

## 二次元電気泳動を用いたマウス神経芽細胞腫 (N18TG2) タンパク質の分析

加藤 博孝

マウス神経芽細胞腫である N18TG 2 を用いた実験はこれまでにストレスタンパク質やリセプタータンパク質など多くの個々のタンパク質についての研究がなされているが、発現している細胞全体のタンパク質を二次元電気泳動ゲル上にマッピングし、データベース化を目指した研究は報告されていない。そこで、マウス神経芽細胞腫 (N18TG2) 細胞の全タンパク質を二次元電気泳動法で分離しその生化学的性質を分析した。

二次元電気泳動により再現性のある約2,500個のタンパク質スポットを再現性よく分離し、その二次元電気泳動像を得た。SDS ポリアクリルアミドゲル上の45個のスポットについて28個のN末端分析と39個の内部配列分析を行い合計30個のスポットのアミノ酸配列を得た。これらのアミノ酸配列の相同性をタンパク質データベースのSWISSPROT を用いて検索し、タンパク質スポットを同定した。これらのうち12個のスポットはマウスですでに報告されている superoxide dismutase, mitochondrial matrix protein 1, alpha enolase などに相同性を持っていて、9 個はマウスでは相当する配列は報告されていないが他の動物に相同性を持った配列で、pyruvate kinase, stathmin, protein kinase C inhibitor 1 などであった。残りの9 個のアミノ酸配列はまだタンパク質データベースに報告されてなく、未知のタンパク質であることがわかった。

N18TG 2 と発生起源の異なる5種類の細胞の二次元電気泳動像を比較し、N18TG 2 に特異的に発現量の多かった5 個のタンパク質スポットを見いだした。これらのうち、1 個は既知のタンパク質で ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase であり、1 個は未知のタンパク質であった。これらのデータと、今後さらなる解析による知見は神経芽細胞腫 (N18TG2) の、細胞生物学、発生分化や病態の解明の一助となるものと思われる。

(平成8年10月23日採用)

### Analysis of Proteins Isolated by Two Dimensional Electrophoresis of Mouse Neuroblastoma Cells (N18TG2)

Hiroataka KATO

An overall profile of the proteins of mouse neuroblastoma cells (N18TG2) was obtained by isolation of 21,500 cellular proteins by high resolutional two-dimensional SDS-PAGE using immobilized pH gradient gel strip for the first dimension. Forty-five polypeptides were subjected to N-terminal sequence and/or internal sequence

analyses, and the amino acid sequences of 30 of them were determined. Homology analysis using the SWISS-PROT protein database showed that the sequences from 12 spots were homologous to mouse proteins already reported, including superoxide dismutase, mitochondrial matrix protein 1 and alpha enolase. The sequences from nine spots were homologous to other known mammalian proteins including pyruvate kinase, stathmin and protein kinase C inhibitor I, but not to mouse proteins. The other nine sequences did not have homologous proteins in the data base so far reported, indicating they are unknown proteins. The results were tabulated together with their isoelectric points and molecular weights. The 45 spots of the 2D-gel of N18TG2 cells were compared with corresponding spots of those from each of five mouse cell lines (FM3A, L5178Y, P3-X63-Ag8.653, ST2 and Y1) which are distinct in their tissue origin. Five of these spots showed an increase in the amount of the protein in N18TG2 cells. One of the five spots was ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, another one was an unknown sequence, and the others were not detected in sequence. The potential data obtained concerning amino acid sequences as well as biological and biochemical characteristics by extending these analyses with proteins on 2D-gel may provide important information regarding cell differentiation, cell proliferation and transformation and may be useful for the diagnosis of neuroblastomas. (Accepted on October 23, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(4): 245-259, 1996

**Key Words** ① Neuroblastoma ② N18TG2  
③ Two-dimensional gel electrophoresis ④ *in situ*-digestion  
⑤ Microsequencing

## はじめに

ヒトの神経系で発現する遺伝子は約30,000と推定されているが<sup>1)</sup>, その大部分のタンパク質の等電点や分子量などの性状やそれらの機能は未知である. 神経細胞の発生・成長・接続・老化・ガン化などを分子レベルで理解する重要な鍵がタンパク質を同定することの中にあることは言うまでもない. そこで, これら未知の分子の機能を調べる上で発現しているタンパク質の生化学的性状を調べてカタログ化し, 各タンパク質の発現の相違をみることで細胞固有の生物学解析をすすめる一助となる.

マウス神経芽細胞腫である N18TG2を用いた実験はこれまでにストレスタンパク質やリセプタータンパク質など多くの個々のタンパク質に

ついでの研究はなされているが, 発現している細胞全体のタンパク質を等電点-分子量二次元電気泳動平面にマッピングし, データベース化した研究は報告されていない. そこで, N18TG2の細胞全体のタンパク質を抽出し分離能の向上した二次元電気泳動法を使って泳動分離し, それらの構成タンパク質を分析した. 同時に神経芽細胞腫(N18TG2)と, マウスの中胚葉と外胚葉性の起源を持つ5種の細胞の二次元電気泳動像のパターンを比較し, N18TG2に特異的に多く発現しているタンパク質スポットの検索を試みた.

