

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580156

研究課題名（和文） 皮膚のニュートリプロテオミクスを用いた栄養状態診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of the diagnostic technique of nutritional status with the nutriproteomics of the skin

研究代表者

大石 祐一（Yuichi Oishi）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00313073

研究成果の概要（和文）：

簡便で誰にでもでき、さらに痛みの少ない栄養状態診断の方法を開発すべく、表皮のタンパク質に着目した。そのために、皮膚のニュートリプロテオミクス法を確立し、マーカーとなりうるタンパク質を見出すことを目的とした。本研究の成果として、アミノ酸バランスの良いタンパク質食、アミノ酸バランスの悪いタンパク質食および無タンパク質食を1週間摂取させたラット背部表皮タンパク質で変動のあったタンパク質を、Ras-related protein Rab-6A, NADH 脱水素酵素, -エノラーゼを含む21種類見出した。

研究成果の概要（英文）：

I focused on the proteomic analysis of epidermal proteins because of developing a new clinical examination technique to evaluate a nutrition status. I investigated the change in epidermal proteins in rats fed diets with different protein quality and quantity (casein diet, gluten diet and protein-free diet) using 2- two-dimensional electrophoresis (2-DE). This 2-DE result showed that 21 types of proteins underwent a change by the diets with low protein quality containing Ras-related protein Rab-6A, NADH dehydrogenase, -enolase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：二次元電気泳動、ニュートリプロテオミクス、表皮タンパク質、MALDI-TOF-MS

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は高齢社会となり、医療費、介護費用の削減は大きな課題である。医療費削減の1つの方法として、栄養状態を良好に保つことがある。栄養状態の悪化は、各種器官・臓器の機能低下や機能障害をおこし、さらに褥瘡を罹

患させる(Am.J.Epidemiol140, 876-888(1994))。この褥瘡は、患者にとって、また看護の者にとっても、非常に厄介であり、予防についても盛んに栄養面から検討されている。このような現状において、摂食によって体内の状態がどのようになったのかを判断することは、非常に重要

である。

現在の方法は、血液を採取し、血液中の様々な因子の変動から栄養状態を検査することが行われている。しかし、幼児や高齢者にとっては、体力的に非常に負担であり、また医師にしかできない方法である。さらに、血液からの感染リスク、医療廃棄物など様々な問題も抱えている。

2. 研究の目的

本研究では、簡便で誰にでもでき、さらに痛みの少ない栄養状態診断の方法を開発すべく、皮膚、特に表皮のタンパク質に着目した。表皮の成分は、簡単に接着テープなどで採取でき、これらを運搬輸送することは簡単である。すなわち、自宅でサンプルを採取し、専門機関で解析し、結果を知らせることができれば、幼児・高齢者にも負担をかけることなく、栄養状態を判断できることになる。さらに血液と異なり、感染性も少なく、また、医療廃棄物に関しても血液以上に神経質になる必要はない。この方法を確立するためには、鍵となるタンパク質を表皮から見出すことが必要となる。

栄養状態の変動を確実に検討するためにはタンパク質レベル、すなわちニュートリプロテオミクスでの検討が適している。そこで、本研究の目的は、皮膚、特に表皮でのニュートリプロテオミクスを行い、栄養状態診断法に適したタンパク質を見出し、表皮タンパク質を用いた栄養状態診断法を確立することである。確立した方法を用いて、低タンパク質栄養条件下で変動する表皮タンパク質の探索をラットを用いて検討した。試験群には、アミノ酸スコア 100 のカゼイン摂食群の他に、タンパク質源としてアミノ酸スコアが 44 の小麦粉に由来したグルテンを摂食させた群と、タンパク質源をすべて除いた食餌をラットに与えた群を設けた。

3. 研究の方法

(1) 表皮プロテオーム手法の検討

二次元電気泳動を行う際、多くのタンパク質を分離するためには、サンプルの前処理が重要である。サンプルの前処理として、タンパク質の可溶化と夾雑物の除去、還元・アルキル化について検討した。

タンパク質の可溶化方法は、尿素 (7~9M)・チオ尿素 (0~2 M) の濃度の変更をすることによって、タンパク質を最も可溶化できる条件を検討した。一般的なタンパク質以外の夾雑物の除去方法は、トリクロロ酢酸 (TCA) あるいはアセトンによるタンパク質の沈殿法、これら二つを組み合わせた TCA/アセトン沈殿法があるが、これらの沈殿手

