
学位論文

アビジン結合蛋白の細胞内局在について

—ウエスタンブロッティング変法と細胞化学的方法を用いて—

岡本 好史

キーワード：アビジン， ビオチン， カルボキシラーゼ， ミトコンドリア， 核，
ABC法， 細胞分画

Localization of Avidin-interacting Proteins in Cultured Cells

— Transblot and Cytochemical Detection —

Yoshifumi OKAMOTO

Abstract : Cell lysates prepared from 3T3-L1 cells were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and incubated with peroxidase-conjugated avidin. Peroxidase-conjugated avidin interacted with bands of proteins with estimated molecular weights of 120, 74, and 72 kDa. This interaction was not limited to 3T3-L1 cells, because peroxidase-avidin also interacted with these 3 proteins in MC3T3-E1, YROS-1, Saos-2, MG63, SCCKN, and SCCTF cells although the staining intensity was different in each cell type. Cell lysates prepared from 3T3-L1 cells were also analyzed by avidin-biotin complex Western blotting method using the anti-Bax antibody. The antibody interacted with bands of proteins with estimated molecular weights of 120, 74, 72, and 25 kDa. However, only the 25-kDa band was detected with the anti-Bax antibody when the direct immunoblotting method was used. Peroxidase-conjugated avidin interacted with these 3 proteins in the mitochondria-containing fractions prepared from 3T3-L1 cells. However, these proteins were not detected in the fractions containing nucleus or peroxisome. FITC-avidin was also localized in mitochondria in the cultured cells. The localization of avidin-interacting proteins in mitochondria was confirmed by using rhodamine-avidin or by double staining with FITC-avidin and Mito-tracker. When attempting to use avidin-biotin complex immunoblotting and immunohistochemical procedures to detect the specific proteins in cultured cells, the avidin-interacting proteins demonstrated in the present study will be detected and will give non-specific staining if the corresponding concentrations of peroxidase-conjugated avidin are used. The present study also indicates that careful observation should be taken when using the avidin-biotin complex system in biochemical and histochemical examination.

緒 言

アビジンは分子量 18kDa のホモ 4 量体から構成される分子量 72kDa の塩基性糖蛋白であり、鳥類、は虫類、および両生類の卵白や卵巣に多量に存在する^{1,2)}。アビ

ジンはビオチンと選択的に結合 ($K_d = 10^{-15}$ M) し、アビジン-ビオチン結合は化学結合のなかで最も強力な非共有結合である¹⁾。ビオチンは免疫グロブリン、レクチン、核酸と容易に化学結合を形成し、かつこれらの

分子の性質は結合したビオチンによって影響を受けることは少ない³⁾。免疫組織化学的研究法として導入されて以来⁴⁾、アビジン-ビオチン複合体法、つまり一般的に“ABC法”といわれている方法は、生化学、分子生物学、および細胞生物学の分野で幅広く応用されてきた³⁾。ところがこの方法で免疫組織化学やウエスタンブロットを行うと、ある組織や細胞に非特異的な反応が認められる⁵⁻⁷⁾。非特異的な反応の原因のひとつに、組織や細胞にビオチンが存在することが考えられる。ビオチンは遊離した状態で細胞内に存在することもあるが、一般的にはある種の蛋白と結合体を構成して細胞内に存在する⁸⁻¹⁰⁾。このように非特異的な反応が認められることもあるが、ABC法はいまだに生化学、分子生物学、細胞生物学、および組織学的研究において有用であり、多方面で広く用いられている¹¹⁻¹³⁾。

Horseshoe peroxidase (HRP) や fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したアビジンを用いて、アビジン反応蛋白(アビジン結合蛋白、ビオチン含有蛋白)を検出する方法は、これまで酵母やバクテリアなどの下等生物において報告されてきた。高等生物においては、アビジン反応蛋白は分子量が高く、存在量が少ないために、標識したアビジンによる検出は不可能であるとされてきた¹⁴⁾。我々のグループはこの報告より以前に、HRP-アビジン、FITC-アビジン、および金コロイダル-アビジンをプローブとして、二枚貝の卵、ラットの肝臓、唾液腺、脂肪細胞等においてアビジン反応蛋白が存在することを報告してきた¹⁵⁻²⁰⁾。

今回の研究で、私はHRP-アビジンやFITC-アビジンを用いて、培養細胞にアビジン反応蛋白が多量に存在することをウエスタンブロットング変法と細胞化学的方法により簡単な方法で証明した。また、アビジン反応蛋白は主にミトコンドリアに局在することを、細胞分画法とミトコンドリアマーカを用いた細胞化学的方法で証明した。

材料及び方法

1. 試薬等

Dulbecco 変法 Eagle 最少必須培地 (D-MEM) と α -変法 Eagle 最少必須培地 (α -MEM) は GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA), 牛胎児血清 (FBS) は JRH Biosciences (Lenexa, KS, USA), ペニシリン G カリウムと硫酸ストレプトマイシンは明治製菓 (東京), プラスチック培養皿は旭ガラス (千葉) よりそれぞれ購入した。蛋白定量キットは Bio-Rad (Richmond CA, USA), polyvinylidene difluoride (PVDF, Immobilon-P) 膜は Millipore (Bedford, MA, USA), HRP-アビジン, FITC-アビジン, ローダミン-アビジン, FITC および Mito-tracker は Sigma (St-Louis, MO, USA) より入手した。化学的蛍光検出剤 (ECL) と X線フィルム (Hyper ECL Film) は Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden) より、

抗 Bax 抗体は Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) より、HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG, FITC 結合ヤギ抗ウサギ IgG, ビオチン結合ヤギ抗ウサギ IgG は Cappel-Organon Teknika (Turnhout, Belgium) よりそれぞれ入手した。他の試薬は Sigma, 和光 (大阪), および関東化学 (東京) より特級を購入して用いた。

2. 細胞と細胞培養

SCCTF 細胞²¹⁾ と SCCKN 細胞²²⁾ は RIKEN Cell Bank (つくば) から購入した。3T3-L1 細胞²³⁾, Saos-2 細胞²⁴⁾, および MG63 細胞²⁵⁾ は American Type Culture Collection より入手した。MC3T3-E1 細胞²⁶⁾ と YROS-1 細胞²⁷⁾ は久米川正好氏 (明海大学) と長嶋洋治氏 (横浜市立大学) よりそれぞれ供与を受けた。3T3-L1, YROS-1, SCCKN, および SCCTF 細胞は D-MEM の入ったプラスチック皿中で培養し, MC3T3-E1, Saos-2, および MG63 細胞は α -MEM 培地中で培養した。それぞれの培地には 10% FBS, 100 U/ml のペニシリン, 100 μ g/ml のストレプトマイシンを添加した。細胞は 5% 炭酸ガスと 95% 空気で制御された湿潤状態の培養器内で 37°C で培養した。細胞分画用には 20 枚の 90mm の培養皿に細胞を播種して用いた。細胞化学的方法には, 60mm プラスチック培養皿中に 18 mm のカバーガラスを置き, その上で細胞を培養して用いた。実験にはコンフルエント状態の細胞を用いた。細胞形態の変化は位相差顕微鏡 (IMT-2, Olympus, 東京) を用いて観察した。

