

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 4 月 27 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21500690

研究課題名（和文）バイオマーカーとしての MCT4 定量系構築への試みと
その制御因子の解明

研究課題名（英文）Experimental design of ELISA for quantitative MCT4 analysis
and an investigation of signal transduction cascades

研究代表者

飯塚 健治（IIZUKA KENJI）

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：10344467

研究成果の概要（和文）：

Monocarboxylate transporter (MCT) 4 の C 末端を認識する抗 MCT4 ポリクローナル抗体、並びに MCT4 中間部のアミノ酸配列の合成ペプチドを抗原として作成された抗 MCT4 ポリクローナル抗体を調整し、単抗体 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法、およびサンドイッチ ELISA 法を用いた測定系を構築した。

研究成果の概要（英文）：

Two types of antibodies, anti-monocarboxylate transporter (MCT) 4 polyclonal antibody recognizes C-terminal end of MCT4 and the anti-MCT4 polyclonal antibody created by considering synthetic peptide of the intermediate part of MCT4 molecule as an antigen, were prepared. Using these antibodies, we constructed both a single and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for quantification of MCT4 concentration in serum and/or culture medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

(1)現状

ライフスタイルの欧米化に伴って肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症、動脈硬化性疾患等の生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿り、これらの克服は国民医療の観点からも極めて重要な課題となっている。特に、動脈硬化症を初めとする様々な全身疾患の前駆状態と

位置づけられているメタボリックシンドロームの発症メカニズムの解明と新しい治療法の確立は、予防医学の観点からも極めて重要な課題であり、これまでに例のない高齢化社会を迎えつつある我が国において国民の健康、医療、福祉の向上の観点からその対策は急務である。

(2)メタボリックシンドロームと糖代謝に係

わる中心臓器としての骨格筋
糖質は食事などで摂取した総量の80%以上が骨格筋で処理されるとされており、糖尿病(2型)は骨格筋の糖、脂質代謝機能異常が発症に深く関わっていると考えられている。骨格筋は生体最大の臓器であり、運動、エネルギー消費、糖脂質代謝に重要な役割を果たす。骨格筋量とその構成成分は、骨格筋の機能発現に重要であるが、これは身体の活動量や環境、種々の病態により変化することが知られており、骨格筋の代謝機能を高める運動療法は、糖尿病の予防および治療に効果的であることが良く知られている。

(3) 乳酸と monocarboxylate transporter (MCT)

細胞内に存在する乳酸は、エネルギー代謝(解糖)の課程で生成され、細胞内pHに大きな影響を与える事から、嫌気性代謝においては細胞外へ移送される一方、好氣的条件ではエネルギー源として積極的に細胞内へ取り込まれることが明らかにされている。これら乳酸の細胞内外への移送にはMCTが重要な関与しており、これまでに骨格筋において、MCTのアイソフォームの一つであるMCT4(MCT3-M)が乳酸の細胞内外の移送に中心的な役割を果たしていることが明らかにされていたが(J. Biol. Chem. 1998; 273: 15920-15926. Lactic Acid Efflux from White Skeletal Muscle Is Catalyzed by the Monocarboxylate Transporter Isoform MCT3)、近年動脈硬化病変においてもこのMCTの発現が局所で増加することが明らかにされた(Circulation. 2005; 112: 1353-1361. Inactivation of Monocarboxylate Transporter MCT3 by DNA Methylation in Atherosclerosis)。

(4) 科学研究費(萌芽研究)で得られた結果

以前我々が、血液中にMCT1が存在する事を見出した(Mol Cell Biochem. 2003 Jun;248(1-2): 217-23. A 44-kDa of protein identical to the N-terminal amino acid sequence of MCT1 in human circulation)結果から、萌芽研究(平成20年終了予定)の着想を得て、さらなる検討を行った結果、後述のごとく

