培養グリオーマ細胞水溶性蛋白分画の二次元電気泳動法による解析

特に PCNA について

本田 千穂・田淵 和雄*・西本 詮

Analysis of the Water-soluble Protein Fraction of Glioma Cells by Two-dimensional Electrophoresis

Chiho HONDA, Kazuo TABUCHI* and Akira NISHIMOTO

*Department of Neurological Surgery, Okayama University, Okayama; *Department of Neurological Surgery, Saga Medical School, Saga*

Abstract

The authors analyzed water-soluble proteins of cultured human and rat glioma cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis methods. Glioma cells were suspended in distilled water and then destroyed by freezing and thawing to obtain the water-soluble protein fractions. A modification of O'Farrell's non-equilibrium pH gradient (NEPHGE) method was used to analyze differences in protein mapping. Manabe's microscale two-dimensional electrophoresis without denaturing agents was used to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) by Western blotting. With O'Farrell's NEPHGE method and silver staining, at least 200 different polypeptides were clearly identified in each cell line. Cytoskeletal proteins, such as actin, were consistently separated in all cell lines. Marked differences in the protein map were observed between human and rat glioma cell lines, and even within the same species. Presumably, these differences are attributable to cell-biological difference in the glioma cell lines. Some proteins that were prominent in proliferating cells were scant in the protein maps of cells cultured for 24 hours in medium not containing calf serum, which suppresses cell growth. PCNA, an acidic nuclear protein that appears only in the late G₁-S phase and is believed to be involved in cell proliferation, was detected by Western blotting and indirect immunostaining. Quantitative analysis of PCNA spots on the protein map appears useful in assessment of glioma cell proliferation. These results indicate that two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis can contribute to the understanding of the biological features of glioma cells.

Key words: two-dimensional electrophoresis, experimental glioma, water-soluble protein, proliferating cell nuclear antigen

I はじめに

グリオーマの細胞生物学的特性を明らかにすることは、グリオーマに対するよりよい診断方法や治療法を考える上

できわめて重要なことと思われる。このような試みの一つとして、二次元電気泳動法によるグリオーマの蛋白分画の解析が考えられる。すなわち、グリオーマが有する種々の蛋白の解析を行うことにより、グリオーマに特異的な腫瘍

岡山大学脳神経外科 *佐賀医科大学脳神経外科

Address reprint requests to: C. Honda, M.D., Department of Neurosurgery, Mitoyo General Hospital, 708 Himehama, Toyohama-cho, Mitoyo-gun, Kagawa 769-16.

受稿 1988年4月6日 受理 1988年7月28日

抗原, グリオーマ細胞の代謝あるいは成長の制御に関連すると思われる諸因子などの同定が可能となってくるものと思われる。今回, 二次元電気泳動法を用いて培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白分画の解析を試みた結果, グリオーマの特性を理解する上で興味ある知見を得たので報告する。

II 材料および方法

1. 材料

細胞は, 当教室でヒトグリオブラストーマ症例より確立され, 継代維持されている KY 細胞⁶⁾, および Ponten ら¹⁹⁾によりヒトグリオーマ症例より樹立された 118 MG 細胞を Rous sarcoma virus で transform した KC 細胞, またラット脳に methylnitrosourea で誘発された C6¹⁾ならびに 9L²⁰⁾細胞を用いた。細胞は, 10% 牛胎児血清および抗生物質を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) を培養液とし, 37°C, 5% 炭酸ガス中で静置培養を行った。細胞増殖後, 培養液を除去し, phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗滌したのち, 細胞を蒸留水中に機械的に浮遊させ, この細胞浮遊液の凍結融解を繰り返すことによって細胞の水溶性蛋白分画を得た。細胞の不溶性蛋白分画は 5000 rpm, 15 分の遠沈により除去し, 上清の水溶性蛋白分画を凍結乾燥によって 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の蛋白濃度に濃縮して試料とした。また, 細胞増殖後, 血清を含まない MEM 中にて 24 時間培養を続け, 増殖が停止したと思われる培養グリオーマ細胞についても同様に水溶性蛋白分画を抽出し, 試料とした。

