

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)活性測定系の
開発に必須の ATGL 活性抑制する抗体作成のための抗原調製

研究分担者 高木敦子

独立行政法人 国立循環器病研究センター 研究所 分子薬理部 室長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovascularopathy: TGCV)の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL 活性測定系を開発することを目的とする。臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、真に ATGL を測定していることを、ATGL 抗体によって活性が抑制されることで示すことが必須である。ATGL に対する抗体の作成に必要な抗原を以下のように調製した。COS1 細胞において発現された組換えヒト His6-ATGL 蛋白の発現条件および HisTrap カラムでの精製条件を検討し、蛋白の銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で精製することができた。

A. 研究目的

ATGL 活性測定系を開発し、臨床検体に応用することで、TGCV の早期発見、早期治療を可能とすることを最終目的とする。平成 24 年度の成果である COS1 細胞に導入した組換え His6-ATGL の生化学的性格付により確立された、ATGL 活性測定条件を基に、臨床検体の ATGL 活性測定系の開発を行う。測定された活性が真に ATGL 由来であることを確認するため、ATGL 活性を抑制する抗体の作成のための抗原調製を平成 25 年度の目的とした。

を、小林邦久先生（福岡大学 筑紫病院 内分泌・糖尿病内科 教授）から譲渡いただいた。

プラスミドはアフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である COS1 にエレクトロポレーション法で導入された。His6-ATGL と His6-CGI-58 精製は可溶化細胞画分より HisTrap カラムクロマト法にて行った。リパーゼ活性は ³H-トリオレインを含むトリオレイン/リン脂質粒子を基質として、ウシ血清アルブミン存在下で測定された。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA とヒト CGI-58 cDNA はヒト白血球から得て、His6 tag を N 末端にもつ pcDNA4/HisMax C ベクター (Invitrogen 社)にクローン化されたもの

(倫理面の配慮)

本研究は、一般化した株化動物細胞を利用するものであるため、倫理面の問題は無いと判断した。動物を使用した実験は行っていない。組換え DNA 及び放射性

同位体使用の実験の許可は得ている。

C. 研究結果

臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、ATGL のリパーゼ活性以外にもリパーゼは存在すると考えられるので、真に ATGL を測定していることを、ATGL 抗体による活性抑制により示すことが必須である。

市販の ATGL 抗体は、ウエスタンブロットには使用できるが、ATGL のリパーゼ活性を抑制できないことがわかった。ATGL 活性を抑制することができる抗体を作成するため、抗原として使用する活性を保持した精製 ATGL を調製することを試みた。精製出発材料として、COS1 で発現された組換え His6-ATGL 蛋白を含む細胞可溶化液を用いた。HisTrap カラムのアプライ条件、カラム条件、溶出条件を検討し、活性のある状態で、蛋白銀染色法で、単一バンドにまで精製することができた。しかし、純度は高いが、微量しか精製 His6-ATGL が得られないので、COS1 細胞での His6-ATGL 発現の条件検討を行った。エレクトロポレーションキュベットあたり 20 ~ 40 μg DNA 及び、2.5 日、4.5 日、6.5 日の条件を検討し、40 μg DNA で、2.5 日の条件を使用することで、最も効率良く ATGL 活性を得ることができた。現在、抗原とする精製 ATGL 蛋白をこの方法で蓄積している途上である。

ATGL の活性促進因子として CGI-58 が知られている。ATGL 活性測定系に添加する必要性がある可能性があるため、同様の方法で、His6-CGI-58 蛋白の精製も行った。

D. 考察

CGI-58 蛋白の真の ATGL 活性促進効果を調べることが必要である。予備的実験では、ATGL と CGI-58 が完全に単一でなかったため、持ち込みも考えられ、その促進効果は 2 倍程度であった。

今回、2 つの蛋白とも精製できたので、促進効果を調べ、ATGL 活性測定系の確実に役立てることができるようになった。

E. 結論

今後、臨床検体を測定していくうえで、つねに、測定されたリパーゼ活性が真に ATGL に由来するものであることを確認するためには、ATGL 抗体の存在下と非存在下での活性を比較する必要がある。HisTrap カラムでの His6-ATGL 精製および発現条件を検討し、蛋白銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で、精製できた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高木敦子、池田康行、小林邦久、平野賢一

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (adipose triglyceride lipase; ATGL) の生化学的特徴について

第 86 回 日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日-13 日 パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし