

細胞増殖における
マイクロフィラメント系の関与

—— サイトカラシン D を用いた解析 ——

1 9 8 5

太 田 恒 孝

目次

	ページ
第一章 序論	1
第二章 実験材料及び基本となる実験方法	6
第三章 細胞系の確立	8
第一節 緒言	8
第二節 実験材料及び実験方法	8
第三節 実験結果	9
第四節 小括	11
第四章 サイトカラシンDによる増殖誘導の阻害	12
第一節 緒言	12
第二節 実験材料及び実験方法	12
第三節 実験結果	14
第一項 増殖誘導によるDNA合成開始に対する サイトカラシンDの効果	14
第二項 対数増殖期の細胞に対するサイトカラシ ンDの効果	16
第三項 サイトカラシンDによる細胞内ミクロフ ィラメントの変化	18
第四項 増殖誘導後のウリジンの取り込みに対す るサイトカラシンDの影響	20
第五項 サイトカラシンD感受性の段階の限定	25
第六項 増殖誘導後のミクロフィラメントの変化	32
第四節 小括	32
第五章 高分子合成に対するサイトカラシンDの影響	36
第一節 緒言	36
第二節 実験材料及び実験方法	36
第三節 実験結果	38
第一項 DNA合成に対するサイトカラシンDの 影響	38
第二項 RNA合成に対するサイトカラシンDの 影響	38

第三項	蛋白合成に対するサイトカラシンDの 影響	-----	41
第四項	ヒドロキシウレアによる細胞のS期への 同調	-----	46
第五項	サイトカラシンD存在下におけるクロマ チン蛋白の供給	-----	46
第四節	小括	-----	52
第六章	G ₂ 期、M期におけるサイトカラシンDの 影響	-----	54
第一節	緒言	-----	54
第二節	実験材料及び実験方法	-----	54
第三節	実験結果	-----	55
第四節	小括	-----	55
第七章	結論及び考察	-----	60
参考文献		-----	63
謝辞		-----	68

第一章 序論

○ 細胞増殖と細胞周期

細胞は、細胞分裂を繰り返して増殖する。この細胞分裂から次の細胞分裂までの過程は細胞周期と呼ばれ、その進行過程は4つの段階に分けられている(図 1)(1,2)。

- 1, M 期 ; 細胞分裂期。
- 2, G₁ 期 ; 細胞分裂の終了からDNA合成の開始までの期間 (gap 1) 。
- 3, S 期 ; DNA 合成期。
- 4, G₂ 期 ; DNA合成の終了から次の細胞分裂が開始するまでの期間 (gap 2) 。

しかし、細胞はいつもこの細胞周期を回って増殖し続けているわけではない。細胞は外部環境の変化に応じて、G₁ 期から周期をはずれG₀ 期と呼ばれる増殖停止状態に入り、また必要に応じて再び細胞周期に復帰する場合がある。例えば生体内においては、通常は必要以上の細胞の増殖は抑制されているが、損傷を生じた場合には細胞が必要なだけ増殖し、その損傷を修復する。この現象を個々の細胞レベルで見ると、G₀ 期への進入及びG₀ 期からの脱出に関する現象であると言える。また、癌細胞はG₀ 期への進入に必要な機能を失った細胞であり、増殖を停止することができないため周囲の環境にかかわらず無秩序に増殖するものと考えられる(3,4)。これらの例が示す様に、G₀ 期への進入及びG₀ 期からの脱出の過程を理解することは、細胞増殖の制御を考える上で最も重要であると考えられる。

G₀ 期は細胞周期上のG₁ 期から移行した一時的な増殖停止状態であり、通常は細胞周期の外に存在すると考えられている。一般的に増殖誘導を行った場合のG₀ 期からS期までの時間がG₁ 期の時間よりも長いことが知られており(5,6)、またG₀ 期においてはクロマチンがG₁ 期よりも凝集していることを示唆する結果が得られている(7)。しかし、その他にはG₀ 期と細胞周期上のG₁ 期とを明確に区別する様な生化学的な知見は得られていない。また、どの様な機構によってG₀ 期への進入及びG₀ 期からの脱出が制御されているのかは明らかではない。