2. O'Farrell 法

各培養グリオーマ細胞株間での蛋白質地図の比較検討には, O'Farrell ら^{16,17)}の方法に準じた二次元電気泳動法を行った。すなわち, 一次元目は直径 2.5 mm, 長さ 12 cm, 2% ampholine (pH 3.5~10, LKB), 9 M 尿素, 2% NP40 を含む polyacrylamide gel を用い, O'Farrell ら¹⁷⁾の non-equilibrium pH gradient (NEPHGE) 法によって 1600 Vhr の泳動を行った。二次元目は 14×15×0.1 cm, 0.1% の sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む 8~15% 密度勾配 polyacrylamide gel を用いた。泳動終了後, 銀染色キット (第一化学薬品) を使用して銀染色を行い, 各蛋白スポットの量的ならびに質的差異の比較検討を行った。なお, アクチンスポットの同定は, 精製されたアクチン (Sigma) を試料の泳動と同条件で試料と同時に泳動することによって行った。さらに, 分子量は molecular weight marker (オリエント酵母) の泳動と比較することによって同定した。

3. 真鍋法

ウェスタンブロッティング—免疫染色には, 真鍋ら¹⁰⁾の

変性剤をまったく含まないマイクロ二次元電気泳動法を用いた。すなわち, ミクロ多検体二次元電気泳動装置 (富士理研社) を用いて, 一次元目は直径 1.3 mm, 長さ 35 mm, 2% ampholine (pH 3.5~10), 0.5% ampholine (pH 3.5~5) を含む polyacrylamide gel で等電点電気泳動を行った。二次元目は 38×35×1 mm, 4~17% 密度勾配 polyacrylamide gel を用いた。泳動終了後, gel の銀染色を行うとともに, 同時に泳動した gel より水平型トランスファープロットング装置 (OMY-1 型, 富士理研社) を用いて蛋白をニトロセルロース膜へ転写した。プロットング後のニトロセルロース膜は, 免疫染色を行って増殖性細胞核抗原 (PCNA) の同定を行った。すなわち, 3% bovine serum albumin を含む PBS 中で室温にて 2 時間振盪して残存蛋白結合部位をマスクしたのち, 抗 PCNA 血清 (×250, Dr. Tan, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, Calif., USA より供与を受けた) と一晚反応させた。コントロールには正常ヒト血清と反応させたもの, およびプロットング後 56°C, 30 分間の加熱により PCNA を不活化したのち²⁴⁾, 抗 PCNA 血清と反応させたものを用いた。PBS で洗滌後, peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG (×200, DAKO) と 1 時間反応させ, PBS で洗滌したのち, 発色は 0.003% H₂O₂ 加 2 mM diaminobenzidine 溶液で約 3 分間行った²⁶⁾。

III 結 果

1. O'Farrell 法

この方法により, いずれの細胞株においても約 200 種の

Fig. 1 Two-dimensional electropherograms of the water-soluble protein fraction of rat 9L (A) and C6 (B) tumor cells by O'Farrell's method.^{16,17)} arrowheads: protein spots more prominent in 9L cells, vertical arrows: protein spots more prominent in C6 cells. MW indicates molecular weight.

Fig. 2 Two-dimensional electropherograms of the water-soluble protein fraction of human KY (A) and KC (B) glioma cells by O'Farrell's method. *arrowheads*: protein spots more prominent in KY cells, *vertical arrows*: protein spots more prominent in KC cells.

蛋白(ポリペプチド)が分離可能であり(Fig. 1, 2), しかも個々の細胞株について、それぞれ高い再現性が得られた。各細胞株から得られた蛋白質地図を比較検討してみると、アクチンを初めとする細胞骨格蛋白などは各細胞株に共通に認められたが、ヒトグリオーマ細胞株とラットグリオーマ細胞株間、またヒトグリオーマ細胞株相互間、ラットグリオーマ細胞株相互間でも多数の蛋白スポットに質的および量的差異が認められた。たとえば、ラット9L細胞では、Fig. 1Aに *arrowhead* で示したように、分子量 40×10^3 以下の比較的低分子領域に他の細胞株にはみられない多数の蛋白スポットが検出された。一方、C6細胞では、Fig. 1Bに *arrow* で示したように、比較的高分子領域で他の細胞株との差が著明であった。ヒトKY細胞とKC細胞の蛋白質地図はほぼ同様のパターンを示し、両者の差異は主として量的なものであった。すなわち、Fig. 2Aに *arrowhead* で示したようにKY細胞に多いものと、Fig. 2Bに *arrow* で示したようにKC細胞に多いものがあつた。