## 材料と方法

### 1. 細胞

以下の6種類の細胞株を培養液(RPMI1640+10% FBS)で25 cm<sup>2</sup>のフラスコにフルシートにな

るまで培養した。N18TG2：マウス神経芽細胞腫(岡山大学, 津田正明先生より供与を受けた), Y1：マウス副腎皮質細胞(理研 Cell Line Catalog 細胞番号: RCB0533), ST2：マウス骨髓ストローマ細胞(RCB0224), L5178Y：マウスリンパ腫(RC B0135), FM3A：マウス乳癌(RCB0086), P3-X63 Ag 8. 653：マウス骨髓腫(RCB0146)

## 2. 細胞タンパク質の抽出

培養フラスコ中フルシートになった細胞の培養液を取り除き, 10%リン酸加緩衝液(PBS: 0.8% NaCl, 0.02% KCL, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4)で洗浄した。次に, ラバーつきガラス棒を用い培養細胞を剝離後細胞を集めた。これをPBSで5回洗浄後, エッペンドルフチューブにうつし, 遠心で可能な限りPBSを取り除いた。エッペンドルフチューブに細胞溶解バッファー(9M尿素, 1% tritonX-100, 100mM DTT, 1mM PMSE (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.8%ファルマライト pH 3-10)を培養フラスコ1個あたり1 mlの割合で加えて縣濁し, 氷冷しながら超音波破碎を合計約1分間行い, その遠心上清を細胞タンパク質として抽出し二次元電気泳動の試料とした。

## 3. 二次元電気泳動

一次元目の等電点電気泳動には固定 pH 勾配ゲルストリップ(18cm, pH4-7, Pharmacia)を使用し, 3つの連続した異なる電圧条件(200V5W15時間, 200V7W10時間, 3,500V7W40時間)で合計65時間通電した。二次元目にはラージフォーマットのゲル(22×22cm, 12.5%のポリアクリルアミド)を用いて SDS 電気泳動した(Millipore 社)。ゲルの組成は30.8% Dura-cryl 溶液(Millipore 社) 207.6ml, 1.5M トリス塩酸緩衝液 pH8.8 123.4ml, H<sub>2</sub>O 162.5ml, 10% SDS 5.0ml, 10%過硫酸アンモニウム 0.9ml, TEMED 0.18ml とした。分子量は次の分子量マーカーを用いて推定した(phosphorylase b: 97.4×10<sup>3</sup>, bovine serum albumin: 66.2×10<sup>3</sup>, ovalbumin: 45.0×10<sup>3</sup>, carbonic

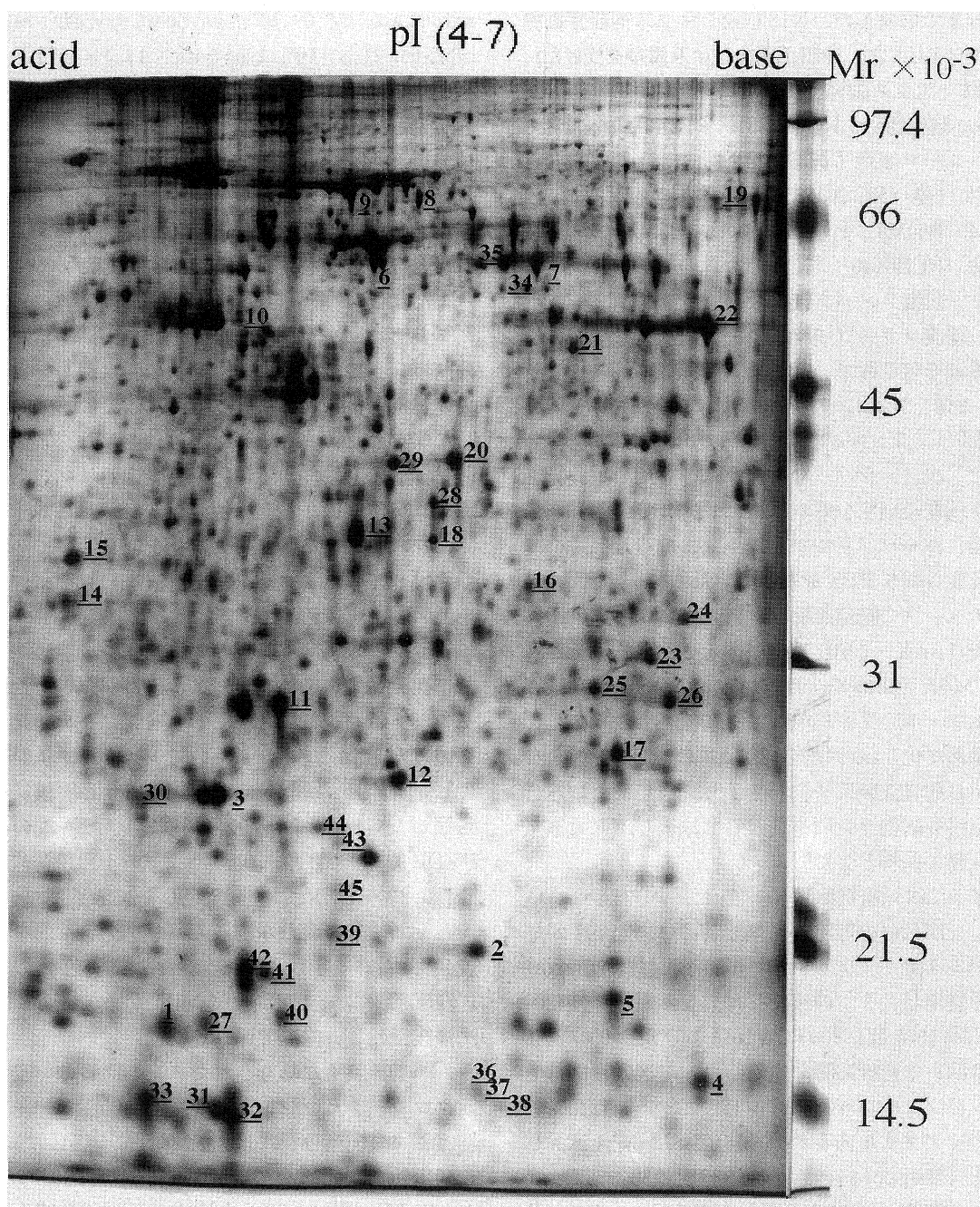
anhydrase: 31.0×10<sup>3</sup>, soybean trypsin inhibitor: 21.5×10<sup>3</sup>, lysozyme: 14.4×10<sup>3</sup> Bio-Rad 社)。二次元電気泳動後のゲルは銀染色(第一製薬社)とクーマシブリリアントブルー(CBB)染色によってタンパク質スポットを可視化した。0.2% CBB 溶液を含む40%メタノールと10%酢酸水溶液で30分間染色し, 20%メタノールと5%酢酸を含む水溶液で脱色した。銀染色またはCBB 染色を行った後の泳動ゲルは, 10%グリセロールと20%メタノール水溶液中に30分間浸し, 二枚のセロファン膜の間にゲルをはさみ約30時間風乾し, その後パウチ(コクヨ)して保存した。これらのゲルはサンワークステーション上で動作する電気泳動画像処理ソフト2DQUEST (PDI 社)を使い, スキャンして泳動像を取り込みバックグラウンドを取り除いてから発現しているタンパク質スポットの数を調べた。