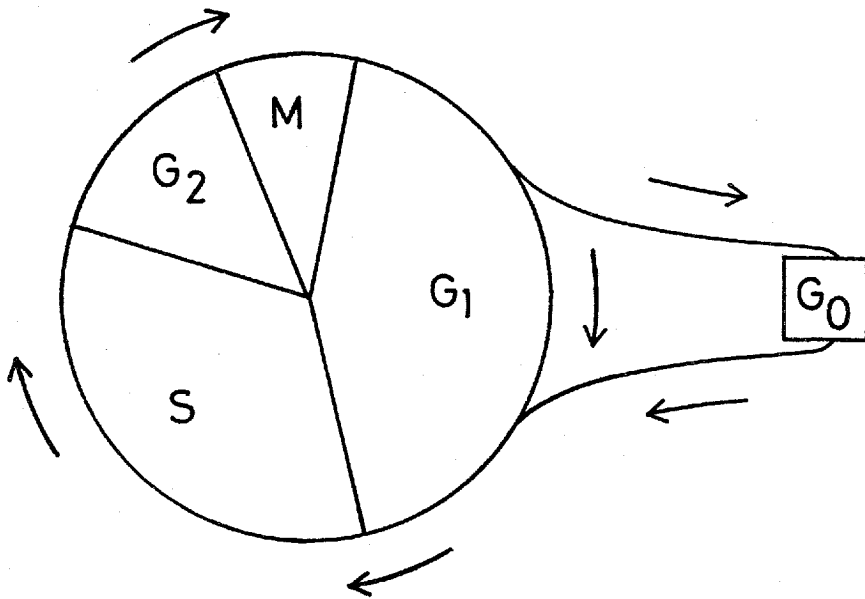


図 1. 細胞周期モデル

M ; 細胞分裂の期間、G₁ ; 細胞分裂の終了からDNA合成の開始までの期間、S ; DNA合成の期間、G₂ ; DNA合成の終了から細胞分裂の開始までの期間、G₀ ; 増殖誘導によってDNA合成及び細胞分裂を再開することができる増殖停止状態。

○ 細胞周期研究のための実験系

これら細胞周期に関する知見は、培養細胞を用いた研究により明らかにされてきた。培養系において、正常細胞の場合には細胞が器壁上で飽和密度にまで増殖したconfluentの状態や(8,9)、血清等の増殖因子(10)を培地から欠乏させることによって(11,12)細胞をG₀期に導入することができる。このようにして導入したG₀期は、可逆的な増殖停止状態であり、細胞密度を低下させることもしくは再び血清等の増殖因子を添加することによって、細胞はG₀期から脱出し、一定時間の後にS期へと進入しDNA合成を再開して増殖する。

培養系では、このように細胞の増殖を容易に制御することが可能であり、生体に比較して実験系として非常に有利である。このような系を用いて増殖誘導後G₀期からS期までの過程を解析することによって、G₀期からの脱出という細胞増殖の制御に重要な過程に関して手がかりを得ることができると考えられる。

○ 細胞骨格

増殖因子等による増殖を誘導する信号は、細胞膜から細胞内部へと伝達され、様々な細胞機能の変化を引き起し、やがてDNA合成が開始されるものと考えられる。その際、細胞膜下や細胞質内を走行し細胞全体にわたって複雑な3次元構造を形成し、様々な細胞機能に関与していると考えられる細胞骨格が、重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

細胞骨格は、真核細胞の細胞質に一般に観察される繊維状の構造であり、その微細形態及び主要な構成蛋白の違いから以下の3種類に大別されている(13)。

- 1, 微小管; 直径25 nm, 主要蛋白: チュブリン (14,15)。
- 2, ミクロフィラメント; 直径6 nm, 主要蛋白: アクチン (16, 17)。
- 3, 中間径フィラメント; 直径10 nm, 主要蛋白: 細胞の起源により5種類 (18,19)。

微小管については、G₀期の細胞に微小管の脱重合を起すコルヒチンを添加することによって、DNA合成が誘導されること(20)、逆に微小管を安定化させるタキソールによって血清等によるDNA合成の誘導

