

# グリオーマ細胞水溶性蛋白分画の二次元電気泳動法による解析に関する研究

岡山大学脳神経外科学教室 (指導: 西本 詮教授)

本 田 千 穂

(昭和61年12月13日受稿)

**Key words :** glioma cell  
water soluble protein  
two dimensional electrophoresis  
proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

## 緒 言

脳腫瘍の中でも主要な位置を占めるグリオーマの細胞生物学的特性を明らかにすることは、グリオーマに対するより良い診断方法や治療法を考える上で極めて重要なことと思われる。グリオーマの特性を解明する試みの一つとして、二次元電気泳動法によるグリオーマの蛋白分画の解析が考えられる。即ち、グリオーマが有する種々の蛋白の解析を行うことにより、グリオーマに特異的な腫瘍抗原、グリオーマ細胞の代謝あるいは成長の制御に関連すると考えられる諸因子 (蛋白)、あるいは、グリオーマの発生、増殖に関係しているであろう癌遺伝子産物 (蛋白) などの同定が可能となってくるものと思われる。一般に蛋白質は、電荷と分子量という互いに独立した二つの性質を持っているため、電荷と分子量との差による分離を同時に行えば、それぞれ単一の蛋白質を検出あるいは分離することが可能である。二次元電気泳動法では、蛋白質をまず平面上の一点から一方向に電荷の差だけを用いて分離し、ついでこれと直角方向に分子量の差だけを用いて分離するため、高い分解能が得られる。さらに、泳動された各蛋白スポットの大きさと染色濃度には、それらの量的情報も含まれているのが特徴である。最近で

は、二次元電気泳動で得られた蛋白の泳動パターンを、コンピューターを用いて解析したり<sup>1,34)</sup>、あるいは、ウエスタンブロッティング法を用いることにより、特定の蛋白の同定が比較的容易となってきた。今回、こうした二次元電気泳動法を用いて、種々の条件下での培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白分画の解析を試みた結果、グリオーマの特性を理解する上で興味ある知見を得たので文献的考察を加えて報告する。

## 材料および方法

### 1. 試料

樹立株化された4種類の培養グリオーマ細胞について、水溶性蛋白分画の解析を行った。培養細胞は、当教室でヒト glioblastoma 症例より確立され、継代維持されている KY 細胞<sup>17,18)</sup>、および Ponten ら<sup>55)</sup> によりヒトグリオーマ症例より樹立された 118MG 細胞をさらに Rous sarcoma virus で transform した KC 細胞、また、ラット脳に methylnitrosourea で誘発された C6<sup>2)</sup> 並びに 9L<sup>57)</sup> グリオーマ細胞を用いた。細胞は、10% 牛胎児血清 (Gibco, 米国) および 200 u/ml Penicillin G (明治製薬) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco, 米国) を培養液とし、Falcon プラスチックシャーレ (Becton Dickinson, 米国) を用いて、37°C、

5%炭酸ガス中で静置培養を行った。水溶性蛋白質分画の抽出方法としては、最初に超音波による細胞破壊を試みたが、これによって得られた試料の実験結果からは、発熱の影響による蛋白質の変性が疑われた。そこで、最も自然な状態で水溶性蛋白質分画が得られる方法として、凍結融解法を採用した。即ち、細胞がシャーレ上でコンフルエンスとなった時点で、培養液を除去し、phosphate buffered saline (PBS) で2回洗浄したのち、ラバーポリースメンを用いて細胞を蒸留水中に機械的に浮遊させ、この細胞浮遊液の凍結融解を繰り返すことによって細胞の水溶性蛋白質分画を得た。細胞の不溶性蛋白質分画は、冷却下に、5000 rpm, 15分の遠沈により除去した。こうして得られた上清の水溶性蛋白質分画は、約0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の蛋白濃度しかなく、このまま試料として用いた場合には、数個の蛋白スポットしか検出できなかった。また、各培養細胞株より得られた試料での蛋白質濃度が異なると、蛋白質地図の比較が困難となることから、それぞれの水溶性蛋白質分画を、10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の蛋白濃度に濃縮して試料とした。濃縮には、蛋白質の変性を起さないようにするため、凍結乾燥法を用いた。また、10  $\mu\text{M}$  の濃度の forskolin (Scripps laboratories, 米国) を作用させた培養グリオーマ細胞についても、同様の方法にて水溶性蛋白質分画を抽出して試料とした。なお、forskolin の培養グリオーマ細胞に及ぼす影響については、細胞増殖、DNA 合成、殺細胞効果、および形態変化の観点から検討し<sup>17)</sup>、細胞増殖ならびに DNA 合成の抑制、および分化の傾向を示す形態変化はもたらずが、殺細胞効果は示さない濃度である10  $\mu\text{M}$  を選定した。さらに、細胞増殖後、血清を含まない MEM 中にて24時間培養を続け、増殖が停止したと思われる培養グリオーマ細胞についても、同様に水溶性蛋白質分画を抽出し試料とした。なお、再現性をみるため、各細胞株について少なくとも3回以上、試料の抽出を行い、各々について検討した。

## 2. 試薬

両性担体は、Ampholine (pH 3.5-10, 3.5-5, LKB, 米国) を用いた。Acrylamide, N, N'-methylenebisacrylamide, N, N, N', N'-tetra-

methylethylenediamine, Nonidet P-40 (NP-40), 2-mercaptoethanol, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, glycerin, agarose, Coomassie brilliant blue R-250, bromophenol blue は、半井化学特級を、ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS), urea, glycine, sulfosalicylic acid, trichloroacetic acid, 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, 水酸化ナトリウム, リン酸は、和光純薬特級を用いた。ゲルの染色には、第一化学薬品の銀染色キット(第一)を用い、免疫染色の際には、Sigma (米国) の bovine serum albumin (BSA), Dr. Eng M. Tan (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, Calif., USA) より供与を受けたヒト抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 血清<sup>39)</sup>, DAKO (Denmark) peroxidase-conjugated rabbit anti-human-IgG を用いた。

## 3. 方法

### a. O'Farrell (変性) 法

各培養グリオーマ細胞株間での蛋白質地図の比較検討には、O'Farrell<sup>49, 50)</sup> の方法に一部変法を加えた二次元電気泳動法を行った。即ち、一次元目は、直径2.5 mm, 長さ12 cm, 2% Ampholine (pH 3.5-10), 9M 尿素, 2% NP40 を含む polyacrylamide gel を用い、O'Farrell の non-equilibrium pH gradient (NEPHGE) 法<sup>50)</sup> によって行った。試料は、蛋白量に対して2.6%の SDS で SDS 化した後、9.5 M 尿素および2倍量の lysis buffer<sup>49)</sup> を加えた。Lysis buffer には、9.5 M 尿素, 2% Ampholine, 5% NP-40 が含まれているので、最終的な NP-40 と SDS の比は8となる。こうして調整した試料の20  $\mu\text{l}$  (蛋白量53  $\mu\text{g}$ ) を load した。1600 Vhr の泳動を行った後、SDS sample buffer<sup>49)</sup> 中で15分間の equilibration を行い、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存して、後日二次元目の泳動を行った。二次元目は、14 $\times$ 15 $\times$ 0.1 cm, 0.1%の SDS を含む8-15%密度勾配 polyacrylamide gel を用いた。なお、SDS と NP-40 の比, load する試料の量, 泳動時間, 密度勾配ゲルの濃度は、種々変化させて予備実験を行い、最も良い分離能が得られる方法として、上記の条件を設定した。泳動終

了後は、Coomassie blue 染色および銀染色を行ったが、Coomassie blue では数個のスポットしか染色されなかったため、各蛋白スポットの量的並びに質的差異の比較検討には、より感度の高い銀染色法を用いた。銀染色は、Oakley<sup>48)</sup>の方法によって行ったが、銀染色キット(第一)で同様の染色が得られることを確認し、以後この染色キットによる染色を行った。なお、Ampholineによるバックグラウンドの着色を減らすため、3.5% sulfosalicylic acid-11.5% trichloroacetic acidによる前処置を行った。アクチンスポットの同定は、精製されたアクチン 1  $\mu\text{g}$  (Sigma, 米国)を、試料の泳動と同条件で、また、試料と同時に泳動することによって行った。さらに、分子量は molecular weight marker (オリエン酵母)の泳動によって同定した。なお、同一試料について、少なくとも3回以上の泳動を行って、再現性を確認した。

#### b. 真鍋(無変性)法

PCNAの検出のため、上記の方法で行った二次元電気泳動ゲルのウエスタンブロッティング-免疫染色を試みたが、この方法ではPCNAは染色されなかった。そこで、ウエスタンブロッティング-免疫染色には、真鍋らの、変性剤を全く含まないマイクロ二次元電気泳動法<sup>33, 35)</sup>を用いた。即ち、富士理研社製マイクロ多検体二次元電気泳動装置を用いて、一次元目は直径1.3 mm、長さ35 mm、2% Ampholine (pH 3.5-10)、0.5% Ampholine (pH 3.5-5)を含むpolyacrylamide gelで、等電点電気泳動を行った。試料には、40% saccharoseを加え、1-5  $\mu\text{l}$  (蛋白量10-50  $\mu\text{g}$ )をloadした。二次元目は、38 $\times$ 35 $\times$ 1 mm、4-17%密度勾配polyacrylamide gelを用い、8枚のゲルを同じ条件で同時に泳動した。泳動終了後、ゲルのCoomassie blue染色または銀染色を行うとともに、同時に泳動したゲルを富士理研社製水平型トランスファーブロッティング装置(OMY-1型)を用いて、蛋白をニトロセルロース膜(東洋ろ紙, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ )へ転写した。この装置では約10分でブロッティングが可能とされているが、この条件では免疫染色に充分な量の蛋白の移動が得られなかった。そこで、種々の電圧、電流、時間での蛋白の移動

度を検討し、泳動された蛋白のほぼすべてが転写される下記の条件を選出した。即ち、冷却下に200 mAで、1時間のブロッティングを行った。ブロッティング後のニトロセルロース膜は、免疫染色を行って、PCNAの同定を行った。即ち、3% BSAを含むPBS中で、室温2時間振とうして、残った蛋白結合部位をマスクしたのち、抗PCNA血清( $\times 250$ )と一晚反応させた。コントロールには、正常ヒト血清と反応させたもの、および、ブロッティング後56 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間の加熱によりPCNAを不活化したのち<sup>68)</sup>抗PCNA血清と反応させたものを用いた。PBSで洗浄後、peroxidase-conjugated-rabbit-anti-human-IgG ( $\times 200$ )と1時間反応させ、PBSで洗浄したのち、発色は0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 加2 mM diaminobenzidine溶液で約3分間行った<sup>71)</sup>。なお、抗体の希釈倍率、反応時間は、予備実験を行って、最も良好な結果が得られる条件に設定した。各実験は3回以上行って、再現性を確認した。

## 結 果

### 1. O'Farrell法

この方法により、いずれの細胞株においても約200種の蛋白(ポリペプチド)が分離可能であり(Fig. 1, 2)、しかも個々の細胞株について、それぞれ高い再現性が得られた。各細胞株から得られた蛋白質地図を比較検討してみると、アクチンをはじめとする細胞骨格蛋白などは、各細胞株に共通に認められたが、ヒトグリオーマ細胞株とラットグリオーマ細胞株間、また、ヒトグリオーマ細胞株相互間、ラットグリオーマ細胞株相互間でも、多数の蛋白スポットに質的および量的差異が認められた。たとえば、ラット9L細胞では、Fig. 1の□で示したスポットのように、分子量 $40 \times 10^3$ 以下の比較的low分子領域に、他の細胞株にはみられない多数の蛋白スポットが検出された。一方、C6細胞では、Fig. 1の○で示すように、比較的高分子領域で他の細胞株との差が著明で、分子量約 $80 \times 10^3$ の酸性蛋白(Fig. 1 矢頭)のように、ヒト細胞株でも認められるが、C6細胞で特に量の多い蛋白スポットも観察された。ヒトKY細胞とKC細

胞の蛋白質地図は、ほぼ同様のパターンを示し、両者の差異は、ラット細胞株間相互の差ほど著明ではなかった。しかし、Fig. 2 に示すように、各スポットの量的差異は明瞭に認められ、□で示すように KY 細胞に多いものと、○で示すように KC 細胞に多いものがあった。

KY 細胞について、対数増殖期にある細胞と、forskolin 10  $\mu$ M を含む培養液中で 48 時間培養した細胞の水溶性蛋白質地図を比較してみると (Fig. 3), 矢印で示すアクチンスポットの濃度が両者でほぼ同程度であるのに対し、forskolin 処置細胞では、○で示すように、分子量  $60 \times 10^3$  から  $70 \times 10^3$  の酸性蛋白や、分子量  $20 \times 10^3$  以下の蛋白など、多数のスポットでその著明な増加がみられた。逆に、□で示すように、forskolin 処置により、減少あるいは消失した蛋白も認められた。

## 2. 真鍋法

この方法では、銀染色により、約 50 種の蛋白が分離可能であった (Fig. 4)。対数増殖中の細

胞 (Fig. 4-a) と、無血清 MEM 中において増殖を停止させた細胞 (Fig. 4-b) とで蛋白質地図を比較してみると、MEM 中においた細胞では、分子量  $35 \times 10^3$ 、等電点 5 付近のスポット (矢頭) をはじめ、○で示すように、数個の蛋白の明らかな減少あるいは消失が認められた。これらの蛋白スポットの中に、PCNA が含まれているか否かを検索する目的で、前述したプロットイング免疫染色法を試みた。Fig. 5 に示す如く、抗 PCNA 血清と反応させたニトロセルロース膜では、コントロール血清との反応ではみられないスポットが検出された。これらのスポットのうち、プロットイングした蛋白を  $56^\circ\text{C}$ 、30 分間の熱処理によって PCNA の抗原性を不活化<sup>68)</sup>したのち抗 PCNA 抗体と反応させた場合 (Fig. 5-c)、また、MEM 中において増殖を停止させた細胞の水溶性蛋白分画について抗 PCNA 抗体を反応させた場合 (Fig. 5-d) には、分子量  $35 \times 10^3$ 、等電点 5 付近のスポットの染色は認められず、このスポットに泳動された蛋白が PCNA