法のうち、夾雑物を確実に除去でき、さらにタンパク質のロスが最も少ない手法を検討した。

タンパク質の還元・アルキル化法は、還元剤としてジチオスレイトール (DTT) とトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) の二種類からの選択、添加条件、添加濃度を検討した。添加濃度は、一般に二次元電気泳動で使用する還元剤の濃度が 10~80 mM のため、0~100 mM 間で濃度を決定した。アルキル化剤は、ヨードアセトアミド (IAA) と 2-ビニルピリジン (VP) の二種類からの選択、添加条件、添加濃度を検討した。添加濃度は 0~100 mM 間で検討した。また、等電点電気泳動後の SDS 平衡化時に還元・アルキル化処理を行うため、そこでの還元剤とアルキル化剤の添加条件についても検討した。

(2) タンパク質栄養状態で変動する表皮タンパク質の網羅的解析

実験動物には 6 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。一週間の馴化飼育後、3 群 (コントロール群 (C 群)、グルテン群 (G 群)、無タンパク質食餌 (PF 群)) に群分けした。C 群には AIN-93G に準じた飼料を与えた。G 群には、タンパク質源をグルテンに置換した飼料を与え、PF 群には、タンパク質源を除いた飼料を与えた。二週間の試験飼育を行い、表皮と血清を採取した。表皮は後背部から全皮膚を採取後、真皮と乖離した。表皮タンパク質の可溶化及び夾雑物の除去、還元・アルキル化は、(1) で確立した方法で処理した。等電点電気泳動は Immobiline Dry Strip pH3-10NL, 18 cm (GEヘルスケアジャパン株式会社) を使用した。SDS-PAGE はアクリルアミド濃度を 12.5% とした。タンパク質の可視化は銀染色法により行った。

(3) MALDI-TOF-MS を用いたタンパク質の同定

マトリックス試薬 (MALDI-MS キャリブレーションキット) と脱塩処理したサンプルを混合し、AXIMA 用サンプルプレート 384 に添加後、MALDI-TOF-MS AXIMA Performance (株式会社島津製作所) に供した。 Mascot 検索を実行し、Protein Score が 51 以上のものを有意差ありとして、タンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 表皮プロテオーム手法の確立

表皮タンパク質の可溶化条件は、尿素 7 M、チオ尿素 2 M 添加で多くのタンパク質を溶解することができた。タンパク質以外の夾雑物除去方法はアセトン沈殿法を用いた。TCA 沈殿法では、TCA 由来のイオン性荷電物質が残存し、等電点電気泳動を妨げた。また、TCA/アセトン沈殿法では、TCA 由来のイオン性荷電物質を除去できたが、作業工程が多いため、タンパク質のロスが起きた。アセトン沈殿法は、荷電物質も残存せず、作業工程も

少なく、タンパク質のロスも少なく夾雑物を除去できた。等電点電気泳動前のタンパク質の還元処理において、TCEPの場合、酸性の等電点を持つタンパク質の還元が十分に行われず、タンパク質スポットの単離が困難であった。そのため、還元剤はDTTを使用した。使用濃度は60 mM、添加条件はサンプル溶解時からの添加が、最もタンパク質スポットの単離に有効だった。アルキル化処理において、アルキル化剤の種類や濃度に関係なく、添加と無添加に差が認められなかった。SDS 平衡化時の還元剤は、DTTを10 mg/ml 添加することが、最もタンパク質スポットの単離に有効だった。アルキル化剤として、VPの使用は、銀染色をする際のバックグラウンドを上昇させるため、IAA使用が好ましかった。また、IAA添加濃度は、25 mg/ml が最もタンパク質スポットの単離に有効だった。

以上より、以下で行う実験での表皮タンパク質の前処理は、尿素7 M、チオ尿素2 Mを含む溶解溶液にて表皮タンパク質を抽出後、アセトン沈殿により夾雑物を除去し、60 mM DTTによる還元を行うこととした。この際アルキル化剤は未添加とした。また、SDS-PAGE 前の SDS 平衡化時の還元・アルキル化は DTT10 mg/ml、IAA25 mg/ml の条件下で行うこととした。