血液中にMCT4が存在する可能性が高く、さらにこの血中MCT4の変化が、末梢組織のMCT4の動向や、生体のエネルギー代謝の一部を反映する可能性が明らかになった。

2. 研究の目的

上記の結果から、全身性の代謝疾患の病勢や治療の状態を把握することができる新しいバイオマーカーとして、血液中のMCT4を利用する可否についてさらなる検討を行う価値があると考えた。

そこで本研究では、研究対象としてエネルギー代謝の首座としての骨格筋細胞に注目して、MCT4がメタボリックシンドロームの代表的な病的環境である高血糖を再現した条件下、ならびにリハビリテーションとしての骨格筋運動によってどの様な動向を示すかについてその細胞内情報伝達系を含めて検討し、併せて血中MCT4を検出する方法を模索し、バイオマーカーとしての機能を具備するか否かについてさらなる詳細な検討を行うことを計画した。

3. 研究の方法

(1) MCT4の変動を制御する

分子生化学的背景の検討

上述のごとく、immunoblotやPCRを用いてラットL6骨格筋細胞におけるMCT4の動向を検討したが、その変動を引き起こす細胞内情報伝達系や関係する分子については現時点ではまったく不明である。そこで本研究では、これらのMCT4の増加や減少がどの様なメカニズムによって引き起こされているのかを中心に、その制御に係わる分子の探索を行うことを計画している。

(2) MCT4蛋白の精製分離

ヒト骨格筋細胞よりmRNAを抽出し、これよりMCT4のcDNA全長を逆転写酵素を用いて作製する。このcDNAをベースとして、pGEX蛋白発現システムを用いてMCT4の全長蛋白を大腸菌で作成し、分離精製する。これは、次年度に計画しているポリクローナル抗体作製へと引き継がれる。また本プロセスで作成するMCT4蛋白は、将来の測定系でのスタンダード(検量線)用標準品としての性格を併せ持つ。

(3) MCT4ポリクローナル抗体の

作製

前年度において大腸菌で作成し、分離精製し

た MCT4 を抗原として家兎に免疫し、複数種 (3 種類以上) のポリクローナル抗体を作成する。

本件で作製される抗体は、将来的に MCT4 測定系を組み立てる場合の中心を成すものである。複数種の抗体を作製する理由として、MCT4 蛋白上の認識部位の違いにより、大きく抗体の性能が異なること、また遺伝子発現システムにより作製した全長 MCT4 蛋白の場合、自然界に存在する蛋白と高次構造が異なる可能性があり、結果的に作製した抗体が抗原との間での立体障害などの関係上 ELISA 上で作動しないケースがあることなども配慮したものである。

本研究においては、MCT4 蛋白の作製から抗体作製までの一連のプロセスが最も時間と労力を要する作業と予想される。特に、予定している蛋白発現システムでは蛋白が発現しないケースも考えられ、様々な発現システムや培養条件の設定が必要になる可能性があると考えられる。さらにこれらによっても目的の MCT4 蛋白全長が作製出来ない場合は、ペプチドフラグメントを人工的に複数作製し、これらを抗原として抗体を作製するが、この場合には蛋白発現から抗体精製までの一連の作業を専門機関へアウトソーシングし、実験の継続性を維持する事を考慮している。

本申請においては、上記の抗体作製までを最終的な到達目標とするが、実験の進展によって上記で作成した抗 MCT4 抗体を用いて、血中の MCT4 を定量することができる ELISA (Enzyme Linked ImmunoSolvent Assay) 測定系を組み立てることを計画している。

4. 研究成果

(1) 検量線作製のための MCT4 蛋白質の調製

Human skeletal muscle cDNAライブラリー (Science Cell Lab. 社製) より GC-rich PCR system (ROCHE社製) を用いて MCT4 の cDNA を増幅するとともに、PURE® *in vitro* Protein Synthesis system (New England Bio Lab. 社製) のマニュアルに基づき、*in vitro*での MCT4 蛋白質発現用の template DNA を作製した。約 40 ng