2. 真鍋法

この方法では、銀染色により約50種の蛋白が分離可能であつた(Fig. 3)。対数増殖中の細胞(Fig. 3A)と無血清MEM中に置いて増殖を停止させた細胞(Fig. 3B)とで蛋白質地図を比較してみると、無血清MEM中に置いた細胞では分子量 35×10^3 、等電点5付近のスポット(*arrowhead*)を初め、*arrow* で示したように数個の蛋白の明らかな減少あるいは消失が認められた。これらの蛋白スポットのなかにPCNAが含まれているか否かを検索する目的で、前述したブロッティング-免疫染色法を試みた。Fig. 4Aに示すごとく、抗PCNA血清と反応させたニトロセル

Fig. 3 Two-dimensional electropherograms of the water-soluble protein fraction of human KY glioma cells by Manabe's method.¹⁰⁾ A: proliferating cells, B: non-proliferating cells cultured for 24 hours in medium not containing calf serum. *vertical arrows*: protein spots diminished in non-proliferating cells, *arrowhead*: proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Fig. 4 Two-dimensional electropherograms stained by the indirect immunoperoxidase method after Western blotting of the water-soluble protein fraction of human KY glioma cells by Manabe's method. A: proliferating cells (anti-PCNA serum), B: proliferating cells (normal human serum), C: proliferating cells (inactivation at 56°C for 30 minutes, anti-PCNA serum), D: non-proliferating cells (anti-PCNA serum). *arrowhead*: PCNA.

ロース膜ではコントロール血清との反応(Fig. 4B)ではみられないスポットが検出された。これらのスポットのうち、ブロッティングした蛋白を 56°C 、30分間の熱処理によってPCNAの抗原性を不活化したのち抗PCNA抗体と反応させた場合(Fig. 4C)、また無血清MEM中に置いて増殖を停止させた細胞の水溶性蛋白分画について抗PCNA抗体を反応させた場合(Fig. 4D)には分子量 35×10^3 、等電点5付近のスポットの染色は認められず、このスポットの蛋白がPCNAであると考えられた。

IV 考 察

polyacrylamide gel 二次元電気泳動法は、1975年のO'Farrell¹⁶⁾の報告以来、高度な分離能と良好な再現性を有するため、種々の蛋白の分析に応用されている。一般に蛋白質は電荷と分子量という互いに独立した二つの性質を持っているため、電荷と分子量との差による分離を同時に行えば、それぞれ単一の蛋白を検出あるいは分離することが可能である。今回用いたO'Farrell法^{16,17)}は、一次元目にNEPHGE、二次元目にSDS gel slab電気泳動を組み合わせた二次元電気泳動法であり、高い分離能が得られるが、高濃度の尿素やSDSを用いるため、泳動された蛋白質の高次構造は破壊されている。高次構造を失った蛋白、すなわちポリペプチドは酵素活性などの生理活性を失っていることが多く、生理活性を持った蛋白の検索にはO'Farrell法は適当ではない。真鍋¹⁰⁾はまったく変性剤を含まず、血清蛋白質や組織の水溶性蛋白質をnativeな状態で分離することのできる二次元電気泳動法を開発し、O'Farrell法で得られるパターンをポリペプチド地図、彼らの方法で得られるパターンを蛋白質地図と呼んで区別すべきであるとしている¹²⁾。しかし、一般にはO'Farrell法で得られるパターンも蛋白質地図と呼ばれることが多い。今回、各細胞株の蛋白質の比較検討にはO'Farrell法を、PCNAの免疫化学的検索には真鍋法を用いた。

今回試料とした蛋白質は、いずれも株化された細胞集団から得られたものであり、展開された電気泳動パターン(蛋白質地図)は、それぞれの細胞の性質の差を直接反映しているものと考えられる。ヒト細胞株とラット細胞株間での蛋白質地図の差は、量的のみならず質的にも明らかで、これらのなかには種差による細胞構成蛋白の違いも含まれているものと思われる。しかし、ラット9L細胞では特に他の細胞株との蛋白質地図の質的差異が著明で、これは9L細胞が真のグリオーマではなく、グリオサルコーマの性格を持った細胞株であること²⁰⁾と関係があるかもしれない。すなわち、腫瘍の組織型によって蛋白質地図に大きな差異が現れる可能性が考えられる。言い換えれば、それぞ

れの組織型によって独特な蛋白質が発現されているものと推測され、今後、多数の細胞株について検討を重ねることにより、蛋白質パターンと腫瘍の組織型との関係を明らかにできるのではないかと考えられる。

