

2021年度 独創的研究助成費 実績報告書

2022年 3月 28日

報告者	学科名	栄養学科	職名	助教	氏名	岩岡 裕二
研究課題	ウエスタンブロット法によるプロアントシアニジン-血中タンパク質複合体の高感度検出法の検討					
研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	岩岡 裕二	助教	食品化学	研究統括	
	分担者	伊東 秀之	教授	食品化学	研究分担	
研究実績の概要	<p>ブドウなどに含まれるプロアントシアニジン(PAC)は抗酸化作用や抗腫瘍作用など多様な生物活性を有する。PACは(+)-CatechinなどのFlavan 3-ol構造よりなる化合物であり、特に高分子のPACは生体内において難吸収性であることからその生体利用性は極めて低いと言われているが、一方でリンゴなどに含まれる高分子のPACは肥満予防効果などを有するなど、高分子のPAC特有の有用な活性が報告されている。PACはその化学的特性より血中の微量成分の分析などに有効的なLC-MS分析において検出感度が極めて低いことから、PACの生体内挙動は未だ不明な点が多い。そこで、申請者らはPAC自身ではなく、PACと複合体化した血中タンパク質を電気泳動により分析することで、新たなPACの高感度検出法を見出す可能性があると考え、検討を行った。その結果、非変性条件下におけるアガロースゲル電気泳動後にポリフェノールに特異性の高いNBT染色を行うことで、PAC 6量体と血中タンパク質の一種であるヒト血清アルブミン(HSA)の複合体を検出する条件を見出した。しかし、PACの生体内への吸収量はごく微量であることが予想されるため、NBT染色の検出感度では不十分である可能性がある。そこで、本研究では抗アルブミン抗体を用いたウエスタンブロット法により、PAC-HSA複合体の高感度検出が可能であるか検討した。</p> <p>①PAC 6量体-HSA複合体のメンブレンへの転写条件の検討</p> <p>まず、PAC 6量体とHSAを生理条件下に近い37℃、pH 7の条件下でインキュベート後、非変性条件下でのアガロースゲル電気泳動(アガロース濃度1%)に供した。次に、タンク式のブロッキング装置により泳動ゲルからポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜にタンパク質を転写し(4℃、終夜)、NBT染色により染色した。その結果、PAC 6量体とHSAの複合体のバンドを検出することができ、またPAC 6量体のみのバンドも検出することができた。以上の結果から、泳動ゲルよりPVDF膜へ対してPAC 6量体およびPAC 6量体-HAS複合体の転写が行われていることが分かった。</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>②ウエスタンブロット法による PAC-血清アルブミン複合体の検出</p> <p>①の転写条件をもとに、まず PAC 6 量体-HSA 複合体をアガロースゲル電気泳動に供し、泳動ゲルから PVDF 膜への転写を行った。その後、ウサギ由来の抗アルブミン抗体を 1 次抗体、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体として使用し、発光のあったバンドを RAS-4000 により検出した。その結果、PAC 6 量体-HSA 複合体のバンドを検出することはできなかった。また、この際、ポジティブコントロールである HSA 標準品のバンドも検出できなかったことから、抗体濃度等の条件検討を行い、適当な検出条件を設定する必要があると考えた。</p> <p>以上の①、②の結果から、PAC6 量体とヒト血中の主要タンパク質である HSA の複合体のバンドを PVDF 膜に転写する検出する条件を見出した。PVDF 膜に転写した PAC 6 量体-HSA 複合体は NBT では検出されたが、1 次抗体に抗アルブミン抗体、2 次抗体に HRP 標識 IgG 抗体を用いたウエスタンブロット法ではこの複合体を検出することができなかった。従って、抗体濃度などの検出条件の検討を更に行う必要があると考える。PAC の高感度検出法を確立し、高分子の PAC を経口摂取したラットなど実験動物の血中から高分子の PAC を検出することができれば、経口摂取により高分子の PAC が体内に吸収される可能性を示す初めてのデータとなる。本研究は PAC の機能性研究へ高い波及効果を与えることができると期待している。</p>
<p>成果資料目録</p>	