

## 11. サイモポエチン刺激に対するヌードマウス脾臓細胞の応答性に関する研究

### 1. [<sup>35</sup>S]メチオニン標識新生蛋白質の2次元電気泳動/画像解析

○戸田年総・木村成道 (都老人研・分子生物学)  
石嶋康史 (同上, 東邦大・理・生理化学)  
松下浩司 (ASR 研)  
吉田光孝 (東邦大・理・生理化学)  
赤堀元規・佐野康子 (ファルマシア・バイオテック)

(目的) サイモポエチンは、主に胸腺および表皮で産生されるペプチドホルモンで、最初 Goldsteinら<sup>1)</sup>によってウシの胸腺から単離された。彼らは、ヌードマウス脾臓由来のThy-1陰性細胞をサイモポエチンで刺激するとThy-1陽性細胞へ変化することを見だし、サイモポエチンが胸腺におけるT細胞の分化誘導因子であると提唱した<sup>2)</sup>。しかし彼らの実験では、サイモポエチン刺激後約2時間でThy-1抗原の誘導が起こっており、分化の結果であると考えられるには反応が速すぎるうえ、Thy-1抗原の誘導を認めただけでT細胞の分化が誘導されたと断定することには問題がある。そこで我々は、サイモポエチン刺激に対するヌードマウス脾臓細胞の応答性を別の角度からあらためて調べ直してみる必要があると考え、本研究を行なった。

(方法) Goldsteinらの実験をできるだけ忠実に再現するために、ヌードマウス脾臓由来のThy-1陰性細胞をヒト型の合成サイモポエチンで刺激し、誘導的に発現してくる蛋白質を [<sup>35</sup>S]メチオニンで標識し、二次元電気泳動展開後オートラジオグラフィーを実施した。二次元パターンの解析には画像解析装置(二次元デンストメーター)を用いた

試料や試薬類、実験法は以下の通りである。  
動物: BALB/c nu/nu ヌードマウス、6週齢雄  
培地: メチオニン不含RPMI1640 ± 5% 透析ウシ胎児血清  
標識アイソトープ: 29.6 MBq/ml [<sup>35</sup>S]-Met (>37 TBq/mmol)  
ヒト型合成サイモポエチン (Gly Leu Pro Lys Glu Val Pro Ala Val Leu Thr Lys Gln Lys Leu Lys

Ser Glu Leu Val Ala Asn Gly Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Met Arg Lys Asp Val Tyr Val Glu Leu Tyr Leu Gln His Leu Thr Ala Leu His): 5 μg/ml  
一次元目: ファルマシア-LKB社製イモビライン・ドライストリップによる水平式等電点電気泳動 (pH 3-10.5 および pH 4-7)

二次元目: 12%T および 15%T 均一ゲル (16 x 15 cm) による垂直式SDS-PAGE (アナテック社製冷却式泳動槽使用)

二次元画像解析装置:

(結果) マウス脾臓抽出蛋白質の多くは弱酸性から中性の等電点領域に分布しており、一次元目の等電点電気泳動に用いるイモビライン・ドライストリップのpH範囲は4-7が適していた。しかしこの条件で等電点電気泳動を行なっても、単に一次的分離だけでは、サイモポエチン刺激による脾臓細胞の応答性を検出することは困難であった。またSDS-PAGEを単独で実施した場合も応答性を検出することはできなかった。これに対し両者を組み合わせた二次元電気泳動を行なった場合、血清の有無およびサイモポエチンの有無で影響を受けたと思われるスポットが検出された。今後さらに、これらのスポットの同定を試みると共に、Thy-1抗原誘導との関連性や、T細胞分化における意義について詳しい解析を進めていく予定である。

(文献)

1. Goldstein G. Nature 1974; 247: 11-14.
2. Scheid MP, Goldstein G, Boyse EA. J Exp Med 1987; 147: 1727-1743.