〔原 著〕

2次元等電点-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 を用いたヒト各種正常臓器細胞蛋白質の検索*

貞広 莊太郎**・高見 博**・高橋哲也**・奥田康一**
小平 進**・石村 巽***・阿部令彦**

Summary

The cellular proteins from various human organs were analyzed by two-dimensional (isoelectric focusing-SDS PAGE) electrophoresis. More than one hundred of polypeptide spots were detected in each organ. Although a unique polypeptide map was obtained from each organ, the patterns of stomach and colon, both originating from the same germ layer and possessing columnar epithelium, were relatively similar. The patterns of heart muscle and skeletal muscle, both originating from the same germ layer and possessing the ability of contraction, were quite different from each other. Those of liver and kidney were similar, although the organs were originated from different germ layer and possessed different functions and cell types. Therefore, the patterns in various organs could not be classified according to their histology, functions and embryology.

There were three spots (molecular weight $\times 10^{-3}$ /isoelectric point: 55/6.0, 43/7.6, 38/8.0), which were commonly found in all of the organs except for the blood. These spots might be species-associated cellular proteins.

There were several qualitatively or quantitatively characteristic spots in each organ. These might be organ-associated cellular proteins.

Key words: organ-associated cellular proteins, species-associated cellular proteins, two-dimensional isoelectric focusing-SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

はじめに

ヒトの1個体を構成しているすべての細胞は同一のDNAを遺伝子として有しており、その調節遺伝子による遺伝子発現の違いから胚細胞が特徴ある形態と機能を有する種々の細胞に分化し、さらに多細胞集合体である臓器組織が形成されていくと考えられている。一方、癌においては正常細胞を癌として発現させる癌遺伝子およびそれを調節する調節遺伝子が存在し、この癌遺伝子の発現により mRNA を介しアミノ酸から癌蛋白質が合成され、癌としての表現形質が作られると考えられている。

著者らは、この癌にみられる蛋白質、すなわち癌関連蛋白質を、著者らにより改良された O'Farrell の 2 次元等電点-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法^{1,2)}を用いて検索してきた³⁻⁷⁾。しかしながら、これら癌組織の細胞蛋白質の検索にはヒト正常組織の細胞蛋白質のマッピングが必要不可欠である。したがって、本稿ではヒトの各種正常臓器の細胞蛋白質のポリペプチドマップを作製し、各種臓器に共通したポリペプチドおよび個々の臓器に特徴的なポリペプチドを検索し、若干の考察を加え報告する。

* A study of cellular proteins from various human organs by two-dimensional gel electrophoresis.

** Sotaro Sadahiro, Hiroshi Takami, Tetsuya Takahashi, Koichi Okuda, Susumu Kodaira, Osahiko Abe, 慶応義塾大学医学部外科学教室.

*** Yuzuru Ishimura, 慶応義塾大学医学部医化学教室.

(受付 1984年1月27日, 受理 1984年3月7日)

実験材料ならびに実験方法

1. 実験材料

ヒトの脳・心臓・肺・食道・胃・大腸・肝・脾・腎・骨格筋・子宮・甲状腺・乳腺を対象として、各々2～5検体を手術材料あるいは死後6時間以内の剖検材料から採取し、ただちに -80°C で冷凍保存した。血液は健康成人の肘静脈から採取した。なお、食道・胃・大腸は粘膜および粘膜下組織を、心臓・子宮は筋肉層を検索対象とした。

2. 試料の作製

各組織の細胞蛋白質の調製法⁸⁾は既に報告したので概略を記す。すなわち、組織を解凍後細切し、lysis buffer [2% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 中でホモジナイズ後、RNase (bovine pancreas, P-L Biochem., U.S.A.) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え静置した。次に超音波により核膜を破壊し、さらに DNase (bovine pancreas, SIGMA, U.S.A.) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え静置後、9.5 M 尿素・2% Nonidet P-40・5% 2-mercaptoethanol・2% Ampholine (pH 3.5～10, LKB, Sweden) 溶液とした。ついで12,000 $\times g$, 30分間遠心分離し上清を細胞蛋白質とした。これらの操作はすべて 4°C 下にて行い、細胞蛋白質はBradford法に基づくProtein-Assay Kit (Bio-Rad, U.S.A.) により定量し、200～800 μg を2次元電気泳動した。