3. ウエスタンブロットングおよびその変法

90mm シャーレに播種し, コンフルエント状態になった細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し, lysate buffer (1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 5 mM EGTA) 400 μ l を添加し, ラバーポリスマンを用いて細胞をシャーレより採取した。採取した細胞を超音波ホモジナイザー (セントラル科学貿易, 東京) で破壊した後, 16,000 g で 10 分間遠心し, 蛋白量を測定した。上清に 100 μ l の 5 \times サンプルバッファー (20mM DTT, 10% SDS, 50% glycerol, 0.4 M Tris-HCl, pH6.8) を加え 100°C で 5 分間煮沸し, 電気泳動用試料とした。このサンプル 10 μ g を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動し, サンプル内の蛋白を分離した。その後, ゲルを PVDF 膜に転写し, 5% BSA を用い, 室温で 2 時間ブロックした。ブロックした膜を HRP-アビジンを用いて室温で 1 時間反応させた。反応後 PBS にて 30 分間 (5 min \times 6 回) 洗浄し, 化学的蛍光検出剤と 1 分間反応させ, X線フィルムに 1 分間感光させた後反応蛋白を検出した。この PVDF 膜を 2% SDS と 0.35% 2-メルカプトエタノーレを含む 62.5 mM Tris-HCl 溶液 (pH 6.8) で 50°C, 30 分間処理し, HRP-アビジンを PVDF 膜から除去した。この PVDF 膜を用いたウエスタンブロットング法は下記の 2 つの

方法により行った。つまり(1):PBSで5分間洗浄後、5%スキムミルクで2時間ブロックし、2,000倍に希釈したウサギ抗 Bax 抗体を用いて4℃で16時間または37℃で1時間反応させた。コントロールとして正常ウサギ血清を等倍に希釈して用いた。反応後PBSで30分間洗浄したPVDF膜を20,000倍希釈のビオチン結合ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間反応させた。洗浄後、20,000倍希釈のHRP-アビジンを用いて室温で1時間反応させた後化学的蛍光検出剤を用いて反応陽性蛋白を検出した。以上の操作は通常ABC法と呼ばれているウエスタンブロッティング法である。(2):この操作を行ったPVDF膜を再度SDSと2-メルカプトエタノールで処理し、抗原と結合している抗体を除去した後、通常ウエスタンブロッティングを行った。則ち、PBSで洗浄後、5%スキムミルクで2時間ブロックしたPVDF膜を2,000倍に希釈したウサギ抗 Bax 抗体と4℃で16時間反応させた。PBSで30分間洗浄し、5,000倍に希釈したHRP結合ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間反応させ、ECLを用いて反応陽性蛋白を検出した。

4. 細胞分画と酵素分析

コンフルエントになった3T3-L1細胞をPBSで2回洗浄し、3.3倍量の0.25 M ショ糖を含む25 mM グリシルグリシン (pH 7.5) 中に加え、Potter-Elvehjem ホモジナイザーで細胞を破碎した。破碎した細胞を300gで5分間遠心し、沈殿物を核画分とした。核を除いた上清を、57%ショ糖溶液をクッションとした33 mlのショ糖密度勾配液(24–54%)に重層し、130,000gで55分間遠心し、遠心管の底から2 mlの画分を分取した。ペルオキシソームのマーカーとしてカタラーゼの活性²⁸⁾を、ミトコンドリアのマーカーとしてグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性²⁹⁾をそれぞれ測定した。核のマーカーとしてはニュークレオリンの発現をウエスタンブロッティング法で検出した^{30,31)}。

5. 細胞化学

カバーガラス上で培養した細胞を、PBSで洗浄後、3.7%ホルムアルデヒド溶液を用いて、常温で10分間固定した。その後-20℃で20分間メタノール透徹した。冷PBSで15分間洗浄した後、4%BSAで45分間ブロックし、50–400倍に希釈したFITC-アビジンで30分間反応させた。対照群として、同倍率のローダミン-アビジン、FITC結合ヤギ抗ウサギIgG、およびFITCを用いた。PBSで洗浄した後、スライドガラス上にマウントして蛍光顕微鏡を用いて観察した。ビオチン含有蛋白の細胞内局在を調べるために、100 nMのMito-trackerで45分間処理した細胞を上記のように固定、透徹後、FITC-アビジンで反応させた。対照群として、同倍率のFITCを用いた。Mito-trackerはU-MNIGフィルター、FITCはU-MNIBAフィルターを用いてOlympus BX-50蛍光顕微

鏡で観察し、Fuji Presto 400film (富士フィルム、東京)を用いて写真撮影した。

結 果

1. HRP-アビジンによる培養細胞のアビジン反応蛋白の検出

SDS-PAGEにより分離した3T3-L1細胞の蛋白をPVDF膜に転写しブロッキングした後、HRP-アビジンと反応させると、分子量が120, 74, 72 kDaと推定される3本のバンドが検出された。図1は10 µgの蛋白をHRP-アビジンの濃度を変えて(0.016–0.25 µg/mlまたは10,000–160,000倍希釈)反応させた結果を示している。これらのバンドの強度はHRP-アビジンの濃度に依存して強くなるが、通常のABC法で用いる濃度、つまり、20,000倍希釈(0.125 µg/ml)のHRP-アビジンでも明らかな陽性バンドが検出された(図1, レーン4)。したがって、以後の実験には原則として20,000倍希釈のHRP-アビジンを用いた。HRP-アビジンの代わりにHRP-ストレプトアビジンを用いても同様の結果が得られた(結果非表示)。

電気泳動用試料(1 mg/ml)に様々な濃度のアビジンまたはビオチン(最終濃度;それぞれ0–100 µg/ml)を加え、37℃で30分間反応させた。その反応産物の10 µlを電気泳動し、PVDF膜に転写後HRP-アビジンと反応させた。図2 Aに示すように、アビジンと反応させたサンプルでは反応陽性バンドの強度はアビジンの濃度に