## 4. ゲル上のタンパク質の PVDF 膜への転写

二次元電気泳動によってゲル上に展開されたタンパク質を電気泳動セミドライブロッティング装置(Millipore 社)を用いて, メタノール処理した PVDF (polyvinyliden-difluoride) 膜に転写した(1mA/cm<sup>2</sup>, 90分間通電)。転写後の PVDF 膜を CBB 溶液(40%メタノール, 10%酢酸, 0.2% CBB)で3分間染色し, 20%メタノールと5%酢酸を含む水溶液でバックグラウンドを脱色しスポットを可視化した。脱染色後の PVDF 膜を3~4時間程度 Milli-Q 水で十分に洗浄後風乾し, 常温で保存した。

## 5. PVDF 膜上に転写されたタンパク質のマイクロシーケンシング

アミノ酸配列分析にはエドマン法(PITC 法)を利用した気相シーケンサー(477A/120A: Applied Biosystems 社)を用いた。PVDF 膜上の CBB で可視化されたタンパク質スポット(1から8枚)はメスで切りだした。N 末端アミノ酸配列分析は, 切り出したタンパク質を含む PVDF 膜の細片をカートリッジブロックに入れて行い, 内部配列分析は次項で述べる方法で行った。求めたアミノ酸配列をシーケンスライ



**Fig. 1.** 2-D PAGE separation pattern of polypeptides from mouse neuroblastoma cells (N18TG2). Polypeptides were separated in the first dimension by isoelectric focusing with an immobilized pH gradient strip between 4 and 7. The polypeptides were separated in the second dimension by SDS PAGE with 12.5% Duracry 1. The profile was obtained by silver staining. Abscissa: pH range 4 (left) to 7 (right); ordinate:  $Mr \times 10^{-3}$ . Each spot with number was subjected to amino acid sequence analysis.

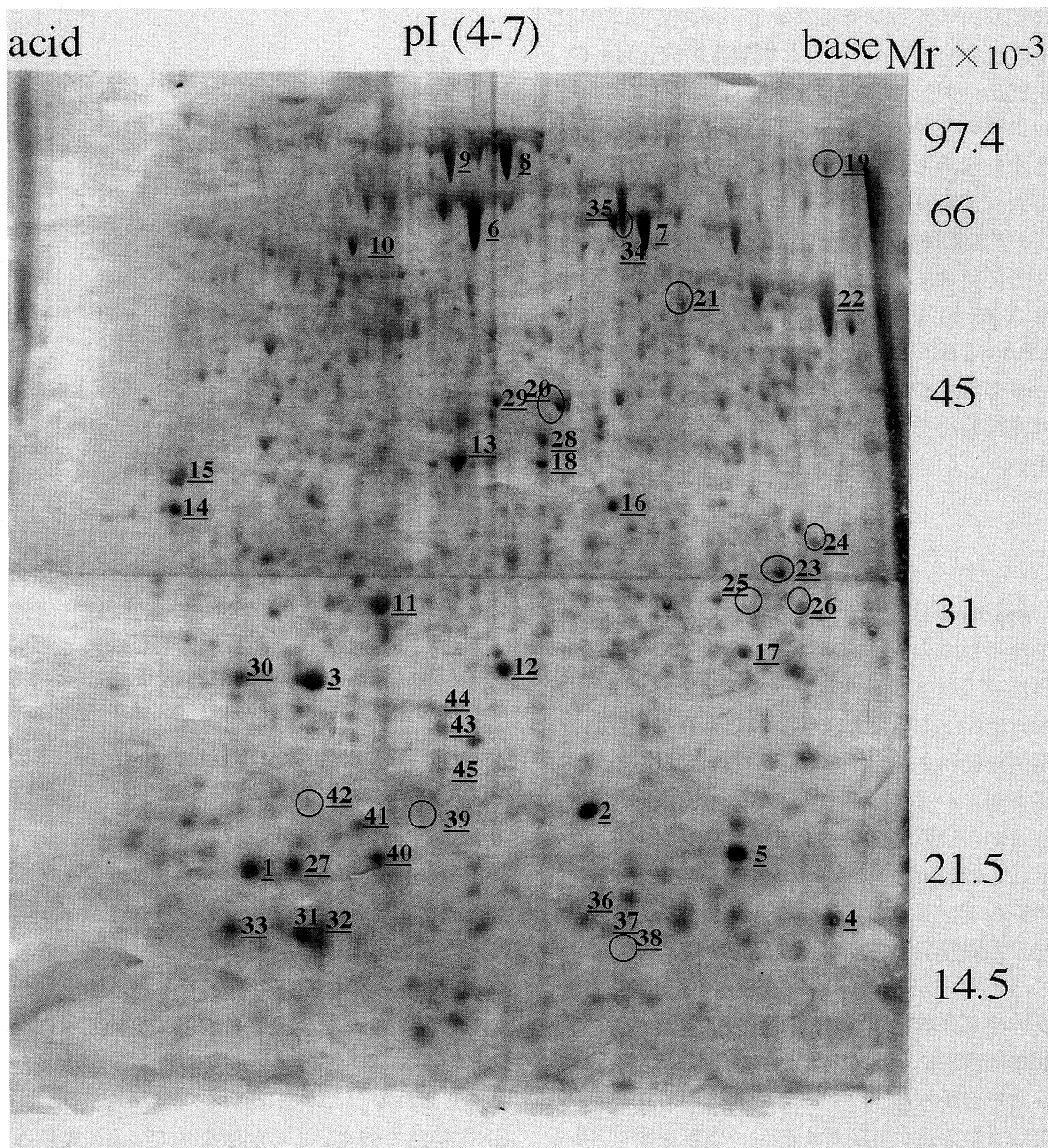


Fig. 2. CBB stained polypeptides on PVDF membrane which were transblotted from the 2-D PAGE of Fig. 1. Abscissa: pH range 4 (left) to 7 (right); ordinate:  $Mr \times 10^{-3}$ . The numbers in the profile are corresponded to those in the Fig. 1, respectively. The amount of polypeptide in a circled spot was decreased compared to that of Fig. 1.

