〔シンポジウム：プロット法と診断〕

Western blot 法による HeLa 細胞フェリチンの分析

山口 稽 子

はじめに

鉄貯蔵タンパクであるフェリチンは、24 個の 2 種のサブユニットから構成されるヘテロポリマーで、還元条件下に SDS-PAGE を行うと、分子量 21,000 の H と 19,000 の L サブユニットが認められる。したがって、両サブユニットの組成の異なるフェリチン分子が、可能性として 25 個存在し、等電点電気泳動で検出できる。等電点の低いフェリチン分子は H サブユニットの比率が高く、等電点が高いほど L サブユニットが多くなる。

フェリチンはある種の悪性腫瘍患者の血清中に増加するため、現在、腫瘍マーカーとしてあるいは治療モニターとして用いられているが、腫瘍に特異的なフェリチンが存在するかどうか、未だ明らかにされていない。この点を解明するため、また腫瘍フェリチンに特異性の高い測定法を確立するため、モノクローナル抗体の作成を試みた。

本稿では、HeLa 細胞フェリチンを用いて作成したモノクローナル抗体の性状、およびそのエピトープの分析を Western blot 法で行う上での問題点を中心に紹介する。

腫瘍フェリチン

イソフェリチンプロファイルは由来臓器によって異なり、ヒト肝および脾臓フェリチンは塩基性の、心や胎盤フェリチンは酸性のプロファイルを示す。悪性腫瘍の場合、正常と比較してより酸性側にシフトした染色像が得られる (図 1 A)。またサブユニット組成も変化し、正常フェリチンより H サブユニットの比率が高くなる。腫瘍フェリチンのサブユニットも正常と同じもので、単に両サブユニットの組成が変化しただけとの見解があ

るが、このような性状の変化に基づいている。

一方、正常とは異なるサブユニットの存在を示唆する結果も得られている。慢性白血病細胞 K 562 に、H と L 以外のフェリチンサブユニットをコードする遺伝子を見出し、それによって生合成された S ペプチドが 43 kDa の分子量をもつことが報告されている¹⁾。また、肝細胞癌フェリチンの高速液体クロマトグラフィーによる分析で、H と L 以外のピークが認められており²⁾、正常とは異なるサブユニットが存在する可能性がある。

腫瘍フェリチンのもう一つの特徴は、鉄含量がきわめて低いことである。正常フェリチンの場合酸性フェリチンほど鉄の取り込みが速く³⁾、またそれに関係の深い ferroxidase 活性部位が、H サブユニットに存在すること⁴⁾ が知られている。腫瘍フェリチンは正常フェリチンと比べて、H サブユニットの比率が高くなるにもかかわらず、鉄の取り込みが遅くまた ferroxidase 活性も低値を示す⁵⁾。これらの結果は、腫瘍フェリチンの H サブユニットが、正常のそれとは異なることを示唆している。

HeLa 細胞フェリチンのモノクローナル抗体の性状

腫瘍フェリチンに特異性の高いモノクローナル抗体の作成を目的として、抗原に HeLa 細胞フェリチンを使用した。最終的に 9 種類のモノクローナル抗体が得られたが、すべて IgG(κ) であった。これらのモノクローナル抗体が腫瘍フェリチンに特異的なものかどうかを検討する場合、抗原として用いたフェリチンと類似のサブユニット組成をもつフェリチンを、コントロールとして用いるのが望ましい。図 2 に MoAb 04231 と種々の正常組織フェリチンとの反応性を、ELISA 法を用いて検討した結果を示す。MoAb 04231 はヒト脾臓フェリチンを

Western blot analysis of HeLa cell ferritin.

Keiko Yamaguchi; 東京理科大学薬学部臨床病態学教室

Correspondence address: Keiko Yamaguchi, Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo, 12 Ichigaya Funakawara-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

図 1. HeLa 細胞フェリチンのモノクローナル抗体と正常肝および肝細胞癌フェリチンの反応
セ・ア膜等電点電気泳動後 A) 抗肝フェリチン抗体, B) MoAb 04231 で染色した。

図 2. HeLa 細胞フェリチンのモノクローナル抗体と各種正常組織フェリチンの反応

はじめ、酸性フェリチンである心および胎盤フェリチンとも反応せず、HeLa 細胞フェリチンとのみ反応した。このモノクローナル抗体を含めて、HeLa 細胞フェリチンに特異性の高い抗体は 3 種類であった。

