〔原 著〕

2次元電気泳動法による末梢知覚および 運動神経組織由来タンパク質の解析

藤 井 裕 之

SUMMARY

Proteins of nerve roots of *Macaca Macacus* were separated by using high resolution two-dimensional electrophoresis (2-DE) to identify protein spots specific for either sensory or motor nerve.

The proteins could be separated into 350 spots in soluble fractions and into 520 spots in membrane-bound fraction from both dorsal and ventral roots. Specific protein spots for either ventral or dorsal root could not be detected, however, quantitative differences were observed in some spots (13-16 kDa, pI 6.3-6.6).

Carbonic anhydrase in soluble fraction from dorsal root was identified by immunostaining as heterogeneous spots having different isoelectric points but same molecular weight. On the contrary, the protein spots could not be detected in soluble fractions of ventral root. Carbonic anhydrase should be a marker protein to distinguish the sensory nerve from the motor nerve.

Keywords: ventral roots, dorsal roots, two-dimensional electrophoresis, immunoblotting, carbonic anhydrase.

はじめに

末梢神経の修復に際して、知覚および運動神経束の断端を正しく修復することは、機能回復の度合を決定する重要な因子である¹⁻³⁾。したがって、知覚神経束と運動神経束の識別が非常に重要となる。最近では、識別の指標となる末梢知覚あるいは運動神経の特異タンパク質を検出して、両者を識別する方法が検討されている。すでに、コリンアセチルトランスフェラーゼ、コリンエステラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼの神経内含有量については、運動神経と知覚神経の間に差があることが報告され⁴⁻⁷⁾、一部は両神経の識別に際して、指標タンパク

質として臨床応用も試みられている。

しかし、末梢神経由来タンパク質の検索はまだ十分に行われておらず、とくに運動神経としての前根と、知覚神経としての後根に由来するタンパク質についてはほとんど検索されていない。

本研究では、末梢知覚あるいは運動神経の特異タンパク質の検出を目的として、解像度の高い2次元電気泳動法を用いて、ニホンザルの前根および後根に存在するタンパク質の解析を行ったので報告する。

Analysis of proteins from ventral and dorsal roots by two-dimensional electrophoresis.

Hiroshi Fujii; 山口大学医学部整形外科教室

Correspondence address: Hiroshi Fujii, Department of Orthopedic Surgery, Yamaguchi University School of Medicine, Kogushi 1144, Ube 755, Japan.

(受付 1992年7月20日, 受理 1992年8月28日)

略号

IEF: isoelectric focusing, SDS: sodium dodecyl sulfate, PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, NC: nitrocellulose, NF: neurofilament, CA: carbonic anhydrase, CBB: Coomassie Brilliant Blue R-250

材料および方法

1. 末梢神経由来タンパク質の抽出

ニホンザル (*Macaca Macacus*, 体重 2.5~4 kg) の両側の神経根組織 (第3腰椎から第3仙椎) を試料とした。試料は、前根を運動神経として、後根を知覚神経として使用した。前根および後根組織は、すでに報告した方法⁸⁾で、可溶性画分と膜結合性画分とに分取した。

2. 2次元電気泳動法

2次元電気泳動法は O'Farrell の方法に準じ、著者の報告した末梢神経由来タンパク質分離の至適条件⁸⁾で行った。つまり、1次元目の等電点電気泳動法 (IEF) において 2% (w/v) アンホラインは pH 3.5~10 と pH 5~7 のものを 1:4 に混合して使用した。また、2次元目の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) のゲル濃度勾配は 7~20% T とした。

泳動後のゲルは銀染色を行うか、あるいはイムノブロッティングへ移行した。銀染色は銀染色キットワコー (和光純薬) を用い、Morrissey らの方法に準じて^{9,10)} 操作を行った。

3. イムノブロッティング

ゲル上に泳動・分離されたタンパク質は恒温ブロッキング装置 (常光社) を用いてニトロセルロース膜 (NC 膜, Millipore 社, 0.22 μ m ポアサイズ) 上に転写した。転写は Towbin の方法¹¹⁾に準じ、20% メタノールを含むトリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) を用いて、2°C, 6 V の条件で4時間行った。転写終了後、NC 膜は 5% スキムミルクを含む 20 mM トリス塩酸緩衝化生理食塩水, pH 7.5 (TBS) でブロッキングし、次に Table 1 に示すように 68 kDa ニューロフィラメント (68 kDa NF) カルボニックアンヒドラーゼ (CA) の1次抗体、2次抗体と順に結合させた。発色は2次抗体に結合しているペルオキシダーゼの、4クロロ-1-ナフトール、過酸化水素を基質とする反応を利用して室温で 20 分間行った。