ブラリー検索プログラム FASTA<sup>2)</sup>を用いて、アミノ酸配列にホモロジーのあるタンパク質を SWISS-PROT Protein Data Bank (release 33) の中から探し出した。

#### 5-1 タンパク質の内部配列分析

まず、疎水性の PVDF 膜をメタノールに30秒

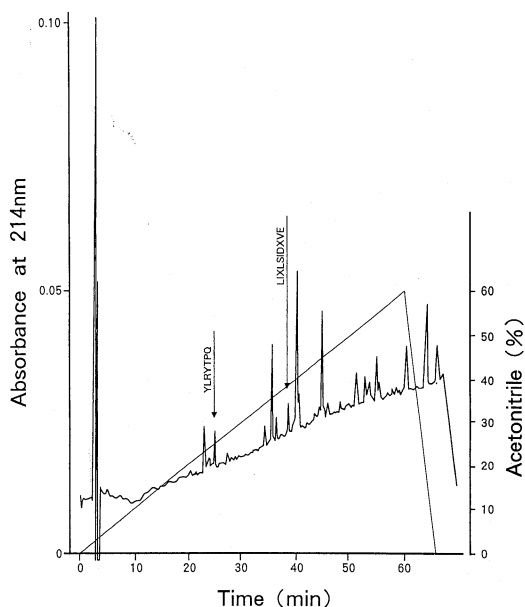
間浸し水になじませた後、直ちに水洗した。次に0.5%ポリビニルピロリドン (PVP-40) を含む100mM 酢酸水溶液0.5ml に30分間 (37°C) 浸し、PVDF 膜上で膜とタンパク質が結合していない部分をコートし消化酵素の膜への吸着を防ぎ、水洗した。その後、PVDF 膜を1 mm 四方

に切り、エッペンドルフチューブ内で10%アセトニトリル-20mM トリス塩酸緩衝液(pH9.0), 0.25 $\mu$ gのリシルエンドペプチダーゼ(アクロモバクター プロテアーゼ1:Lys-C:和光純薬)を含む水溶液0.1mlで37°Cで一晩膜内消化を行った。消化液の上清をとり、膜から遊離したペプチドをC18逆相カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離精製した。溶出はA液(0.1% TFA/H<sub>2</sub>O)とB液(0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN)の直線勾配を用い、0.25ml/minの流速で行った。得られた各々のペプチドは凍結乾燥し4°Cで保存しアミノ酸配列分析に用いた。

### 結果と考察

**Figure 1** は、マウス神経芽細胞腫(N18TG2)で発現しているタンパク質を等電点電気泳動とSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により二次元ゲル上に分離し、銀染色により可視化した電気泳動パターンである。これにより等電点(水平方向)が4から7で分子量(垂直方向)が約1万から10万のタンパク質をラージフォーマット(22×22cm)のゲル全体に約2,500個のタンパク質スポットとして良好に分離することができた。4回独立して二次元電気泳動を行っても同じパターンが得られたので**Figure 1**に示したマウス神経芽細胞腫(N18TG2)のタンパク質の泳動像は再現性があるものと判断し、解析を進める上での基本パターンとした。これらの像は一次元目に固定化pHゲル等電点電気泳動を用い二次元目にラージフォーマットのゲルを使うことによって、高分子領域の各スポットの線状痕は従来の泳動に比べて著しく減少しスポットも中心が集中化して、分離能が飛躍的に向上し再現性が増した。

**Figure 2** はタンパク質の量を銀染色に用いる量の20~50倍に増やし二次元電気泳動後PVDF膜に転写し、その膜をCBB染色した像である。PVDF膜上には約500個のタンパク質スポットが得られた。この500個のスポット数は**Figure 1**の



**Fig. 3.** Chromatogram of peptides extracted from PVDF membrane *in situ*-digestion with lysyl Endopeptidase. Peptides were detected by UV absorbance at 214 nm. Two peaks denoted with arrow were subjected to sequence analysis and their sequences are shown, respectively. Amino acid were designated by a single letter. X: unknown amino acid

スポット数に比べ少ない。そこでブロッティング後のゲルを銀染色して、タンパク質がゲル中に残存していないかを調べたが、タンパク質スポットはゲル中に確認できずゲルから溶出したものと考えられた。PVDF膜上で見いだされなかったタンパク質は元々の発現量が少なかったと考えられる。この様なタンパク質の定量には、CBB染色で強く染まるが銀染色でつよく染色されないタンパク質も存在するし、また逆の場合もあるので<sup>3)</sup>、個々のタンパク質について二つの染色法による発色の比較検討が必要である。PVDF膜上のタンパク質スポットのアミノ酸配列を分析するにあたって、**Figure 2**上のスポットが基本となる**Figure 1**の銀染色像で得られたスポットと対応しているかどうかをタンパク質量を変え電気泳動して、パターンを比較検討した。この結果、PVDF膜上のスポットを**Figure 1**のスポットと対応させることができた。しかし

ながらスポット番号20, 36, 42などではスポットの等電点と分子量は対応しても転写された濃度が増加したり減少したりしていた。またスポット10, 15, 13で囲まれる領域は **Figure 1** から期待されるタンパク質量と比べて非常に薄いスポットとなっていたが、その原因は不明であった。

