

マイクロ2次元電気泳動法を用いた ネコ尿タンパク質分析の基礎的検討

Analysis of cat urine protein using micro two-dimensional electrophoresis: a basic examination

坂口和子, 鈴木 潤

麻布大学生命・環境科学部食品生化学

Kazuko Sakaguchi, Jun Suzuki

Department of Food Biochemistry, School of Life and Environmental Science, Azabu University

Abstract: One method of understanding of the pathology of diabetic nephropathy is to evaluate protein spot (spot) dynamics through micro two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (M2D-PAGE; native and denaturing) analysis of urine. In this study 0.25- μ l aliquots of urine were collected from and analyzed for normal, diabetes mellitus and chronic renal failure cats.

The urine of diabetes mellitus cats could be broadly divided into two groups: minimal observation of spot A, almost identical to that in normal cats (Group A); and, observation of multiple other spots in addition to clearly defined spot A (Group B).

This study suggests the expediency of M2D-PAGE analysis, which uses non-concentrated urine, for clinical veterinary screening tests. In future studies, identification of target proteins will be carried out using each type of anti-cat antibody. Moreover, better understanding of diabetes mellitus progression and diabetic nephropathy pathology may be possible through protein spot assay.

1. 目的

ネコもヒトと同様に高齢化が進んでおり、それに伴いネコの糖尿病も増加しているため、獣医領域でも糖尿病への関心が高まっている。糖尿病は初期の自覚症状が少ないため早期発見が困難であり、自覚症状が出現したときには糖尿病性腎症（腎症）¹⁾などの合併症を併発していることもあり獣医臨床領域でも問題になっている。

現在、ヒトでは糖尿病性腎症の早期診断には尿中微量アルブミンの測定が用いられている²⁾。しかし微量アルブミン尿を呈する早期腎症でも組織像ではすでに軽度の糸球体硬化が認められる。さらにそれ以前の腎症前期でも健常者と比較して糸球体、間質、

細動脈に変化があり、その変化は早期腎症と有意差がないとする報告もあるため、かならずしも微量アルブミンが腎症の早期診断の鋭敏な指標であるとは言えず、より早期腎症の診断指標として、微量アルブミン以外のマーカー物質が期待されている¹⁾。

本研究では、正常ネコ、糖尿病ネコおよび慢性腎不全ネコの濃縮操作を伴わない尿を試料とし、マイクロ2次元電気泳動（M2D-PAGE；未変性-変性）³⁾分析後、銀染色法およびウエスタンブロット法（WB法）⁴⁾を用いて糖尿病に特徴的なスポットの動態観察を行い、糖尿病性腎症の病態把握および早期マーカータンパク質の検出を検討した。

2. 方法

1. 試料

正常ネコ尿 (4検体), 糖尿病ネコ尿 (8検体), 慢性腎不全ネコ尿 (7検体) を用いた。

2. 試料の調整

100倍濃縮はMILLIPORE社製のMICROCON YM-3 (Regenerated Cellulose 3,000MWCO) を用いて, 500 μ l の試料を10,000 Gで5-6時間遠心して行った。次にフィルターを転倒し1,000 Gで30分遠心し, 濃縮尿を作製した。添加試料は検体尿, 100倍濃縮尿ともに飽和シュクロース水溶液で1:1に調整した。

3. 試薬

実験に供した試薬はAmpholine: pH3.5-10, pH3.5-5 (Amersham Biosciences), N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン, 過硫酸アンモニウム (和光純薬工業社), アクリルアミド (ナカライテスク社), CBBR-250 (ナカライテスク社), Silver Stain KANTO III (関東化学社), アルカリフォスファターゼ染色液 (AP: フナコシ社), Rabbit Anti-Human Albumin, Rabbit Anti-Human Transferrin, Rabbit Anti-Human Haemopexin, Sheep Anti-Human Pre-albumin, α_1 -AT: Rabbit Anti-Human Alpha-1-Antitrypsin, Rabbit Anti-Human Alpha1-Macroglobulin, Rabbit Anti-Human Beta₂-Macroglobulin, Rabbit Anti Human Gc-globulin, Anti Apolipoprotein A I Goat-Poly, Anti Apolipoprotein A II Goat-Poly, Anti-Albumin Cat, Goat-Poly, 2次抗体: Anti-IgG (H+L), Sheep, Rabbit-Poly, Biotin, Anti-IgG (H+L), Mouse および Goat-Poly, Biotin (DAKO社) である。

