

子牛型白血病由来培養リンパ腫瘍細胞の膜蛋白質抗原の 分離と同定

| | |
|-------|---|
| 誌名 | 日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College |
| ISSN | 03738361 |
| 著者 | 柴藤, 徳洋 新井, 敏郎 小泉, 紀子 |
| 巻/号 | 37号 |
| 掲載ページ | p. 5-9 |
| 発行年月 | 1988年12月 |

子牛型白血病由来培養リンパ腫瘍細胞の 膜蛋白質抗原の分離と同定

柴藤徳洋・新井敏郎・小泉紀子・町田伸生・大木与志雄

日本獣医畜産大学 獣医生理化学教室

要約 子牛型白血病由来培養リンパ腫瘍細胞株 (BTL-C3) は、培養にともなって細胞膜表面異常抗原 BTLA が発現してくる。今回、BTL-C3 細胞株から可溶性膜蛋白質抗原を抽出して検討を行った。BTL-C3 細胞をテフロンホモジナイザーで破壊し、ショ糖密度勾配遠心法 (100,000 g, 60分) で膜を分離した。膜は比重 1.17 周辺に分画された。膜分画を NP40 処理して得た可溶性蛋白質抗原を SDS PAGE Western blotting 法により分析した結果、20~30本の泳動バンドとして検出された。このうち分子量が約 50,000, 35,000, 27,000 の蛋白質は抗 BTLA 血清と特異的に反応し、これらは BTLA の主要構成成分と考えられた。

キーワード : 子牛型白血病, ショ糖密度勾配遠心分離法, BTLA.

日獣畜大研報, 37, 5~9, 1988.

牛の白血病は、地方病型 (Enzootic bovine lymphoma, EBL) と散発型 (Sporadic bovine lymphoma, SBL) に大別され⁷⁾、地方病型は、成牛型白血病として原因ウイルス (BLV) も同定されている^{1,9)}。一方、散発型白血病は、臨床症状などから子牛型、胸腺型、皮膚型として分類されているが、いまだはっきりとした病因は明らかにされていない。これまで、当研究室では、子牛型白血病牛から培養細胞株を樹立し、これらの株では培養にともなって腫瘍細胞膜表面に異常抗原 (BTLA) が発現してくることが間接蛍光抗体法により確認されている^{3-5,12)}。

本研究では、膜異常抗原を精製するための準備として、小田ら¹⁰⁾のショ糖密度勾配遠心分離法を応用して、腫瘍細胞から膜の分離を試みるとともに、膜蛋白質抗原について、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS PAGE), Western blotting 法により、解析を行った。さらに、腫瘍細胞を接種した子牛の血清を用いて、分離した腫瘍細胞膜の抗原性について酵素抗体法により検索を行った。

実験材料および方法

1. 供試細胞 : 子牛型白血病牛由来の培養 T リンパ腫瘍細胞株 (BTL-C3)^{3,4)}を用いた。本細胞株の膜表面には異常抗原 (BTLA) が発現していることが間接蛍光抗体法により確認されている¹²⁾。

2. 細胞膜抗原の調整 : $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個の BTL-C3 細胞を 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris を含む 0.25 M ショ糖溶液に入れ、1000 rpm, 10 分間遠心分離し、細胞を洗浄する。この操作を 2 回繰り返す。

3. 細胞膜の分離 : 細胞膜の分離操作の概要は Fig. 1 に示した。以下の操作はすべて 4°C 以下の低温で行った。洗浄細胞を 3~5 ml の 0.2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 を含む 1 mM NaHCO_3 溶液 (pH 7.5) でテフロンホモジナイザーを用いて、破壊し、1000 rpm, 10 分間遠心分離する。沈渣を 1 mM CaCl_2 を含む 1 mM NaHCO_3 溶液 (pH 7.5) に懸濁後、1000 rpm, 10 分間遠心分離して洗浄する (2 回)。上清を捨て、沈渣を 0.25 M ショ糖溶液に蛋白質濃度が 10~20 mg/ml となるように懸濁する。これに倍量の飽和ショ糖溶液を加え、密度 (d) を 1.22 とする。この上に、 $d=1.20$ (43.11% w/w), 1.18 (39.33% w/w), 1.17 (37.40% w/w), 1.16 (35.45% w/w) のショ糖溶液を静かに順次、重層し、日立超高速遠心器 SCP 55 H により、スイングロータを用いて 100,000 g, 60 分間遠心分離し、膜を浮上させる。細胞膜は密度 1.16~1.18 に分離されるので、この部分をピペットにより遠心管に分取する (これを膜画分とする)。この膜画分を 4 倍量の 1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液を加えて希釈し、1500 rpm, 10 分間遠心分離して得た沈渣を 0.25 M ショ糖液に再懸濁して、1500 rpm, 10 分間遠心分離し、洗浄する (2 回)。

