

血球系細胞におけるカベオリンの発現の意義について： リアルタイムPCR法によるカベオリンmRNA定量法の開発

畑中 道代、前田 環、石山 聡子

細胞表面にはカベオラと呼ばれる陥入した膜構造が存在する。カベオラは「シグナル伝達の間」と考えられており、様々なシグナル伝達分子が集積していることが明らかにされている。カベオラにはカベオラ特異的蛋白質カベオリンが存在し、シグナル伝達の抑制分子として機能することが明らかになっている。

カベオリンにはカベオリン-1、-2、-3のアイソフォームが存在する。この中でカベオリン-1の発現は、癌化をはじめとして多くの疾患で変化することが明らかにされており、疾患のマーカーとしての応用が期待されている。そのための定量法の確立は急務である。各カベオリンタンパク質の検出については、ポリクローナル抗体による免疫沈降後、各アイソフォームに特異的なモノクローナル抗体を用いたWestern blotting法をすでに確立している。今年度はさらに高感度な定量法として、カベオリンのmRNAを定量するリアルタイムPCR法の開発を試みた。

〔方法〕血球細胞ではカベオリンの発現が認められないが、われわれは、T細胞系の白血病細胞株にカベオリンが発現していることを見いだした (Hatanaka, M. et. al, 1998. Biophys. Biochem. Res. Comm. 253, 382-387)。蛋白質レベルで発現が明らかな細胞株OKM-2T、OKM-3T、Jurkat-Idaおよび発現していないJurkat-Cent、MT-1を用いてmRNA定量の検討を行った。細胞より抽出したRNAをcDNAに逆転写し、これをテンプレートとしてreal-timeでcDNAの増幅を行った (LightCycler使用)。プライマーはカベオリンDNA配列より、各アイソフォームを特異的に増幅できるプライマーを設計した。cDNA量と増幅が認められるPCRサイクル数が直線関係にあることから、既知コピー数のcDNAを用いて検量線を作成し、検体中のcDNA量を求めた。

〔結果と考察〕リアルタイムPCR法により、OKM-2T、OKM-3T、Jurkat-Idaでカベオリン-1、-2のmRNAの発現を認めた。一方、カベオリン-3の発現は認めなかった。Jurkat-Cent、MT-1では3者のmRNAを検出できなかった。これらの結果は、Western blotting法による蛋白質レベルの結果とほぼ同様の発現パターンを示し、本法でカベオリンアイソフォームの定量が可能であることが明らかとなった。本法ではWestern blotting法に比較して少量の検体で検討が可能のため、今後診断への応用が可能である。