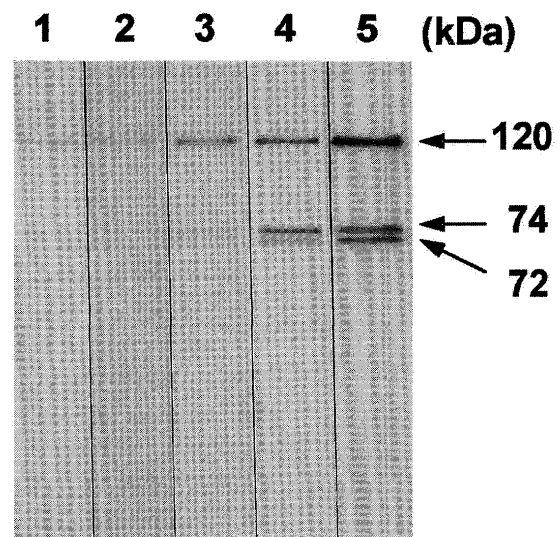


図1 3T3-L1細胞におけるアビジン反応蛋白の同定
コンフルエント状態の3T3-L1細胞から調製した蛋白を10% SDSで電気泳動し、PVDF膜に転写後、様々な濃度のHRP-アビジンと反応させた。lane 1, 0.016; lane 2, 0.032; lane 3, 0.064; lane 4, 0.125; そして lane 5, 0.25 µg/mlのHRP-アビジンを用いた。分子量マーカーから推測される分子量を右側にkDaの単位で記した。

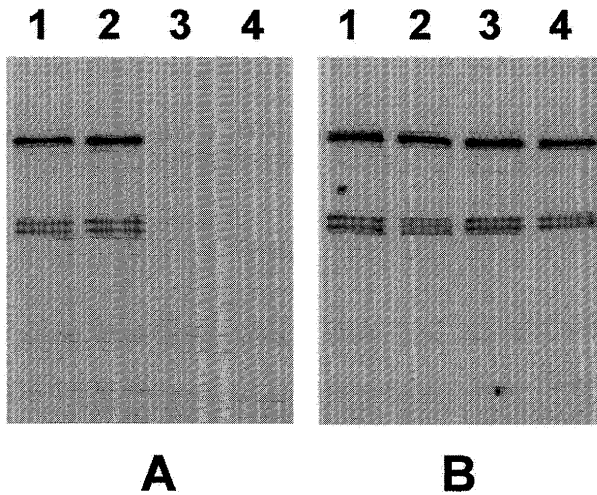


図2 アビジン反応蛋白の検出に対するアビジンとビオチンの影響
電気泳動用に調製した蛋白と様々な濃度のアビジン (A) またはビオチン (B) と37°Cで30分間反応させた。Lane 1, 0; lane 2, 10; lane 3, 100; lane 4, 1,000 µg のアビジン (A) またはビオチン (B) で反応させた蛋白を電気泳動に用いた。

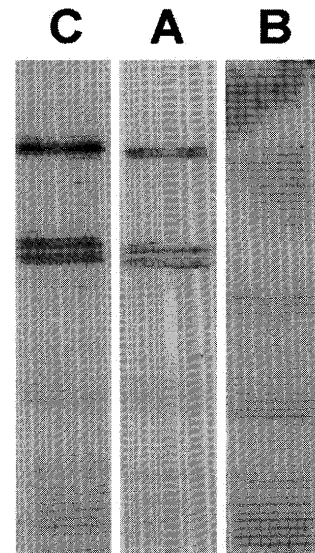


図3 HRP-アビジンに対するアビジンとビオチンの影響
HRP-アビジンと0.1µgのアビジン (A) またはビオチン (B) を37°Cで30分間反応させ、その反応産物を用いてアビジン反応蛋白を検出した。対照として無添加の HRP-アビジン (C) を用いた。

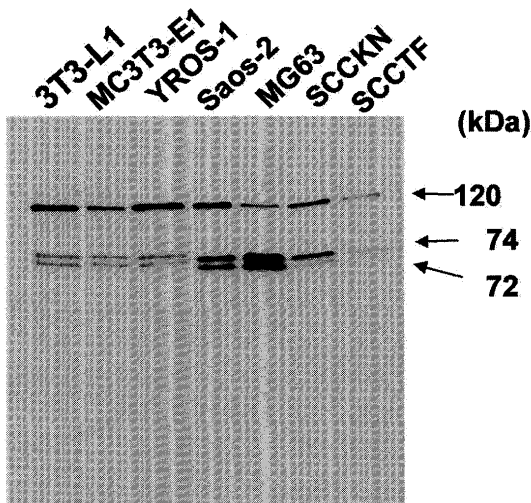


図4 様々な細胞におけるアビジン反応蛋白の同定
図に示した細胞から調製した蛋白を10% SDS-ポリアクリドアミド内で電気泳動し、PVDF膜に転写後、HRP-アビジン (20,000倍希釈, または0.125 µg/ml) と反応させた。

依存して減少し、高濃度では完全に消失した。ビオチンと反応させたサンプルでは、ビオチンの濃度に関係なく3本の反応陽性バンドが検出された (図2 B)。また、HRP-アビジンにビオチンを加え、37°Cで30分間反応させた後、反応液をプローブとして用いると、3本のバンドは検出されなかった (図3, B)。一方、HRP-ア

ビジンにアビジンを加えると、反応強度は減少するものの、3本のバンドは検出された (図3, A)。

アビジン陽性の3本のバンドが3T3-L1細胞に特異的であるか否かを検討するために、MC3T3-E1細胞 (マウス細胞)、YORS-1細胞 (ラット細胞)、Saos-2細胞、MG63細胞、SCKKN細胞、およびSCCTF細胞 (ヒト細胞) を培養し、電気泳動用試料を調製した後、HRP-アビジンを用いて同様の実験を行なった。図4に示すように反応の強度に若干の差は認められるが、3T3-L1細胞と同様にいずれの細胞でも、分子量120, 74, および72kDaの3本の反応陽性バンドが検出された (図4)。

2. ABC ウェスタンブロッティング法によるアビジン反応蛋白の検出

異なる量の3T3-L1細胞の蛋白 (12 µg と10 µg) を電気泳動後、PVDF膜に転写して HRP-アビジン (20,000倍希釈) で反応させると、分子量120, 74, および72 kDaと推定される3本のバンドが検出された (図5, p-avidin)。SDSと2-メルカプトエタノールでPVDF膜からHRP-アビジンを除去し、Bax抗体を用いてABCウェスタンブロッティング法を行った。つまり、転写膜をウサギ抗Bax抗体 (2,000倍希釈) で反応させ、ビオチン結合ヤギ抗ウサギIgG (20,000倍希釈) と反応させた後、HRP-アビジン (20,000倍希釈) と反応させた。図5に示すように、ABC法では3T3-L1細胞に存在する分子量120, 74, 72, および25 kDaと推定される4本のバンドが検出された (図5, A B C)。Bax蛋白の分

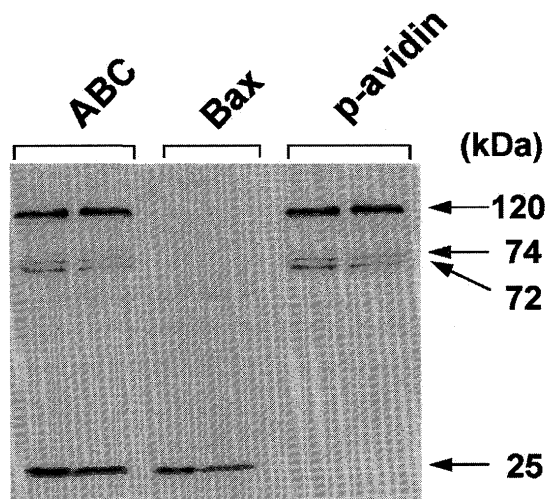


図5 3T3-L1細胞におけるBax蛋白とアビジン反応蛋白の検出

コンフルエント状態の3T3-L1細胞から調製した試料(12と10 μg)を電気泳動し、PVDF膜に転写後、HRP-アビジンを用いてウエスタンブロット変法(p-avidin)を行った。HRP-アビジンをSDSとメルカプトエタノールで除去し、抗Bax抗体を用いてABCウエスタンブロット法(ABC)を行った。再度反応産物を除去後、抗Bax抗体を用いて通常のウエスタンブロット法(Bax)を行った。

分子量は25 kDaであるので、この実験により検出された25 kDaと推定される蛋白は、抗Bax抗体により認識されるBax蛋白である。他方、ABC法で検出される3本のバンドはHRP-アビジンで検出される3本のバンドと全く同じものであった。これらの反応産物を再度PVDF膜から除去し、抗Bax抗体を用いて、通常のウエスタンブロット法を行った。つまり、抗体を除去したPVDF膜をウサギ抗Bax抗体(2,000倍希釈)と反応させた後、HRP結合ヤギ抗ウサギIgG(5,000倍希釈)と反応させた。抗Bax抗体は25 kDaと推定されるバンドのみを検出した(図5, Bax)。以上の結果はABC法で検出される3本のバンドは細胞内に存在するアビジン結合蛋白であり、ABCウエスタンブロッティング法で非特異的に検出されることを意味する。

3. 細胞分画によるアビジン反応蛋白の細胞内局在

アビジンに反応する蛋白の細胞内局在を調べるために、コンフルエント状態の3T3-L1細胞を破碎し、核画分を除去した後シヨ糖密度勾配法により細胞分画を行った。グルタミン酸デヒドロゲナーゼはミトコンドリアに多量に存在することから、その活性を測定してミトコンドリア画分を同定することが可能である。図6Aに示すように、フラクションナンバー7, 8, 9にグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性が高いことから、これらの

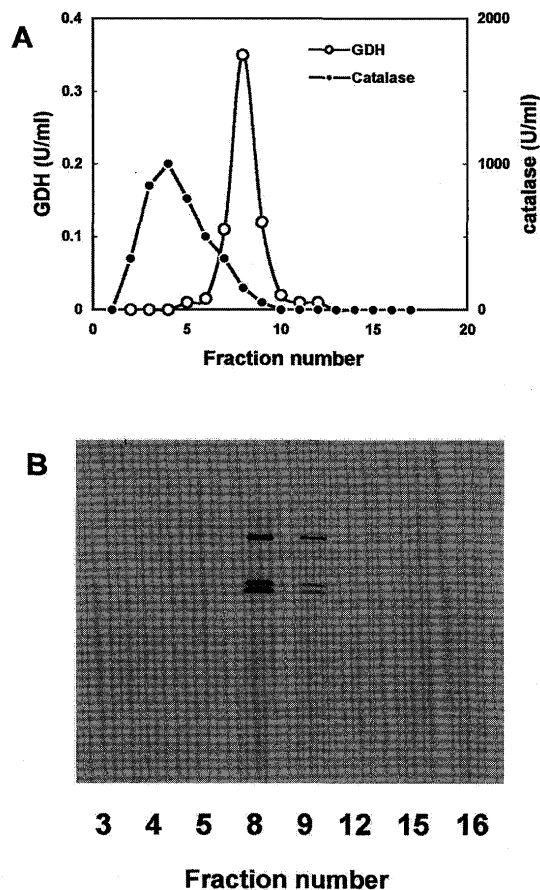


図6 3T3-L1細胞の細胞内小器官におけるアビジン反応蛋白の検出

(A) 3T3-L1細胞の核を除去した分画を調製し、シヨ糖密度勾配法により細胞分画を行い、各フラクションを調製した。それぞれのフラクションを用いて、CatalaseとGDHの活性を求めた。(B) 等量のフラクションから電気泳動用試料を調製し、電気泳動、PVDF膜に転写後HRP-アビジンと反応させた。

画分がミトコンドリアを含む画分であることがわかった。一方、フラクションナンバー3, 4, 5ではカタラーゼ活性が高く、この画分はペルオキシソームを含む画分である(図6A)。それぞれの画分から電気泳動用試料を調製し、電気泳動、PVDF膜に転写後HRP-アビジンを用いて、ウエスタンブロッティング変法を行った。ミトコンドリアを含む画分として同定されたフラクションナンバー8と9の画分にHRP-アビジン陽性の3本のバンドが検出された。ところが、ペルオキシソーム画分(フラクション, 3, 4, 5)にはこのような陽性バンドは検出されなかった。これらの所見は3本の反応陽性蛋白はミトコンドリアには存在するが、ペルオキシソームには存在しないことを意味する(図6B)。

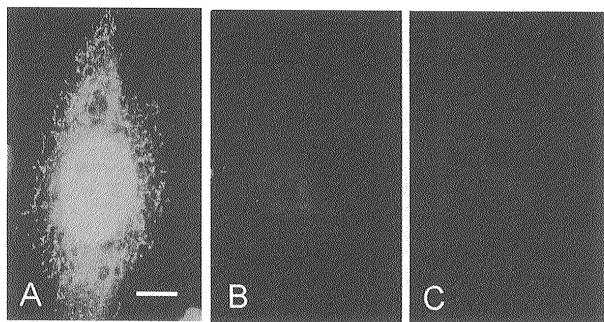


図7 3T3-L1細胞のミトコンドリアにおけるアビジン反応蛋白の局在
コンフルエント状態の細胞を3.7%ホルマリンで固定後、メタノールで透徹した。PBSで軽く洗浄した後、200倍希釈のFITC-アビジン(A)、FITC-IgG(B)、およびFITC(C)で60分間反応させた。バーは10 μ mを示す。

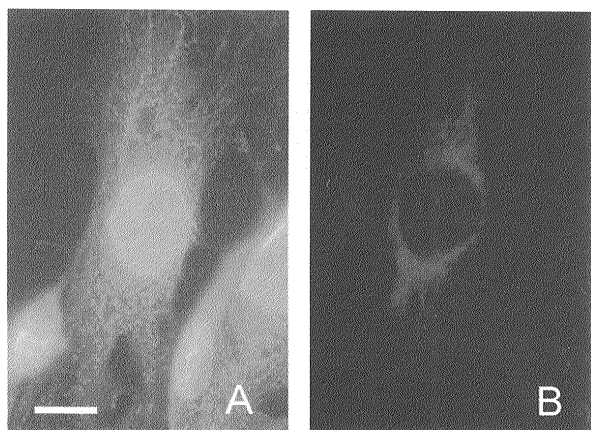


図8 3T3-L1細胞の核におけるアビジン反応蛋白の局在
コンフルエント状態の細胞を3.7%ホルマリンで固定後、メタノールで透徹した。PBSで軽く洗浄した後、200倍希釈のFITC-アビジン(A)とローダミン-アビジン(B)で60分間反応させた。バーは10 μ mを示す。

4. FITC-アビジンによるアビジン反応蛋白の細胞内局在の同定

3T3-L1細胞におけるアビジン反応蛋白の細胞内局在を細胞レベルでより詳細に調べるために、培養した3T3-L1細胞を固定、メタノール透徹後FITC-アビジンと反応させた。図7Aに3T3-L1細胞におけるFITC-アビジンの典型的な反応像を示す。FITC-アビジンは核と核の周囲、特にミトコンドリアと推定される細胞内小器官に点状に局在していた(図7A)。FITC-アビジンの代わりに、FITC-IgG(図7B)とFITC(図7C)を用いるとこの反応は検出されなかった。以上の結果から、この陽性反応はアビジンによることが明らかである。図7Aに示すように、FITC-アビジンは核に存在する蛋白

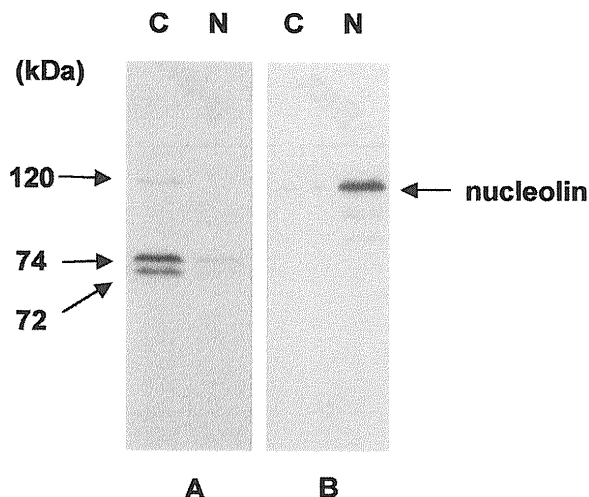


図9 3T3-L1細胞の核におけるアビジン反応蛋白の検出
3T3-L1細胞から細胞質(C)と核(N)を分離し、蛋白溶液を調製後、それぞれの蛋白を電気泳動し、PVDF膜に転写後、HRP-アビジンと反応させた(A)。細胞質(C)と核(N)から調製した蛋白溶液を電気泳動し、抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロットを行った(B)。推定される分子量をkDa、ニュークレオリンをnucleolinで記した。

とも反応する。このことを確かめるために、FITC-アビジンの代わりにローダミン-アビジンを用いて細胞を染色し、核におけるローダミン-アビジンの局在を調べた。図8に示すように、FITC-アビジンが核とミトコンドリアを染色しているのに対し、ローダミン-アビジンはミトコンドリアのみを染色し、核における反応は認められなかった。

核におけるアビジン反応蛋白の存在の有無を蛋白レベルで確認するために、コンフルエント状態の3T3-L1細胞から細胞質と核を調製し、それぞれの画分を電気泳動後、HRP-アビジンで反応させ、ウエスタンブロット法を行った。図9Aで示すように、細胞質画分ではHRP-アビジン陽性の3本のバンドが検出されたが、核蛋白にはこのようなバンドは全く検出されなかった。この画分が核を含む画分であることを確認するために、核のマーカー蛋白であるニュークレオリンを抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロット法で検出した。核画分では120 kDaに染色されるニュークレオリンのバンドが検出されたが、細胞質画分では検出されなかった(図9B)。前述の細胞分画法の結果と総合して、アビジン反応蛋白はミトコンドリアを含む細胞質には存在するが、核には存在しないことが判明した。このことは、ローダミン-アビジンを用いた結果と一致する。

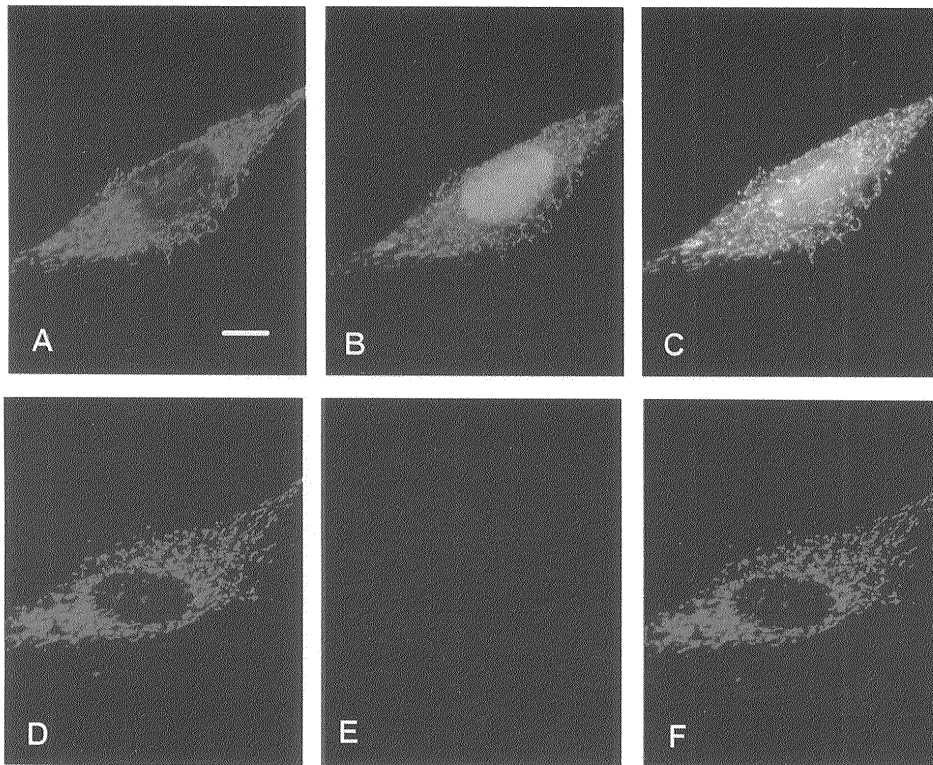


図10 3T3-L1 細胞におけるアビジン反応蛋白の局在

コンフルエント状態の 3T3-L1 細胞を 100nM Mito-tracker で45分間処理し, 3.7%ホルマリンで固定後, メタノールで透徹した。PBS で軽く洗浄した後, 200倍希釈の FITC- アビジン (A-C), または FITC (D-F) で60分間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて, 細胞を Mito-tracker (A, D), FITC (B, E), Mito-tracker と FITC の2重露出 (C, F) で観察した。バーは10 μm を示す。

5.2 重染色法によるアビジン反応蛋白の細胞内局在

ミトコンドリアにおけるアビジン反応蛋白の局在を詳細に調べるために, 3T3-L1 細胞を Mito-tracker で処理し, 45分間培養した後, 固定後 FITC- アビジンで細胞を染色した。図10A に示すように, 細胞質特に核の周囲の細胞内小器官が Mito-tracker により赤く染色された。Mito-tracker はミトコンドリアのマーカーであるので, この陽性部位がミトコンドリアである。FITC 専用の U-MNIBA フィルターで細胞を観察すると, アビジン反応蛋白は緑色に染色され, 核と細胞質に FITC- アビジンで検出される蛋白が局在した (図10B)。この細胞質内局在は核を除く Mito-tracker により染色される部位と酷似していた。さらに, Mito-tracker の赤と FITC の緑を用いて2重露出を行うと, お互いが重なりあい, 黄色の染色として検出された (図10C)。このことは, Mito-tracker の局在と FITC- アビジンにより染色される蛋白の局在が一致することを意味する。つまり, アビジンはミトコンドリアに局在する蛋白と反応した。Mito-tracker で処理した細胞を FITC のみで反応させると, ミトコンドリアは Mito-tracker によって赤く染色されたが (図10D), FITC との反応はほとんど認められなかった (図10E)。この両者を重ねあわせても, 赤く染

色されるだけであった (図10F)。この結果は前述の細胞分画より得られた結果と完全に一致した。以上の結果から, FITC- アビジンと反応する蛋白はミトコンドリアに存在するビオチンを含む蛋白であることが判明した。ラットやヒトの細胞を用いた2重染色法でも同様の結果が得られた。図11にラットの YROS-1 細胞で得られた結果を示す。

考 察

本研究で私はマウス, ラット, およびヒトの培養細胞に HRP- アビジンと反応する分子量120, 74, および72 kDa と推定される3種類の蛋白が存在することを明らかにした。HRP- アビジンの活性は HRP- アビジンにビオチンを加えることにより消失すること, SDS-PAGE 用に調製した蛋白溶液にアビジンを加えると, アビジンの濃度に依存して3本のバンドが消失することなどから, 本研究で検出された3種類のアビジン反応蛋白はビオチンを含む蛋白と推測される。ビオチンは真核細胞に存在する4種類のカルボキシラーゼ, すなわちアセチル CoA カルボキシラーゼ, ピルビン酸カルボキシラーゼ, プロピオニル CoA カルボキシラーゼ, メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼの構成要素である³²⁻³⁵⁾。ピ

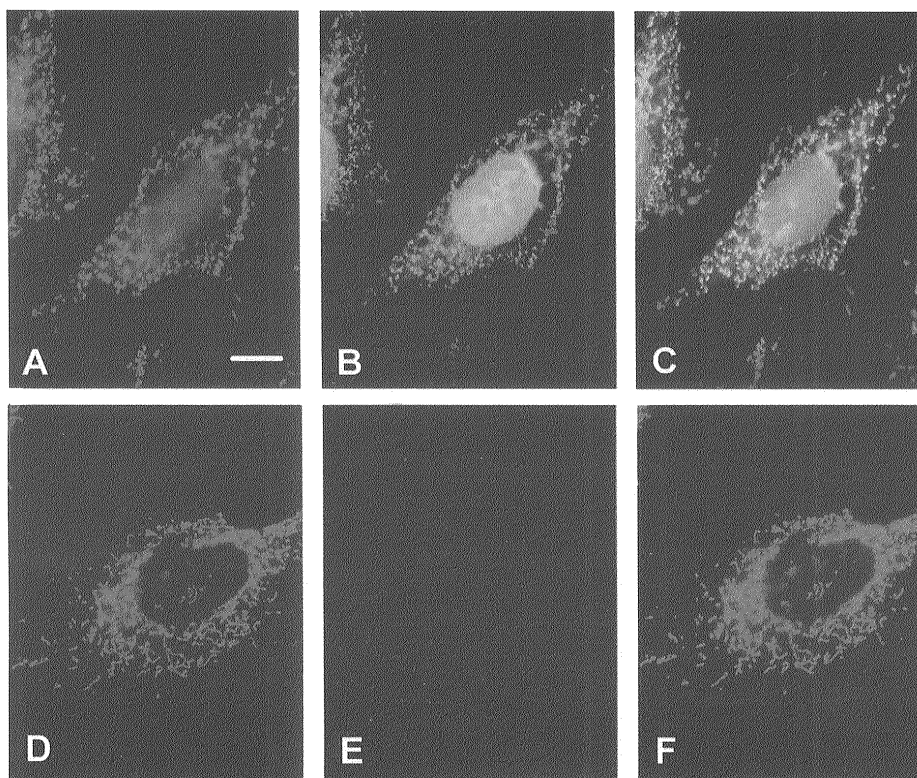


図11 YROS-1 細胞におけるアビジン反応蛋白の局在

コンフルエント状態の YROS-1 細胞を 100nM Mito-tracker で45分間処理し、3.7%ホルマリンで固定後、メタノールで透徹した。PBS で軽く洗浄した後、200倍希釈の FITC- アビジン (A-C)、または FITC (D-F) で60分間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて、細胞を Mito-tracker (A, D), FITC (B, E), Mito-tracker と FITC の2重露出 (C, F) で観察した。バーは10 μ m を示す。

オチンを含むという事実とその分子量から、120 kDa の蛋白はピルビン酸カルボキシラーゼ、74 kDa と72 kDa の蛋白はそれぞれプロピオニル CoA カルボキシラーゼとメチルクロトニル CoA カルボキシラーゼと推定される^{32,33)}。一方、アセチル CoA カルボキシラーゼは分子量220 kDa の蛋白であるが、今回用いた条件では検出されなかったが、ECL の反応時間を長くすることにより、新たに分子量 220 kDa と推定されるバンドも検出された。また、低濃度のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、PVDF 膜への転写時間を長くすることにより、分子量 220 kDa と推定されるバンドの検出は可能であった。よってこのバンドはアセチル CoA カルボキシラーゼであると推測される。事実、アセチル CoA カルボキシラーゼの活性が高い二枚貝の受精卵ではこの蛋白も今回の実験方法で容易に検出することが可能である¹⁵⁾。これらのカルボキシラーゼがピオチン含有する理由とその生物学的意義に関しては不明である^{32,33)}。

3T3-L1 細胞から調製した蛋白を、抗 Bax 抗体を一次抗体として用いた ABC 法でウエスタンブロッティングを行なうと、抗 Bax 抗体は分子量120, 74, 72, および 25 kDa と推定される蛋白と反応した。ピオチン結合 2 次抗体を用いない通常の免疫プロット法を用いると抗