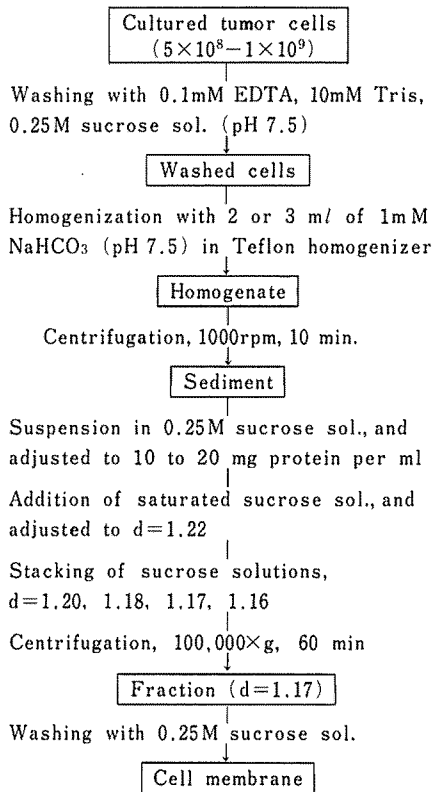


Fig. 1. Procedure of isolation of cell membrane from cultured tumor cells.

こうして得られた沈渣を 0.05% (w/v) Nonidet P 40 を含む 0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 2~5 ml に入れ、激しく振とうした後、氷水中に 30 分間浸して膜画分の蛋白質を可溶化する。これを 10,000 rpm, 30 分間遠心分離して得た上清を膜蛋白質可溶化抗原とした。

4. 膜蛋白質可溶化抗原の SDS PAGE Western blotting 法による検索: 蛋白質抗原は、4°C で 1 晩 SDS 化し、蛋白質濃度は 1~2 mg/ml となるように調整した。抗原は SDS polyacrylamide gel electrophoresis により分離し、さらに、Western blotting 法によりニトロセルロース膜に転写した^{11,14)}。蛋白質が転写されたニトロセルロース膜を、蛋白質染色液 (0.2% Coomassie brilliant blue G, 40% メタノール, 10% 酢酸) により 3~5 分間染色し、90% メタノール, 2% 酢酸溶液で脱色後、水洗、乾燥し保存した。

5. 膜異常抗原 BTLA の酵素抗法による検索: 膜

蛋白質可溶化抗原が転写されたニトロセルロース膜に、2% BSA を含む 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl 緩衝液, pH 7.2 (TBS) をマウントし、37°C, 90 分間反応させ、蛋白質が転写されていない部分をブロックしたのち、0.05% Tween 20 を含む TBS (Tween·TBS) で洗浄後、10 倍に希釈した被検血清と 37°C, 90 分間反応させた。BTL-C 3 細胞を接種し、抗 BTLA が陽性となった子牛の血清⁵⁾ を陽性血清として用いた。また、BTLA 陰性の健康牛血清を対照として用いた。血清と反応させた後、Tween TBS で洗浄し、Peroxidase 標識抗ウシ IgG (ウサギ製) (Zymed Lab., USA) の 1000 倍希釈液と、37°C, 90 分間反応させた。Tween TBS で洗浄した後、0.05% 4-chloro-1-naphtol, 0.001% H₂O₂ を含む 10 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.4) により染色を行った。

5. 蛋白質含量の定量: 抗原の蛋白質含量の測定は、Dye-Binding Assay⁸⁾ により行った。

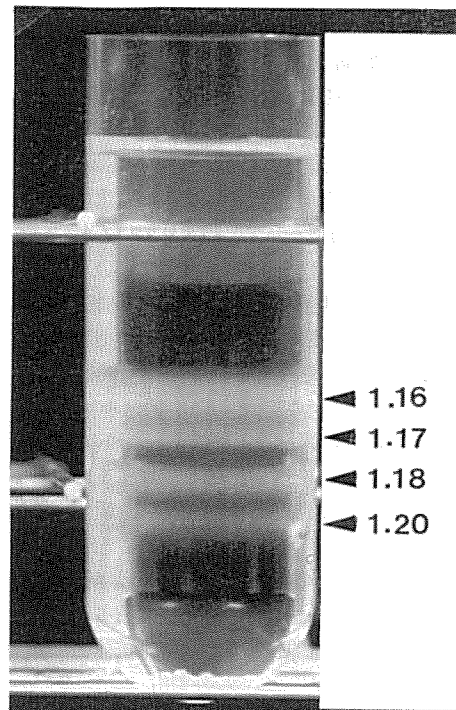


Fig. 2. The appearance of centrifuge tube after sucrose density gradient centrifugation. The cell membrane was isolated at d = 1.17 fraction as cloudy layer.

実験結果

1. 細胞膜の分離: Fig. 2 は, ショ糖密度勾配遠心分離法により細胞成分を分離した結果の写真である。細胞膜は $d=1.17$ 周辺に白濁した不透明の層として分離された。この膜分画に蛋白質可溶化剤 (NP 40) を加えて得られた可溶化抗原の濃度は約 0.2 mg/ml であった。

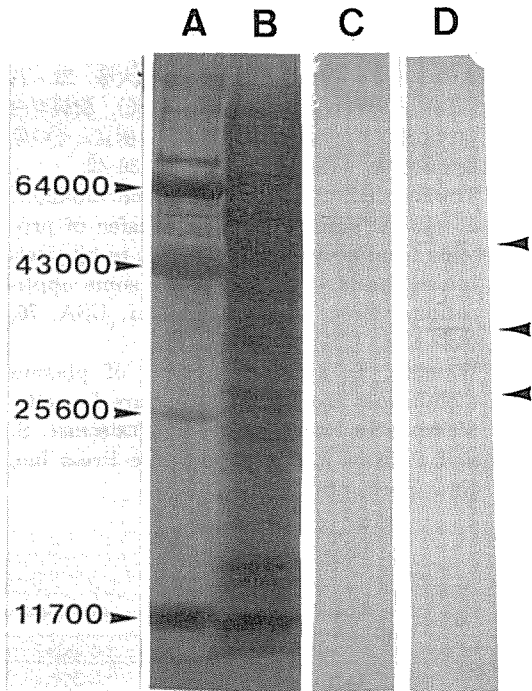


Fig. 3. SDS-PAGE and Western blotting analyses of soluble protein antigens from the cell membrane.

Lane A: molecular weight protein markers, bovine serum albumin (64,000), ovabumin (43,000), chmotrypsinogen A (25,600), cytochrome C (11,700).

Lane B: stained with Coomassie brilliant blue G.

Lane C: reacted with normal calf serum.

Lane D: reacted with anti-BTLA serum, three bands showed specific reaction with the serum.

また, 遠沈管の最下層には核成分が分離された。

2. 膜異常抗原 BTLA の分離・同定: ショ糖密度勾配遠心分離法により得られた細胞膜分画の可溶化蛋白質を SDS PAGE Western blotting 法により分離すると, 20~30 本の比較的境界の明瞭なバンドとして検出された。Fig. 3-B)。これらのうち約 3 本が抗 BTLA 陽性血清と特異的に反応した (Fig. 3-D)。これらの分子量は, それぞれ約 50,000, 35,000, 27,000 であった。いっぽう, これらのバンドは, 抗 BTLA 陰性健康牛血清とは全く反応しなかった (Fig. 3-C)。

考察

成牛型白血病については, その原因ウイルスが明らかにされ^{1,9)}, ウイルス抗原として p 24, gp 51 が分離同定され¹⁾, 診断等に応用されている。これに対し, 散発型白血病では, 診断法すら確立されていない。子牛型白血病牛から樹立した培養腫瘍細胞⁴⁾では, 膜異常抗原 BTLA が培養にともなって増強してくることが知られ, この BTLA に対する抗体が散発型白血病牛血清中に共通に存在することが蛍光抗体法により確認されている^{12,13)}。したがって, この膜異常抗原 BTLA を分離精製し, その性質を明らかにすることは散発型白血病的診断のために重要なことである。今回, ショ糖密度勾配遠心法により分離した腫瘍細胞膜からの可溶化蛋白質抗原の中にみられた抗 BTLA 陽性血清と特異的な反応を示す 3 本のバンドは, BTLA の主要な成分と考えられた。今後, この蛋白質を精製し, その性質を明らかにするとともに, 成牛型白血病ウイルス抗原として知られる p 24, gp 51 との差異などについて検討していく必要がある。また, ショ糖密度勾配遠心分離法は, 細胞膜を分離するためだけの方法ではなく, ショ糖の密度, 回転数, 遠心時間を調整することにより種々の細胞成分やウイルスなどの分離も比較的容易に行える^{6,10,15)} ことから, 今後, さらに応用範囲が広がるものと考えられた。

