

平成27年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	肉用牛の脂肪交雑度合を予測するバイオマーカーの開発を目的とした血清中酸化修飾タンパク質の定量法の確立	
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部 遺伝子工学科 永井 宏平 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

我が国においては、筋肉内脂肪量（霜降り、さし）が牛肉の値段に最も強い影響を与える。以前に我々は筋肉内脂肪量の多い牛の筋肉中で酸化ストレスが増大することを明らかにした。そこで本研究では、血清中の酸化修飾タンパク質が筋肉内脂肪量を予測するマーカーとして使用できるかどうかを検討するための第一歩として、ウシ血清中の酸化修飾タンパク質の定量法の確立を試みた。

2. 研究経過及び成果

本研究では、活性酸素種によって酸化された脂質がタンパク質と反応することで生じるある種の酸化脂質修飾タンパク質を解析対象として、ウシの血清中における本酸化修飾タンパク質を Western blot 法や LC-MS/MS 法で検出・定量する方法の確立を試みた。

① Western blot 法による定量法の確立

岐阜県畜産試験場より供与された牛血清を用い、血清中の HEL 修飾タンパク質を western blot 法で検出できるかどうかを検討した。血清タンパク質 5 ug を SDS-PAGE にかき PVDF 膜に転写した後に、当該酸化修飾に反応するモノクローナル抗体で検出したところ、血清中に少なくとも 2 つの酸化修飾タンパク質のバンドが検出された。これらのバンドを切り取り質量分析計で解析したところ、これらは血清タンパク質である A と B が修飾を受けたものであることが分かった。

我々は現在、本方法を用いて、筋肉内脂肪の多い牛のグループと少ないグループでのタンパク質 A と B の酸化修飾体の定量比較を行い、バイオマーカーとしての評価を進めている。

② LC-MS/MS 法による定量法の確立

岐阜県畜産試験場より供与された牛血清中のタンパク質を Trypsin によって断片化した後に、生じたペプチドを nanoLC-MS/MS (AB sciex 社製 Triple TOF5600+システム) によって解析し、網羅的に MS/MS を取得した。得られた MS/MS スペクトルをデータベース検索ソフト Protein Pilot (AB sciex 社) で解析した。その結果、全体で 1000 個以上のタンパク質が同定され、そのうち、100 個程度のタンパク質が、解析対象として酸化修飾を受けていることが判明した。

同定結果を精査したところ、いくつかのタンパク質については、酸化修飾を受けている割合を、(酸化修飾ペプチドのピーク面積 / 未修飾ペプチドのピーク面積) という形で評価することが可能であることが明らかとなった。

このように、LC-MS/MS を用いた方法では、一度の測定で多数の酸化修飾タンパク質の定量をすることが可能であることが判明した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究で開発したウシの血清中の酸化修飾タンパク質の定量法を用いて、当該酸化修飾タンパク質のウシの脂肪交雑の予測マーカーとしての評価を進める。

現在、解析対象とする血清は十分な数集まっているため、これらを数百検体～数千検体の規模で解析し、バイオマーカーとしての価値を評価し、2年以内に論文投稿を行う。また、畜産の現場で利用可能なレベルのマーカーを発見した場合には特許を取得し、臨床検査機器のメーカーなどと共同で事業化を目指す。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)