3. 2次元電気泳動法

本法については既に報告^{8,9)}しているので略記する。

1) 1次元目等電点電気泳動

内径2 mm, 長さ70 mmのカラムを使用した。ゲルは4%アクリルアミド ($T=4.0\%$, $C=5.3\%$) とし、電極槽液は陽極に0.01 M リン酸, 陰極に0.02 M 水酸化ナトリウムを用いた。100 V, 60分間の予備泳動後, 陽極端に試料をセットし, 100 V, 60分間, 続いて200 V, 170分間, さらに300 V, 10分間の本泳動を行った。泳動後, ゲルはadaptation buffer [0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2.3% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol] 中で平衡化した。

2) 2次元目 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2次元目の板状セルは, 10.2 $\times$ 8.2 $\times$ 0.12 cm のガラス板と, スペーサーとして10.2 $\times$ 0.6 $\times$ 0.12 cm のガラス板を用いて作製した。濃縮用ゲルは4.5% アクリルアミド ($T=4.5\%$, $C=2.7\%$), 分離用ゲルは11% アクリルアミド ($T=11.0\%$, $C=2.7\%$) とし, 電極槽液として0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glycine,

0.1% sodium dodecyl sulfate 溶液を用いた。セルは水平にセットし, 0.1% Bromphenol blue をマーカーとし25 mA/gel で約70分間泳動した。

3) 染色・脱染色

泳動終了後, ゲルは染色液 [0.01% Coomassie brilliant blue R 250, 10% trichloroacetic acid, 10% acetic acid, 20% methanol] 中で1晩振盪した。染色後, 脱色液 [10% acetic acid, 10% isopropyl alcohol] 中で約5時間振盪し脱染色した。

4) 等電点ならびに分子量の推定

等電点は, 同時に泳動した1次元目のゲルを5 mm 間隔に切断し, 精製水中で1晩振盪後 pH メーターにより求めた pH 勾配から推定した。分子量は, SDS-ゲル分子量測定用標準蛋白質 (BioRad, U.S.A.) を2次元目に同時に泳動し推定した。

5) スポットの表示

それぞれのスポットは分子量 $\times 10^{-3}/\text{pI}$ (等電点) で表示した。例えば, 180/6.1 は分子量180,000, 等電点 pH 6.1 のスポットを示している。

6) ポリペプチドマップの評価と検索

各ゲルのポリペプチドマップ上, 比較的大きく濃い15～20個のスポットからなるポリペプチドマップを便宜上, スポットパターンと称した。これらのスポットパターンを中心に各種臓器のスポットを比較し, 各臓器に共通したスポットおよび各臓器に特徴的なスポットを検索した。

4. 材料の保存性の検討

手術時採取したヒト肝を3分割し, 1部はただちに -80°C に冷凍保存した。残りは各々3時間室温にて放置後冷凍保存・6時間室温にて放置後冷凍保存した。これら3検体から, それぞれ細胞蛋白質を調製し2次元電気泳動し, そのポリペプチドマップを比較した。

5. 材料の部位による差および個体差の検討

各臓器について, 同一個体よりえた臓器から3ヵ所を採取し, それぞれの細胞蛋白質のポリペプチドマップを比較した。次いで, 同一臓器からえられた細胞蛋白質のポリペプチドマップを個体間で比較した。

6. 細胞蛋白質の回収率の検討

試料として調製した細胞蛋白質の回収率を, ヒト肝を用いて検索した。3検体をそれぞれ2分割し, 一方は細胞蛋白質を調製し, 前述した方法により総蛋白質量を測定した。他方は Kjeldahl 法⁹⁾により組織の総窒素量を測定し, これより組織の総蛋白質量を求めた。これらの値から細胞蛋白質の回収率を算出した。

Fig. 1. 2D-Electrophoretic patterns of cellular proteins of human organs.

A. Esophagus B. Stomach C. Large intestine D. Pancreas

$\blacktriangledown$: characteristic spot in each organ $\triangle$ 1 : Albumin $\square$ 2 : Transferrin

$\circ$ 3 : Hemoglobin ∇ : Spot which was found in a few organs

∇ : Spot which was found in 11 or more organs

Fig. 2. 2D-Electrophoretic patterns of cellular proteins of human organs.
A. Brain B. Lung C. Liver D. Kidney
Symbols are the same as shown in Fig. 1.

材料の保存性について、手術時にえた肝をただちに冷凍保存した材料・3時間室温放置後冷凍保存した材料・室温に6時間放置後冷凍保存した材料で、細胞蛋白質のポリペプチドマップを検討すると、3者は極めてよく類似していた。

なお，細胞蛋白質の回収率は，肝では平均 90.5% (range 4.7%) であった。

食道 (Fig. 1, A) は発生学的に内胚葉前腸由来の臓器

胃 (Fig. 1, B) は発生学的には食道と同じく内胚葉由来の臓器であるが、組織学的には腺上皮からなる。290個のスポットが分離され、61/7.5, 55/6.0, 48/6.8, 43/7.6, 38/8.0, 37/7.1 の比較的大きな6個のスポット (↓) は食道と同様認められた (Table 1) が、胃のスポットパターンは食道のそれとは著しく異なっていた。

脾 (Fig. 1, D) は内胚葉前腸由来の臓器で、組織学的には複合胞状腺からなる外分泌部とそこに散在する内分泌部とから構成される。300個のスポットが分離され、56/6.6, 54/6.5, 49/6.6, 47/6.7, 33/6.1 の大きなスポット (▼) は脾に特徴的であった。また ↓ で示した6個のスポットは脾にも認められた (Table 1)。

肺 (Fig. 2, B) は内胚葉由来で, 多数の肺胞構造からなっている. 260 個のスポットが分離され, 食道・胃・大腸・脾・大脳に共通してみられた 6 個のスポット (↓) は肺にも認められた (Table 1). 肺のスポットパターンには, 胃・大腸のそれと類似性がみられた.

61/7.5 ²⁾	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
55/6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48/6.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
43/7.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
38/8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37/7.1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

Table 1. Summary of spots¹⁾ which are commonly found in 11 or more organs studied.

- 23 —

Fig. 3. 2D-Electrophoretic patterns of cellular proteins of human organs.

A. Thyroid B. Breast

Symbols are the same as shown in Fig. 1.

れたが, 61/7.5, 37/7.1 のスポットはみられなかった (Table 1). また, 58/6.9, 39/7.7 のスポット (V) は腎 (Fig. 2, D) と共通してみられ, 50/6.9, 44/7.8, 43/7.3 のスポット (V) は腎と心臓 (Fig. 4, A) とに共通していた。

腎 (Fig. 2, D) は中胚葉由来の臓器で, 組織学的には糸球体と尿細管とが含まれる。360 個のスポットが分離され, 分子量 60,000~35,000, 等電点で pH 6.5~8.0 の範囲に多数のスポットが密在していた。39/6.5 のスポット (▼) は腎に特徴的であり, また ↓ で示した 6 個のスポットは腎にも認められた。 (Table 1) 一方, 90/7.1 のスポット (V) は心臓と共通してみられ, 前述のごとく, 58/6.9, 39/7.7 のスポット (V) は肝と, 50/6.9, 44/7.8, 43/7.3 のスポット (V) は心臓と肝とに共通していた。腎と肝のスポットパターンには類似性がみられ, かつ他の臓器のそれとは著しく異っていた。