さて、個々のグリオーマの細胞生物学的悪性度は多様であり、それぞれのグリオーマについて、その増殖能を正確に把握しておくことは、グリオーマ患者の治療法の選択や予後の推定を行う上できわめて重要であると言える。従来、グリオーマの増殖能の検索には ^3H -thymidineの標識率(labeling index)^{8,9)}や分裂指数(mitotic index)などが用いられてきた。最近ではGratzner⁵⁾によって作製されたthymidine analogueであるbromodeoxyuridine(BrdU)に対するモノクローナル抗体を用いる方法がグリオーマの増殖能の解析に試みられつつある^{7,15)}。この方法は、一定時間内にDNA合成中の細胞に取り込まれたBrdUをモノクローナル抗体を用いて検出するものであり、日常臨床への応用は必ずしも容易ではない。したがって、グリオーマの増殖能を判定するより直接的な方法としては、もともと増殖中の細胞にのみ発現されている物質を検出することと考えられ、著者らはPCNAに注目してきている。

抗PCNA抗体は、1978年、Miyachiら¹⁴⁾によって全身性エリテマトーデス(SLE)患者の一部の血清中に抗核自己抗体として検出されたもので、その後の研究により、PCNAは増殖中の細胞の核内に特異的に出現することが明らかにされた²³⁾。最近ではPCNAは、1980年、Bravoら²⁾によって発見され、cyclinと命名された蛋白質と同一の蛋白質であることが判明している¹³⁾。PCNA/cyclinは分子量 $33 \sim 36 \times 10^3$ 、等電点 $4.8 \sim 4.9$ の非ヒストン性酸性核蛋白であり、その抗原性は 56°C 、30分間の加熱で不活化され²⁴⁾、最近ではそのアミノ酸配列の一部も明らかにされている¹⁸⁾。また、PCNAは動物種とは関係なく、しかも正常あるいは腫瘍細胞を問わず、細胞増殖期、特にlate G₁～S期の細胞の核内に特異的に発現され、細胞のDNA合成に深く関与しているものと考えられている³⁾。PCNAはこのような特性を持っているため、各種悪性腫瘍の診断に抗PCNA抗体を用いようとする試みが散見される^{4,25)}。

そこで、著者らは培養グリオーマ細胞および開頭術によって得られたヒトグリオーマ生検組織におけるPCNAの発現を抗PCNA抗体を用いて間接酵素抗体法により検索した^{21,22)}。その結果、各種グリオーマにおけるPCNA陽性細胞の割合は、これまで報告されているBrdUあるいは ^3H -thymidineの標識率⁷⁾とよく一致していることが判明した。したがって、PCNAはグリオーマの増殖能を推定する上でよい指標となりうると考えられる。しかし、ヒトグリオーマ組織で免疫組織化学的にPCNAを検出するに

は難点もある。SLEにおける抗PCNA抗体の出現頻度は約2%しかなく¹⁴⁾、十分な量の抗体を得ることは容易ではない。また、ヒトグリオーマ組織において免疫組織染色を間接法で行う場合、二次抗体である抗ヒトIgG抗体は組織中に含まれているIgGとも反応してしまい、陽性反応を確認しにくい欠点がある。ところが、今回行ったようにグリオーマ蛋白の二次元電気泳動によって分離した蛋白について免疫染色を行えば、PCNAのみを検出することが可能である。また、これによって銀染色による蛋白質地図上のPCNAスポットを同定すれば、二次元電気泳動-銀染色のみによってPCNAの検出が可能となる。さらにまた、二次元電気泳動による蛋白質地図上の各スポットは、大きさと染色濃度により量的情報も含んでいるのが特徴である。そこで、たとえばコンピューターによる解析を加えれば¹¹⁾、PCNAの半定量化も可能となる。したがって、種々のグリオーマの蛋白質の二次元電気泳動を行い、そのPCNAスポットの量を検討することにより、グリオーマの増殖能の程度を容易に推定できるようになるものと考えられる。