(2) タンパク質栄養状態で変動する表皮タンパク質の網羅的解析

試験飼育3日目以降にC群に比してG群、PF群で体重が有意に低値を示した。G群は試験飼育後の体重増加はほとんど認められず、PF群は試験飼育開始から体重は減少した。また、血清アルブミン濃度は、C群に比してPF群で有意に低値を示したが、G群では有意差が認められなかった。このことより、PF群は低タンパク質栄養状態だと判断した。表皮タンパク質の二次元電気泳動の結果、C群(図1)に比して、G群(図2)で有意に変動した表皮タンパク質は8種類、C群に比してPF群(図3)で有意に変動した表皮タンパク質は18種類、C群に比してG群・PF群両方で有意に変動した表皮タンパク質は4種類認められた(図4)。また、G群と認められた。よって本方法では30種類のタンパク質が栄養状態で変動することが認められた。さらにこのうち、9種類は、副腎皮質ホルモン誘導体デキサメタゾン投与により変動したので、21種類のタンパク質が栄養状態で変動することがわかった。

(3) MALDI-TOF-MSを用いたタンパク質の同定

タンパク質栄養条件の違いによって特異的に変動した21種類の表皮タンパク質のうち、3種類を同定した。それぞれ Ras-related protein Rab-6A(図5)、NADH dehydrogenase(図6)、-enolase(図7)であった。Ras-related protein

Rab-6Aは、C群に比してG群とPF群で低値を示した。Ras-related protein Rab-6Aは、ゴルジ体やトランスゴルジネットワークに存在し、ゴルジ体から小胞体に向かう膜移動を制御する役割を示すタンパク質である。本タンパク質はC群に比してG群とPF群で有意に低値を示した。

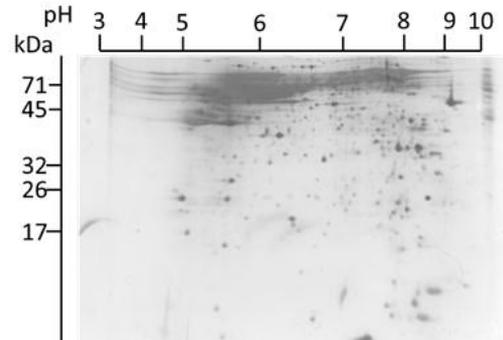


図1 カゼイン摂食群による表皮タンパク質の二次元電気泳動



図2 グルテン摂食群による表皮タンパク質の二次元電気泳動

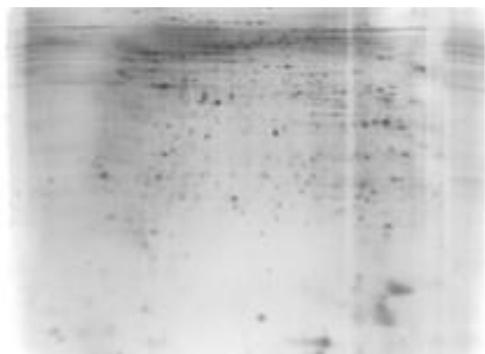


図3 無タンパク質摂食群による表皮タンパク質の二次元電気泳動

Ras-related protein Rab-6Aは、生体内での活性化プロセスとエフェクターの種類に関する研究が

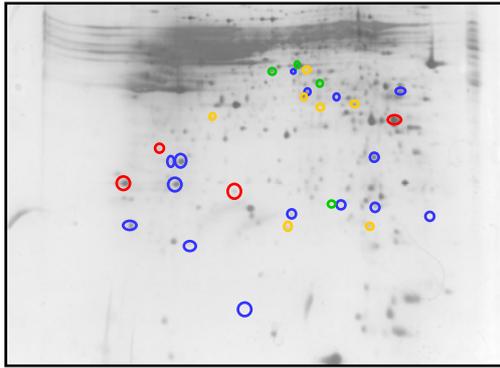


図 4 各摂食群間で有意差のある表皮タンパク質の二次元電気泳動

緑はカゼイン食群とグルテン食群で有意差のある表皮タンパク質、青はカゼイン食群と無タンパク質食群で有意差のある表皮タンパク質、黄はグルテン食群と無タンパク質群間で有意差のある表皮タンパク質、赤はカゼイン食群と他の2群間で有意差のある表皮タンパク質

主に行われているタンパク質である。しかし、現在 Ras-related protein Rab-6A 発現量の変化を調べた研究は行われていないため、本研究が Ras-related protein Rab-6A の生体内での役割を解明する手がかりとなる可能性が示唆された。

