

CLEIA 法を用いた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

メタボリックシンドロームは、肥満・高血圧・糖尿病・高脂血症などの生活習慣病が重複している疾患のことである。これは、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といわれている。上記のような生活習慣病を3～4つ併せ持つ人は、心臓病発症リスクが健常者の31倍になってい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。脂肪組織は、中性脂肪からの食事エネルギーを貯えるだけでなく、エネルギー代謝のコントロール基盤としても認識されている。ケモカインは構造が類似した小分子量の細胞遊走活性を示すサイトカインのスーパーファミリーであり、炎症性メディエーターとして知られている。また、白血球が炎症部位に集まる際や白血球活性化においても重要な役割を果たす。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、アミノ酸 99 残基、分子量 11025 のタンパク質で、健常者の血中濃度は 149 pg/ml である。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 を定量することで、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ので報告する。

2 実験方法および測定方法

2.1 ゲノム DNA の抽出

採取した 8 ml の血液から Magtration System 6GC (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社) により、DNA を自動的に抽出した。

2.2 PCR 法による MCP-1 遺伝子の増幅

抽出した DNA を DNA プライマーおよび Takara Ex Taq Polymerase によって 35 サイクル繰り返すことによって、目的部位を増幅させる。このとき、変性温度 94℃ (30 sec)、アニーリング温度 53.0～61.1℃ (30 sec)、伸長温度 72℃ (1 min) で反応させた。その後、アガロース S ゲルにより電気泳動を行い、アニーリング温度の検討を行った。

Table 1 Primer の設計

Primer	Sequence (5'-3')
Forward	ATGAAAGTCTCTGCCGCC
Reverse	TCAAGTCTTCGGAGTTTGGGT

2.3 MCP-1 の DNA シーケンス解析

PCR 産物のゲルから目的のバンドを切り取り、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により、精製を行った。その後、精製した DNA をプレヒート処理した。処理後、エタノール沈澱を行い、CEQ8800 (BECKMAN

Study on Hghly-sensitive Measurement of Adipocytokine MCP-1 by CLEIA Method.

Memi KINOSHITA, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

COULTER) により、DNA シーケンス解析を行った。シーケンスによって得られた遺伝子配列が目的物質と一致するかを調べた。

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

各アニーリング温度における PCR 産物のアガロース S による電気泳動の結果を Fig. 1 に示す。遺伝子を増幅させるために適したアニーリング温度は、56.6℃であることが分かった。しかし、299 bp の目的物質と考えられるバンドは薄く、もう一つ 1053 bp 付近に濃いバンドが見られた。この 1053 bp 付近のバンドは、非特異的反応により得られたと考えられる。

3.2 シーケンス解析

299 bp と 1053 bp の各バンドを切り出し、シーケンス解析を行った。299 bp のバンドは濃度が薄く解析できなかったが、1053 bp のバンドはシーケンス解析ができたので、この結果を Fig. 2 に示す。これにより、1053 bp の物質は、Chemokine(C-C motif) ligand 7 precursor (MCP-3) と相互性があることが確認できた。

4 まとめ

鋳型 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)。

Primer を用いて鋳型 DNA から MCP-1 遺伝子を増幅し、シーケンス解析を行った。

MCP-1 は、299 bp からなる遺伝子であるが、1053 bp にもバンドが見られた (Fig. 1)。この遺伝子配列を解析した結果、MCP-3 との相互性が確認された (Fig. 2)

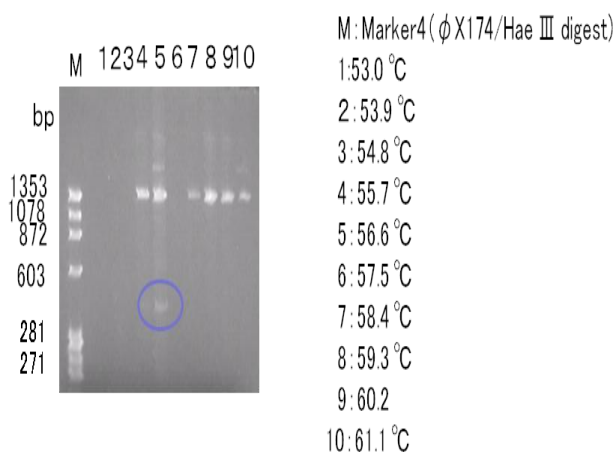


Fig. 1 MCP-1 の各温度における PCR 産物の電気泳

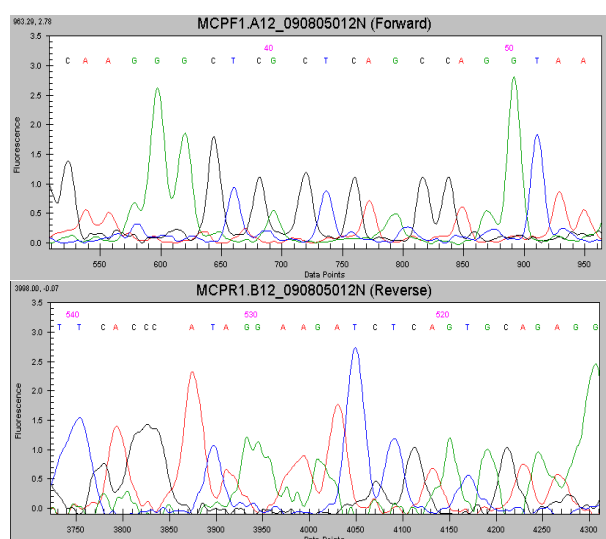


Fig. 2 シーケンス結果

「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 nvestigation*. 2006, **116**, 1494-1505
- 4) K.Yanaba, et al, *Ann Rheum Diz*. 2006,65,124-126