**Figure 2** の PVDF 膜上で濃度が濃く分析が容易と考えられる順に45個のタンパク質スポットを切り出し、そのポリペプチド鎖のN末端配列や内部配列を求めた (**Table 1**)。N末端の分析には1~8枚程度のPVDF切り出し膜細片を直接プロッティングカートリッジに挿入して、アミノ酸配列を求めた。この分析により得られたN末端アミノ酸配列は **Table 1** 中で“\*”をつけて表した。N末端が検出できなかったスポットについては膜内酵素消化を行い抽出されたペプチドをHPLCで分離精製し、それらのペプチドのアミノ酸配列を求めた。一例として **Figure 2** 中のスポット26から得られたペプチドのHPLCによる分離パターンを **Figure 3** に示した。図中、矢印で示したピークから得られたアミノ酸配列を一文字表記で示す。これらペプチドのアミノ酸配列分析の初期収率は2.4から3.8pmolであった。電気泳動から膜転写、ペプチドの抽出と分離、及びシーケンサーによるアミノ酸配列分析までの一連の分析の回収率を既知量のタンパク質 (carbonic anhydrase) を使って調べると約5%で、これは報告されている10%<sup>4)</sup> に比べるとやや低いものであった。これらの分析感度からタンパク質スポット中に約100pmol程度のタンパク質があれば分析が可能であることがわかった。この感度からすると **Figure 2** に分離されたタンパク質のうち50個程度が分析できると推測された。発現量が少ないタンパク質からアミノ酸配列を得るには二次元電気泳動を行う前に細胞分画や各種のクロマトグラフィーを利用したタンパク質の粗分画を行ったり、二次元電気泳動を多数回行って同一スポットからタンパク質を抽出し回収するなどの方法でタンパク質を濃縮することが必須となる。スポット10, 14,

16, 18では濃く染色されていたがスポットの濃度から期待される程のペプチドの回収にはいかなかった。

この様にして得られたアミノ酸配列に相同なタンパク質をタンパク質データベース SWISS PROT 上で検索し、その結果を **Table 1** の第一番目のカラムに、その相同率を最後のカラムに示した。分析した45個のスポットのうちN末端分析と内部配列分析から30個からアミノ酸配列が得られた。30個のうち12個は既に報告されているマウスのタンパク質に80から100%の相同性があり、superoxide dismutase, mitochondrial matrix protein 1, alpha enolase などであった。9個はマウスの既知タンパク質には対応するものはなかったが他の動物の既知タンパク質に90~100%の相同性を持っていて、pyruvate kinase, stathmin, protein kinase C inhibitor 1などが含まれていた。残りの9個のタンパク質については既知のタンパク質データベース内に相同性が無かったので、未知なタンパク質であることがわかった。既知タンパク質に相同のものがあることが判明したペプチドの実測された等電点や分子量は対応する相同タンパク質の等電点や分子量と非常によく一致していることから、これらは既知タンパク質とファミリーをなし構造や機能もそれらと類似しているものと推測される。

N末端を分析した27個のスポットのうち20個は5サイクル以上エドマン反応を行ってもN末端から遊離したPTHアミノ酸が認められなかった。これらのうち13個(スポット1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17, 20, 22, 24, 26, 27)のスポットについては膜内消化でアミノ酸配列が求められたので、N末端配列が得られなかったのはN末端がブロックされていたためと結論した。N末端がブロックされていたのは74%であった。N末端をブロックするN末端保護基としてはホルミル基・アセチル基・メチル基・グリコシル基などが知られているが、デブロッキングによるN末端の同定は行わなかった。これまでに細胞内の全タンパク質でN末端がブロックされてい

**Table 1.** Summary of information for polypeptide spots from mouse neuroblastoma cells (N18TG2) <sup>a)</sup>

| Spot <sup>b)</sup><br>no. | Identification                                   | Source | N-terminal <sup>c)</sup><br>Mr/database <sup>d)</sup><br>pI/database <sup>d)</sup> | Mr/gel <sup>e)</sup><br>pI/gel <sup>e)</sup> | Sequence data <sup>c)</sup>              | Identity             |
|---------------------------|--|--------|--|--|--|----------------------|
| 1                         | Actin  | Human  | Blocked<br>42,009<br>5.02  | 15,400<br>4.64                               | YPIEEGGVTNNXDME<br>AGFAGDXAPRAVFPSIVGRPR | 86%<br>100%          |
| 2                         | Stathmin   | Human  | Blocked<br>17,171<br>5.68  | 17,500<br>5.63                               | ESVPDFFLSPP                              | 91%                  |
| 3                         | Phosphatidylethanol<br>amine-binding<br>protein  | Bovine | Blocked<br>20,854<br>7.35  | 23,500<br>4.8                                | LYEQLSGK                                 | 100%                 |
| 4                         | Protein kinase C<br>inhibitor 1                  | Bovine | Blocked  | 13,900<br>6.36                               | KAQVAQPGGDT                              | 91%                  |
| 5                         | Superoxide<br>dismutase                          | Mouse  | Blocked<br>15,811<br>6.04  | 16,100<br>6.08                               | DGVANVSIEDRVISLXGEHS                     | 100%                 |
| 6                         | Mitochondrial<br>matrix protein 1                | Mouse  | Not blocked<br>60,941<br>5.83  | 65,400<br>5.31                               | *AKDVKFGADARALMLQGVDLL                   | 100%                 |
| 7                         | Probable protein<br>disulfide isomerase<br>ER-60 | Mouse  | Not blocked<br>56,621<br>5.95  | 63,700<br>5.82                               | *SDVLELTD<br>AASNL<br>VVVAE              | 100%<br>100%<br>100% |
| 8                         | Mitochondrial<br>stress-70 protein P             | Mouse  | Not blocked  | 73,800<br>5.48                               | *ASEAIKGA VVGIDLG                        | 100%                 |
| 9                         | Heat shock protein<br>family                     | Mouse  | Blocked  | 72,400<br>5.23                               | SQIHDI VLVGGSTRIPK<br>TVTNAVVTVPAY       | 91% -<br>100%        |
| 10                        | —  |        | Blocked  | 86,200<br>4.86                               | not detected                             |                      |
| 11                        | Ubiquitin carboxyl-<br>terminal hydrolase        | Human  | Not blocked<br>24,782<br>4.99  | 28,000<br>5                                  | *MQLKPMEINPEMLNK                         | 100%                 |
| 12                        | ATP synthase D<br>chain, mitochondrial           | Rat    | Blocked<br>18,561<br>5.94  | 24,400<br>5.37                               | YPYWPHQPILMC                             | 100%                 |

| Spot<br>no. | Identification                     | Source | N-terminal<br>Mr/database <sup>c)</sup><br>pI/database <sup>d)</sup> | Mr/gel <sup>e)</sup><br>pI/gel <sup>e)</sup> | Sequence data <sup>c)</sup>      | Identity |
|-------------|------------------------------------|--------|--|--|----------------------------------|----------|
| 13          | Tubulin beta-5 chain               | Mouse  | Not blocked<br>49,671<br>5.17  | 38,400<br>5.24                               | *MREIVHIQAG                      | 100%     |
| 14          | —                                  |        | Blocked  | 34,000<br>4.32                               | not detected                     |          |
| 15          | Heat shock protein<br>family       | Mouse  | Not blocked<br>37,300<br>4.33  |  | *DFFNGKELNKS                     | 100%     |
| 16          | —                                  |        | Blocked  | 34,700<br>5.5                                | not detected                     |          |
| 17          | Unknown                            |        | Blocked  | 25,600<br>6.07                               | TQGPYDVVVLPGGNLGAQNL<br>VTTHPLAK |          |
| 18          | —                                  |        | Blocked  | 38,000<br>5.48                               | not detected                     |          |
| 19          | —                                  |        | Blocked  | 71,800<br>6.4                                | not detected                     |          |
| 20          | Alpha enolase                      | Mouse  | Blocked<br>46,993<br>6.38  | 44,000<br>5.55                               | XPDDPSRYITPDQLADLY               | 100%     |
| 21          | Mitochondrial<br>matrix protein P1 | Mouse  | Not blocked<br>60,941<br>5.83  | 54,400<br>5.93                               | *AKDVKFGADARALM                  | 100%     |
| 22          | Alpha enolase                      | Mouse  | Blocked<br>46,993<br>6.38  | 56,500<br>6.38                               | SPDDPSRYIGPDTLADLYK              | 90%      |
| 23          | Unknown                            |        | Not blocked  | 30,500<br>6.19                               | *LHTKGALPXD TVTXX                |          |
| 24          | Unknown                            |        | Blocked  | 33,100<br>6.3                                | SISNSH<br>SALTYDGALLGDRXLRVDIA   |          |

| Spot<br>no. <sup>b)</sup> | Identification               | Source | N-terminal<br>Mr/database <sup>d)</sup><br>pI/database <sup>d)</sup> | Mr/gel <sup>e)</sup><br>pI/gel <sup>e)</sup> | Sequence data <sup>c)</sup>              | Identity |
|---------------------------|------------------------------|--------|--|--|--|----------|
| 25                        | —                            |        | Blocked  |  | not detected                             |          |
|                           |                              |        |  | 28,800<br>6.01                               |  |          |
| 26                        | Unknown                      |        | Blocked  |  | *PGGLLLXGDEAPNXE<br>YLRYPQ<br>LIXLSIDXVE |          |
|                           |                              |        |  | 28,300<br>6.25                               |  |          |
| 27                        | Actin                        | Human  | Blocked<br>42,009<br>5.02  | 15,400<br>4.76                               | IEXGIVTNXXDMEXN                          | 93%      |
| 28                        | Pyruvate kinase              | Human  |  |  | KXVNLPGAAVDLPAVX                         | 100%     |
|                           |                              |        | 57,746<br>6.38   | 40,500<br>5.48                               |  |          |
| 29                        | Alpha enolase                | Mouse  |  |  | XPDDPKRYITPDQLADXYK                      | 84%      |
|                           |                              |        | 46,993<br>6.38   | 43,600<br>5.36                               |  |          |
| 30                        | —                            |        |  |  | not detected                             |          |
|                           |                              |        |  | 23,500<br>4.54                               |  |          |
| 31                        | Actin                        | Human  |  |  | AGFAGDDAPRAVFPGVGRP                      | 100%     |
|                           |                              |        | 42,009<br>5.02   | 13,300<br>4.8                                |  |          |
| 32                        | Unknown                      |        |  |  | KXXVXGYEXLRXS                            |          |
|                           |                              |        |  | 13,100<br>4.84                               |  |          |
| 33                        | —                            |        |  |  | not detected                             |          |
|                           |                              |        |  | 13,400<br>4.57                               |  |          |
| 34                        | —                            |        |  |  | not detected                             |          |
|                           |                              |        |  | 63,700<br>5.76                               |  |          |
| 35                        | Unknown                      |        |  |  | KXIVAVASR<br>FXNXELA<br>KXFGGELVDFY      |          |
|                           |                              |        |  | 63,700<br>5.64                               |  |          |
| 36                        | Heat shock protein<br>family | Mouse  |  |  | NQVAMNPNTN VFDA                          | 100%     |
|                           |                              |        |  | 14,100<br>5.61                               |  |          |

| Spot <sup>b)</sup><br>no. | Identification | Source | N-terminal <sup>c)</sup><br>Mr/database <sup>d)</sup><br>pI/database <sup>d)</sup> | Mr/gel <sup>e)</sup><br>pI/gel <sup>e)</sup> | Sequence data <sup>c)</sup>               | Identity |
|---------------------------|----------------|--------|--|--|---|----------|
| 37                        | Unknown        |        |  | 13,500<br>5.64                               | KXFYP EEVNDM<br>FYPEEVNDMVXT              |          |
| 38                        | —              |        |  | 13,200<br>5.71                               | not detected                              |          |
| 39                        | —              |        |  | 18,200<br>5.16                               | not detected                              |          |
| 40                        | Unknown        |        |  | 15,600<br>5.11                               | KVQVQASIXQ<br>KXVQVDQV<br>KXVTLFXASXIPSTH |          |
| 41                        | Unknown        |        |  | 16,900<br>4.94                               | KXXTPLKK<br>KVAGQDGSVVQFK                 |          |
| 42                        | —              |        |  | 17,100<br>4.88                               | not detected                              |          |
| 43                        | —              |        |  | 21,700<br>5.2                                | not detected                              |          |
| 44                        | —              |        |  | 22,300<br>5.13                               | not detected                              |          |
| 45                        | —              |        |  | 16,300<br>4.90                               | not detected                              |          |

- a) Homology search was carried out by FASTA program in SWISS-PORT database. A homologous protein with the highest score was tabulated together with its molecular weight, isoelectric point, and identity to the query sequences.
- b) The spot number corresponds to that in Fig. 1, respectively.
- c) Present analysis (X : unknown amino acid)
- d) These values were cited from the homologous protein.
- e) These values were measured from the separation pattern of Fig. 1.