次に、これらのモノクローナル抗体と他の腫瘍フェリチンとの反応性を検討した。セルロース・アセテート膜等電点電気泳動後、まずモノクローナル抗体で免疫染色し、続いて同じ膜を抗肝フェリチン抗体を用いて染色した。MoAb 04231 は肝細胞癌および K 562 から精製したフェリチンとも反応した。図 1 A に肝細胞癌フェリチンの結果を示す。しかし、HeLa や K 562 細胞のフェリチンと同じ位置に認められた心フェリチンのバンドは、モノクローナル抗体でほとんど検出できなかった。さらに、MoAb 04231 を用いて、正常肝組織と肝癌組織切片を酵素免疫染色した結果、両染色像に明らかな差が認められた⁶⁾。これらの結果から、MoAb 04231 は腫瘍フェリチンに特異的なエピトープを認識していると推定し

た。

Western blot 法によるエピトープの分析

1. フェリチンのペプチドへの断片化

大きなタンパク質の一次構造を決定する場合、通常まずいくつかのポリペプチドに分離し、それぞれのポリペプチドをさらに小さなペプチドに切断する。ブロッティング後、免疫染色によってそのペプチドを同定するだけなら、ポリペプチドを分離精製する必要がないので、タンパク質から小ペプチドにワンステップで切断できれば好都合である。フェリチンサブユニットの解離は、変性剤や還元剤の存在下あるいは高濃度の希酸溶液中で起こる。このようなサブユニットの解離条件下で、小ペプチドに切断できる方法があればそれを用いる。フェリチンサブユニットの分子量は共に約 20,000 であり、したがって得られるペプチドの分子量があまり小さくならないように、切断箇所の少ない方法を選択することが重要である。

断片化する方法は、酵素を用いるものと化学的切断法がある。現在、この目的で良く利用されている酵素は、酸性および塩基性アミノ酸の N 末端か C 末端を切断するものが多い。フェリチンはこれらのアミノ酸含量が高く、またその他の酵素を用いるにしても、サブユニット解離条件下で活性を保持することは難しい。Table 1 は化学的切断に用いられる試薬と、H サブユニットの切断箇所を示す。このうち、希酸酸性条件下で行える BrCN を用いた方法は得られる断片数も適当で、上記条件に合致する。

Table 1. Chemical methods for protein cleavage analysis.

Position	Chemicals	Position in H subunit
Met-X	BrCN	³⁷ Met-Ser, ⁷⁰ Met-Lys, ¹⁰⁰ Met-Gly, ¹⁵⁸ Met-Gly
Trp-X	BNPS-skatole, DMSO-HCl-HBr	⁹³ Trp-Glu
Asn-Gly	NH ₂ OH	—
Asp-Pro	HCOOH, TFA	¹²⁶ Asp-Pro
X-Cys	NTCB, DMAP	⁹⁰ Cys-Asp, ¹⁰² Cys-Ala, ¹³⁰ Cys-Asp

BNPS-skatole: 3-Bromo-3-methyl-2-(nitrophenylmercapto)-3H-indole

DMSO: Dimethylsulfoxide

TFA: Trifluoroacetic acid

NTCD: 2-Nitro-5-thiocyanobenzoic acid

DMAP: 4-Dimethylaminopyridine

Table 2. Fragment of ferritin H subunit obtained by BrCN.

Fragment	Length	Weight	pI
Thr (1)-Met (37)	37aa	4,267	5.3
Ser (38)-Met (79)	33aa	4,119	5.7
Lys (71)-Met (100)	30aa	3,477	6.4
Glu (101)-Met (158)	58aa	6,752	6.8
Gly (159)-Ser (182)	24aa	2,553	3.6

フェリチンの両サブユニットの一次構造はすでに解明されている。一次構造が明らかなものについては、タンパク質のデータ・バンクを利用して、各種切断法によって得られるペプチド断片の情報を入手することができる。