4. ゲル作製

ゲル作製は既報^{3),5)} のように行ったが, 異なる部分を以下に示した。

M2D-PAGE (未変性-SDS) 一次元目等電点電気泳動用ゲル: Ampholine pH3.5-10を0.04 ml, 蒸留水を0.46 ml加えて, ゲル化した。二次元目密度勾配ゲル電気泳動用ゲル: 4%から17%ゲル溶液に0.1%になるようにSDSを加えゲルを作製した。

5. ミクロ二次元電気泳動

M2D-PAGE (未変性-変性) は既報^{3),5)} に従った。

6. 染色

銀染色は二次元目密度勾配ゲルが終了した平板ゲルを, 50%メタノール-10%酢酸に一晩振とうした後, Silver Stain KANTO III (関東化学株式会社) を用いて染色を行った。

7. ウエスタンブロット法 (WB法)

アルカリフォスファターゼ法 (AP法) で行い, 染色法は既報^{3),5)} に従った。

8. 画像記録および処理

CBB染色ならびに銀染色後, 脱色したゲルおよび免疫化学的染色した膜は, フォトショップソフト (Photoshop 5.0J, 東京) を使用し画像をパソコンに取り込み保存した。

3. 結果と考察

本研究では糖尿病性腎症の病態を把握するひとつとして, 正常ネコ尿4検体, 糖尿病ネコ尿8検体ならびに慢性腎不全ネコ尿7検体の検体尿0.25 μ lを用いて, M2D-PAGE (未変性-変性) 分析後に銀染色を行い, スポットの動態観察を行った。正常ネコ尿でスポットaの痕跡が観察され, その他のスポットはほとんど観察することができなかった (図1)。糖尿病ネコ尿では, 正常ネコとほぼ同様にスポットaがわずかに観察されるA群 (No.1, No.2) と, 明瞭なスポットaに加えスポットa以外のスポット (b, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) が観察されるB群 (No.3~No.8) の2群に分類された (図1)。

慢性腎不全ネコ尿では, 糖尿病ネコ同様すべての検体でスポットaを観察することができた。しかし, スポットa以外のスポットが観察されたのは2検体のみで (図2, No.1, No.2), 残りの5検体は正常ネコとほぼ同様であった (図2, No.3~No.7)。

つぎに, 糖尿病ネコ尿で多くのスポットを観察することができた図1のNo.6およびNo.8について同定を試みたがスポットaはAlbumin (Alb), スポットb; Transferrin (Tf), スポットd; Haemopexin (Hpx), スポットe; Gc-globulin (Gc), スポットf; α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), スポットh; Prealbumin (PA), スポットi; Apolipoprotein I (ApoA-I), スポットj; Apolipoprotein II (ApoA-II), スポットk; α_1 -microglobulin (α_1 M) およびスポットl; β_2 -microglobulin (β_2 M) と推察した。なお, 検体尿を

