

## メラノサイトにおけるチロシナーゼの分布

山本博章, 竹内拓司 (東北大・理・生物)

Cellular localization of tyrosinase in the mouse melanoma cell

HIRO-AKI YAMAMOTO, TAKUJI TAKEUCHI

メラノサイト(メラニン色素細胞)におけるメラニン合成の鍵酵素と言われるチロシナーゼの細胞内移送を調べる端緒として, この酵素の細胞内分布を調べた。

B16マウスメラノーマ(黒色腫)のホモジネイトを77,000g, 60分遠心して得た沈査を, トリプシン処理し, チロシナーゼを可溶化した。硫酸分画, セファデックスG-100, イオン交換体を用いたクロマトグラフィーにより, 精製チロシナーゼを得た。この方法では, メラノソームから可溶化する場合と同様の標品が得られた。

この精製標品をPBSに溶かし, 等量のアジュバントとともにウサギの皮下に1mgずつ3~4回くり返し注射することにより, 抗血清を得た。この血清(56°C 30分処理済)は, チロシナーゼ溶液と一本の沈降線を示した。

培養メラノーマ細胞(クローンN)を, 0.01M過ヨウ素酸, 0.075M リシン, 2%パラホルムアルデヒド, 0.037M Na-リン酸緩衝液, または4%パラホルムアルデヒド, ピクリン酸混液の二方法を用いて固定した。エポンに包埋する場合はOsO<sub>4</sub>による二次固定を行なった。この試料をエポンまたはメタクリレートに包埋し, 間接酵素抗体法によってチロシナーゼの検出を試みた。現在までに反応が陽性であったのは, メラノソーム, ゴルジ小胞, GERL様構造およびERの突起部であり, さらに同定できない構造が残っている。しかしながら, まだ細胞内構造が不明確なので, 今後さらに検討を重ねたい。

## 細胞融合による形質発現機構研究における, 除核細胞の利用について

高山洋一, 竹内拓司(東北大・理・生物)

Recombination of karyoplast and cytoplast for the study of gene expression

YÔICHI TAKAYAMA, TAKUJI TAKEUCHI

B16マウスメラノーマのサブライン, G4. E. TG 14.N. はプラスチック円盤によるサイトカラシンBの除核法では接着性の悪さの為に除核収率は非常に低かったが接着性の強い新しいサブラインSを分離することにより解決した。除核条件はL細胞, メラノーマとも7μg/ml サイトカラシンB, 32°C, 27,000g, 20分であった。次にUV-HVJによる融合時にカリオプラストに混在する完全な細胞は生残してしまうので除く事が必要である。サイトプラストに混在する完全な細胞及びカリオプラストは核の側にマーカーとしてBrdU, 6-TG 抵抗性のものを用いればこれらの薬剤で選別できる。カリオプラストが100%純粋であれば薬剤による選別法と組み合わせる事により再構成細胞をとる事ができるが, 実際は困難である。また核のマーカーに対応して細胞質マーカーがあれば再構成細胞の分離は可能である。メラノーマにはメラノソームというマーカーがあるのでL細胞にTK<sup>-</sup>, 培養液にBrdUを用い, クローニングと併用する事によって再構成細胞がとれる点が有利である。現在L細胞側に細胞質マーカーが存在しないので逆の実験はできない。

今後, エリスロマイシンその他の生化学的な細胞質マーカーは, クローニングなどの操作が不用な点でよりすぐれているのでそれらを検討してみるつもりである。