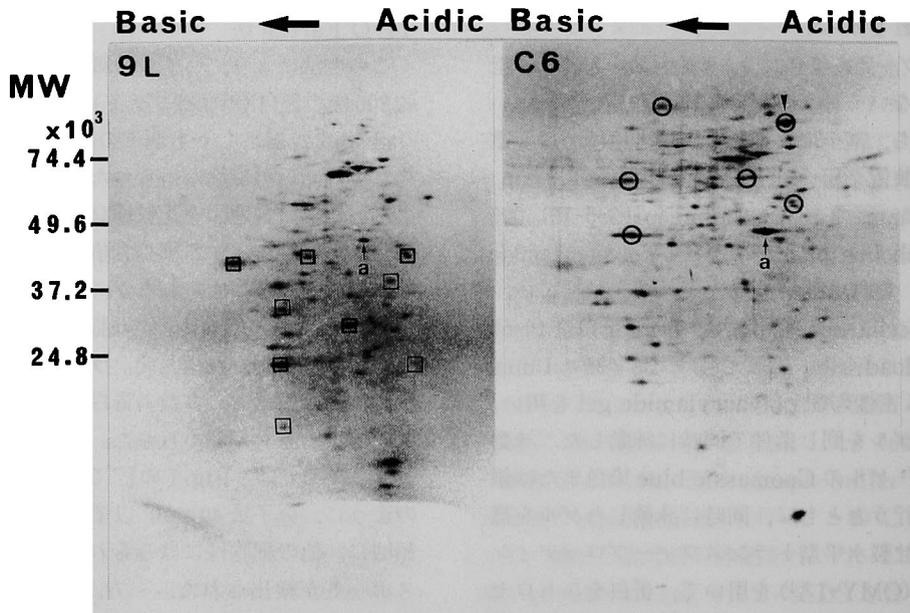


Fig. 1 ラット 9L 細胞株ならびにラット C6 細胞株水溶性蛋白質分画の O'Farrell 法を用いた二次元電気泳動による蛋白質 (ポリペプチド) 地図

a = アクチン

□ = 9L 細胞株でのみ認められるか、他の細胞株に比べ 9L 細胞株に多い蛋白スポット

○ = C6 細胞株でのみ認められるか、他の細胞株に比べ C6 細胞株に多い蛋白スポット

(▼ = C6 細胞株で特に量の多いスポット)

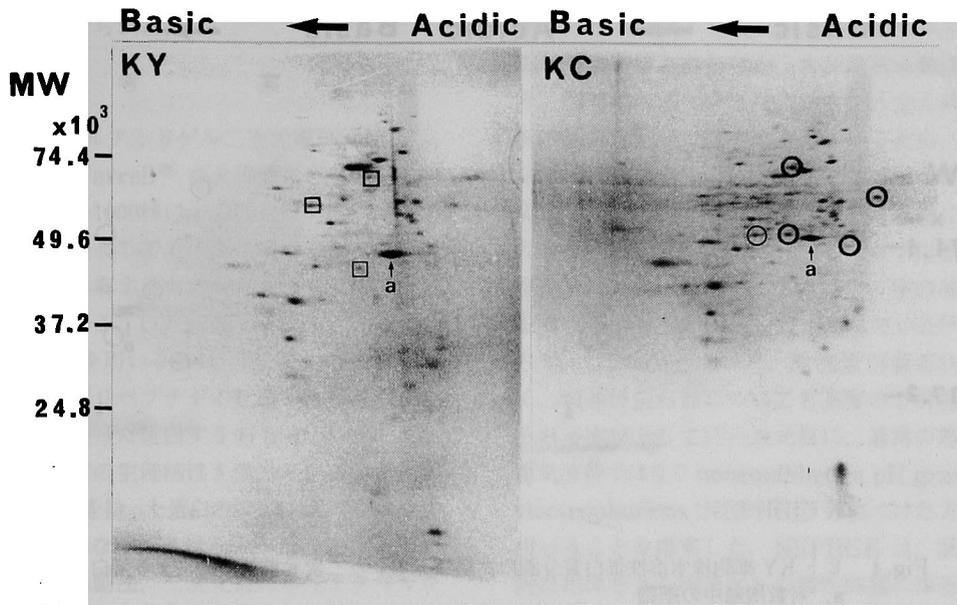


Fig. 2 ヒト KY 細胞株ならびにヒト KC 細胞株水溶性蛋白質分画の O'Farrell 法を用いた二次元電気泳動による蛋白質 (ポリペプチド) 地図

a = アクチン

□ = KC 細胞株と比較して KY 細胞株に多い蛋白スポット

○ = KY 細胞株と比較して KC 細胞株に多い蛋白スポット

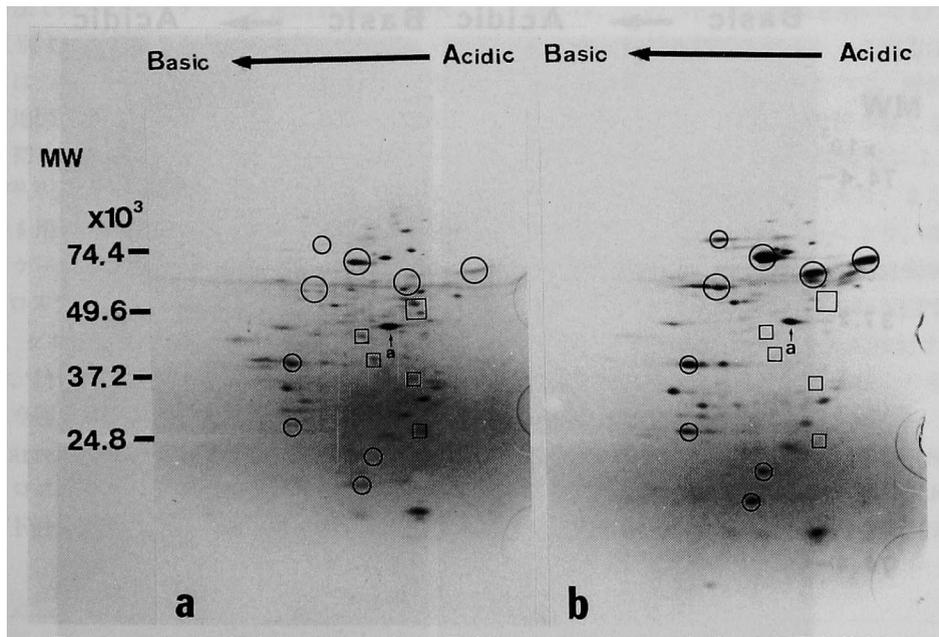


Fig. 3 ヒト KY 細胞株の forskolin 処置前後における O'Farrell 法による蛋白質 (ポリペプチド) 地図の変化

a. 対数増殖中の細胞の水溶性蛋白質地図

b. forskolin 10  $\mu$ M, 48時間処置後の細胞の水溶性蛋白質地図

a = アクチン

○ = forskolin 処置により増加した蛋白

□ = forskolin 処置により減少した蛋白

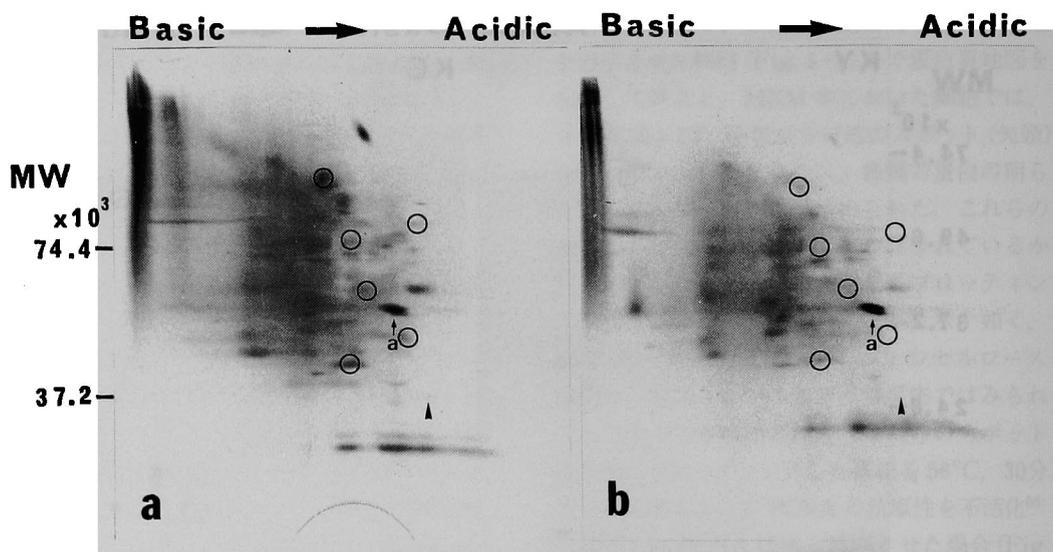


Fig. 4 ヒト KY 細胞株水溶性蛋白質分画の真鍋法を用いた二次元電気泳動による蛋白質地図

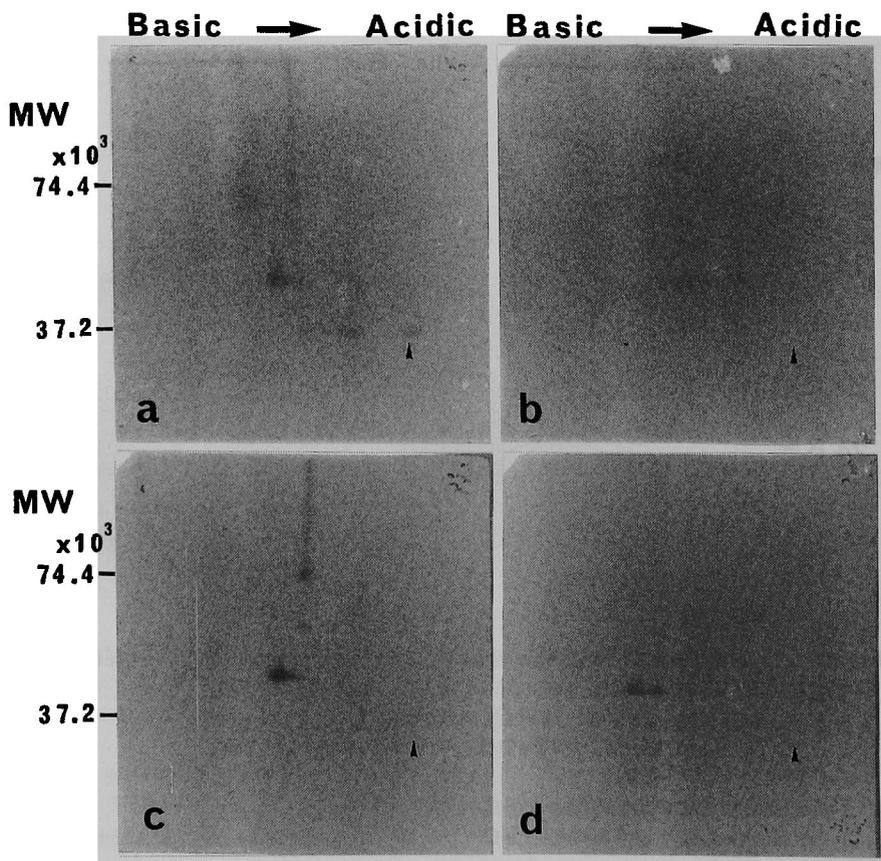
a. 対数増殖中の細胞

b. 細胞増殖後、血清を含まない培養液中で24時間培養して増殖を停止させた細胞

a = アクチン

○ = 増殖停止により減少した蛋白

▲ = PCNA と考えられるスポット



であると考えられた。

### 考 案

ポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法は、1975年、O'Farrell<sup>49)</sup>が大腸菌蛋白質を、一枚のゲル上で、1000種以上の蛋白質スポットに分離し得たと発表して以来、高度な分離能と、良好な再現性を有するため、種々の蛋白の分析に応用されている。O'Farrell法では、高濃度の尿素やSDSを用いるため、蛋白質の高次構造は破壊され、ポリペプチドの状態泳動される。高次構造を失った蛋白すなわちポリペプチドは、酵素活性などの生理活性を失っていることが多く、生理活性を持った蛋白の検索には、O'Farrell法は適当ではない。真鍋ら<sup>30,31)</sup>は、一次元目に等電点電気泳動法、二次元目にポリアクリルアミド密度勾配電気泳動法を用い、血清蛋白質や、組織の水溶性蛋白質を native な状態で分離する二次元電気泳動法を開発し、O'Farrell法で得られたパターンを、ポリペプチド地図、彼らの方法で得られるパターンを蛋白質地図と呼んで区別すべきであるとしている<sup>36)</sup>。しかし、一般には、O'Farrell法で得られたパターンも蛋白質地図と呼ばれることが多い。真鍋らの方法は、初め16×14 cmのゲルを用いるものであったが<sup>30,31)</sup>、38 mm×35 mmのミクロスケールのゲルを用いる方法が開発され<sup>33)</sup>、分離能もマクロスケールのものと大差ないとされている<sup>32)</sup>。ミクロスケール法は、泳動時間が短時間で済み、また、ゲルの取扱いも容易で、免疫化学的な検出の際、抗体が少量ですむなど、種々の利点がある。今回、各細胞株の蛋白質の比較検討には、O'Farrell法を、PCNAの免疫化学的検索にはミクロスケールの真鍋法を用いた。

