

先端研究基盤共用促進事業（先端研究設備プラットフォームプログラム）

顕微イメージングソリューションプラットフォーム

利用報告書

報告日 2022/3/31

北海道大学創成研究機構長 殿

下記の通り利用結果を報告します。

●利用課題名

生体由来タンパク質試料における $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 同位体解析

●申請者情報

機関名：同志社大学

部署名：生命医科学部

代表者：宮坂知宏 准教授

●利用期間

2021年11月20日～2022年3月31日

●利用装置

同位体顕微鏡システム（北海道大学）委託分析

●利用分野

ライフサイエンス

●利用目的

生体におけるタンパク質の半減期は多様であるが、とくに超長寿命が想定されるタンパク質について老化または加齢性疾患との関連が想定されている。しかし、*in vivo* でのタンパク質半減期について簡便かつ有用な解析法はない。高い感度と定量性が担保される $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 存在比分析が可能であれば、動物を一定濃度の ^{15}N を含む飼料で飼育し、通常飼料に切り替えた後の生体タンパク質中の ^{15}N 濃度をモニタリングすることで、タンパク質の半減期を調べることが可能となる。本研究では、先行研究結果から判定した ^{15}N 添加飼料を用いてマウスを一定期間飼育し、各組織を採取する。それぞれの組織から総タンパク質を精製し、ラベリングの程度について検証する。これにより、生体由来タンパク質寿命測定法開発に向けた基礎的データを得る。

●利用結果

本研究では、生体中タンパク質のターンオーバーを簡便に、より正確に解析できる手法の開発と、申請者がこれまで手がけてきた脳内のタウタンパク質半減期の決定を目指すものである。本年度は ^{15}N および unlabeled のスピルリナをもちい、測定感度の検証、 ^{15}N 混和飼料の作成、およびそれを用いたマウスタンパク質のラベル化について検証した。

はじめに、精製タウタンパク質および 15N または 14N 置換されたスピルリナ由来のタンパク質を調整し、適切な混和の後にシリコンウェハ上に塗布し、同位体顕微鏡で解析した。その結果、タンパク質 1 μ g/spot で良好な解析が可能であった。また、15N / 14N タンパク質の混和量を変えた試料を作成し、その検出感度、定量性について検証した結果、一定濃度の 15N 添加を十分な感度、精度で検出出来ることを確認した。この結果をもとに 15N スピルリナの餌への混和量を決定した。

さらに、15N 添加飼料またはコントロール飼料により飼育したマウスより血漿、血球、脳を採取し、生化学的に総タンパク質を調整した。得られたタンパク質試料について 1 μ g をシリコンウェハ上に塗布し、同位体顕微鏡で解析した。その結果、マウス胎児期から離乳までの期間 15N 添加飼料で飼育したマウスについては添加した飼料中と同等な 15N/14N 濃度が検出された。これは僅か 1 世代でのラベリングで目的のラベル化が可能になった事を意味している。本結果より、15N ラベル化飼料の作成、マウスの個体ラベル化条件の決定に至った。本成果については、2023 年に日本神経化学会にて発表を計画中である。

●成果公開について

本利用報告書を 2023 年 3 月に公開する

-
- 受付番号： C21P0015-A 北
 - 受理日： 2022 年 3 月 31 日
 - 受付担当者： 阿部