甲状腺 (Fig. 3, A) は内胚葉由来の臓器で, 組織学的にはコロイドを含んだ多くの腺管がみられる。120 個のスポットが分離され, 38/7.1 のスポット (▼) が特徴的であった。また, Table 1 に示した 6 個のスポット

(↓) のうち 61/7.5, 55/6.0, 48/6.8, 43/7.6, 38/8.0 の 5 個のスポットはみられたが, 37/7.1 のスポットはみられなかった。

乳腺 (Fig. 3, B) は外胚葉由来の乳腺組織と中胚葉由来の結合組織とから構成されており, 100 個のスポットが認められた。6 個のスポット (↓) は乳腺でも認められた。また Alb (↓1), Tf (↓2), Hb (↓3) のスポットは他のスポットに比し著しく大きかった。

心臓 (Fig. 4, A) は発生学的には中胚葉由来の臓器で, 組織学的には心筋からなり, 280 個のスポットがみられた。Table 1 に示した 6 個のスポットのうち, 61/7.5, 55/6.0, 43/7.6, 38/8.0, 37/7.1 の 5 個のスポット (↓) は認められたが, 48/6.8 のスポットはみられなかった (Table 1)。一方, 90/7.1 のスポット (V) は前述のごとく腎と共通してみられ, 同様に 50/6.9, 44/7.8, 43/7.3 のスポット (V) は肝と腎とに, 43/7.0, 26/5.4 のスポット (V) は食道と骨格筋とに共通していた。しかし, 心臓のスポットパターンは他の臓器のそれとは著しく異っていた。

骨格筋 (Fig. 4, B) は中胚葉由来であり, 組織学的に

Fig. 4. 2D-Electrophoretic patterns of cellular proteins of human organs.
A. Heart B. Skeletal muscle C. Uterus D. Blood
Symbols are the same as shown in Fig. 1.

は横紋筋からなる。240個のスポットが分離され、36/5.8, 30/7.1 の大きなスポット (▼) が特徴的であった。また、心臓と同様 61/7.5, 55/6.0, 43/7.6, 38/8.0, 37/7.1 の5個のスポット (↓) はみられたが、48/6.8 のスポットはみられなかった (Table 1)。一方、前述のごとく 43/7.0, 26/5.4 のスポット (V) は食道と心臓とに共通していた。しかし、骨格筋のスポットパターンは他の臓器のそれとは著しく異っていた。

子宮 (Fig. 4, C) は中胚葉由来の臓器で、採取した筋肉層は平滑筋からなる。260個のスポットがみられ、160/6.8, 130/8.0 の大きなスポット (▼) は子宮に特徴的であった。一方、食道・胃・大腸・脾・大脳・肺・腎・乳腺と同様6個のスポット (↓) は子宮にも認められた (Table 1)。子宮のスポットパターンには、胃・大腸のそれと類似点がみられた。このように同じ中胚葉由来の筋肉組織である心臓・骨格筋・子宮のスポットパターンは互いに著しく異っていた。

血液 (Fig. 4, D) には40個のスポットを認めた。Alb (↓1), Tf (↓2), Hb (↓3) のスポットは著しく大きく、その他のスポットは小さかった。

今回検索した13の各種臓器において、Alb, Tf, Hb, および 55/6.0, 43/7.6, 38/8.0 のスポットはいずれにも共通してみられた (Table 1)。これらのうち、Alb, Tf, Hb は血液では著しく大きなスポットとしてみられたが、55/6.0, 38/8.0 のスポットは血液では小さく、また 43/7.6 のスポットは血液にはみられなかった。