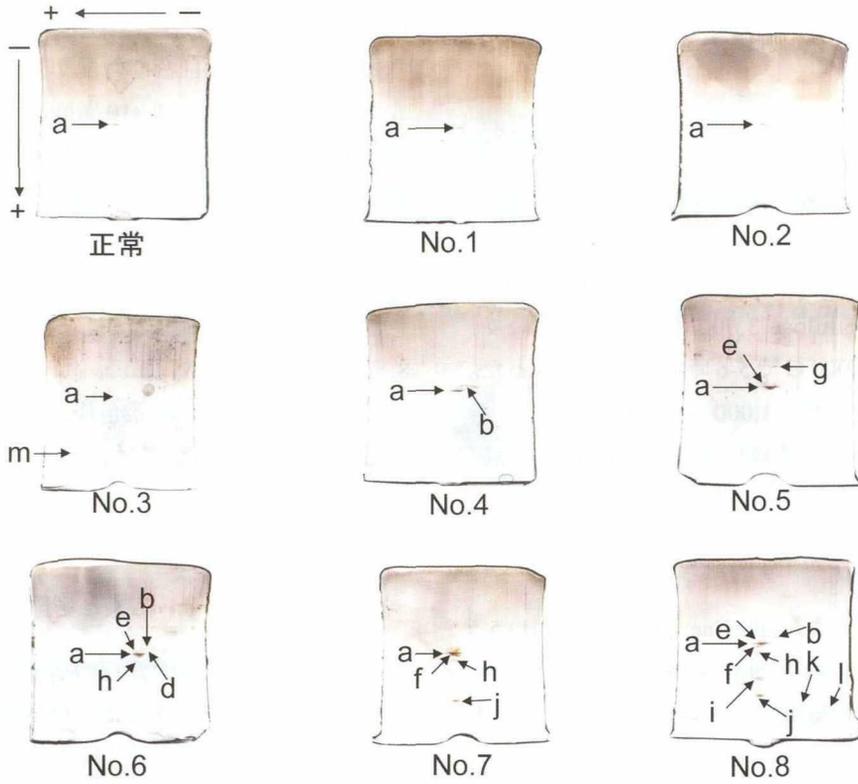


Fig. 1. M2D-PAGE of normal cat urine and diabetes mellitus cat urine.
 Normal cat, diabetes mellitus cat (Group A : No.1, No.2; only a spot, B : No.3 ~ No.8; two or a lot of spots)

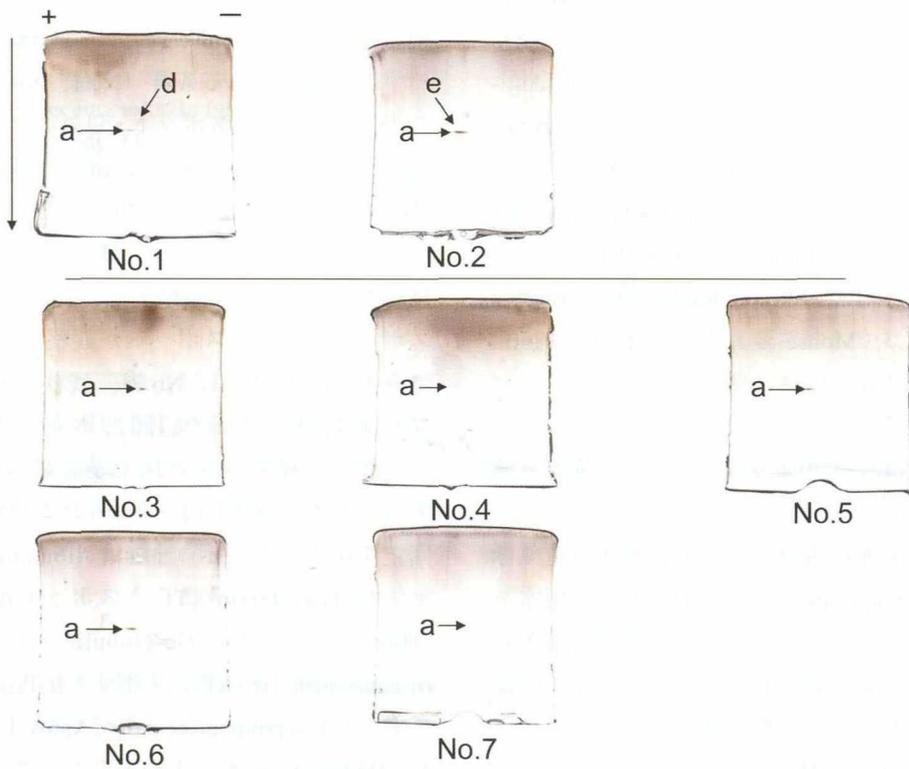


Fig.2. M2D-PAGE of chronic renal failure cat urine
 (Group A : No.1, No.2; leakage type, Group B : No.3 ~ No.7; non-leakage type).

M2D-PAGE分析後、免疫染色法（ウエスタンブロット；WB）により各種抗ヒト血清を用いて、アルカリフォスファターゼ染色（AP法）による同定を試みた結果、Albのみを確認することができた（図は省略）。また、今回入手することができた抗ネコAlb血清を用いて同様に同定を試みた結果、抗ヒトAlb血清を用いたときよりもより明瞭に検出することができ（図は省略）、これらのことよりエピトープが同一種の抗体を用いてWBを行うことの有用性が示唆された。よってスポットaは免疫学的にAlbと同定できた。さらに、Alb付近に存在するスポットb、dおよびfについて再検討するため、各々のスポットが一番濃く現れていた検体を用いて100倍濃縮をそれぞれ行った後、再度検体尿と100倍濃縮尿をM2D-PAGE分析後、WBのAP法により同定を試みた。その結果、 α_1 -AT、Hpx、Tfにおいては、検体尿では確認することはできなかったが、100倍濃縮尿では同定できた。しかし α_1 -ATでは複数のスポットが出現し、 α_1 -ATの遺伝型と推察された。また、Tfではzone現象により中ぬけしたことが観察されたが、この原因として、M2D-PAGEを行う際に用いた100倍濃縮尿の濃度に問題があり、抗原と抗体の最適条件ではなかったことが考えられる。Tfに関しては、適切な濃度の濃縮尿を用いてWBを行えば、より明瞭に確認できることが期待される。図1のNo.8の検体尿を用いたWBでは、Alb以外のタンパク質を同定することができなかった。これらのことは100倍濃縮尿を用いたWBの結果から、 α_1 -AT、HpxおよびTfでは検体尿であったために濃度が薄すぎたこと、Gc、 α_1 M、 β_2 MおよびPAでは、抗ヒト血清とネコ血清との低反応性によるものと推察できる。

ヒトの尿タンパク質のM2D-PAGE（未変性-未変性）分析においては検体尿8 μ lならびに濃縮尿のスポット観察の報告がある⁶⁾。当研究室では、尿タンパク質のM2D-PAGE分析を行なう上での課題の1つとして尿の濃縮法を検討している。100倍濃縮では、MICROCON YM-3を用いて遠心分離することで、500 μ lから5 μ lまで濃縮操作を行なうため、透析膜に沈着したタンパク質まで夾雑物として採取する危険が考えられる。そのため正常ネコ、糖尿病ネコおよび慢性腎不全ネコの尿をM2D-PAGE分析するにあたり濃縮操作を行わず、1次元目等電点電気泳動

（IEF）の通電方法にstep width方式を取り入れ、検体尿0.25 μ lの微量でタンパク質をIEF分析することが、スポットを観察する上で有効であった。

現在、ヒトでは糖尿病性腎症の早期診断には尿中微量アルブミンの測定が用いられているが、分析結果よりアルブミンの日差変動があることから、微量アルブミンが腎症の早期診断の鋭敏な指標であるとはいえず、アルブミンのみを診断指標とする危険性が推察される。

