

アディポサイトカイン MCP-1 の高感度測定に関する研究

日大生産工（院） ○木下 芽実
日大生産工 小森谷 友絵 日大生産工 神野 英毅

1 緒言

近年の豊かな食生活による過剰なエネルギー摂取、運動不足による消費エネルギーの減少に由来する内臓脂肪の蓄積が原因で、メタボリックシンドロームである人が増加している。メタボリックシンドローム患者は、心臓病発症リスクが高くなることが明らかになっているが、自覚症状が少ないため、放置しがちになることが現状である。そのため、このメタボリックシンドロームを早期発見することが必要となっている。

近年、ホルモンとサイトカイン(ケモカイン)を分泌する脂肪組織が注目されてきた。ケモカインの中で最も注目されている物質が MCP-1 である。MCP-1 は、単球の活性因子で、単球以外へもさまざまな作用をもち、炎症の際、リンパ球の組織浸潤を促し、各種炎症性疾患で高値を示す。そのため、MCP-1 を定量することにより、メタボリックシンドロームを早期に発見することが可能であると考えられている。

本研究では、MCP-1 のイムノアッセイによる定量を目的とし、抗体作製に必要な抗原 MCP-1 の遺伝子の調製を行った。

2 実験方法および測定方法

2.1 ゲノム DNA の抽出

自動核酸抽出装置 Magtration System 6GC (プレジジョン・システム・サイエンス) を用いてヒト血漿からゲノム DNA を抽出した。

2.2 PCR 法による MCP-1 遺伝子の増幅

抽出したゲノム DNA をテンプレートとし、MCP-1 の Forward、Reverse プライマー (Table1) および KOD Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR 法によって目的部位を増幅させる。このときの条件として、変性温度 94℃ (15 sec)、アニーリング温度 60.0～65.0℃ (30 sec)、伸長温度 68℃ (2 min) で 35 サイクル反応させた。PCR 産物を 12.5 %アクリルアミドゲルにより分離し、SYBR Green I (TaKaRa) で染色し、バンドを確認することで、アニーリング温度の検討を行った。

2.3 プラスミドベクターの作製

PCR により増幅した遺伝子を pET-100/D-TOPO vector (Invitrogen) にサブクローニングし、TOP10 Competent Cells (Invitrogen) に形質転換し、LB 寒天培地にまき、一晚インキュベートした。形成されたコロニーを T7 プライマー (Table1) を用いて PCR を行い、その後、2 %アガロース S ゲルを用いた電気泳動により、vector に組込まれたかを確認した。陽性コロニーの植継ぎをし、一晚攪拌インキュベートし、プラスミドを PureYield Plasmid Miniprep System(Promega)により精製した。

Table 1 Primer の設計

Primer	Sequence (5'-3')
MCP-1Forward	CACCTTCAAGAACCATTGTG
MCP-1Reverse	TTAAGTCTTCGGAGTTTGGGT
T7 Forward	TAATACGACTCACTATA
T7 Reverse	CCACCGCTGAGCTTAAACTA

Study on Hghly-sensitive Measurement of Adipocytokine MCP-1.

Memi KINOSHITA, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

2.4 MCP-1 の DNA シーケンス解析

プラスミドを PureYield Plasmid Miniprep System(Promega)により精製した。精製したプラスミドを遺伝子配列解析装置 CEQ8800 (BECKMAN COULTER) を用いて DNA シーケンス解析を行った。得られた遺伝子配列が目的遺伝子配列 MCP-1 (NP_002973.1) と一致するかをアライメント解析した。

3 実験結果および考察

3.1 PCR 法による MCP-1 遺伝子の増幅

アニーリング温度を 60.0~65.0 °C に変化させ、PCR を行った。その PCR 増幅産物のアクリルアミドゲル電気泳動結果を Fig. 1 に示す。目的遺伝子の分子量は 106 bp であり、アニーリング温度は、62.2°C でクリアにバンドが得られたため、最適であることが分かった。

3.2 MCP-1 遺伝子の組換え

スクリーニングを行ったコロニーが陽性であるかの確認を行った。そのコロニーPCR のアガロース S ゲルによる電気泳動の結果を Fig. 2 に示す。これにより、T7 プライマー (276 bp) と目的物質(106 bp)を合わせた分子量である 382 bp 付近にバンドが見られたため、MCP-1 遺伝子が pET-100/D-TOPO Vector に組込まれたことが確認できた。

3.3 シーケンス解析

精製したプラスミドのシーケンス解析を行った。これにより、MCP-1 と相互性があることが確認できた。

4 まとめ

ゲノム DNA を得るために血液より DNA を抽出した。その後、Matarin,M らの MCP-1 遺伝子配列を参考にタンパク質発現をするための Primer を設計した (Table 1)。

MCP-1 は、106 bp からなる遺伝子であり、目的のバンドを電気泳動により確認することができた (Fig. 1)。

MCP-1 遺伝子が Vector に組込まれたことがコロニーPCR 後の電気泳動とシーケンス解析により確認できた (Fig. 2)。

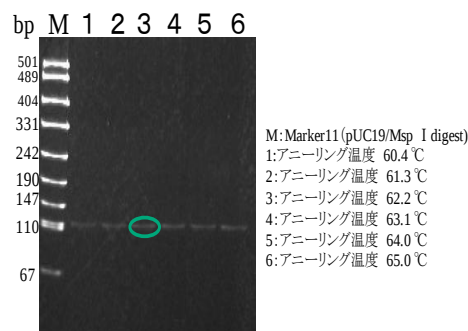


Fig. 1 MCP-1 の各温度における PCR 産物の電気泳動結果

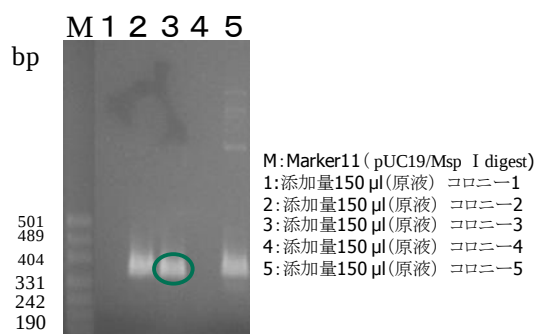


Fig. 2 MCP-1 のコロニーPCR 産物の電気泳動結果

「参考文献」

- 1) Marie Eugenia Frigolet Vazquez-Vela, et al, *Archives of Research*. 2009, **39**,715-728
- 2) 神田 一, 脂肪組織由来のMCP-1とメタボリックシンドローム, 肥満研究, 2007, **13**,311-313
- 3) H.Kanda, et al, *The Journal of Clinical Investigation*. 2006, **116**, 1494-1505
- 4) K.Yanaba, et al, *Ann Rheum Dis*. 2006,65,124-126