NADH dehydrogenase はミトコンドリアの内膜に存在し、電子を NADH から補酵素 Q (CoQ) へ転移させる酸化還元酵素である。本酵素は、C 群に比して G 群と PF 群で有意に高値を示した。NADH dehydrogenase の増加については、Insulin-like-growth factor- (IGF-) が関与していることが考えられた。食餌タンパク質は血中の IGF- 量に大きな影響を及ぼすことが知られており、グルテン食や無タンパク質食摂取で、血中 IGF- 濃度が減少することが報告されている (Br. J. Nutr., 63, 521-534 (1990))。また、血清 IGF- 濃度は加齢に伴い、減少することも報告されている (J. Clin. Endocrinol. Metab., 80, 3209-3222 (1995))。Juan らは、若齢ラットと比較して高齢ラットで肝臓中の NADH dehydrogenase 発現量が増加すること、高齢ラットに IGF- を投与することによって NADH dehydrogenase 発現量が若齢ラットと同程度まで減少することを報告している (Endocrinol., 149, 2620-2627 (2008))。このことより、NADH dehydrogenase 発現量の変化は、グルテン食や無タンパク質食摂取による IGF- 量の減少による影響である可能性が示唆された。IGF- は低栄養で減少することから、NADH dehydrogenase は、低栄養の指標としての利用価

値があることが考えられた。しかし、IGF- 発現量は、低栄養だけでなく、加齢や肝硬変などでも減少を示す。そのため、NADH dehydrogenase の変動は、低栄養に対して特異的ではない可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

-enolase は細胞室内に局在し、解糖系の 2-ホスホグリセリン酸がホスホエノールピルビン酸に変換される反応を触媒する酵素である。本酵素は C 群に比して、G 群で有意に低値を示し、PF 群で減少傾向を示した。-enolase は低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor-1、HIF-1) によって発現量を制御されていることが知られている (J. Biol. Chem., 269, 23757-23763 (1994))。また、肝臓中 HIF-1 濃度は、エネルギー制限食をラットに与えたとき、減少することが報告されている (Biogerontol., 6, 27-37 (2005))。このことから、表皮中の -enolase 減少は、HIF-1 による制御である可能性が推察された。また、

-enolase は発癌により発現量が増加することも近年明らかになっており、治療やバイオマーカーへの利用が注目されている (FEBS J., 278, 1064-1074 (2011))。そのため、表皮中の -enolase が発癌により影響を受けるか否かを明らかにすることは、タンパク質栄養の診断マーカーとしての利用価値を検討するために重要な課題になると考えられる。

これら 3 種類のタンパク質は、栄養条件以外でも変動を示すタンパク質や生体内での変動が未だ研究されていないタンパク質であった。そのため、単独では栄養状態の診断マーカーとして利用できないが、複数のタンパク質を組み合わせることにより、栄養状態の診断マーカーとして利用できる可能性が考えられた。

本研究ではタンパク質栄養条件以外の比較検討について、デキサメタゾン投与による影響を検討したところ、9 種類のタンパク質が栄養条件でも変動した。しかし、表皮タンパク質は、今回検討した要因以外にも変動する。例えば、火傷や UV 照射で表皮中のタンパク質発現量に変化が認められることや、強皮症患者では、表皮中のケラチン量が変動することが知られている (Rheumatol., 47, 1754-1760 (2008))。また、動物性高脂肪食の摂取は、ラットの表皮中のセラミド量を減少させることが報告されている (Mol. Nutr. Food Res., 55, S186-S192 (2011))。このことは、セラミド合成や分解に関与する酵素の発現量が増加している可能性が考えられる。したがって、摂取する食事の質によっても表皮タンパク

