

P-13 2D-DIGE を利用したラット小腸上皮細胞に対する MRJP-1 multimer の

細胞増殖作用機序の解析

◎面 すみれ¹⁾、野崎怜雄²⁾、三浦ゆり³⁾、岩本真知子³⁾、津元裕樹³⁾、河野 透⁴⁾、山口喜久二⁵⁾、本間直幸⁶⁾、森山隆則⁶⁾

1) 北海道大学大学院保健科学院、2) 同大学院生命科学院、3) 東京都健康長寿医療センター研究所、4) 同大学院薬学研究院、5) ジャパンローヤルゼリー株式会社、6) 同大学院保健科学研究院

【目的】Royal Jelly (RJ)は働き蜂の下咽頭腺から分泌される外分泌液で、女王蜂の成長に重要な役割を果たしている。RJ には様々な成分が含まれているが、その中で可溶性蛋白質の 80%以上を示すのが major royal jelly proteins (MRJPs)である。これまで我々は MRJP-1 multimer に注目した研究を実施し、細胞増殖作用を有することを明らかにした。今回、我々はラット小腸上皮細胞 (IEC-6)を用い 2D-DIGE を応用した細胞増殖作用機序の網羅的な解析を実施したので報告する。

【対象・方法】MRJP-1 multimer 刺激により発現が変動する細胞内蛋白質を以下の方法で検出した。播種した IEC-6 は接着を確認後、無血清培地で培養した。その後、既報の方法¹⁾で精製した同蛋白質（最終濃度 0.1mg/ml）を添加し 24 時間後に回収した。対照は非添加細胞群とした。それぞれ試料を 5 検体ずつ用意した。次に細胞溶解液を作成し、総蛋白質量を測定後、100 μ g の試料蛋白質を蛍光標識した。これを膨潤したゲルにアプライし、等電点電気泳動を実施後、SDS-PAGE を行った。画像解析により変化が見られたスポットをピ

ッキングし、トリプシン処理後、MALDI-TOF/MS により蛋白質を同定した。候補蛋白質の mRNA はリアルタイム PCR 法にて添加 0, 1, 3, 6 時間後に発現を解析した。

【結果】二次元電気泳動像における MRJP-1 multimer 添加群と非添加群のスポットを比較したところ、添加群において複数のスポットで%vol の増減が確認された。そのうち統計学的に有意差の認められる 6 個の増加スポット、2 個の減少スポット、計 8 個のスポットを検出した。その中で最も変化量の大きい蛋白質であった γ -enolase の mRNA 量を測定したところ、添加 3 時間後、6 時間後に有意な増加が認められ、添加 3 時間後に最も高くなることを確認した。

【考察】本検討によって、ラット小腸上皮細胞において MRJP-1 multimer 添加群と非添加群で γ -enolase を中心とする複数の蛋白質の発現に変化が見られた。このことから MRJP1 は細胞内シグナルを変化させる外部刺激として機能することが示唆された。今後、細胞増殖に関わるシグナル伝達の解明を目指したい。

1) Nozaki R et al. Food Chem 134: 2332-2337, 2012.