考 察

蛋白異常に関連する種々の代謝異常疾患、進行性筋ジストロフィーなどの遺伝疾患および癌などの病因・病態の研究に、電気泳動法を用いた蛋白質の分析は広く行われている。著者らは既に O'Farrell の2次元等電点 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を改良し、少量の試料で泳動可能にした方法¹⁾により動物の癌で癌関連蛋白質を報告してきた³⁻⁵⁾。最近にはさらに、高分解能にて泳動時間を短縮した改良法²⁾を用いて、ヒトの癌組織における癌関連蛋白質を検索しているが^{6,7)}、これらの検索には癌発生の母体であるヒト各種正常臓器の蛋白質の、詳細なマッピングが必要不可欠である。

著者らは既にラットの各臓器の細胞蛋白質を本法を用いて検索し、(1)各臓器いずれにも共通して認められるスポットが存在すること、(2)各臓器はそれぞれ特徴あるポリペプチドマップを有し、質的あるいは量的に各臓器に特徴的と考えられるスポット (臓器関連細胞蛋白質) がいくつか認められること、(3)組織学的・発生的・機能

的に類似点を有する腺胃・小腸・大腸などには、共通したスポットがみられる反面、共通しないスポットもみられること、(4)肝と腎には多数の共通するスポットがみられること、などの結果を報告した。

著者らは今回、実験材料の保存性を検討したところ、切除あるいは死後6時間以内の材料を用いる限り、経過時間による細胞蛋白質の変化は考慮する必要はないと考えられた。また、材料の採取部位あるいは個体による細胞蛋白質の変動も軽度であり、採取部位や個体差を考慮しても結論が大幅に変わることはないと考えられた。一方、細胞蛋白質は前述した試料作製法によれば、回収率は平均 90.5% (肝) と比較的高率であったので、細胞内に多量に含まれている structural proteins や酵素などは、本法において検出・分析されていると考えられた。また、各臓器には少量の血液が存在していると考えられるが、血液の細胞蛋白質のスポットは Alb, Tf, Hb を除外すればごく僅かであった。それゆえ、各臓器のポリペプチドマップにおける血液の影響は極めて少ないと考えられた。

これらのことより、特有の組織像と機能を有している各臓器の細胞蛋白質から、それぞれ特徴あるポリペプチドマップがえられたことは予想されたことであった。特に、肝にみられた大きな 180/6.1 のスポットのような他の臓器に検出されないスポット、および他の臓器に比し著しく多量に存在する特徴あるスポットは、臓器関連細胞蛋白質の範疇に入るものと考えられた。また、同じく内胚葉由来で組織学的・機能的に類似点のある胃と大腸の細胞蛋白質に、類似性がみられたことも予想されたことであった。しかし、同じく中胚葉由来で組織学的にも横紋を有する心臓と骨格筋の細胞蛋白質には著しい差がみられ、反対に発生学的・組織学的・機能的に著しく異なる肝と腎の細胞蛋白質には類似性がみられた。また、例えば 48/6.8 のスポットは、内胚葉由来臓器である食道・胃・大腸・脾・肺・肝・甲状腺、外胚葉由来臓器である大脳、および中胚葉由来臓器である腎・子宮に検出されたが、同じく中胚葉由来である心臓と骨格筋には検出されなかった (Table 1)。一方、37/7.1 のスポットは内胚葉由来臓器である食道・胃・大腸・脾・肺にはみられたが、同じく内胚葉由来の肝と甲状腺にはみられなかった。このように、内・中・外の胚葉別、あるいは組織型別、機能別からのみスポットおよびスポットパターンの共通性・特徴を説明することは困難であった。組織発生・分化の過程において、蛋白質がいかなるかわりあいを持っているか明確でない現在、細胞蛋白質のポリペプチドマップを規定する主因子について、今後追究し

