

マイクロ2次元電気泳動法によるパラコート投与ラット およびウサギの血漿アンチプロテアーゼの分析

田中 雅樹¹, 坂口 和子¹, 鈴木 潤¹, 赤堀 文昭²

¹麻布大・環境保健・健康化学, ²麻布大・獣医・薬理学

目的

臓器線維症の発現メカニズムの解明はいまだ成されていない。そこで、生体内のコラーゲン増加に関与しているアンチプロテアーゼ（主に α_1 antitrypsin : α_1 AT, α_2 macrogloblin : α_2 M）の変動とその生物学的意義を病態学的立場から明らかにすることを目的にする。また、パラコート（PQ）はヒトやサル、イヌ、ラット等に誘発肺線維症を誘発し、ウサギやハムスターには誘発させない。この動物種差の感受性の違いからアンチプロテアーゼ（ α_1 AT, α_2 M）を proteome 解析の面から追求することで臓器線維症発現メカニズムの解析へアプローチする。

本研究はその第一段階として、正常なヒトとラットとウサギの血漿中の α_2 M と α_1 AT について、変性剤を用いないマイクロ2次元電気泳動法（以下、M2D-PAGE）を用いて、その局在を検討した。さらにPQを投与したラットとウサギの血漿中の α_2 M と α_1 AT の動態を病態学的立場から観察した。

試料および方法

1. 試料

- 1) 正常ラットは、Slc : Wistar 雄ラット（6週齢）を用いた。また、PQラットは、PQ 7 mg/kg を雄ラット（6週齢）111匹に6～9日間毎日皮下投与し、体重の減少が2日間連続して認められた時点で中止した（文献1）。投与後10日（投与日を0日）にPQ処置ラットは体重減少後生存した

- 群（I群）、体重の減少と亜急性中毒徴候を示し、死の転帰をとると判断し、切迫屠殺した群（II群）、および一般状態と体重の変化のみられなかった群（III群）に大別したものを試料とした。
- 2) 正常ウサギは JW-NIBS（4ヶ月齢）を用いた。また、PQウサギは、各群4匹ずつ用いた。PQ投与群にはPQ 10 mg/kg, 対照群には生食 0.2 mL/kg をいずれも2日に1回、6回皮下投与し（初回投与日を0日として、投与11日目に屠殺）、同一個体より経時的に血液試料を採取したものを試料とした。

2. 実験方法

試料の血漿を各々 1.5 μ L を用い8検体同時にM2D-PAGE（文献2）に従い泳動を実施した。またタンパク質スポットの同定は、Western blot 法によりヒト特異抗血清を用いて同定した。スポット解析にはフォトショップソフト、2-D full ソフト（ベルトールドジャパン社）を用いた。

結果および考察

電気泳動パターン上での血漿中 α_2 M, α_1 AT の同定は、CBB 染色したものと免疫化学的染色をしたものを比較して行った。免疫化学的染色の結果、 α_2 M の分子種が、ヒトでは1つ、ラットには4つの isoform が観察され、ラットでは分子量の大きい順に α_2 M-1 (MW 720 kDa, pI 5.4 ~ 5.9), α_2 M-2 (MW 340 kDa, pI 4.1), α_2 M-3 (MW 290 kDa, pI 4.2), および α_2 M-4

(MW 180 kDa, pI 4.1)であった。ウサギには分子量のわずかに異なる2つの isoform が観察され、分子量の大きい順に α_2M-1 , α_2M-1' とした。 α_1AT は、ヒトで2つのスポット、ラットでは1つのスポットが確認されたが、ウサギの α_1AT は同条件では観察が不可能であった。そこで、試料量を増やし実験を行ったところ検出可能となったことから、量的に少ないことが考えられた。

PQ 投与ラットのタンパク質スポットにおいて、亜急性PQ中毒によって死の転帰をとったラットの α_2M-1 は顕著に増加したが、一方、体重が回復後、生存したラットでは α_2M と α_1AT の減少が観察された。

PQ 投与ウサギでは、亜急性毒性で α_2M-1 は、3日目から7日目に増加し、その後11日目に減少傾向を示した。なかでも、体重が回復したウサギの初期に α_2M-1 が増加し、 α_2M-1' は、11日目に著しく増加した。また、投与群すべてのウサギで11日目に α_2M-1' の増加傾向が認められた。

これらのことより、 α_2M 分子種のなかでも α_2M-1 はウサギおよびラットのいずれにおいても、急性相タンパク質としての役割を果たしていることが示唆され、ラットにおいては α_2M の分子種がPQ投与後、回復期から肺線維化へ関与していることが伺われた。今後はさらに、 α_2M の各分子種の分子特異性の役割を明らかにする必要があると考えられる。

現在、PQ 投与後のラットおよびウサギの α_2M と α_1AT の各々の isoform についての定量を行い病態解析を進めている。

参考文献

1. Akahori F, Oehme FW. 1983. Inhibition of collagen synthesis as treatment for paraquat poisoning. *Vet Hum Toxicol* 25: 321-327.
2. Manabe T, Takahashi Y, Higuchi N, Okuyama T. 1985. Identification map of human plasma protein: Micro two-dimensional electrophoresis followed by multiple immunoreplica technique. *Electrophoresis* 6: 462-467.