が阻害されることが報告されている (21)。これより、G₀ 期からの脱出の過程に微小管は重要な機能を果していると考えられている。

また、マイクロフィラメントも細胞増殖の制御に関与していると考えられている。例えば、癌細胞では増殖因子要求性の低下や器壁への接着依存性の消失に伴い、マイクロフィラメントの集合体であるアクチンケーブルが消失すること (22~24)、また EGF (Epidermal Growth Factor) などの増殖因子による増殖誘導の初期に、マイクロフィラメントの再構成が起ることが観察されている (25~27)。また、化学発癌物質によって癌化させたヒトの細胞では、その悪性度とマイクロフィラメントの主要な構成蛋白であるアクチンの変異の程度との間に、非常に強い相関が認められることが報告されている (28~30)。さらに、最近細胞の増殖や癌化に重要な役割を果している可能性から注目を集めている発癌遺伝子の一つ、ネコ肉腫ウイルスの *v-fgr* 遺伝子の中にアクチン遺伝子が組み込まれており、発癌遺伝子の一部として機能している可能性が考えられている (31)。これらはいずれも間接的な証拠ではあるが、マイクロフィラメントが細胞増殖の制御において何らかの役割を果している可能性を示している。

なお、中間径フィラメントに関しては、増殖との関連を示す様な知見は現在のところ得られていない。

本研究では、これら細胞骨格系の中でも特にマイクロフィラメントに注目して、その細胞増殖における関与を検討したものである。なお、マイクロフィラメント系の機能を検討する手段としては、特異的な阻害剤であるサイトカラシン D を用いた。

サイトカラシン類は、アクチン-マイクロフィラメント系に作用することが良く知られている Helminthosporium dematiodecum などの真菌類の代謝産物であり、サイトカラシン A~M の他 40 種類以上の類似物質が報告されている (32)。in vitro ではアクチン繊維 (F-アクチン) の重合端 (barbed end) に結合することによってアクチンモノマー (G-アクチン) の結合を阻害し、それ以上の重合を阻害する (33~36)。また、アクチン繊維間の相互作用を阻害することによって網目形成、ゲル形成を妨げる。また、すでに形成されたゲルをも溶解する (37~39)。細胞レベルでは、細胞の形態変化を引き起し、細胞運動、食作用、細胞質分裂などを阻害することが知られている。多くのサイトカラシン類を

用いた実験から、*in vitro* におけるアクチンへの直接効果と、細胞に与える作用との間に強い正の相関があることが報告されており (40)、サイトカラシン類を細胞に与えた場合の作用はマイクロフィラメント系への効果を介するものと考えられている。しかし、サイトカラシン類の中で最も良く用いられているサイトカラシンBは、マイクロフィラメント系への効果の他に、細胞膜表面のグルコース輸送蛋白に対して高い親和性を持っており、グルコースの細胞内への輸送を阻害することが知られている (41~43)。一方、サイトカラシンDは、グルコース輸送に対して阻害作用がなく (44)、またマイクロフィラメントに対する作用がサイトカラシンBよりも強いことが知られている (40)。

本研究では、細胞周期の進行、特にG₀期からの脱出の過程におけるマイクロフィラメント系の関与を検討した。実験に際し、まずG₀期への導入及び増殖誘導の効率の良い細胞系を確立した。この細胞を用いて、G₀期からの増殖誘導を行い、その際サイトカラシンDを添加した場合のその後の過程に与える影響を検討した。

第二章 実験材料及び基本となる実験方法

1. 使用細胞

細胞は、培養系の非筋細胞である African green monkey kidney cell GC-7 を親株としてクローニングを繰り返して得られたクローン 2-5-2 株を用いた (第三章)。親株である GC-7 細胞は、東京大学医科学研究所の山口氏より分与を受けた。

2. 培養条件

培養は、10% 牛血清を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地にグルコース (3.5 g/l), ペニシリン G (50000 U/l), 硫酸ストレプトマイシン (0.1 g/l), 重炭酸ナトリウム (1.6 g/l) を添加した培地で、気相は 5% 二酸化炭素、95% 空気、水蒸気飽和、37°C の条件で、二酸化炭素インキュベーター (NBS Model CO-20) 中で単層培養を行った。

継代は、4日ごとに細胞が subconfluent の状態にまで増殖した時点で行った。細胞をトリプシンによって器壁より遊離させ、5倍に希釈して ($6\sim 8 \times 10^3$ 細胞/cm²) 新たなシャーレに撒き込んだ。

また、長期間にわたって継代を重ねていると、細胞の性質がしだいに当初とは変化して行く場合がある。本研究においては、これを防ぐ為に3ヶ月以上の継代は行わず、あらかじめ液体窒素中に凍結保存しておいた細胞に切り換えることとした。このことによって、細胞の性質を常に一定に保った。