文献

- 1) BURNY, A., BRYCK, C., *et al.* (1980). Bovine leukemia Virus: Molecular Biology and Epidemiology. Viral Oncology, (Klein, G. ed.) Raven Press. New York. pp. 231-289.
- 2) 今井浩三・谷内 昭 (1982). Immunodepletion による腫瘍細胞の抗原解析. 免疫実験操作法 IX (日本免疫学会編) 金沢, pp. 3589-3593.
- 3) 石井 博・大木与志雄 (1982). 牛白血病由来 T 細胞系腫瘍細胞株の継代培養とその免疫化学的性状. 日獣大研究報告, 31, 17-22.

- 4) ISHII, H., and OKI, Y. (1984). Continuous cell culture and characteristics of T-lymphoid tumor cells from calf forms of lymphosarcoma. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46** (1), 123-127.
- 5) 金谷和明・生亀友理子・大木与志雄 (1987). 子牛型白血病由来腫瘍細胞株産生ウイルスの子牛に対する実験的感染と末梢血リンパ球内増殖性の検討. *日獣大研究報告*, **36**, 1-7.
- 6) LISTER, R.M., and HADDI, A.F. (1971). Some properties of apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. *Virology*, **45**, 240-251.
- 7) MASHAK, R.R., *et al.* (An International Committee on Bovine Leucosis) (1968). Criteria for the Determination of the normal and Leukotic State in Cattle. *J. Natl. Cancer Inst.*, **41**, 243-263.
- 8) 松田治男 (1980). Dye-Binding Assay によるタンパクの微量定量法, *免疫実験操作法 IX* (日本免疫学会編) 金沢, pp. 2745-2748.
- 9) MILLER, J.M., MILLER, L.D., OLSON, C., and GILLETTE, K.G. (1969): Virus-like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**, 1297-1305.
- 10) 小田琢三・小村幸子 (1969) がんの細胞膜 (寺山宏編) 南江堂, 東京, pp. 128-137.
- 11) 尾形研二・笠原 忠・中野康平・荒川正明 (1983). SDS ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜に転写されたタンパク質抗原の高感度な酵素抗体法による検出. *免疫実験操作法 XII* (日本免疫学会編), 金沢, pp. 3825-3833.
- 12) 大木与志雄・大和真一・東保智徳・小山浩一・藤巻由紀夫 (1984). 散発性白血病由来 T 細胞性リンパ腫瘍 (BTL) 細胞株における異常抗原とその牛血清抗体の証明, *日獣大研究報告*, **33**, 28-35.
- 13) 大木与志雄・斉藤 篤・後藤 浩・大藤 章・石原則和・野村耕二・杉山公宏 (1986). 胸腺型白血病由来ヌードマウス移植細胞株の樹立とその免疫学的性状, *日獣大研究報告*, **35**, 36-42.
- 14) TOWBIN, H., STAEBELIN, T., and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
- 15) WARREN, L. (1974). Isolation of plasma membrane from tissue culture-L cells. *Methods in Enzymology 31* (FLEISCHER, S. and PACKER, L. ed.) Academic Press Inc, New York, pp. 156-168.

Isolation and Determination of Cell Membrane Protein Antigen
from Cultured Lymphoid Tumor Cells from Calf Type
of Bovine Leukosis

Tokuhiro SHIBATO, Toshiro ARAI, Noriko KOIZUMI,
Nobuo MACHIDA and Yoshio OKI

Department of Veterinary Biochemistry, Nippon Veterinary
and Zootechnical College

ABSTRACT

In the cultured tumor cell line, BTL-C 3, from calf type of bovine leukosis, bovine T-lymphoid tumor cell surface antigen (BTLA) was detected strongly. In the present experiment, soluble protein antigen from the cell membrane of BTL-C 3 cell line was studied. The tumor cells were homogenized in teflon tube, and cell membrane was isolated by sucrose density gradient centrifugation (100,000 g, 60 min). The cell membrane was isolated around density = 1.17 fraction and treated with NP 40 to be soluble.

The soluble protein antigens were separated by SDS PAGE-Western blotting method, and were detected as 30 to 40 bands. Three bands with molecular weights of 50,000, 35,000 and 27,000 respectively, showed specific reaction with the anti-BTLA serum. These bands were considered to be major components of BTLA.

Key words : calf type of bovine leukosis, sucrose density gradient centrifugation, BTLA
Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 37, 5~9, 1988.