の DNA を用いてキット内の酵素を用いて 37 °C で 4 時間インキュベートして、MCT4 蛋白質を反応容器内で調製した。サンプルの蛋白濃度は、BCA protein assay kit (PIERCE社製) を用いて定量した。

作製した MCT4 蛋白質は SDS-PAGE で分析し、MCT4 蛋白質が持つと想定される分子量である約 54kDa 付近にシングルバンドでシグナルが認められることを確認した。

上記の MCT4 を陽性コントロールして、これを 2 倍ずつの濃度に希釈した値と、測定系で得られた吸光度を 2 次元に配置し、各ポイントの交点が示す直線式を ELISA 法の検量線とすることで、任意の資料の吸光度から MCT4 の濃度を算出することとした。

(2) 抗体 (MCT4-TM) の作成

ヒト骨格筋細胞の MCT4 の遺伝子配列を基に得られた 15 個のアミノ酸配列を合成し (シグマアルドリッチジャパン社製)、これを家兎に免疫して 49 日後に抗 MCT4 抗体を含む血清を得たのち、この中から IgG 分画を精製し (Melon Gel IgG spin purification Kit; PIERCE社製)、以後これを MCT4-TM とした。続いて、上記の MCT4-TM 抗体、並びに C 末端配列を抗原として作成された goat を宿主とする市販の抗 MCT4 ポリクローナル抗体 (MCT4-C) が MCT4 を実際に認識することが出来るか否かを SDS-PAGE 検証し、これら 2 種類の抗体がそれぞれヒト培養骨格筋細胞由来の MCT4 を認識出来ることを確認した。

(3) ELISA による MCT4 測定システムの構築

固相抗体 (MCT4-C) を蒸留水で 1 μg/mL とするように希釈した。この希釈溶液を、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μL ずつ加え、プレートシールで上面をシールし、室温で 2 時間静置した。次いで、固相抗体溶液を除去し、ブロッキング緩衝液 (Protein-Free Blocking Buffers; PIERCE社製) を各穴に 200 μL ずつ加え、室温で 1 時間静置した。

試料溶液 (各濃度に調整した MCT4 蛋白質) および対照溶液 (Can Get Signal, solution1 のみ; TOYOBO社製) を各穴に 100 μL ずつ加え、プレートシールで上面をシールし、4°C で一晩静置した。

次いで、試料溶液および対照溶液を除去し、各穴を 0.1% Tween-20 含有 TBS (250 μL) で 3 回洗浄した。ついで対象溶液 (Can Get Signal, solution1; TOYOBO社製) で検出用抗体である MCT4-TM を horseradish peroxidase (西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ; HRP) で標識したものを 2000 倍に希釈し、各穴に 100 μL ずつ加

え、プレートシールで上面をシールし、室温で2時間静置した。

次いで、HRP標識検出抗体溶液を除去し、各穴を0.1%Tween-20含有TBSで3回洗浄した。そして、基質溶液(1-Step Ultra TMB-ELISA; PIERCE社製)を各穴に150 μ Lずつ加え、25分間静置した。

次いで、各穴に2N硫酸を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、30分以内に吸光度(450nm)を測定した。

これらの方法の下でMCT4-CまたはMCT4-TMのいずれか1つの抗体を用いて行った単抗体ELISA法による結果をそれぞれ図1および図2に、また2種類の抗MCT4抗体を用いたサンドイッチELISAの結果を図3に示す。

(4) 新規性・独自性

ELISA法の樹立において目的蛋白であるMCT4を検出するための抗体の反応性は重要な要素の一つである。これまでの検討の結果、市販されている既存の細胞膜貫通部位を認識する抗MCT4抗体を用いたELISA構築予備実験では、良好な反応性を得ることはできなかった。そこで申請者は、市販品とは異なる部位を認識することができる抗体