3. G₀ 期への導入

細胞を $3.2\sim 3.8 \times 10^3$ 細胞/cm² の密度で撒き込み、2日間通常の方法で培養した後、牛血清を含まない培地でさらに3日間培養し、増殖を停止させた。この条件では、細胞は撒き込んだ後1回程度の分裂を行っただけで、まだ十分に分裂増殖が可能な密度、接触阻止が働かない状態で増殖を停止した。本研究では、この状態の細胞を G₀ 期として用いた。

4. 増殖誘導

G₀ 期に導入した細胞の培地を、新たに10%牛血清を含む培地に交換することで行った。

5. 標識化合物

[methyl-³H] - チミジン、 [5-³H] - ウリジン、 L- [4,5-³H] - ロイシンは、R C C Amershamより購入した。

6. 試薬

Dulbecco変法Eagle培地、ロイシン欠乏MEM培地は、日水製薬株式会社より、牛血清はIrvine Scientificより購入した。

その他特に記していない試薬は、すべて市販の特級を用いた。

第三章 細胞系の確立

第一節 緒言

細胞周期に関する研究を行うにあたっては、その目的に適した細胞系を確立することが必要である。ことにG₀期の周辺の解析を行う場合には、G₀期への導入の方法が容易であり、その操作によって増殖を続ける細胞の頻度が小さい集団が得られること、さらに増殖誘導に際して反応する細胞の頻度の高い細胞系を用いることが必要である。

本研究で親株として用いたGC-7細胞は、器壁上で飽和密度にまで増殖し confluentの状態にまで達するとそれ以上は増殖しないという接触阻止が強く、正常細胞に近い性質を持った細胞であった。しかし、この細胞は線維芽細胞様と上皮細胞様の2種類の細胞が混在した不均一な細胞群であった。

本研究を行うにあたり、このGC-7細胞を親株として、G₀期への導入の程度が良く、かつ増殖誘導に対する反応頻度の高い細胞系を確立することを目指した。

第二節 実験材料及び実験方法

1, 細胞、培養条件、G₀期への導入
第二章と同じ。

2, クローニング

直径100mmのシャーレに約100個の細胞を撒き込み、2~3週間培養しコロニーが十分な大きさにまで成長した時点でコロニーを単離、クローニングした。1回のクローニング操作につき、20個前後のクローン単離した。その後、各クローンの細胞についてG₀期導入の操作を行い、後述のオートラジオグラフィによってG₀期に導入された細胞の頻度を比較した。最も高頻度でG₀期に導入されているクローンから、さらにクローニングを行い、よりG₀期への導入頻度の高い細胞群を得、さらにもう一度この選択を繰り返した。

3. オートラジオグラフィー

直径13mmのカバーガラス上に撒き込んだ細胞を、G₀期への導入など必要な処理を行った後 [methyl-³H] -チミジン (3 μCi/ml) で所定の時間標識した。その後、磷酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、冷5%トリクロロ酢酸 (TCA) で固定、酸可溶性成分を抽出除去し水洗乾燥した。細胞表面にオートラジオグラフィー用乳剤を塗布し、遮光して一週間露光した後に現像した。細胞を光学顕微鏡 (Nikon Model S) にて観察し、一定の視野内での核内に感光した銀粒子が認められた細胞の全細胞に対する割合を測定した。なお、一検体について約1000個の細胞を計数した。

4. 試薬

オートラジオグラフィー用乳剤 (SAKURA NR-M2) は、小西六写真工業株式会社より購入した。

その他の試薬は、第二章と同じ。

第三節 実験結果

親株であるGC-7細胞は、接触阻止が十分に働かない様な低細胞密度では、G₀期への導入のための処理を行った後においても約24%の細胞はDNA合成を行っていることがオートラジオグラフィーによって示された (表 1)。

G₀期への導入の処理の後にDNA合成を行っている細胞の頻度は、1回目のクローニング操作によって得られたクローン2では約15%、クローン2から2回目のクローニングによって得られたクローン2-5では約12%とクローニング操作を繰り返すことにより低下した。クローン2-5からさらにクローニングを行うことによって得られたクローン2-5-2では、10%以下の細胞しかDNA合成を行わないという細胞群が得られた (表 1)。

