

1 ミクロ 2 次元電気泳動を用いた CoQ 結合タンパク質サポシン B の 定量法の開発

○野村 剛, 田中秀幸, 加柴美里, 森内 寛, 吉村眞一, 山本順寛, 藤沢章雄
東京工科大学 応用生物学部

【緒 言】

コエンザイム Q (CoQ) はミトコンドリア内での ATP 産生に, そして細胞膜やリポタンパク質などの抗酸化防御に必須であり, 生体にとって必要不可欠な化合物である. しかし, その組織中レベルは加齢と共に減少することがヒトやラットで報告されており (Kalen et al., *Lipids* **24**(7), 579–584.(1989)), その原因は不明である. 一方, サポシン B (Sap B) に CoQ 結合能があることが見出され (Jin et al., *J. Clin. Biochem. Nutr.* **42**(2), 167–74.(2008)), 生体中で CoQ 輸送タンパク質として作用していると考えられる. そこで組織中 Sap B の定量法を確立し, 加齢による変動を検討した.

【方 法】

組織中 Sap B レベルは低いことが予想され, 高感度かつ選択性の高い手法が必要であることから, Sap B を認識する特異抗体を用いる方法を検討することにした. 一方, Sap B には Gln–Asp–Gln の 3 つのアミノ酸を余計に含む変異体 (Exon 8) が存在し, これらを抗体で区別することは困難であると予想される. そこで両者を 2 次元電気泳動 (2DE) により分離した後, 特異抗体を用いたウェスタンブロット法 (WB) により検出する手法 (2DE–WB 法) の確立を目指した. そして定量には適切なタンパク質を内部標準に用い, その発色強度比から Sap B を定量する手法を検討した.

【結 果】

Sap B (等電点 4.60, 分子量約 9,000) と Exon8 (等電点 4.45, 分子量約 9,500) を分離するために, 1 次元目に等電点電気泳動, 2 次元目に SDS–PAGE を用いた. マウス腎臓のホモジネートを分析したところ, Sap B と思われるスポットを検出し, 分子量および等電点マーカールとの比較から Sap B と同定した. また予め Exon 8 が存在することが予想されるマウス心臓のホモジネートを同様に分析したところ, Sap B の近傍に別のスポットが観察され, これを Exon 8 と予想した. このことから Sap B と Exon 8 を分離できることが示唆された. さらに大腸菌由来の Sap B (E) (等電点 5.90, 分子量約 14,000) を分析したところ, Sap B とは異なる位置にスポットが観察されたことから, 内部標準物質として使用できることが推察された. そこで腎臓ホモジネートに Sap B(E) を混合して分析したところ, 両者は異なる位置にスポットが観察され, 夾雑スポットのオーバーラップもなかった. さらに Sap B および Sap B (E) のタンパク量と発色強度比との相関を観察したところ, それぞれ相関係数 $R^2=0.98$ および $R^2=0.97$ となり, 良好な直線関係が認められた. そして観察される Sap B および Sap B(E) の発色強度比を求めたところ $\text{Sap B}/\text{Sap B(E)}=2.68\pm 0.13$ ($n=6$) となり, 変動係数が 4.86% となったことから, 本手法による組織中 Sap B の定量が可能であると推察される. 本手法を用いて 4 週齢, 8 週齢, そして 8 ヶ月齢のマウス組織中の CoQ レベルおよび Sap B レベルを測定する.