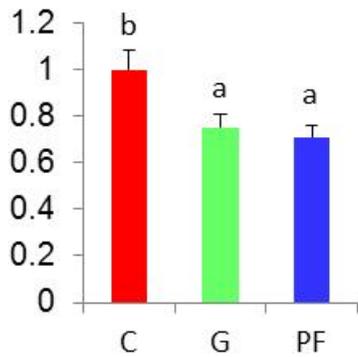


図5 食餌の違いによる表皮 Ras-related protein Rab-6A の変動

C;カゼイン摂食群, G;グルテン摂食群, PF;無タンパク質摂食群
異符号は、 $p < 0.05$ で有意差あり。

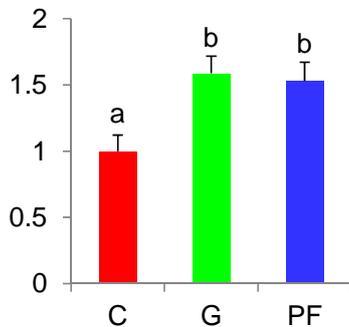


図6 食餌の違いによる表皮 NADH dehydrogenase の変動

C;カゼイン摂食群, G;グルテン摂食群, PF;無タンパク質摂食群
異符号は、 $p < 0.05$ で有意差あり。

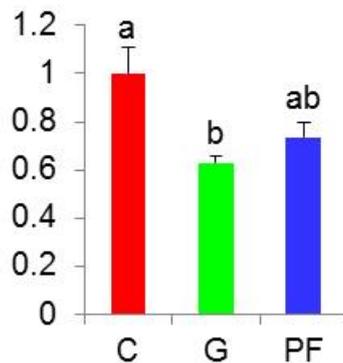


図7 食餌の違いによる表皮 -enolase の変動

C;カゼイン摂食群, G;グルテン摂食群, PF;無タンパク質摂食群
異符号は、 $p < 0.05$ で有意差あり。

質の発現量に変動が生じる可能性が考えられる。そのため、他の環境要因の条件下で表皮プロテオームを行い、それらの要因のみで変動するタンパク質の情報を蓄積し、タンパク質栄養条件の違いのみ特異的に変動する表皮タンパク質を明らかにすることが今後の課題である。

また、本研究で変動を調べた表皮タンパク質は、分子量が約 10~50 kDa のもので、全て細胞内タンパク質であった。表皮中の高分子のタンパク質には、ケラチンやインテグリン、フィブロネクチンなど細胞外に存在するタンパク質も数多く存在し、今回これらのタンパク質の分離を行うことができなかった。今後、アクリルアミド濃度を変えて SDS-PAGE を行うことで、高分子の細胞外タンパク質の栄養状態での変動を調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

山根拓実、服部一夫、大石祐一, Adiponectin promotes hyaluronan synthesis along with increases in hyaluronan synthase 2 transcripts through an AMP-activated protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent pathway in human dermal fibroblasts., *Biochemical and Biophysical Research*, 査読あり, 415, 2011, pp.235-238
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.093.151

山根拓実、服部一夫、大石祐一, A high-fat diet reduces ceramide synthesis by decreasing adiponectin levels and decreases lipid content by HMG-CoA reductase and CPT-1 mRNA expression in the skin., *Molecular Nutrition and Food Research*, 査読あり, 55 巻, 2011, pp.S186-S192
DOI:10.1002/mnfr.201100144

山根拓実、服部一夫、大石祐一, 滝田聖親, High-fat diet reduces levels of type I tropocollagen and hyaluronan in rat skin. *Molecular Nutrition and Food Research*, 査読あり, 54 巻, 2010, pp.S53-S61
DOI:10.1002/mnfr.20100022

〔学会発表〕(計5件)

山根拓実、服部一夫、大石祐一, アディポネクチンが皮膚中ヒアルロンン合成に及ぼす影響、日本食品科学工学会、2011年9月9日~11日、東北大学
山根拓実、鈴木真里菜、松川寛紀、服部一夫、

大石祐一、ラットの皮膚に及ぼす食餌中油脂原の影響、日本栄養・食糧学会、2011年5月13日～15日、御茶ノ水女子大学

藤田 尚子、岡田歩美、町田千代美、服部一夫、大石祐一、タンパク質栄養条件の違いにより変動する表皮タンパク質のプロテオーム解析、日本農芸化学会、2011年3月25日～28日、京都女子大学

山根 拓実、佐藤 ますみ、坂本 真美、服部 一夫、大石 祐一、Adiponectin が皮膚中 I 型コラーゲン合成に及ぼす影響、日本農芸化学会、2011年3月25日～28日、京都女子大学

村松 愛美、山根 拓実、服部 一夫、大石 祐一、表皮角化細胞における TGF- β 1 のセラミド合成への影響、日本農芸化学会、2011年3月25日～28日、京都女子大学

山根拓実、服部一夫、大石祐一、滝田聖親 Adiponectin が I 型コラーゲンおよびヒアルロン酸合成酵素 2 遺伝子発現に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、2010年5月21日～23日、長崎ブリックホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 祐一 (Yuichi Oishi)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00313073

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：