ていく必要があろう。

種 (species) 間での臓器の蛋白質の比較は、古くより種々の方法を用いて行なわれている。Comings ら¹⁰⁾ は 1 次元 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いてラット・ウズラ・カエル・魚の細胞質蛋白質を、Barrett ら¹¹⁾ は 2 次元等電点-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いてラットとニワトリの非ヒストン核蛋白質を比較しているが、いずれも同一臓器では、種間で類似点が多いと報告している。著者らのヒトの胃・大腸・脾・大腸・肺・肝・腎・心臓・骨格筋・子宮・血液の細胞蛋白質を、それぞれ既に報告したラットの各臓器⁸⁾ と比較したところ、同一臓器ではスポットパターンは比較的類似していたが、個々のスポットについてみると、等電点と分子量とがともに一致するスポットは多くなく、種間での差異が存在した。

一方、今回検索したヒトの 13 の各種臓器には、いずれにも共通してみられるスポットが存在した。それらの中で、血液において大きなスポットとしてみられた Alb, Tf, Hb 以外に、Table 1 に示した 55/6.0, 43/7.6, 38/8.0 のスポットはラットの各臓器にみられず、ヒト細胞に共通する蛋白質である可能性がある。

今回作製したポリペプチドマップは、分子量 200,000 ~ 20,000, 等電点で pH 5.5 ~ 8.5 の範囲内に泳動され、かつ本実験の条件下で可溶性の蛋白質からなっている。また、Coomassie brilliant blue 染色にて検出可能な 100 ~ 360 個の蛋白質に限定しており、検索した臓器も 13 種と血液のみである。したがって、今後より微量のポリペプチドを検出する場合には、銀染色やラジオオートグラフィーを用いたり、また泳動可能な分子量・等電点をより拡大する必要もあろう。

結 語

ヒトの 13 種の臓器と血液の細胞蛋白質を、2 次元等電点-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて分析したところ、各臓器の細胞蛋白質にはそれぞれ 100 個以上のスポットがみられ、それぞれ特有なポリペプチドマップを有していた。しかし、同じ内胚葉由来で腺上皮からなる胃と大腸のスポットパターンには類似性が認め

られたが、同じ中胚葉由来で横紋を有する心臓と骨格筋のスポットパターンは著しく異なっていた。一方、発生学的・組織学的・機能的に著しく異なる肝と腎のスポットパターンには類似性がみられた。したがって、各臓器の細胞蛋白質のポリペプチドマップと組織型・機能・発生学的胚葉等の間の関連性は少なかった。

各臓器の細胞蛋白質には、質的あるいは量的に特徴的なスポットが認められ、これらは臓器関連細胞蛋白質である可能性が推測された。

一方、血液を除いた 13 種の臓器いずれにも共通して認められるスポットが 3 個 (55/6.0, 43/7.6, 38/8.0) あり、これらはヒト細胞に共通する細胞蛋白質である可能性が示唆された。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、ご助言いただいた東京理科大学理学部化学科 奥山典生教授と真鍋敬博士に深謝致します。一部の材料をご提供いただいた慶応義塾大学医学部病理学教室の御好意に感謝致します。また、実験にご協力いただいた藤崎園枝嬢、田中敏文氏に感謝致します。

文 献

- 1) 高見 博：蛋白質核酸酵素, **23** : 924, 1978.
- 2) 高見 博：臨床検査, **26** : 1537, 1982.
- 3) Takami, H. et al. : Cancer Res., **39** : 507, 1979.
- 4) Takami, H. et al. : Cancer Res., **39** : 2096, 1979.
- 5) Takami, H. et al. : Keio J. Med., **29** : 9, 1980.
- 6) 貞広荘太郎他：最新医学, **38**, 413, 1983.
- 7) Sadahiro, S. et al. : Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **24** : 164, 1983.
- 8) 貞広荘太郎他：生物物理化学, **27** : 181, 1983.
- 9) 菅原 潔他：生物化学実験法 7, 蛋白質の定量法, 初版, 学会出版センター, 東京, 1977, p.25
- 10) Comings, D.E. et al. : Experimental Cell Res., **75** : 73, 1972.
- 11) Barrett, T. and Gould, H.J. : Biochim. Biophys. Acta, **294** : 165, 1973.