Bax 抗体は25 kDa のバンドのみを認識した。Bax 蛋白の分子量は25 kDa であるので、他の 3 本のバンドは ABC 法によって検出される非特異的なバンドである。この所見は 3T3-L1 細胞を含む培養細胞から調製した蛋白を HRP- アビジンと反応させると、3 本のアビジン反応蛋白が認められることと一致する。アビジン反応蛋白とウエスタンブロッティングにより特異的に認識される蛋白を識別するために、今回の実験では分子量25 kDa の Bax 蛋白に対する抗体を用いた。このサイズの分子量は上記の 3 本のバンドから容易に区別することができるので、本来の免疫反応陽性蛋白を容易に検出することができる。もし分子量が 72-74 kDa や 120 kDa 付近の蛋白を検出する目的で ABC ウエスタンブロッティング法を用いると、アビジン反応蛋白が存在する為、その同定は不可能である。よって、ウエスタンブロット法を行う場合は ABC 法を避けて、通常のウエスタンブロット法を行うことを推奨する。

一般的に、培養細胞におけるピオチン含有蛋白の検出には放射性同位元素で標識したピオチンで細胞を培養し、蛋白溶液を調製後、SDS-PAGE による蛋白の分離、乾燥したゲルのオートラジオグラフィーを行なってきた^{36,37)}。この方法では、オートラジオグラフィーに15

—50日間の露出が必要である。また、特異的な抗体を用いて、免疫沈降法やウエスタンブロット法により、反応蛋白を検出する方法も行われてきた^{38, 39)}。これらの方法では、放射性同位元素や特異的な抗体を用いるため、安全性に問題があり、かつ高価である。さらに、今回の検出法に比較して時間と手間がかかる。本研究で用いたアビジン反応蛋白の検出法は非常に簡単で、検出能も高く、1日ですべての実験を終了することが可能である。このような理由で私達のグループは真核生物のアビジン反応蛋白の検出にHRP-アビジンを用いている。

アビジン反応蛋白は本研究で調べたすべての培養細胞においてHRP-アビジンによって容易に検出される。我々のグループはラットの各種器官、組織でアビジン反応蛋白を今回のような方法で検出した^{19, 20)}。その結果、肝臓、腎臓、心臓、耳下腺、および脂肪組織にこれらの蛋白は多量に存在し、大脳、小脳、大腸、および小腸では中程度の発現が認められるが、肺、脾臓、および精巣ではその発現は比較的低かった。別のグループもヒトを含む哺乳類細胞におけるアビジン反応蛋白を今回のような方法で検出して報告した⁴⁰⁻⁴²⁾。培養細胞を用いた本研究の結果を加えて、いずれの組織、細胞にも発現に強弱の差は認められるがアビジン反応蛋白は存在し、本研究で用いた方法で検出が可能であった。以上の所見から、これらの蛋白は動物や細胞の種類に関わらず、すべての細胞で発現されていると推測される。

私はさらに、本研究でアビジン反応蛋白の細胞内局在に注目した。細胞分画法によりアビジン反応蛋白は3T3-L1細胞のミトコンドリアを含む画分に存在し、ペルオキシソームや核には存在しなかった。ミトコンドリアとペルオキシソームの画分の証明には酵素化学的方法を用いて、核の存在には核特異的な蛋白であるニュークレオリンの存在をウエスタンブロット法を用いて確認した。他の細胞内小器官にアビジン反応蛋白が存在するかどうかについては現在検討中である。アビジン反応蛋白がミトコンドリアに局在することは、FITC-アビジンを用いた細胞化学的方法により、ミトコンドリアと思われる細胞内小器官内で強い染色が見られることから明らかである。ところが、この方法では核内にも強い染色が認められた。核内の陽性反応が非特異的であることは、ローダミン-アビジンを用いると核内での反応が認められないことによって証明された。このことは細胞分画法による結果と一致している。原因は明らかでないが、FITC-アビジンが核と非特異的に反応することは古くから知られている⁴³⁾。

Mito-trackerはミトコンドリアを特異的に染色する色素であり、3T3-L1細胞をMito-trackerで処理すると、細胞内小器官のうち、ミトコンドリアが特異的に染色された。Mito-trackerを取り込んだ細胞をFITC-アビジンで染色すると、図10に示したように、Mito-trackerは赤い色に、FITC-アビジンは緑に染色される。これらの局在

部位が同一であることは、Mito-trackerの赤とFITC-アビジンの緑を重ね合わせることにより、黄色に染色されることにより明らかである。つまり、FITC-アビジンはミトコンドリア内に存在する蛋白と選択的に結合する。同様の結果はヒトおよびラット細胞を用いても証明された。これらの結果はコロイダル金-アビジンを用いて行ったラット肝臓、ヒト骨格筋、ヒヨコ心筋、および酵母を用いた電顕結果と一致する^{44, 45)}。

結 論

アビジンは3T3-L1細胞を含む培養細胞内に存在する3つの蛋白と結合した。その分子量は、120, 74, 72 kDaであった。細胞分画法と細胞化学的方法により、アビジン結合蛋白は、その大部分がミトコンドリア内に局在することが判明した。ABCウエスタンブロット法により、本来の抗体で検出されるバンドの他にこれら3本のバンドが非特異的に検出された。

今回の研究において、私は培養細胞に内在性のアビジン結合蛋白が存在し、この蛋白はHRP-アビジンまたはFITC-アビジンを用いて、簡易な方法で検出可能であることを示した。また、この研究はABC法でウエスタンブロットや免疫組織化学などを行った場合、アビジン結合蛋白の存在により、反応が非特異的にも起こる可能性があることを示している。以上のことより、ABC法を用いた実験結果の解釈には細心の注意を払うべきである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った口腔解剖学第二講座羽地達次教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲御助言を戴きました口腔解剖学第一講座北村清一郎教授、口腔生理学講座細井和雄教授に深謝致します。最後に数々の御教示と御援助を戴いた森本景之博士、岡村裕彦博士、および吉田賀弥博士に感謝致します。また、実験の一部を担当して下さった佐々木英子技術専門職員と学部学生の藤原めぐみさんに感謝致します。

参考文献

- 1) Green NM: Avidin. *Adv Protein Chem* 29, 85-133 (1975)
- 2) Elo HA and Korpela J: The occurrence and production of avidin: a new conception of the high affinity biotin-binding protein. *Comp Biochem Physiol* 78B, 15-20 (1984)
- 3) Wilchek M and Bayer EA: The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem* 171, 1-32 (1988)
- 4) Hsu SM and Raine L: Protein A, avidin, and biotin in immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 29, 1349-1353 (1981)