**Table 2.** Comparison of relative amount of proteins for each of the 45 spots in Fig. 1 with the 2-D gel spots from each of 5 cell lines.<sup>a)</sup>

| N18TG2 <sup>b)</sup> | FM3A    | L5178Y  | P3-X63-Ag8.633 | ST2     | Y1      |
|----------------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| 1                    | ○       | -       | ○              | ○       | ○       |
| 2                    | ○       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 3                    | ○(weak) | ○       | ○              | ○(weak) | ○(weak) |
| 4                    | ○       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 5                    | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 6                    | -       | -       | ○              | -       | -       |
| 7                    | -       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 8                    | -       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 9                    | -       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 10                   | -       | -       | -              | ○       | -       |
| 11                   | -       | -       | -              | -       | -       |
| 12                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○(weak) |
| 13                   | -       | -       | ○(weak)        | ○       | ○       |
| 14                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 15                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 16                   | -       | -       | -              | -       | -       |
| 17                   | ○       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 18                   | ○       | ○(weak) | ○              | ○       | ○       |
| 19                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 20                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 21                   | ○       | ○(weak) | ○              | ○       | ○       |
| 22                   | ○(weak) | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 23                   | -       | ○(weak) | ○              | -       | ○(weak) |
| 24                   | -       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 25                   | ○       | ○(weak) | ○              | ○(weak) | ○(weak) |
| 26                   | -       | -       | -              | -       | ○(weak) |
| 27                   | ○       | -       | ○              | ○       | ○       |
| 28                   | ○       | ○(weak) | ○              | ○       | ○       |
| 29                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 30                   | -       | -       | ○(weak)        | ○       | -       |
| 31                   | ○       | ○       | ○(weak)        | -       | -       |
| 32                   | ○       | -       | -              | ○       | ○       |
| 33                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 34                   | -       | -       | -              | -       | -       |
| 35                   | -       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 36                   | ○       | -       | ○              | -       | ○       |
| 37                   | ○       | -       | ○              | -       | ○       |
| 38                   | -       | -       | -              | -       | -       |
| 39                   | -       | -       | ○              | ○       | ○       |
| 40                   | ○       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 41                   | ○       | ○       | ○              | ○(weak) | ○       |
| 42                   | -       | ○(weak) | ○(weak)        | ○(weak) | ○(weak) |
| 43                   | ○       | -       | ○(weak)        | -       | -       |
| 44                   | ○       | ○       | ○              | ○       | ○       |
| 45                   | ○       | -       | ○              | -       | ○       |

a) "○" : comparable to N18TG2 cells; "○(weak)" : weakly expressed compared to N18TG2; "-" : none or little, if any, compared to N18TG2. Spots 11, 16, 26, 34, 38 are specifically expressed in N18TG2 cells.

b) Cell lines

|                 |                         |
|-----------------|-------------------------|
| N18TG2          | Mouse Neuroblastoma     |
| FM3A            | Mouse Mammary carcinoma |
| L5178Y          | Mouse Lymphoma          |
| P3-X63-Ag 8.633 | Mouse Myeloma           |
| ST2             | Mouse Bone Marrow       |
| Y1              | Mouse Adrenal carcinoma |

ると報告されている割合はイネ種子胚芽タンパク質は70%<sup>5)</sup>、豆科のシカクマメ種子子葉タンパク質では約40%<sup>6)</sup>であり、N18TG2全体のタンパク質についても限られた分析数ではあるが同程度のタンパク質のN末端のブロックがあるものと推定される。

**Figure 1** に示した再現性のある二次元電気泳動像とマウス由来の5種類の培養細胞、副腎皮質細胞、骨髄ストローマ細胞、リンパ腫、乳癌、骨髄腫の二次元電気泳動像を比較することによってマウス神経芽細胞腫(N18TG2)に特異的に発現しているタンパク質を検索した。**Figure 1** に示したマウス神経芽細胞腫(N18TG2)中のアミノ酸配列を分析した45個に対応するタンパク質スポットはマウスリンパ腫では29個、マウス骨髄腫では37個、マウス乳癌では26個、マウス骨髄ストローマ細胞では33個、マウス副腎皮質細胞では35個であった。これらをまとめた**Table 2**の結果からマウス神経芽細胞腫(N18TG2)では5個(11, 16, 26, 34, 38)のタンパク質が特異的に発現していることがわかった。このうちの1つ(スポット11)は細胞の代謝に関与する ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase で、このタンパク質は神経系の腫瘍に特異的多量に発現することが報告されている<sup>7)</sup>。他の1個(スポット26)についてはタンパク質データベース上に相同性を有するアミノ酸配列は見いだされず前述した未知のタンパク質であった。残りの3個のタンパク質(スポット16, 34, 38)は配列を決定することが出来なかった。これら5つのタンパク質は神経系で特異的な機能を果たしたり、また他の何らかの理由によって細胞内に蓄積したものと考えられる。

最近、酵母ではすでにそのゲノムの全塩基配列が決定し、大腸菌では近々ゲノムの全塩基配列が決定される予定である。ヒト、イネなどでもゲノムの全塩基配列を決定しようとする研究がさかんに行われている。しかし、DNA分子中のどの領域がタンパク質をコードしているのかを明らかにするためには、DNAの分析だけでは不十分で、遺伝子発現産物としてのタンパク質