この細胞GC-7クローン2-5-2は、G₀期への導入の頻度が高いだけでなく、血清による増殖誘導に対しても90%以上の細胞がDNA合成を再開するという、反応性の良い細胞であった。なお、この細胞の

表 1. GC-7細胞から得られた種々のクローンの増殖停止状態
への導入頻度の比較

各クローンの細胞を無血清培地中で3日間培養した後、[methyl-³H]
ーチミジン (3 μCi/ml) で32時間標識し固定した後、オートラジオグ
ラフィーを行って増殖を停止していない細胞の頻度 (標識細胞頻度) を
求めた。

Cell lines	% of labeled nuclei
Wild type GC-7	24.37±4.30 ^{a)}
GC-7 clone 2	15.02±2.67
GC-7 clone 2-5	12.40±1.23
GC-7 clone 2-5-2	7.40±3.02

a) Mean±S.D. (n=6)

対数増殖期での周期時間は、およそ22時間であった。また、この細胞はアクチンケーブルが顕著な細胞であった。

第四節 小括

GC-7細胞より、クローニングを繰り返すことによって得られたGC-7クローン2-5-2は、G₀期への導入頻度が高く、かつ増殖誘導に対して高い反応性を示す細胞であった。

この細胞は、G₀期周辺の解析を行うために必要な性質を備えた細胞であると考えられた。また、アクチンケーブルが良く発達していることから、マイクロフィラメントの形態学的観察にも有用であろうと考えられた。

第四章 サイトカラシンDによる増殖誘導の阻害

第一節 緒言

マイクロフィラメントは、様々な細胞機能に関与していることが報告されている(45~49)。また、細胞増殖におけるマイクロフィラメントの関与を示唆する報告も数多く知られている(22~31)。しかし、細胞周期の各時期においてマイクロフィラメントがどのように関与しているのかについては、十分な知見が得られていない。本章では、サイトカラシンDによってマイクロフィラメントの構造を変化させることにより、細胞増殖の制御の上で特に重要であると考えられるG₀期からS期へという増殖誘導後の過程でのマイクロフィラメントの関与を検討した。

第二節 実験材料及び実験方法

1. 細胞

細胞は、第三章でGC-7細胞からクローニングによって単離したGC-7クローン2-5-2を用いた。

2. 培養条件、G₀期への導入、増殖誘導

第二章と同じ。

3. オートラジオグラフィー

第三章と同じ。

4. ミクロフィラメントの染色

毒キノコ Amanita phalloides の代謝産物の一種であり、アクチン繊維にのみ高い親和性を持つファラシジンをケイ光標識した、7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) -ファラシジンを用いて、細胞内のマイクロフィラメントを染色した(50)。

カバーガラス上に撒き込んだ細胞をPBSで洗浄後3.5%ホルムアルデヒド溶液で室温にて15分間固定、さらにPBSで洗浄した後-20℃ア

セトンで5分間脱水及び脱脂を行い風乾した。これに $1.3 \mu\text{g/ml}$ の NBD-ファラシジン液 $20 \mu\text{l}$ を添加し、室温で20分間インキュベートした後、余剰のNBD-ファラシジンをPBSで洗浄しPBS:グリセリン=1:1の液で封入してケイ光顕微鏡 (Olympus Model BH2-RFL) で観察した。その際、励起光は450~480nm、観察は515nmで行った。

5. 酸可溶性画分へのウリジンの取り込み

直径60mmのシャーレに撒き込んだ細胞を、 G_0 期に導入した。増殖誘導を行った後、所定の時間で培地を20mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 培地 pH7.4 (通常の培地に緩衝作用強化のために、HEPESを添加したもの。増殖誘導を行った細胞には、生理食塩水に対して透析し低分子を除去した牛血清を10%添加したもの。) に交換した。同時に [$5\text{-}^3\text{H}$] -ウリジンを含むウリジン溶液を最終濃度 10^{-6} Mになるよう ($1.5 \mu\text{Ci}/1.5\text{ml}/\text{dish}$) 添加し、 37°C 10分間インキュベートした。その後、培地を除去しPBSで洗浄した後、冷5% TCAによって酸可溶性画分を抽出し、液体シンチレーションカウンター (Packard 3320型) で放射活性を測定して、高分子に取り込まれていないウリジン量を算出した。なお、ここで用いた細胞及び実験条件下では、細胞に取り込まれたウリジンの量は $10^{-5} \sim 10^{-8}$ Mの細胞外ウリジン濃度の範囲で、また時間的には0~60分までの間で比例関係が認められた。