(MCT4-TM)を独自に作製し、これを既存のMCT4蛋白のC末端部分を認識する異種宿主に由来する抗体と組み合わせてELISAシステムを組み立てた。

(5) MCT4発現に関わる情報伝達系の検討

当該年度における今ひとつの実験計画に基づき、MCT4蛋白の挙動を制御する分子について検討を行った。これまでの報告から、MCT4は骨格筋細胞の膜上に単体で存在するのではなく、CD147との2量体を形成していることが明らかにされている。またCD147はMCT4の細胞膜上での安定性に関与している可能性があることから、ウェスタンブロットを中心とする方法を用いて運動負荷環境を擬似的に再現した環境でCD147の変化を検討したところ、細胞膜を含む細胞内CD147が圧力の負荷によって比較的短時間に変動を示す可能性が明らかになり、今後両者の関係をさらに検討する必要があると考えられた。

図1

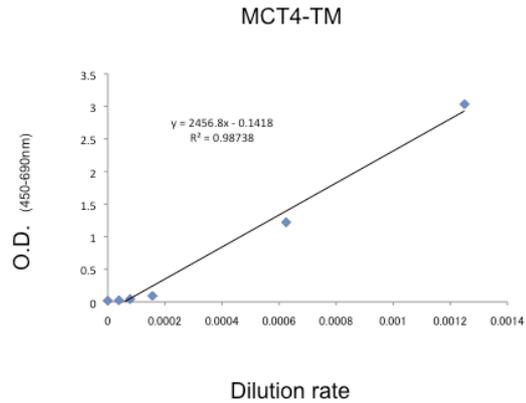


図2

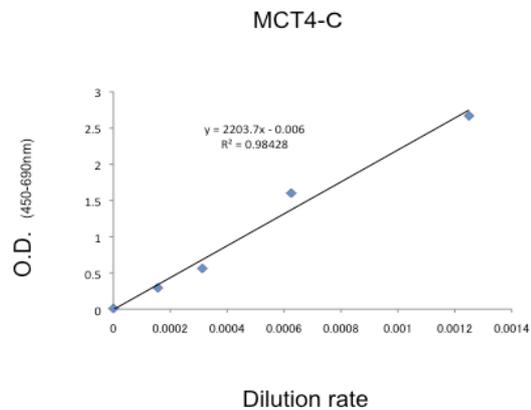
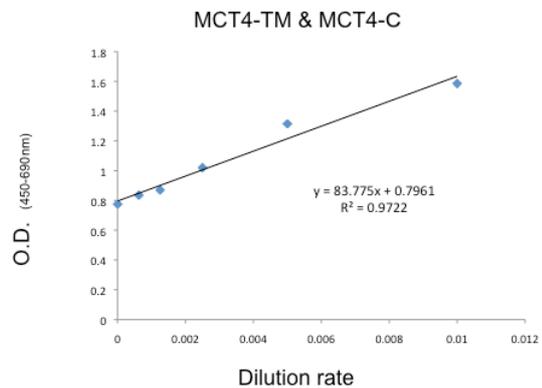


図3



(図の解説)

- 図1 MCT4-TM抗体を用いて作製した単抗体ELISA法の検量線を示す。
- 図2 MCT4-C抗体を用いて作製した単抗体ELISA法の検量線を示す。
- 図3 MCT4-TM抗体並びにMCT4-C抗体の両方を用いて作製したサンドイッチELISA法の検量線を示す。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

飯塚健治、森田憲輝、町田拓自、平藤雅彦

エネルギー代謝指標としてのMCT4の
有用性についての基礎的検討
第 38 回薬物活性シンポジウム

平成 22 年 11 月 12 日

札幌市教育文化会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 ; なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 健治 (IIZUKA KENJI)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 10344467

(2) 研究分担者

平藤 雅彦 (HIRAFUJI MASAHIKO)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号 : 20142987

町田 拓自 (MACHIDA TAKUJI)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号 : 90433424

(3) 連携研究者

なし