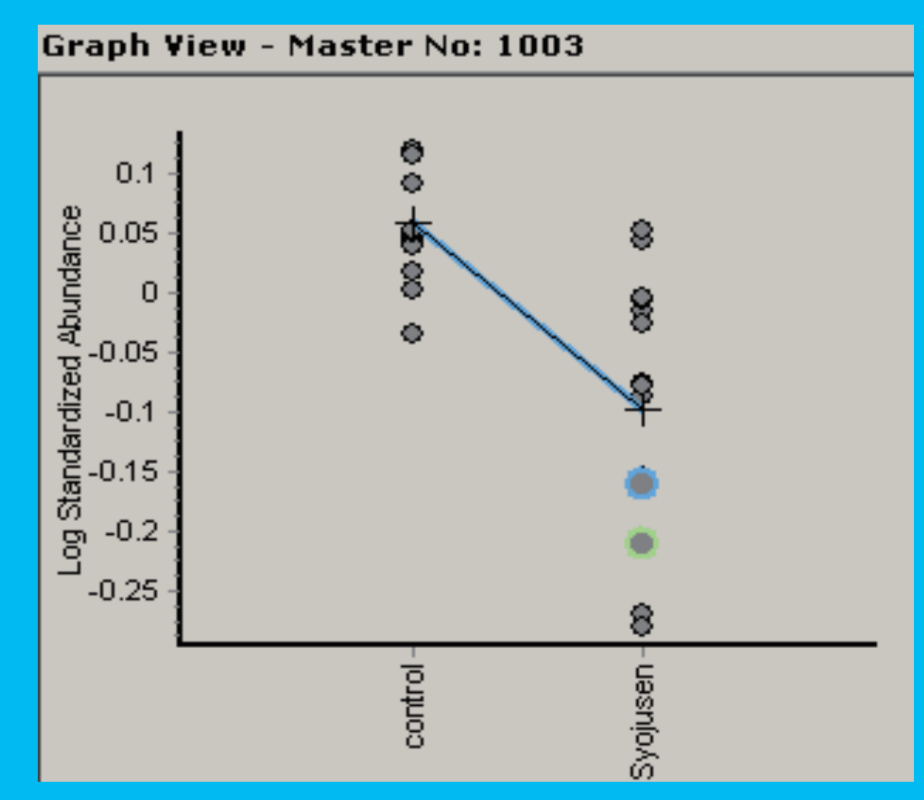
immune response
Inferred from electronic annotation.

Spot No.639 Ficolin-1



Involved in serum exerting lectin activity.

Spot No.1003 Mannose-binding protein A



Calcium-dependent lectin involved in innate immune defense.

松寿仙服用前後の血液流動性の比較（参考データ）

松寿仙を服用する前と8週間継続して摂取(1回5ml, 1日3回)した後の血液流動性を比較するために、シリコンチップ上の毛細血管モデルを全血100µlが通過する時間をMC-FANで測定した。測定を実施した健康人3人全員で全血通過時間の短縮が認められ、松寿仙の服用が血液流動性改善に効果があることが示唆された。