ところで、腎糸球体基底膜は、2つの選択的透過性によって血漿タンパク質の尿細管への漏出をコントロールしている。1つはIV型コラーゲンを主体として形成されている網目構造によるタンパク質分子の大きさの選択的透過性（size barrier）である。もう1つは、腎糸球体基底膜の構成成分の1つである陰性荷電した糖タンパク質（ヘパラン硫酸プロテオグリカンなど）と、同じく陰性荷電しているタンパク質分子とが互いに反発しあうという荷電による選択的透過性（charge barrier）である。これらの機能によって、AlbやTfなどの中分子量以上の血漿タンパク質（分子量6.5万以上）は通常、尿中に漏出されない¹⁾。しかし糖尿病性腎症では、高血糖状態の持続によって、糸球体過剰濾過、メサンギウム細胞の代謝異常、グリケーション（糖化反応）、酸化ストレスの亢進などが生じ、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの減少によるcharge barrierの障害と、IV型コラーゲンの破綻によるsize barrierの障害が起これ、本来尿中には排泄されないタンパク質が排泄され、タンパク尿が生じるとされている¹⁾。

今回、正常ネコ尿、糖尿病ネコ尿ならびに慢性腎不全ネコ尿の検体尿を用いたM2D-PAGE分析により、糖尿病ネコ6検体で特異的なスポットを観察することができた。これらのスポットの中には糖尿病および糖尿病性腎症の指標となるスポットの存在が期待される。しかし、抗ヒト血清とネコ血清の反応性のために、すべてのスポットの同定までには至らなかった。現在、抗ネコ血清はAlbしか市販されていないが、今後は、目的タンパク質の抗ネコ血清によるWBを行うことで、糖尿病の進行状況や糖尿病性腎症の病態の把握が期待される。今回の濃縮操作を伴わない検体尿を用いるM2D-PAGE分析法は、病態を知るスクリーニング検査として、その有用性が

示唆された。

4. 要約

本研究では糖尿病性腎症の病態を把握するひとつとして、正常ネコ、糖尿病ネコおよび慢性腎不全ネコから採取した尿 (0.25 μ l) をマイクロ2次元電気泳動 (M2D-PAGE: 未変性-変性) 分析により、タンパク質スポット (スポット) の動態観察を行った。

糖尿病ネコ尿では、正常ネコとほぼ同様にスポット a がわずかに観察される A 群と、明瞭なスポット a に加えスポット a 以外の複数スポットが観察される B 群の2群に大別することが可能であった。

本研究により、濃縮操作を伴わない尿を用いる M2D-PAGE 分析法は臨床獣医におけるスクリーニング検査として有用であることが示唆された。今後は、標的タンパク質の同定を各種抗ネコ抗体を用いることで実施し、スポットの定量を行うことで、より適切に糖尿病の進行状況や糖尿病性腎症の病態の把握することが可能と考えられる。

謝辞

本研究を行なうにあたり、貴重な試料を提供して頂いた前田獣医科動物病院の前田浩人博士のご好意

に深謝いたします。

文献

- 1) 明石寛次: 糖尿病性腎症の診断の進め方, *Medical Technology* 2002; 30: 1520-1528.
- 2) 伊藤喜久, 渡津吉史, 尿中微量アルブミン測定の標準化の現状と問題点, *臨床検査* 2002; 46: 769-772.
- 3) Sakaguchi, K., Suzuki, J., Tanaka, M. and Akahori, F.: Detection of α 2u-globulin in plasma as a toxicity biomarker in the rats poisoned with paraquat by micro two-dimensional electrophoresis. *Jpn. J. Electroph.* (生物物理化学), 2004; 48: 105-109.
- 4) Towbin H, et al.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 4350-4354.
- 5) Sakaguchi, K., Suzuki, J., Tanaka, M., and Akahori, F.: Micro two-dimensional electrophoresis of antiprotease in plasma from rats and rabbits poisoned by paraquat. *Jan.J.Electroph.*, 2002; 46: 153-156.
- 6) 真鍋敬, 高橋裕子, 奥山典生, 田中祥子, 本宮成雄, 腎疾患患者尿蛋白質のマイクロ2次元電気泳動法による分析, *生物物理化学* 1984; 28: 159-165.