を直接解析しておくことが重要である。これらの解析は一度に多数のタンパク質を効率的に分離できる2D-PAGEと、近年のアミノ酸配列分析の技術の向上により、可能になりつつある。今回マウス神経芽細胞腫(N18TG2)の二次元電気泳動の基本パターンでは約2,500個のタンパク質スポットが再現性よく分離された。今回45個のタンパク質スポットの解析により、30個のタンパク質スポットのアミノ酸配列を決定することが出来たが、これらを更に推し進め種々の生化学的、物理化学的、あるいは生物学的特性を分析し、得られた結果をデータベース化することで特定遺伝子の産生するタンパク質の同定を効率的に行うことができる。すでに、ヒト<sup>8)~12)</sup>、ラット<sup>13)~15)</sup>、大腸菌<sup>16),17)</sup>、酵母<sup>18),19)</sup>などで2D-PAGEによって分離されたタンパク質のデータベース化が図られている。今回9個の未知のアミノ酸配列を見いだしたので、これらのアミノ酸配列を元にしてそれらをコードする遺伝子のクローニングが可能になった。これらの解析を数多くのタンパク質について進めることによってそれらタンパク質の神経芽細胞腫(N18TG2)内での機能の解明ができ、腫瘍化の機序解明の手がかりとなるものと期待される。また、これらの方法を利用してヒトの神経芽細胞腫の病態をタンパク質化学的に特徴づけることで、早期診断や治療の一助を果たすものと考えられる。

原稿を終えるにあたり研究に導いて頂いた川崎医科大学 大学生化学 細川桂一前教授ならびに引き続いてご指導して頂いた湊川洋介教授に深謝いたします。また終始有益なご助言とご協力を頂いた川崎医科大学 大学生化学 伏谷建造講師、生化学センターの角田(東山)佳代研究補助員ならびに当教室員の方々に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 加藤菊也：神経系で発現する未知の遺伝子の探索. 蛋白 核酸 酵素 38 : 489-494, 1993
- 2) Pearson WR, Lipman DJ : Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 35 : 2444-2448, 1988
- 3) Syrový I, Hodný Z : Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. J Chromatogr 569 : 175-196, 1991
- 4) Fernandez J, Andrews L, Mische SM : An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinylidene difluoride-bound proteins for internal sequence analysis. Anal Biochem 218 : 112-117, 1994
- 5) 平野 久：遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析. 東京, 東京化学同人. 1993, pp109-110
- 6) Hirano H : Microsequence analysis of the winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel. J Protein Chem 8 : 115-130, 1989
- 7) Mattano LA, Moss TJ, Emerson SG : Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res 52 : 4701-4705, 1992
- 8) Celis JE, Rats GP, Celis G, Madsen P, Gesser B, Kwee S, Madsen PS, Nielsen HV, Yde H, Lauridsen JB, Basse B : Towards establishing comprehensive database of cellular proteins from transformed human epithelial amnion cells (AMA) and normal peripheral blood mono nuclear cells. Leukemia 2 : 561-602, 1988
- 9) Celis JE, Rats GP, Madsen P, Gesser B, Lauridsen JB, Olsen KPB, Kwee S, Rasmussen HH, Nielsen HV, Crüger D, Basse B, Leffers H, Honore B, Moller O, Celis A : Computerized comprehensive database of cellular and secreted proteins from normal human embryonic lung MRC-5 fibroblasts : Identification of transformation and/or proliferation sensitive proteins. Electrophoresis 10 : 76-115, 1989
- 10) Celis JE, Rats GP, Madsen P, Gesser B, Lauridsen JB, Kwee S, Rasmussen HH, Nielsen HV, Crüger D, Basse B, Leffers H, Honore B, Moller O, Celis A, Vandekerckhove J, Bauw G, Damme JV, Puype M, Bulcke MVD : Comprehensive human cellular protein databases and their implication for the study of genome organization and function. FEBS Lett 244 : 247-254, 1989
- 11) Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P, Olsen E, Madsen P, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Vorum H, Kristensen DB, Ostergaard M, Haunsø A, Jensen NA, Celis A, Basse B, Lauridsen JB, Ratz GP, Andersen AH, Walbum E, Kjærgaard I, Andersen I, Puype M, Damme JV, Vandekerckhove J : The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995) : Mapping components of signal transduction pathways. Electrophoresis 16 : 2177-2240, 1995
- 12) Anderson L, Anderson NG : High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proc Natl Acad Sci USA 74 : 5421-5425, 1977
- 13) Garrels JI, Franza BJ : Transformation-sensitive and growth-related changes of protein synthesis in REF52 cells. A two-dimensional gel analysis of SV40-, adenovirus-, and Kirsten murine sarcoma virus-transformed rat cells using the REF52 protein database. J Biol Chem 264 : 5299-5312, 1989
- 14) Cossio G, Sanchez JC, Golaz O, Wettstein R, Hochstrasser DF : Spermatocytes and round spermatids of rat testis : Protein patterns. Electrophoresis 16 : 1225-1230, 1995
- 15) Benito B, Wahl D, Steudel N, Cordier A, Steiner S : Effects of cyclosporine A on the rat liver and kidney protein pattern, and influence of vitamin E and C coadministration. Electrophoresis 16 : 1273-1283, 1995
- 16) Neidhardt FC, Appleby DB, Sankar P, Hutton ME, Phillips TA : Genomically linked cellular protein

databases derived from two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 10 : 116-122, 1989

- 17) VanBogelen RA, Sankar P, Clark RL, Bogan JA, Neidhardt FC : The gene-protein database of *Escherichia coli* : edition 5. Electrophoresis 13 : 1014-1054, 1992
- 18) Bataille N, Peypouquet M-F, Boucherie H : Identification of polypeptides of the carbon metabolism machinery on the two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*. Location of 23 additional polypeptides. Yeast 3 : 11-21, 1987
- 19) Latter GI, Boutell T, Monardo PJ, Kobayashi R, Futcher B, McLaughlin CS, Garrels JI : A *Saccharomyces cerevisiae* internet protein resource now available. Electrophoresis 16 : 1170-1174, 1995