毛細血管モデルによる血液流動性評価
流動性=悪い



流動性=良い

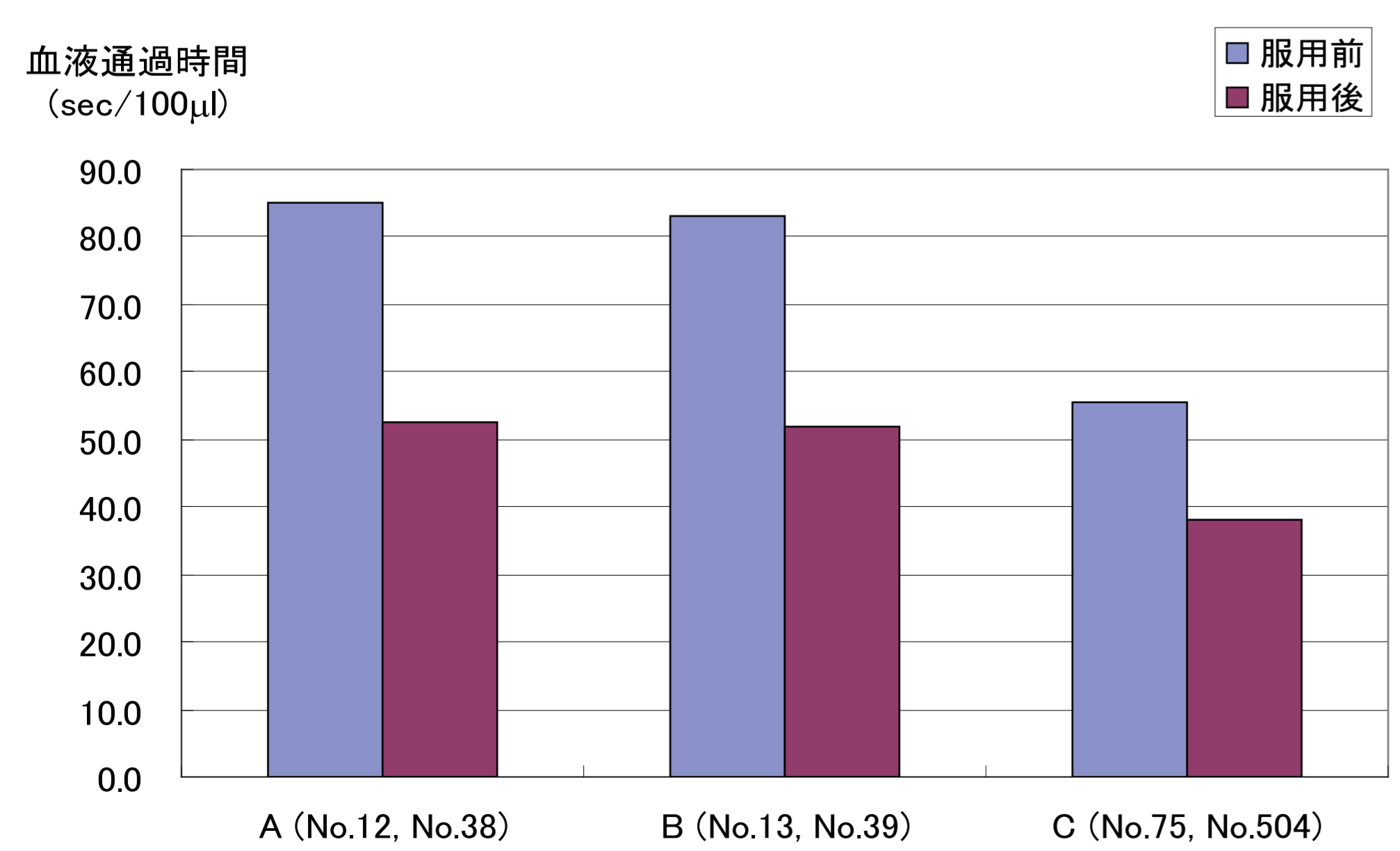


図-1. 松寿仙服用前後の血液流動性の比較

まとめ

1. Proteo Miner処理のプロトコールを改良することにより、血中の微量成分の定量比較解析を可能にした。

2. 松寿仙を12週間投与したラット血清の解析から、投与により増減したタンパク質を検出、質量分析装置を用いて同定した。

増加：Fumarylacetoacetase、Fructose-bisphosphate aldolase B、Glia-derived nexin

減少：Zinc-alpha-2-glycoprotein、Ficolin-1、Mannose-binding protein A

免疫系に関与するものが多く同定され、ヒトでの結果と同様の傾向がみられた。さらに同定を実施し、関連について詳細な解析を実施中。