

SDS-PAGEによる5%ブドウ糖液下での赤血球凝集反応の原因に関する犬および猫の赤血球膜タンパク分析

佐藤 祐未¹, 坂口 和子¹, 鈴木 潤¹, 並河 和彦²

¹麻布大学生命・環境科学部食品生化学, ²麻布大学獣医学部伝染病学

1. はじめに

犬および猫の赤血球は通常であれば5%ブドウ糖液中に浮遊させても、赤血球膜表面に存在する糖鎖が荷電しているため、互いに反発しあい凝集することはない。しかし、正常あるいは異常のいずれでも、何らかの原因で凝集する場合があることを我々は見出した。このような *in vitro* での反応は生体内でも同様の反応を起こす可能性が考えられ、生体への影響が懸念される。本研究では犬および猫の赤血球膜タンパクに着目し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析により赤血球が凝集する原因を追究することを目的とした。

2. 材料と方法

用いた試料は、異常猫と正常猫の中から、5%ブドウ糖液下で赤血球凝集反応が陽性であったものと陰性であったものそれぞれ3頭ずつの計12検体である。赤血球凝集反応は、検体の血液を遠心後、血漿を取り除いた赤血球沈査 10 μ L を 5% グルコース 490 μ L の入った試験管に入れ混和後、凝集の有無を観察し、凝集したものを陽性、非凝集のものを陰性とした。次に、検体それぞれの赤血球から膜画分を得て、それを試料として SDS-PAGE 分析 (ゲル濃度 10%) を行い、CBB 染色後のタンパクバンドを比較した。また、上記の検体の血漿も同様に SDS-PAGE 分析し、タンパクバンドを比較した。

3. 結果および考察

正常猫では約 36 kDa と 80 kDa の位置にあるバンドが、非凝集のものは明瞭であるのに対して、凝集す

るものはやや不明瞭であった。つまり、凝集するものは 36 kDa と 80 kDa の分子量を持つタンパクの存在量が少ない傾向である。分子量 36 kDa のタンパクは Glycophorin A で、膜形成脂質 2 重層構造タンパク群の 1 つであり糖鎖の基底部分にあるタンパクである。このタンパクが減少することによって、糖鎖の機能が失われて膜安定性が低下し、赤血球の凝集が起こると考えられる。また、分子量 80 kDa のタンパクは Protein 4.1 で、糖鎖は持っていないが膜の裏打ち構造に相当する細胞骨格タンパク質群の 1 つである。このタンパクの減少も、膜安定性に関与すると考えられる。次に、異常猫ではターゲットとする分子量の位置のバンドが一様でなく多様性が認められた。これは、それぞれの検体の病態の差異による影響と推測される。一方、血漿タンパク分析では、凝集と非凝集を比較すると泳動像の明確な差異はなかった。このことから、血漿タンパクは赤血球凝集には関与しないことが示唆される。しかし、正常と異常を比較すると、約 38 kDa の位置のバンドが異常では共通して明らかに正常よりも濃染されている。つまり、病気の猫は 38 kDa の分子量を持つ血漿タンパクが著しく増加している傾向が示された。

今後は、質量分析やウエスタンブロット法などを用いて、赤血球膜および血漿成分のターゲットとするタンパクを同定する予定である。また、今回は猫を検体として実験を行ったが同様に犬についても調べていきたい。さらに、猫および犬の赤血球凝集と病態の関連性についても調査する予定である。