6. DNase I 阻害測定法

アクチンモノマー (G-アクチン) がDNase Iと特異的に1:1の結合をし、その酵素活性を阻害すること (51,52) を利用して、Blikstadらの方法 (53) に従って測定した。

増殖誘導後の細胞をPBSで洗浄した後、アクチン繊維を安定化させる緩衝液 (5mM Tris HCl pH7.6、0.5% Triton X-100、150mM NaCl、2mM MgCl_2 、0.2mM Dithiothreitol、0.2mM ATP) で溶解した ($1.0 \sim 1.2 \times 10^6$ 細胞/ml)。この液 $10 \mu\text{l}$ をDNase I ($1 \text{U}/10 \mu\text{l}$) と混合し、DNA溶液 ($40 \mu\text{g/ml}$) 1mlとともに 30°C 湯浴中でインキュベートし、260nmの吸光度変化をスペクトロフォトメーター (日立 Model 200-10) で測定した。DNase IによってDNAが分解され吸光度は増加するが、アクチンモノマーが存在するとDNase Iの活性が阻害され、吸光度の

増加は抑制された。その抑制の程度から細胞内のアクチンモノマーの量を求めた。また、先の細胞液に当量の脱重合液 (20mM Tris HCl pH7.5、1.5M 塩酸グアニジン、1.0M 酢酸ナトリウム、1mM CaCl₂、1mM ATP) を加え、アクチン繊維を脱重合させてすべてをアクチンモノマーとして同様の測定を行い、細胞内の全アクチン量を求めた。これより、細胞内のアクチンモノマーの割合を求めた。

7. 試薬

サイトカラシンDは、Aldrich Chemical Co. の製品を用い、ジメチルスルホキシドにて2 mg/mlに溶解して冷凍保存した。実験に際しては、培地で必要な濃度に希釈して用いた。

NBD-フェラシジンは、和光純薬工業株式会社より購入した。この標品は、メタノール溶液に溶解されており、使用時には窒素ガスによって溶媒を蒸発させた後、あらためてPBSに溶解させた。

DNase IはSigma Chemicalより購入した。

その他の試薬は第三章と同じ。

第三節 実験結果

第一項 増殖誘導によるDNA合成開始に対するサイトカラシンDの効果

血清除去によってG₀期に導入した細胞に、血清を再添加することにより増殖誘導を行うと同時に、種々の濃度 (0~1.0 μg/ml) のサイトカラシンDを添加した。その後32時間までにS期に進入しDNA合成を再開した細胞の頻度を、[methyl-³H]-チミジンの取り込みによるオートラジオグラフィーを行って検討した。

サイトカラシンDを添加しない場合には、90%以上の細胞がS期に進入しDNA合成を行っており、血清刺激に対して細胞が十分に反応していることが示された。サイトカラシンDを添加した場合には、その濃度に従ってS期への進入が阻害された。この阻害は、0.6 μg/mlの濃度で60%に達し、さらに高い濃度のサイトカラシンDを添加した場合でも70%以上の阻害効果は認められなかった (図 2)。