O'Farrell法<sup>49)</sup>は、一次元目にゲルディスク

等電点電気泳動、二次元目にSDSゲルスラブ電気泳動を組み合わせた二次元電気泳動法であり、等電点の差と分子量の差という全く異なる性質の組み合わせで蛋白質を分離するため、高い分離能が得られる。しかし、この方法では、等電点4-7の酸性蛋白質については、非常に良好な分離が得られるのに対し、等電点7以上の塩基性蛋白質については、等電点ゲル中の尿素の影響によるものか、分離能が劣っていた<sup>54)</sup>。そこで、O'Farrellらは<sup>50)</sup>、酸性蛋白質だけでなく、塩基性蛋白質についても高度の分解能が得られる方法として、一次元目に、通常の等電点電気泳動ではなく nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) と名づけた方法を用いることを提案した。NEPHGEは、試料を両性担体を含む円筒ゲルの酸性側端に添加し、すべてのポリペプチドが正に荷電した状態で泳動を開始し、最も塩基性のポリペプチドがゲルの他端に到達したところで泳動を終了する方法である。今回、各培養細胞株の蛋白質の比較検討には、このNEPHGH法を用いたO'Farrellの二次元電気泳動法を行った。この方法では、通常の等電点電気泳動法に比べて、酸性蛋白質の分離能は劣り、また、再現性が良くないと指摘されている<sup>36)</sup>が、今回、銀染色により、200種以上の蛋白質が分離可能であり、また、実験条件を厳密に同一にすることにより、高い再現性が得られた。従って、広い等電点領域の蛋白について、一度に解析できるこのNEPHGH法は、蛋白質全体のパターンを比較検討するには、通常の等電点電気泳動による方法よりも優れていると考えられる<sup>50)</sup>。

今回試料とした蛋白質は、いずれも株化された単一の細胞集団から得られたものであり、展開された電気泳動パターン(蛋白質地図)は、

Fig. 5 ヒトKY細胞株水溶性蛋白分画を、真鍋法による二次元電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、間接酵素抗体法で染色

- 対数増殖細胞—抗PCNA血清
- 対数増殖細胞—正常ヒト血清
- 対数増殖細胞—56°C, 30分間加熱でPCNAを不活化—抗PCNA血清
- 増殖停止細胞—抗PCNA血清

▲=PCNA

それぞれの細胞の性質の差を直接反映しているものと考えられる。ヒト細胞株と、ラット細胞株間での蛋白質地図の差は、量的のみならず質的にも明らかで、これらの中には、種差による細胞構成蛋白の違いも含まれているものと思われる。しかし、ラット 9L 細胞では、特に他の細胞株との蛋白質地図の質的差異が著明で、これは、9L 細胞が真のグリオーマではなく、グリオサルコーマの性格を持った細胞株であること<sup>47)</sup>と関係があるかも知れない。即ち、腫瘍の組織型によって、蛋白質地図に大きな差異が現れる可能性が考えられる。言い換えれば、それぞれの組織型によって、それぞれに独特な蛋白質が発現しているものと推測され、今後、多数の細胞株について検討を重ねることにより、蛋白質パターンと腫瘍の組織型との関係を明らかにできるのではないかと考えられる。また、KY 細胞と KC 細胞は、同様にヒトグリオーマ細胞由来であるにもかかわらず、その蛋白質地図には数個の蛋白スポットで明らかな違いが認められた。それらがどのような意味を持つかは、今後さらに検討が必要であるが、このような差異の明らかな蛋白を同定し、さらにくわしく検討することにより、グリオーマの発生あるいは増殖について、重要な情報が得られる可能性がある。たとえば、ある種の発癌物質や発癌ウイルスの感染により特定の蛋白質が増加することを、二次元電気泳動によって検出できることが報告されており<sup>6, 9, 10, 15, 16, 27, 28, 60, 61)</sup>、また、それらの蛋白質と各種の成長因子やその受容体、あるいは癌遺伝子産物との関連も検索されている<sup>5, 12, 53, 56)</sup>。著者ら<sup>18)</sup>も、培養グリオーマ細胞における癌遺伝子産物や、上皮成長因子受容体の発現について、各々に対するモノクローナル抗体を用い、Flow cytometer で解析しているが、さらに、二次元電気泳動による検索も加えたいと考えている。

さて、細胞内情報伝達における second messenger として知られる cyclic AMP (cAMP) に細胞増殖調節作用があることは古くから知られている<sup>52)</sup>。一般にグリオーマ細胞には、細胞内 cAMP 濃度を増加させる諸因子により細胞分化が誘導されると考えられている<sup>11, 23, 26, 42, 43, 47, 62, 63)</sup>。細胞内

の cAMP 濃度を上昇させる方法としては、1) cAMP 合成酵素 *adenylate cyclase* を活性化する、2) cAMP 分解酵素 *phosphodiesterase* の活性を抑制する、3) cAMP またはその誘導体を添加する、の 3 つの方法が考えられるが、これまでは、1), 2) として適当な薬剤がなく、また、cAMP そのものを培養液に加えても細胞内への取り込み効率が悪い<sup>ため、もっぱら dibutyryl cAMP の添加が用いられてきた<sup>11, 23, 26, 42, 43, 47, 62, 63)</sup></sup>。グリオーマ細胞の培養液中に *dibutyryl cAMP* を添加することにより、単に形態学的に<sup>23, 42, 43)</sup>だけでなく、生化学にも細胞分化が証明されている。たとえば、1965年、Moore ら<sup>40)</sup>によって発見された S-100 蛋白は、グリオーマにおいては一般に形態学的により分化したものに多く含まれている<sup>41)</sup> ことなどより、グリオーマ細胞の分化の指標となりうると考えられている<sup>64)</sup> が、培養グリオーマ細胞に *dibutyryl cAMP* を作用させることにより細胞内の S-100 蛋白量が著明に増加することが知られている<sup>26, 62, 63)</sup>。最近、*adenylate cyclase* 活性化物質として注目されつつある *forskolin* を、グリオーマ細胞に作用させた時の蛋白質地図の変化を検討した。*Forskolin* ( $7\beta$ -acetoxy-8, 13-epoxy-1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 9 $\alpha$ -trihydroxylabd-14-en-11-one) は、ネパール、インド地方で民間薬として用いられているシソ科の植物 *Coleus forskohlii* から、心筋収縮増強物質として発見され<sup>3, 29)</sup>、1981年、その効果は *adenylate cyclase* の活性化に基くものであることが明らかとなった<sup>38)</sup>。*forskolin* による *adenylate cyclase* の活性化は、微量で強力な効果を示し、完全に可逆的であり、組織あるいは培養細胞にも、また、抽出した膜分画に対しても同様な効果を示すなど、従来知られている *adenylate cyclase* 活性化物質とは全く異なる特徴を持っており<sup>58, 59)</sup>、cAMP についての細胞生理学的研究において、有用な薬剤となるであろうと期待されている。*Forskolin* は、培養グリオーマ細胞に対して、形態学的分化を誘導するとともに、増殖抑制効果を示し<sup>17)</sup>、蛋白質地図上も著明な変化をもたらした。*forskolin* は、グリオーマ細胞内の S-100 蛋白の増加をもたらすことが報告されており<sup>14)</sup>、蛋白質地図上増加