4. 主要タンパク質スポットの分子量および等電点の決定

主要タンパク質スポットの分子量の決定には、分子量マーカーとして SDS-6 H (Sigma 社) を使用した。等電点は、すでに報告した方法で算定し、可溶性画分では試料中のイオンの影響を排除するために補正した値をそのスポットの等電点とした⁸⁾。

5. タンパク質スポットの定量

タンパク質スポットについては、2次元画像解析装置 (PD 110, Molecular Dynamics 社) にてその染色強度を積算し、定量を行った。

結 果

1. 前根および後根由来タンパク質の銀染色像の比較
a) 可溶性画分

前根および後根由来タンパク質の可溶性画分の銀染色像には、それぞれ pH 3.8 から pH 9.2, 分子量 10 kDa から 200 kDa の範囲に、350 個のタンパク質スポットを認めた (Fig. 1 A, 1 B)。これらの中に、前根あるいは後根に特異的なタンパク質スポットは認められなかった。しかし、Fig. 2 に示す分子量 13 kDa から 18 kDa, 等電点 6.3 から 6.5 の範囲にある四つのタンパク質スポットについて、2次元画像解析装置を用いて定量を行ったところ、スポット 4 とスポット 2 の量比は、前根では 1.2, 後根では 1.3 とほぼ同様であるのに対して、スポット 4 とスポット 1 の量比は、前根では 1.0, 後根では 2.5 と明らかに差が認められた。

b) 膜結合性画分の分離

膜結合性画分の前根および後根由来タンパク質を分離すると、それぞれに、520 個のタンパク質スポットを認めた (Fig. 3 A, 3 B)。これらの中に、前根あるいは後根に特異的なタンパク質スポットは検出されなかった。

2. 可溶性画分と膜結合性画分におけるタンパク質スポットの比較

Fig. 1 C に示す可溶性画分の 20 個の主要タンパク質スポットと、Fig. 3 C に示す膜結合性画分の 18 個の主

Table 1. Lists of antibodies used in immunoblotting.

Antigen	1st antibody	2nd antibody
68 kDa Neurofilament	mouse anti-68 kDa neurofilament monoclonal antibody [Oncogene Science, IF 07]	goat anti-mouse IgM antibody peroxydase conjugated [Cappel, 3211-0201]
Carbonic Anhydrase	rabit anti-carbonic anhydrase monoclonal antibody [Didets, AB-3010]	goat anti-rabbit IgG antibody peroxydase conjugated [Cappel, 3212-0081]

Fig. 1. Comparison of 2-DE patterns of proteins in soluble fraction from dorsal roots with that from ventral roots.

Fifty μg of proteins were loaded on each IEF capillary gel. The proteins were stained with "Silver Stain Kit Wako" as described in materials and methods. The spots enclosed by a rectangle are shown in Fig. 6 in detail. Panel A: ventral roots, panel B: dorsal roots, panel C: schematic diagram of the proteins in soluble fraction from nerve roots. The values of M_w and pI of the protein spots numbered 1 to 20 were listed in Table 1.

Fig. 2. Difference in the density of the protein spots between dorsal roots and ventral roots.

The 2-DE patterns corresponds to that enclosed by a rectangle as shown in Fig. 5. The densities of the four protein spots from ventral roots (panel A) and dorsal roots (panel B) indicating by arrow heads were determined by 2D-image analyzer as described in materials and methods.

要タンパク質スポットの等電点を算定して、分子量とともに Table 2 に示した。これらのタンパク質スポットのうち、アルブミン、 α および β -チューブリン、アク

チンは、両画分に共通して認められた。しかし、両画分の 2 次元泳動像は著しく異なり、ほかに共通するスポットは同定できなかった。

Fig. 3. Comparison of 2-DE patterns of the proteins in membrane-bound fraction from dorsal roots with that from ventral roots.

Fifty μ g of proteins were loaded on each IEF capillary gel. The proteins were stained with "Silver Stain Kit Wako". Panel A: ventral roots. Panel B: dorsal roots. Panel C: schematic diagram of 2-DE patterns of the proteins in membrane-bound fraction from nerve roots. The values of M_w and pI of the protein spots numbered 1 to 18 were listed in Table 1.