2. 電気泳動によるペプチドのマッピング

BrCN 分解によってHサブユニットから、Table 2 に示したようなフラグメントが得られる。これらのペプチドはすべて 10 kDa 以下のペプチドである。このような低分子ペプチドの場合、Laemmli 法では高濃度ゲルを用いても十分な分離は望めない。最近、トレーディングイオンをグリシンからトリシン [N-トリス (ヒドロキシメチル) メチルグリシン] に変えて、5-20 kDa のペプチドの分離が尿素の添加なしで行えること、尿素を使用するとさらに低分子の分離が可能であったと報告されている⁷⁾。HeLa 細胞フェリチンのペプチド断片とほぼ同じ分子量をもつ、ヒトの補体成分 C3 の断片化されたペプチド (1-20 kDa) のマッピングに応用された例も報告されている⁸⁾。

フェリチンサブユニットの BrCN によって得られる断片についてはタンパク質のデータバンクからそれぞれの等電点も知ることができる。分子量がほぼ同じもの (¹Thr-³⁷Met, ³⁸Ser-⁷⁰Met は、SDS-PAGE では分離できないが等電点電気泳動で分離できる。したがって、SDS-PAGE だけでは不十分な場合、両電気泳動あるいはそれらを組み合わせた二次元電気泳動を行うことにより、すべてのペプチドに相当するバンドあるいはスポットが検出できる可能性がある。

3. ブロットイング

電気泳動で分離されたペプチド断片を抗体と反応させて検出するために、ゲルからフィルターにブロットイングする。使用緩衝液、ブロットイング時間などの検討が必要であるが、中でもフィルターの選択が大切である。最近、ブロットイングされたタンパク質のバンドから、直接アミノ酸配列を決定することが可能になり⁹⁾、タンパク質やペプチドの結合容量の大きなフィルターの開発

図 3. Western blot 法によるモノクローナル抗体 04231 が認識するフェリチンサブユニットの分析

が盛んに行われている。その分析に現在、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜が最も良く使用されている。2 kDa 以下のペプチドがゲルよりも PVDF 膜上に良く保持されていたとの報告がある⁸⁾。数社から市販されているので、その中から最適のものを選択する。しかし、抗体と反応させる前のフィルターの洗浄およびブロッキング操作中に、ブロットイングされたペプチドの一部が失われることがある。これを防止するため、場合によっては、ペプチドに有効な固定液についての検討がなされるべきかもしれない。

図 3 にフェリチンを SDS-PAGE でサブユニットに分離した後、PVDF 膜を用い常法に従ってブロットイングし、MoAb 04231 で免疫染色した結果を示す。MoAb 04231 は H サブユニットとのみ反応し、腫瘍フェリチンの H サブユニットが正常と違うという、先の結果とよく一致するものであった。

おわりに

HeLa 細胞フェリチンのモノクローナル抗体を作成し、正常組織フェリチンとはほとんど反応しないが、腫瘍フェリチンとよく反応するモノクローナル抗体を得た。組織染色でも同様な結果が得られたことから、腫瘍フェリチンに特異的なエピトープあるいはサブユニット

(444) 生物物理化学

が存在すると考えられる。そのモノクローナル抗体の認識するエピトープを Western blot 法で分析する時の最大の問題は、電気泳動による小さなペプチド断片の分離と、ペプチドを膜上に効率よく保持することである。

Western blot 法である程度そのペプチドを特定できれば、ただちにあるいは若干の操作（Hサブユニットの分離精製など）を行うだけで、アミノ酸配列の決定が可能である。今後、このモノクローナル抗体や合成ペプチドを用いたフェリチンのアッセイ系を確立することにより、腫瘍マーカーとしてのフェリチンの有効性はさらに増すものと期待される。

文 献

- 1) Shterman, N. et al.: Cancer Res., **49**: 5033, 1989.
- 2) 山口稽子, 他: 医学のあゆみ, **145**: 513, 1988.
- 3) Wagstaff, M. et al.: Biochem. J., **173**: 969, 1978.
- 4) Levi, S. et al.: Biochemistry, **28**: 5179, 1989.
- 5) 山口稽子, 他: 生物物理化学, **35**: 129, 1991.
- 6) 浅川英男, 他: 医学のあゆみ, **153**: 545, 1990.
- 7) Schagger, H. and Jagow, G.: Anal. Biochem., **166**: 368, 1987.
- 8) Ploug, M. et al.: Anal. Biochem., **181**: 33, 1989.
- 9) 平野 久: 生物物理化学, **33**: 165, 1989.