- 5) Fishleder A, Sedmak D and Tubbs RR: Relative merits of the avidin-biotin complex (ABC) and unlabelled peroxidase-anti-peroxidase techniques for studying polypeptide hormones. *Am J Clin Pathol* 77, 770-772 (1982)
- 6) Bussolati G and Gugliotta P: Non-specific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem* 31, 1419-1421 (1983)
- 7) Jones CJP, Mosley SM, Jeffrey IJM and Stoddart RW: Elimination of the non-specific binding of avidin to tissue sections. *Histochem J* 19, 264-268 (1987)
- 8) White HB III, Dennison BA, Ferrar MD, Whitney CJ, McGuire JC, Meslar HW and Sammelwitz PH: Biotin binding protein from chicken egg yolk: assay and relationship to egg-white avidin. *Biochem J* 157, 395-400 (1976)
- 9) Neumaier M, Fenger U and Wagener C: Biotin protein, transblot studies with biotin-labeled proteins, electrophoretic mobilities and detection limits. *Anal Biochem* 156, 76-80 (1986)
- 10) Ahmad PM and Ahmad F: Mammalian pyruvate carboxylase: effect of biotin on the synthesis and translocation of apo-enzyme into 3T3-L adipocytes mitochondria. *FASEB J* 5, 2482-2485 (1991)
- 11) Hurley WL, Finkelstein E and Holst BD: Identification of surface proteins on bovine leukocytes by a biotin-avidin protein blotting technique. *J Immunol Methods* 85, 195-202 (1985)
- 12) Adams JC: Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40, 1457-1463 (1992)
- 13) White HB III, Orth WH III, Schreiber Jr RW and Whitehead CC: Availability of avidin-bound biotin to the chicken embryo. *Arch Biochem Biophys* 298, 80-83 (1992)
- 14) Lydan MA and O'Day DH: Endogenous biotinylated proteins in dictyostelium discoideum. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 990-994 (1991)
- 15) Haneji T and Koide SS: Identification of avidin-interacting proteins in Spisula oocytes: correlation with germinal vesicle breakdown. *J Exp Zool* 246, 216-222 (1988)
- 16) Haneji T and Koide SS: Transblot identification of biotin-containing proteins in rat liver. *Anal Biochem* 177, 57-61 (1989)
- 17) Haneji T, Nagano T and Koide SS: Identification of pyruvate carboxylase in 3T3-L1 cells by transblot and its correlation with differentiation into adipocytes. *Biochem Int* 25, 995-1001 (1991)
- 18) Haneji T, Toyama Y and Nagano T: Detection of endogenous avidin-interacting proteins in rat liver cells by transblot and electron microscopy. *J Electron Microsc* 42, 231-235 (1993)
- 19) Shirakawa S, Murata T, Mochizuki H, Takehara T, Kobayashi S and Haneji T: Transblot identification of avidin-interacting proteins in rat salivary glands. *Biochem Mol Bio Int* 40, 67-72 (1996)
- 20) Sasaki E, Okamoto Y, Yoshida K, Okamura H, Shimizu K, Nasu F, Morimoto H and Haneji T: Transblot and cytochemical identification of avidin-interacting proteins in mitochondria of cultured cells. *Histochem Cell Biol* 120, 327-333 (2003)
- 21) Urade M, Ogura T, Uematsu T, Takahashi Y, Kishimoto H and Yoshioka W: Induction of bleomycin resistance in a human oral squamous carcinoma cell line and characterisation of bleomycin-resistant and -sensitive clones. *Oral Oncol* 30, 409-414 (1994)
- 22) Urade M, Ogura T, Mima T and Matsuya T: Establishment of human squamous carcinoma cell lines highly and minimally sensitive to bleomycin and analysis of factors involved in the sensitivity. *Cancer* 69, 2589-2597 (1992)
- 23) Green H and Kehinde O: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27 (1975)
- 24) Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K and Rodan GA: Characterization of human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 47, 4961-4966 (1987)
- 25) Franceschi RT, James WM and Zerlauth G: $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D_3 specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 123, 401-409 (1985)
- 26) Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S and Kasai S: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96, 191-198 (1983)
- 27) Machida J, Koshino T, Yoshida N, Hiruma T, Miyagi Y, Aoki I, Watanabe S, Kuchino Y, Misugi K and Nagashima Y: Establishment of two rat osteosarcoma cell lines (YROS-1 and YROS-2) induced by radioactive phosphorus. *Pathol Res Pract* 191, 478-485 (1995)
- 28) Aebi H: Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 2. New York, Academic Press, 1974, pp 673-684
- 29) Schmidt E: Glutamate dehydrogenase, UV-assay. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 2. New York, Academic Press, 1974, pp 650-656
- 30) Morimoto H, Okamura H and Haneji T: Interaction of protein phosphatase Δ with nucleolin in osteoblastic cells. *J Histochem Cytochem* 50, 1187-1193 (2002)

- 31) Kito S, Shimizu K, Okamura H, Yoshida K, Fujita M, Morimoto H, Morimoto Y, Ohba T and Haneji T: Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 950-956 (2003)
- 32) Moss J and Lane MD: The biotin-containing enzymes. *Adv Enzymol* 35, 321-442 (1971)
- 33) Wood HG and Barden RE: Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem* 46, 385-413 (1977)
- 34) Chandler CS and Ballard FJ: Distribution and degradation of biotin-containing carboxylases in human cells lines. *Biochem J* 232, 385-393 (1985)
- 35) Kirkeby S, Moe D, Bog-Hansen TC and van Noorden CJ: Biotin carboxylases in mitochondria and the cytosol form skeletal and cardiac muscle as detected by avidin binding. *Histochemistry* 100, 415-421 (1993)
- 36) Frytag SO and Utter MF: Induction of pyruvate carboxylase apoenzyme and holoenzyme in 3T3-L1 cells during differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1321-1325 (1980)
- 37) Chandler CS and Ballard FJ: Multiple biotin-containing proteins in 3T3-L1 cells. *Biochem J* 237, 123-130 (1986)
- 38) Lim F, Rohde M, Morris CP and Wallace JC: Pyruvate carboxylase in the yeast *pyc* mutant. *Arch Biochem Biophys* 258, 259-264 (1987)
- 39) Hollinshead M, Sanderson J and Vaux D: Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. *J Histochem Cytochem* 45, 1053-1057 (1997)
- 40) Satho S, Tatsumi H, Suzuki K and Taniguchi N: Distribution of manganese superoxide dismutase in rat stomach: application of Triton X-100 and suppression of endogenous streptavidin binding activity. *J Histochem Cytochem* 43, 1157-1163 (1992)
- 41) Kim SH and Suh YH: Limitation of enzyme-conjugated streptavidin-biotin system in the detection of eukaryotic proteins by immunoblot analysis. *Comp Biochem Physiol* 115B, 57-61 (1996)
- 42) Praul CA, Brubaker KD, Leach RM and Gay CV: Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 312-314 (1998)
- 43) Fleming H, Condon R, Peterson G, Guck I, Prescott E, Chatfield K and Duff M: Role of biotin-containing membranes and nuclear distribution in differentiating human endometrial cells. *J Cell Biochem* 71, 400-415 (1998)
- 44) Ruggiero FP and Sheffield JB: The use of avidin as a probe for the distribution of mitochondrial carboxylases in developing chick retina. *J Histochem Cytochem* 46, 177-183 (1998)
- 45) Rohde M, Lim F and Wallace JC: Electron microscopic localization of pyruvate carboxylase in rat liver and *Saccharomyces cerevisiae* by immunogold procedures. *Arch Biochem Biophys* 290, 197-201 (1991)