V ま と め

ヒトおよびラット培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白分画を二次元電気泳動法によって解析した。O'Farrell法による二次元電気泳動gelについて銀染色を行った結果、約200種の蛋白スポットが分離可能であり、ヒトグリオーマ細胞株とラットグリオーマ細胞株間のみならず、ヒトグリオーマ細胞株相互間、ラットグリオーマ細胞株相互間にも蛋白質の質的あるいは量的差異が認められた。これらの差異のなかにはグリオーマ細胞の細胞生物学的特性の差異に基づくものもあると思われ、二次元電気泳動法による蛋白分画の解析はグリオーマの細胞生物学的特性の検索にも有用な方法となるものと考えられる。また、蛋白質変性剤を含まない系での二次元電気泳動法(真鍋法)に引き続き、ニトロセロロース膜へのウェスタンブロッティング後、特定の蛋白質に対する特異抗体を用いた免疫染色を行うことにより、蛋白質の同定が可能であった。今回、こうして同定したPCNAはlate G₁~S期の細胞核内に特異的に出現する蛋白質であることから、二次元電気泳動法を用いてPCNAの量的変化を観察することにより、今後、グリオーマ細胞の増殖能の程度を容易に推定できるようになるものと考えられる。

本論文の要旨は、第44回(1985年10月、長崎)および第45回(1986年10月、東京)日本脳神経外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Benda P, Lightbody J, Sato G, Sweet W: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371, 1968
- 2) Bravo R, Celis JE: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 84: 795-802, 1980
- 3) Celis JE, Celis A: Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin (proliferating cell nuclear antigen) in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3262-3266, 1985
- 4) Chang PK, Frakes R, Tan EM, Brattin MG, Smetana K, Busch H: Indirect immunofluorescence studies of proliferating cell nuclear antigen in nucleoli of human tumor and normal tissues. *Cancer Res* 43: 3770-3777, 1983
- 5) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and iodo-deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-476, 1982
- 6) 本田千穂, 田淵和雄, 入江恵子, 福岡高宏, 三野章典, 吉岡純二, 植田清隆, 大本堯史: 培養グリオーマ細胞に及ぼすforskolinの影響. *神経化学* 24: 223-225, 1985
- 7) Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB, Edwards MSB, Gutin PH, Davis RL, DeArmond SJ: In situ cell kinetics studies on human neuroectodermal tumors with bromodeoxyuridine labeling. *J Neurosurg* 64: 453-459, 1986
- 8) Hoshino T, Wilson CB: Cell kinetic analysis of human malignant brain tumors (gliomas). *Cancer* 44: 956-962, 1979
- 9) Johnson HA, Haymaker WE, Rubini JR, Fliedner TM, Bond VP, Cronkite EP, Hughes WL: A radiographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after in vivo uptake of tritiated thymidine. *Cancer* 13: 636-642, 1960
- 10) Manabe T, Hayama E, Okuyama T: Microscale multisample two-dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. *Clin Chem* 28: 824-827, 1982
- 11) Manabe T, Okuyama T: Quantitative analysis of two-dimensional electropherograms with a television camera-microcomputer system. *J Chromatogr* 264: 435-443, 1983
- 12) 真鍋 敬, 奥山典生: 二次元電気泳動法. *ぶんせき* 12: 941-947, 1983
- 13) Mathews MB, Bernstein RB, Franza BR, Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376, 1984
- 14) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978
- 15) 長島 正, 星野孝夫: 5-Bromodeoxyuridine (BrdU)を用いたヒト中枢神経系腫瘍の成長解析. *脳と神* 37: 1195-1201, 1985
- 16) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis. *J Biol Chem* 250: 4007-4021, 1975
- 17) O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142, 1977

- 18) Ogata K, Ogata Y, Nakamura RM, Tan EM: Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. *J Immunol* 135: 2623-2627, 1985
 - 19) Ponten J, Macintyre EH: Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Path Microbiol Scand* 74: 465-486, 1968
 - 20) Schmidek HH, Nielsen SL, Schillei AL, Messer J: Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitroso-methylurea. *J Neurosurg* 34: 335-340, 1971
 - 21) 田淵和雄, 本田千穂, 中根一穂: グリオーマの悪性度診断における増殖性細胞核抗原(PCNA)の有用性. 医のあゆみ 137: 319-320, 1986
 - 22) Tabuchi K, Honda C, Nakane PK: Demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 27: 1-5, 1987
 - 23) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 154: 1899-1909, 1981
 - 24) Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM: Characterization of antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J Exp Med* 159: 981-992, 1984
 - 25) Takasaki Y, Robinson WA, Tan EM: Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis of patients with chronic myeloid leukemia. *JNCI* 73: 655-661, 1984
 - 26) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
- 〔別刷請求先: 〒769-16 香川県三豊郡豊浜町姫浜708, 三豊総合病院脳神経外科, 本田千穂〕