3. イムノブロットング像の比較

68 kDa NF は、可溶性画分では pI 5.2 の単一なスポットとして染色されたが、その染色性はきわめて微弱であった (Fig. 4 A). 一方、膜結合性画分では、 pI 5.3 を

中心とした多様性をもつスポットとして染色され、その染色性は可溶性画分に比して著しく高かった (Fig. 4 B). しかし、両画分において前根と後根の染色像に差を認めなかった。

Fig. 4. Immunostaining patterns of the proteins from dorsal roots with anti-68 kDa neurofilament monoclonal antibody.

Panel A: soluble fraction. Panel B: membrane-bound fraction.

Table 2. Molecular weights and isoelectric points of the proteins in soluble and membrane-bound fractions from nerve roots.

A			B		
Spot No.	Mw (kDa)	pI	Spot No.	Mw (kDa)	pI
1	145	5.2	1	200	5.5
2	84	5.4	2	150	5.3
3	82	6.3	3	140	5.5
4	72	7.0	4	91	5.6
5	66	6.5	5	66	6.5
6	58	5.4	6	66	5.3
7	53	5.3	7	53	5.4
8	56	5.4	8	56	5.5
9	62	7.9	9	60	7.8
10	45	5.3	10	57	5.9
11	43	5.6	11	43	5.7
12	43	5.8	12	43	5.9
13	33	6.3	13	37	6.5
14	36	6.8	14	35	6.0
15	32	6.7	15	34	5.3
16	29	5.1	16	31	6.0
17	26	5.9	17	28	6.7
18	24	6.9	18	24	5.6
19	23	6.1			
20	16	5.9			

Panel A : The proteins in soluble fraction. The numerals from 1 to 20 correspond to the numbers of protein spots in Fig. 1 C.

Panel B : The proteins in membrane-bound fraction. The numerals from 1 to 18 correspond to the numbers of protein spots in Fig. 3 C.

Fig. 5. Immunostaining patterns of the neural proteins of soluble fractions with anti-carbonic anhydrase monoclonal antibody.

A and B were immunostaining patterns followed 2-DE, and C and D were immunostaining patterns followed SDS-PAGE. Panel A: ventral roots. Panel B: dorsal roots. Panel C: ventral roots. Panel D: dorsal roots.

CA は、可溶性画分の後根の染色像において、29 kDa, pI 5.1 を中心とした等電点に多様性をもつ数個のスポットとして染色されたが (Fig. 5 B), 可溶性画分前根の染色像には明瞭なスポットを認めなかった (Fig. 5 A).

また、この可溶性画分の試料を1次元の SDS-PAGE 後、抗 CA 抗体を用いてイムノブロッティングすると、Fig. 5 C, D のように 29 kDa の位置に前根に比べて後根に強い発色帯を認めた。しかし、前根にも微弱ながら

(16) 生物物理化学

発色帯は検出された。一方、膜結合性画分では、29 kDa の位置にスポットは検出されなかった（データ未発表）。

考 察

1. 銀染色像の比較

前根および後根の可溶性画分タンパク質の2次元電気泳動後の銀染色像を比較すると、両者は酷似していた。

これらの中に前根あるいは後根に特異的なタンパク質スポットは検出できなかったが、その一部に量比の違いを認めた (Fig. 2)。銀染色におけるタンパク質スポットの定量性について、井上らは、銀染色キットワークを用いた場合に、CBB 染色での定量性と高い相関を示すと報告しており¹¹⁾、ここでは2次元画像解析装置を用いて、タンパク質スポットの定量を行った。Fig. 2 のスポット 1 とスポット 4 の量比は、前根の 1.0 に対して後根は 2.5 と明らかに大きく、これは、同じタンパク質でも前根・後根でタンパク量が異なるものが存在することを示唆している。量比の異なるタンパク質スポットの同定については今後の検討に委ねる。

軸索流中のタンパク質については、コリンエステラーゼ⁵⁾ やコリンアセチルトランスフェラーゼ¹²⁾ などの酵素が運動神経に優位に存在すると報告されている。しかし、今回、銀染色法を用いて行った2次元電気泳動では、運動神経に特異的なタンパク質スポットは検出されなかった。

また、膜結合性画分の前根・後根の銀染色像を比較すると、この画分においても、いずれかに特異的なタンパク質スポットは検出されなかった。

2. イムノブロットング像

68 kDa NF は細胞骨格を構成するタンパク質であるが、可溶性および膜結合性画分で、前根と後根の間に差を認めなかった。68 kDa NF は可溶性画分では非常に微弱なスポットとして染色されたが、膜結合性画分では強い染色性を示した。これは、すでに報告¹³⁾があるようにこのタンパク質の難溶性に起因するものと思われる。また、68 kDa NF は膜結合性画分において、等電点に多様性をもつ数個のスポットに分離されたが、この理由としてリン酸化が考えられる。NF のリン酸化については多くの研究が行われているが¹⁴⁾、まだその意義は解明されていない。したがって、末梢神経の変性、再生状態における NF の多様性の変化については非常に興味のある問題であり、その解析には2次元電気泳動法が必須である。