がみられた蛋白の中には、S-100蛋白のようなグリオーマの分化の指標となりうる蛋白が含まれているものと思われる。また、細胞膜レセプター adenylate cyclase 系を構成する種々の蛋白成分が次第に明らかにされつつあり、レセプターから adenylate cyclase に至る経路には、G蛋白と呼ばれる GTP 結合蛋白が介在していることが知られるようになった<sup>24</sup>。G蛋白は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3つのサブユニットからなるが、最近、G蛋白の一種 transducin の  $\alpha$  サブユニットが、癌遺伝子の一つ ras 遺伝子産物 p21 と類似していることが指摘され<sup>70</sup>、癌遺伝子が adenylate cyclase 系を介して癌化、あるいは癌細胞の増殖の制御を行っている可能性が推察されている<sup>46</sup>。したがって、adenylate cyclase 活性化物質である forskolin は、癌遺伝子産物の発現にも影響を及ぼす可能性があり、forskolin 処置によってもたらされた蛋白質地図の変化は、それらを反映しているのかも知れない。

一般に、個々のグリオーマの細胞生物学的悪性度は多様であり、それぞれのグリオーマについて、その悪性度あるいは増殖能の程度を正確に把握しておくことは、グリオーマ患者の治療法の選択や、予後の推定を行う上で極めて重要であるといえる。従来、グリオーマの増殖能の検索には、<sup>3</sup>H-thymidine の標識率 (labeling index)<sup>19,20,22,25,71</sup> や、分裂指数 (mitotic index) などが用いられてきた。最近では、Gratzner<sup>13</sup> によって作製された、thymidine analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体を用いる方法が、グリオーマの増殖能の解析に試みられつつある<sup>21,44,45</sup>。この方法では、一定時間内に DNA 合成中の細胞に取り込まれた BrdU をモノクローナル抗体を用いて検出するものであり、臨床に用いるには、患者に BrdU を投与しなければならず、日常臨床への応用は、必ずしも容易ではない。したがって、グリオーマの増殖能を判定するより直接的な方法としては、もともと増殖中の細胞にのみ発現されている物質を検出することと考えられる。したがって、著者らは、最近、増殖性細胞核抗原 (proliferative cell nuclear antigen, PCNA) に注目してきている。ところで抗 PCNA

抗体は、1978年 Miyachi ら<sup>39</sup> によって、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の一部の血清中に、抗核自己抗体として検出されたもので、その後の研究により、PCNA は増殖中の細胞の核内に特異的に出現することが明らかにされた<sup>67</sup>。最近では、PCNA は、1980年、Bravo ら<sup>4</sup> によって発見され、cyclin と命名された蛋白質と同一の蛋白質であることが判明している<sup>37</sup>。PCNA/cyclin は、分子量  $33-36 \times 10^3$ 、等電点 4.8-4.9 の非ヒストン性酸性核蛋白であり、その抗原性は、56°C、30分の加熱で不活化され<sup>68</sup>、最近ではそのアミノ酸配列の一部も明らかにされている<sup>51</sup>。PCNA は、動物種とは関係なく、しかも正常あるいは腫瘍細胞を問わず細胞増殖期、特に late G1-S 期の細胞の核内に特異的に発現され、細胞の DNA 合成に深く関与しているものと考えられている<sup>7</sup>。PCNA は、このような特性を持っているため、抗 PCNA 抗体を各種悪性腫瘍の診断に用いようとする試みが散見される。Takasaki ら<sup>69</sup> は、白血病の診断、特にその blast crisis の指標として、PCNA が有用であることを報告している。また、Chang<sup>8</sup> らは、腎癌、前立腺癌、大腸癌などに、抗 PCNA 抗体を用いて間接蛍光抗体染色を行い、PCNA 陽性細胞の割合と、腫瘍の発育速度とが良く一致していることを見出している。そこで、著者らは、培養グリオーマ細胞および開頭術によって得られたヒトグリオーマ生検組織における PCNA の発現を、抗 PCNA 抗体を用いて、間接酵素抗体法により検索した<sup>65,66</sup>。その結果、各種グリオーマにおける PCNA 陽性細胞の割合は、これまで報告されている BrdU あるいは <sup>3</sup>H-thymidine の標識率<sup>21</sup> と良く一致していることが判明した。したがって、PCNA は、グリオーマの増殖能を推定する上で良い指標となりうると考えられる。しかし、ヒトグリオーマ組織で、免疫組織化学的に PCNA を検出するには難点もある。SLE における抗 PCNA 抗体の出現頻度は約 2% しかなく<sup>39</sup>、十分な量の抗体を得ることは容易ではない。また、ヒトグリオーマ組織において、免疫組織染色を間接法で行う場合、二次抗体である抗ヒト IgG 抗体は、組織中に含まれている IgG と反応してしまい、

バックグラウンドが染色されて、陽性反応が確認しにくい欠点がある。ところが、今回行ったように、グリオーマ蛋白の二次元電気泳動によって分離した蛋白について免疫染色を行えば、PCNAのみを検出することが可能である。また、これによって、銀染色による蛋白質地図上のPCNAスポットを同定すれば、二次元電気泳動—銀染色のみによって、PCNAの検出が可能となる。また、蛋白質地図上の各スポットは、大きさと濃度により量的情報も含んでいるので、たとえばコンピューターによる解析を加えれば<sup>34)</sup>、PCNAの半定量も可能となる。したがって、種々のグリオーマの蛋白質の二次元電気泳動を行い、そのPCNAスポットの量を検討することにより、グリオーマの増殖能の程度を容易に推定できるようになるものと考えられる。

### 結 論

ヒトおよびラット培養グリオーマ細胞の水溶性蛋白質分画を二次元電気泳動法によって解析した。O'FarrellのNEPHGE法による二次元電気泳動ゲルについて、銀染色を行った結果、約200種の蛋白スポットが判別できた。上記の方法による水溶性蛋白質分画の解析の結果、ヒトグリオーマ細胞株とラットグリオーマ細胞株間のみならず、ヒトグリオーマ細胞株相互間、ラットグリオーマ細胞株相互間にも、蛋白質の質的あるいは量的差異が認められた。これらの差異の中には、グリオーマ細胞の細胞生物学的特性の差異に基くものもあると思われ、二次元

電気泳動法による蛋白質分画の解析は、グリオーマの細胞生物学的特性の究明にも有用な方法となるものと考えられる。また、同一の細胞株でも、薬剤により細胞分化を誘導することにより、二次元電気泳動法での蛋白質地図に変化が認められた。この変化を詳細に検討することにより、グリオーマ細胞の分化あるいは脱分化に直接関与しているであろう種々の蛋白質を検出できる可能性が考えられる。また、蛋白質変性剤を含まない系での二次元電気泳動法(真鍋法)に続き、ニトロセルロース膜へのウエスタンブロットリング後、特定の蛋白質に対する特異抗体を用いた免疫染色を行うことにより、蛋白質の同定が可能である。今回、こうして同定したPCNAは、late G<sub>1</sub>-S期の細胞核内に特異的に出現する蛋白質であることから、二次元電気泳動法を用いて、PCNAの量的変化を観察することにより、今後グリオーマ細胞の増殖能の程度が容易に推定できるようになるものと考えられる。

