

P 47. 2次元電気泳動法によるヒト T リンパ球系白血病細胞の識別  
——I 報 CCRF・CEM と JURKAT の差異——

○藤本正憲・田中経彦・中村和行 (山口大・医・第1生化学)  
戸田年総 (都老人研・分子生物学)  
藤倉義久 (山口大・医・第1解剖学)

〔序〕

最近、J.E.Celis らは2次元電気泳動法を用いて細胞構成タンパク質の詳細な分析を行い、細胞の種類や病態におけるそれらタンパク質の変化を明らかにしつつある。<sup>1)</sup> 今回、我々はクローン化されたヒト T リンパ球系白血病細胞である CCRF-CEM 細胞と JURKAT 細胞についてその構成タンパク質の分析を2次元電気泳動法を用いて行い、若干の知見を得たので報告する。

〔材料及び方法〕

試料調製：CCRF-CEM及びJURKAT細胞は埼玉社会保険中央病院・小児科・免疫研究室の斉藤ミドリ博士より供与された。それぞれの細胞はRPMI-1640(日水)に0.005%ゲンタマイシン及び2mMグルタミンを含む培養液にFCS(Whittaker Bioproduct, Lot No. 9M0582)を10%加えた液を用い37℃, 5% CO<sub>2</sub> 大気中で培養し、増殖した細胞約 2×10<sup>9</sup> 個を採取した。接着性を示す CCRF-CEM 細胞はかき出し棒により物理的に培養瓶(フラスコ, 50mℓ)からはがし採取した。採取した細胞は 600×g で5分間遠心し上澄の培養液を捨て、沈査を約20倍量の150mM NaCl含有10mMリン酸緩衝液pH 7.4 (PBS) に懸濁し、再び 600×g で5分間遠心し上澄のPBSを捨てた。同様の操作を3回繰り返し上澄みのPBSにタンパク質が検出されなくなるまで細胞を洗浄後、沈査に約4倍量の1mM EDTA液(pH 7.2)を加え室温で2時間ゆっくりと攪拌しながら細胞を破壊した。その液を15000×gで10分間遠心して上澄を採取し、これを細胞内可溶性タンパク分画として2次元電気泳動用の試料とした。試料中のタンパク濃度はLowry法により決定した。

2次元電気泳動法：2次元電気泳動法はO'Farrell法を一部変えて行った。1次元目の等電点電気泳動(IEF)には毛細管式(63mm×φ1.2mm)ポリアクリルアミドゲル(T, 4%; 2% アツァイ(LKB), pH 5~7 : pH 3.5~10 (4:1); 9M尿素

及び2%NP-40を含む)を用い、2次元目のSDS電気泳動には平板式(w85×h60×r1.0mm)ポリアクリルアミドゲル(T, 10% or 15%; C, 2.67%)を用いた。分子量マーカーはSigmaキットSDS-6H 或いはSDS-70Lを用いた。泳動終了後銀染色法<sup>2)</sup>を用いてタンパク染色を行った。

タンパク質の一次構造決定：調製用2次元電気泳動は前述の組成と同じ細管式(130mm×φ2.3mm)IEFポリアクリルアミドゲル及び平板式(w137×h100×r2.0mm)SDSポリアクリルアミドゲルを用いて行った。分離されたタンパク質をPVDF膜に転写した後、クマシーブルー-R-250(CBB)染色をを行った。目的のタンパクスポットを切り取り、気相式プロテインシーケンサー(ABI社470A型)によりそのタンパク質のN末端部アミノ酸配列を決定した。

〔結果及び考察〕

ヒト T リンパ球系白血病細胞を構成する可溶性タンパク質はFig. 1 に示すように数百個のスポットに分離された。CCRF-CEMとJURKATを比較すると数個のスポットについて差異が認められた。特に⇒印で示すスポット(38kDa, pI5.7)はJURKATに特徴的であり、▶印で示すスポット(21kDa, pI6.5)はJURKATで濃染された。一方、▷印で示すスポット(39kDa, pI6.6), スポット(37kDa, pI6.4), スポット(35kDa, pI6.5), スポット(27kDa, pI6.4)はCCRF-CEMに特徴的であった。これらのタンパクスポットが細胞の機能或いは形態の差異を反映するものか明らかにする目的で⇒印で示すスポットについてN末端部の一次構造の決定を行い、そのタンパク質の同定を試みている。

〔文献〕

- 1) Celis, J.E. et al. : Electrophoresis., 13 : 893, 1992.
- 2) Heukeshoven, J and Dernick, R. : Electrophoresis., 6 : 103, 1985.

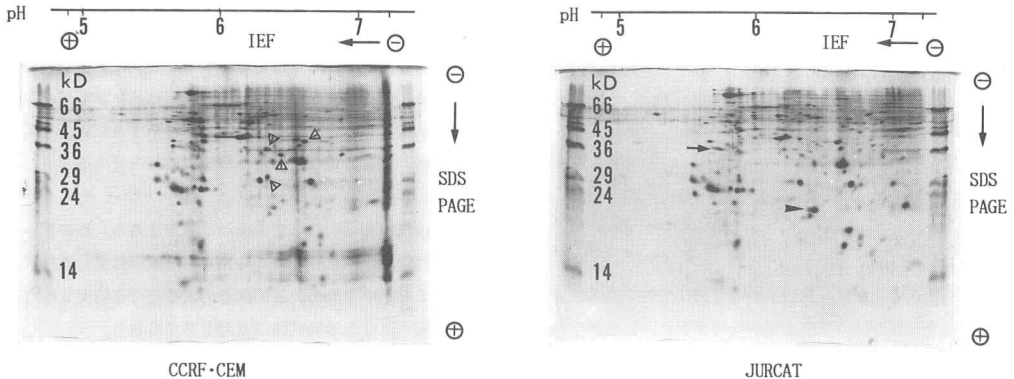


Fig. 1. CCRF-CEM および JURKAT 細胞における可溶性タンパク質の2次元電気泳動像