Riley らは組織活性染色を用いて、CA が運動神経よ

りも知覚神経に多量に存在すると報告しているが^{6,7)}、われわれの結果もこれに一致していた。一方、1次元のSDS-PAGE 後のイムノブロットング像において、前根組織にも少量ながら発色帯が認められたことや、CA が γ -モーターニューロンにも存在するという報告⁷⁾があることなど、知覚神経の特異タンパク質であるかどうかはまだ問題を残している。

CA の組織活性染色による知覚、運動神経の識別方法の問題点として、新鮮例には適用できるが、陳旧例では識別不能であることが指摘されている。今後、ここで述べた2次元電気泳動を用いた方法により、陳旧例における識別の可否について検索を行う必要があると考える。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました山口大学医学部整形外科河合伸也教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究に際し、直接ご指導いただきました山口大学医学部第一生化学竹尾和典教授、ならびに中村和行助教授に深謝いたします。また、終始ご指導をいただいた土井一輝助教授、試料採取にあたりご協力いただいた整形外科教室の諸兄、ならびに貴重なご助言をいただいた第一生化学教室の諸兄に心より感謝いたします。

文 献

- 1) James AL, Dennis BP, John AB. Microsurgical repair of peripheral nerve injuries in upper extremities. *Ann Plast Surg* 1979; 2: 24-31.
- 2) Kutz JE, Shealy G, Lubbers L. Intrafascicular nerve repair. *Orthop Clin North Am* 1981; 12: 277-86.
- 3) Grabb WC, Bennet SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 1970; 46: 31-8.
- 4) Engel J, Ganel A, Melamed R, Rimón S, Farine I. Choline acetyltransferase for differentiation between human motor and sensory nerve fibers. *Ann Plast Surg* 1979; 4: 376-80.
- 5) Gruber H, Zenker W. Acetylcholinesterase: Histochemical differentiation between motor and sensory nerve fibers. *Brain Res* 1973; 51: 207-13.
- 6) Riley DA, Ellis S, Bain JLW. Ultra structural cytochemical localization of carbonic anhydrase activity in rat peripheral sensory and motor nerves, dorsal root ganglia and dorsal column nuclei. *Neuroscience* 1984; 13:

- 189-206.
- 7) Riley DA, Sanger JR, Matloub HS, Yousif NJ, Bain JLW, Moore GH. Identifying motor and sensory myelinated axons in rabbit peripheral nerves by histochemical staining for carbonic anhydrase and cholinesterase activities. *Brain Res* 1988; 453: 79-88.
- 8) 藤井裕之. 末梢神経構成タンパク質の分離を目的とする2次元電気泳動法の至適化. *生物物理化学* 1993; 37: 3-9.
- 9) Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; 117: 307-10.
- 10) 井上 勤, 浅賀宏昭, 田村真弓. 銀染色による微量タンパク質の検出法. *生物物理化学* 1986; 30: 229-38.
- 11) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 4350-4.
- 12) White HL, Chen-Wu J. Kinetics of choline acetyltransferases from human and other mammalian central and peripheral nervous tissues. *J Neurochem* 1973; 20: 297-307.
- 13) 田代朋子. 遅い軸索内輸送と軸索細胞骨格の動態. *蛋白質核酸酵素* 1989; 34: 1715-24.
- 14) Komiya Y, Tashiro T, Kurokawa M. Occurrence of faster migrating neurofilament proteins as revealed by their phosphorylation. *Biomed Res* 1986; 7: 359-63.

要 旨

末梢運動および知覚神経の特異タンパク質の検出を目的として、2次元電気泳動法によるニホンザルの前根・後根由来タンパク質の解析を行った。

銀染色像において、可溶性画分および膜結合性画分の前根・後根由来タンパク質は、それぞれ 350, 520 のスポットに分離された。これらの中に前根あるいは後根に特異的なタンパク質スポットは検出されなかったが、分子量 13~18 kDa, 等電点 6.3~6.6 の範囲にある四つのタンパク質スポットにおいて、量比の差が認められた。

イムノブロッティング像では、カルボニックアンヒドラーゼが後根の可溶性画分に、より強い染色性と多様性を示した。