### 謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師西本 詮教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究について直接御指導と御助言を頂きました、佐賀医科大学脳神経外科学教室の田淵和雄教授をはじめ、諸先生、諸氏諸嬢の御厚意に心より感謝いたします。なお、本論文の要旨は第44回および第45回日本脳神経外科学会総会において発表した。

### 文 献

1. Anderson NI, Taylor J, Scandora AE, Coulter BP and Anderson NG : The TYCHO system for computer analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns. *Clin Chem* (1981) 27, 1807-1820.
2. Benda P, Lightbody J, Sato G and Sweet W : Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* (1968) 161, 370-371.
3. Bhat SV, Bajwa BS, Dornauer H, de Souza NJ and Fehlhaber HW : Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus forskohlii* briq. *Tetrahedron lett* (1977) 19, 1669-1692.
4. Bravo R and Celis JE : A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* (1980) 84, 795-802.

5. Burbeck S, Latter G, Metz E and Leavitt J : Neoplastic human fibroblast proteins are related to epidermal growth factor precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) **81**, 5360-5363.
6. Cabel F, Gotteaman MM and Yuspa SH : Induction of specific protein synthesis by phorbol esters in mouse. *Cancer Res* (1981) **41**, 2025-2031.
7. Celis JE and Celis A : Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin (proliferating cell nuclear antigen) in cultured cells : Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 3262-3266.
8. Chang P-K, Frakes R, Tan EM, Brattin MG, Smetana K and Busch H : Indirect immunofluorescence studies of proliferating cell nuclear antigen in nucleoli of human tumor and normal tissues. *Cancer Res.* (1983) **43**, 3770-3777.
9. Crawford IV, Pim DC, Gurney EG, Googfellow P and Taylor-Papadimirou J : Detection of a common feature in several human tumor cell lines — a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 41-45.
10. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW and Old LJ : Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) **76**, 2420-2424.
11. 古田知久 : 培養グリオーマ細胞の形態学的分化に伴う DNA ヒストグラムならびに S-100 蛋白量の経時的変化に関する研究. *岡山医学会雑誌* (1982) **94**, 1113-1125.
12. Garrels J and Schubert D : Modulation of protein synthesis by nerve growth factor. *J Biol Chem* (1979) **254**, 7978-7985.
13. Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo-and-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication. *Science* (1982) **218**, 474-476.
14. Higashida H, Sano M and Kato K : Forskolin induction of S-100 protein in glioma and hybrid cells. *J Cell Physiol* (1985) **122**, 39-44.
15. Hiwasa T, Fujimura S and Sakiyama S : Tumor promoters increase the synthesis of a 32,000-dalton protein in BALB/c 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 1800-1804.
16. Hiwasa T, Fujiki H, Sugimura T and Sakiyama S : Increase in the synthesis of a Mr 32,000 protein in BALB/c 3T3 cells treated with tumor-promoting indole alkaloid or polyacetates. *Cancer Res* (1983) **43**, 5951-5955.
17. 本田千穂, 田淵和雄, 入江恵子, 福岡高宏, 三野章典, 吉岡純二, 植田清隆, 大本堯史 : 培養グリオーマ細胞に及ぼす forskolin の影響, *神経化学* (1985) **24**, 223-225.
18. 本田千穂, 田淵和雄, 入江恵子, 福岡高宏, 三野章典, 吉岡純二, 植田清隆, 大本堯史 : ヒトおよびラット培養脳腫瘍細胞における pp60src. および上皮成長因子受容体 (EGF-R) の発現の検討. *神経化学* (1985) **24**, 388-390.
19. Hoshino T and Wilson CB : Cell kinetic analysis of human malignant brain tumors (gliomas). *Cancer* (1979) **44**, 956-962.
20. Hoshino T : A commentary on the biology and growth kinetics of low-grade and high-grade gliomas. *J Neurosurg* (1984) **61**, 895-900.
21. Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB, Edwards MSB, Gutin PH, Davis RL and DeArmond SJ : In situ cell kinetics studies on human neuroectodermal tumors with bromodeoxyuridine labeling. *J Neurosurg* (1986) **64**, 453-459.
22. Johnson HA, Haymaker WE, Rubini JR, Fliedner TM, Bond VP, Cronkite EP and Hughes WL : A radiographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after *in vivo* uptake of

- tritiated thymidine. *Cancer* (1960) 13, 636-642.
23. 神野哲夫, 中沢恒幸, 加藤雄司: Cyclic AMP と悪性神経膠腫. 第一報 Dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate の悪性神経膠腫におよぼす影響. *臨床神経* (1972) 12, 584-595.
  24. 堅田利明, 宇井理生: 細胞膜受容体とアデニル酸シクラーゼの連関①—GTP結合蛋白質の機能を中心に—, 蛋白質, 核酸, 酵素 (1985) 30, 209-219.
  25. Kury G and Carter HW: Autoradiographic study of human nervous system tumors. *Arch Pathol* (1965) 80, 38-42.
  26. Labourdette G and Mandel P: Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1980) 96, 1702-1709.
  27. Leavitt J and Kakunaga T: Expression of variant form of actin and additional polypeptide changes following chemical-induced *in vitro* neoplastic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* (1980) 255, 1650-1661.
  28. Leavitt J, Goldman D, Merril C and Kakunaga T: Actin mutation in a human fibroblast model for carcinogenesis. *Clin Chem* (1982) 28, 850-860.
  29. Lindner E, Dohadwalla SN and Bhattacharya BK: Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohlii*; Forskolin. *Drug Res* (1978) 28, 284-289.
  30. 真鍋 敬, 城久美子, 小島清嗣, 奥山典生: 血漿蛋白質の二次元電気泳動. *生物物理化学* (1978) 22, 171-177.
  31. Manabe T, Tachi K, Kojima K and Okuyama T: Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins without denaturing agents. *J Biochem* (1979) 85, 649-659.
  32. Manabe T, Kojima K, Jitzukawa S, Hoshino T and Okuyama T: A normalized protein map of human plasma, and characterization of the normalized spots by microscale amino acid analysis. *Clin Chem* (1982) 28, 819-823.
  33. Manabe T, Hayama E and Okuyama T: Microscale multisample two-dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. *Clin Chem* (1982) 28, 824-827.
  34. Manabe T and Okuyama T: Quantitative analysis of two-dimensional electropherograms with a television camera-microcomputer system. *J Chromatography* (1983) 264, 435-443.
  35. 真鍋 敬, 高橋裕子, 奥山典生: ミクロ多検体 2次元電気泳動法. *免疫実験操作法* (1983) 12, 3807-3823.
  36. 真鍋 敬, 奥山典生: 二次元電気泳動法. *ぶんせき* (1983) 12, 941-947.
  37. Mathews MB, Bernstein RB, Franza BR and Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* (1984) 309, 374-376.
  38. Metzger H and Lindner E: The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Drug Res* (1981) 31, 1248-1250.
  39. Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* (1978) 121, 2228-2234.
  40. Moore BW: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* (1965) 19, 739-745.
  41. 守屋芳夫, 古田知久, 坪井雅弘, 田淵和雄, 西本 詮: ヒト脳腫瘍と S-100 蛋白質. *神経化学* (1978) 17, 429-432.
  42. 永井政勝, 寺岡 暉, 野村和弘, 松谷雅生, 佐野圭司: Dibutyryl adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate による悪性グリオーマ細胞の形態学的変化. *脳神経* (1973) 25, 295-306.

