

演題名 血清トランスサイレチンの分子変性の検討

氏名 ○見谷敦司¹⁾、滝脇正貴¹⁾、開 美絵子¹⁾、羽生 登²⁾、山内一由³⁾、本田孝行^{3) 4)}、日高宏哉¹⁾

所属 1) 信州大学医学部保健学科、2) JA 長野厚生連篠ノ井総合病院、3) 信州大学病院臨床検査部、

4) 信州大学医学部病態解析診断学

【目的】

血清トランスサイレチン(TTR)は、主にサイロキシン(T4)の輸送とレチノール結合蛋白(RBP)と複合体を形成してビタミン A の輸送に関与する。TTR 分子は分子量約 55KDa の 4 量体蛋白であり、肝臓などで合成される。臨床的には急性相反応物質として炎症の指標や栄養アセスメントの短期蛋白代謝の指標に利用される。TTR はこのような重要な生理的機能を持つが、アミロイドーシスの原因蛋白の 1 つとなる。家族性ポリニューロパチー(FAP)では、血清 TTR の一塩基変異体がアミロイド蛋白の前駆体蛋白であり、また全身性老人性アミロイドーシスの前駆体蛋白はアミノ酸置換の認められていない野生型 TTR あることが報告されている。しかし、TTR のアミロイド蛋白への変性の機序は明らかでない。

今回、血清 TTR の還元剤処理による TTR 分子の変性およびその性質の変化を等電点電気泳動、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および質量分析で検討した。

【材料と方法】

1. 分析試料はヒト血清を用いた。
2. 血清 TTR の分子表現型の分析は、平板等電点電気泳動法およびラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用い、イムノブロッティング(抗 TTR 抗血清:ニットーポー)により TTR を検出した。
3. 血清 TTR の分子質量は、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)を用いた。
4. TTR の精製: 血清 TTR の精製は、DEAE-Sephacel イオン交換ゲルクロマトグラフィーと Blue-Sepharose アフィニティクロマトグラフィーを用いた。

5. 血清中の含硫黄アミノ酸は、羽生らの蛍光色素 SBD-F を用いた SBD-F プレカラムラベル HPLC 法を用いた。

【結果】

1. 血清 TTR は等電点電気泳動で、pH4.5 から 5.5 の領域で 4 本のバンドが検出された。TTR をジチオスレイトール(DTT)またはシステインなどの還元剤による処理で、TTR の IEF パターンは変化し、SDS-PAGE により 2 量体さらに単量体が形成されたことを認めた。
2. 精製 TTR のシステイン塩酸塩(Cys-HCl)の処理により、等電点および分子量に通常バンドより陽極および高分子の変性バンドが検出された。さらに、一部は電気泳動ゲルの塗布原点に沈着していた。このとき、質量分析では TTR は Cys が結合したままであった。

【考察】

TTR 4 量体の単量体への変性は、DTT やシステインなどの還元剤で引き起こされるが、システイン塩酸塩(Cys-HCl)の処理により TTR は著しい分子の変性が引き起こされ、次いでは分子が凝集することが認められた。これらの反応は生体内で引き起こされるかどうかは不明であるが、生体内で局所的または長時間酸性条件にさらされることにより、TTR の分子構造の変性が引き起こされ、アミロイド生成性の単量体が生成される可能性がある。

【結語】

システイン化された TTR は、システイン塩酸塩による処理により、著しい分子の変性と性質の変化を認めた。