43. 永井政勝, 寺岡 暉, 降旗俊明, 野村和弘, 松谷雅生: 悪性脳腫瘍と cyclic AMP. 脳外 (1974) 2, 511-519.
44. 長島 正, 星野孝夫: 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) を用いたヒト中枢神経系腫瘍の成長解析. 脳神経 (1985) 37, 1195-120.
45. Nagashima T and Hoshino T: Rapid detection of S-phase cells by anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibody in 9L brain tumor cells *in vitro* and *in situ*. Acta Neuropathol. (Berl) (1985) 66, 12-17.
46. Newbold R: Mutant ras proteins and cell transformation. Nature (1984) 310, 628-629.
47. 野村和弘, 渡辺 卓, 渋谷壯一郎, 中村 治, 長島 正, 星野孝夫: 9L グリオーマ細胞に及ぼす cyclic AMP の影響 - Flow cytometry による成長解析 -. 脳神経 (1986) 38, 392-398.
48. Oakley BR, Kirsch DR and Morris NR: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem (1980) 105, 361-363.
49. O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis. J Biol Chem (1975) 250, 4007-4021.
50. O'Farrell PZ, Goodman HM and O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell (1977) 12, 1133-1142.
51. Ogata K, Ogata Y, Nakamura RM and Tan EM: Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. J Immun (1985) 135, 2623-2627.
52. Pastan IH, Johnson GS and Anderson WB: Role of cyclic nucleotides in growth control. Ann Rev Biochem (1975) 44, 491-522.
53. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A and Oren M: Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. Nature (1986) 320, 182-185.
54. Piperno G, Huang B and Luck DJL: Two dimensional analysis of flagellar protein from wild type and paralyzed mutants of Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74, 1600-1604.
55. Ponten J and Macintyre EH: Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand (1968) 74, 465-486.
56. Samad A, Anderson CW and Carroll RB: Mapping of phosphomonoester and apparent phosphodiester bonds of the oncogene product p53 from simian virus 40-transformed 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83, 897-901.
57. Schmidek HH, Nielsen SL, Schillei A L and Messer J: Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea. J Neurosurg (1971) 34, 335-340.
58. Seamon KB, Padgett W and Daly JW: Forskolin; Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. Proc Natl Acad Sci USA (1981) 78, 3363-3367.
59. Seamon K and Daly JW: Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. J Biol Chem (1981) 256, 9799-9801.
60. Strand M and August JT: Polypeptides of cells transformed by RNA or DNA tumor viruses. Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74, 2729-2733.
61. Sugioka Y, Fujii-Kuriyama Y, Kitagawa T and Muramatsu M: Changes in polypeptide pattern of rat liver cells during chemical hepatocarcinogenesis. Cancer Res (1985) 45, 365-378.
62. Tabuchi K, Furuta T, Norikane H, Tsuboi M, Moriya Y and Nishimoto A: Evaluation of drug-induced morphological differentiation of rat glioma cells (C-6) from the aspects of S-100 protein

- level and con A binding pattern. J Neurol Sci (1981) 51, 119-130.
63. Tabuchi K, Imada M and Nishimoto A : Effect of cyclic AMP on S-100 protein level in C-6 glioma cells. J Neurol Sci (1982) 56, 57-63.
  64. 田淵和雄：脳腫瘍の診断；脳腫瘍マーカー。外科 Mook No.39. 脳腫瘍 (1984) p 64-70.
  65. 田淵和雄, 本田千穂, 中根一穂：グリオーマの悪性度診断における増殖性細胞核抗原 (PCNA) の有用性。医学のあゆみ (1986) 137, 319-320.
  66. 田淵和雄, 本田千穂, 中根一穂：増殖性細胞核抗原 (PCNA/cyclin) を指標としたグリオーマの悪性度診断の試み。第4回脳腫瘍病理研究会講演集 (1987) p 97-103.
  67. Takasaki Y, Deng JS and Tan EM : A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. J Exp Med (1981) 154, 1899-1909.
  68. Takasaki Y, Fishwild D and Tan EM : Characterization of antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. J Exp Med (1984) 159, 981-992.
  69. Takasaki Y, Robinson WA and Tan EM : Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis of patients with chronic myeloid leukemia. J Natl Cancer Inst (1984) 73, 655-661.
  70. Tanabe T, Nakada T, Nishikawa Y, Sugimoto K, Suzuki H, Takahashi H, Noda M, Haga T, Ichiyama A, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H and Numa S : Primary structure of the  $\alpha$ -subunit of transducin and its relationship to ras proteins. Nature (1985) 315, 242-245.
  71. Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA (1979) 76, 4350-4354.
  72. Tym R : Distribution of cell doubling times *in vivo* human cerebral tumors. Surg Forum (1969) 20, 445-447.

**Analysis of the water-soluble protein fraction of  
glioma cells by two dimensional electrophoresis**

**Chiho HONDA**

**Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. A. Nishimoto)**

The author analyzed water-soluble proteins of cultured human and rat glioma cells obtained by freezing and thawing cells suspended in distilled water. The author used O'Farrell's two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (NEPHGE method) with slight modification to analyze differences in the protein map, and Manabe's microscale two dimensional electrophoresis without denaturing agents for Western blotting to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin). By O'Farrell's method and the silver staining technique, at least 200 different polypeptides were clearly identified in each cell line. Cytoskeletal proteins such as actin were constantly separated in all cell lines. Marked differences in the protein map were observed between human and rat glioma cell lines, and even within the same species. It is supposed that these differences arise from the cell-biological differences between the glioma cell lines. Marked differences in the portion map were also seen between proliferating glioma cells and glioma cells treated with forskolin (an adenylate cyclase activator), which can induce morphological and biochemical differentiation of glioma cells. Some proteins increased in amount after the treatment with forskolin, suggesting that these proteins are related to the differentiation of glioma cells. Some other proteins which were prominent in the proliferating cells diminished in cells cultured 24 hours in medium without calf serum to suppress cell growth. PCNA (proliferating cell nuclear antigen), an acidic nuclear protein which appears solely in late G<sub>1</sub>-S phase and is believed to be closely related to cell proliferation, was revealed by Western blotting and indirect immunostaining. The quantitative investigation of the PCNA spot on the protein map may be useful in assessing the proliferating activity of glioma cells. These results indicate that two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis is useful for the clarification and understanding of the biological features of glioma cells.