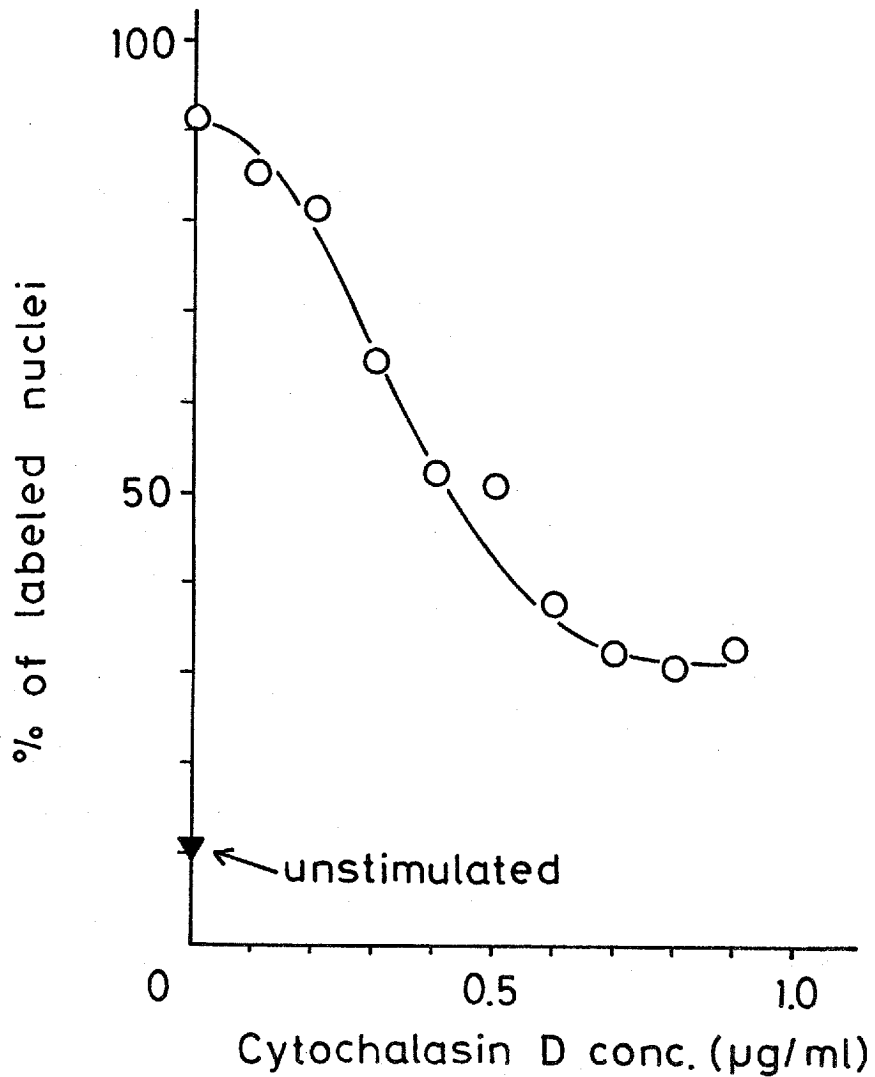


図 2. 血清による刺激を行った細胞のS期への進行に対するサイトカラシンDの濃度依存的阻害効果
 G₀期に導入した細胞を10%牛血清を含む培地によって増殖誘導を行い、同時に種々の濃度のサイトカラシンDを添加した。その後32時間まで [meth1-³H] -チミジン (3 µCi/ml) で標識し、固定後オートラジオグラフィを行った。

なお、ここで用いた0～0.95 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では細胞に急激な毒性は示さず、細胞は48時間以上生存した。しかし、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上のサイトカラシンD濃度では細胞の急激な球状化が起り、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上では細胞の死滅、器壁よりの剝離が著しく、実験に用いることはできなかった。

また、1.0 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンD存在下においても、約30%の細胞はS期へと進入していることが示された。後述のようにマイクロフィラメントを観察した際にも、サイトカラシンDを添加した場合にアクチンケーブルの消失し難い細胞が存在することが示された。これは、細胞の状態によってサイトカラシンDに対する感受性が異なるため、またはサイトカラシンDに対して比較的感受性の低い細胞が存在しているためであるという可能性が考えらるが、その理由は明らかではない。

第二項 対数増殖期の細胞に対するサイトカラシンDの効果

対数増殖期の細胞も、サイトカラシンDによってそのS期への進入が阻害された。この場合にも、この実験の範囲内では0.6 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度のサイトカラシンDを添加しても、さらに大きな阻害は認められなかった(図 3)。この場合には、最大の効果を示す濃度においても約50%の細胞はS期に進入しており、 G_0 期から増殖誘導を行った場合に比較してサイトカラシンDに対する感受性が低いように思われた。しかし、ここでの感受性の違いが有意な差であるか否かは不明であった。

また、より高濃度(0.8 $\mu\text{g/ml}$ 以上)のサイトカラシンDを添加した場合には、二核の細胞の増加が観察された。細胞質分裂にはマイクロフィラメントが主要な役割を果していることが知られており(54,55)、この働きを阻害することによって核分裂のみが進行して二核の細胞が増加したものと考えられる。S期への進行は、二核の細胞の増加が認められるよりも低濃度のサイトカラシンDによって阻害されており、細胞質分裂よりもS期への進入に関する段階の方がサイトカラシンDに対して感受性が高いことが推察された。

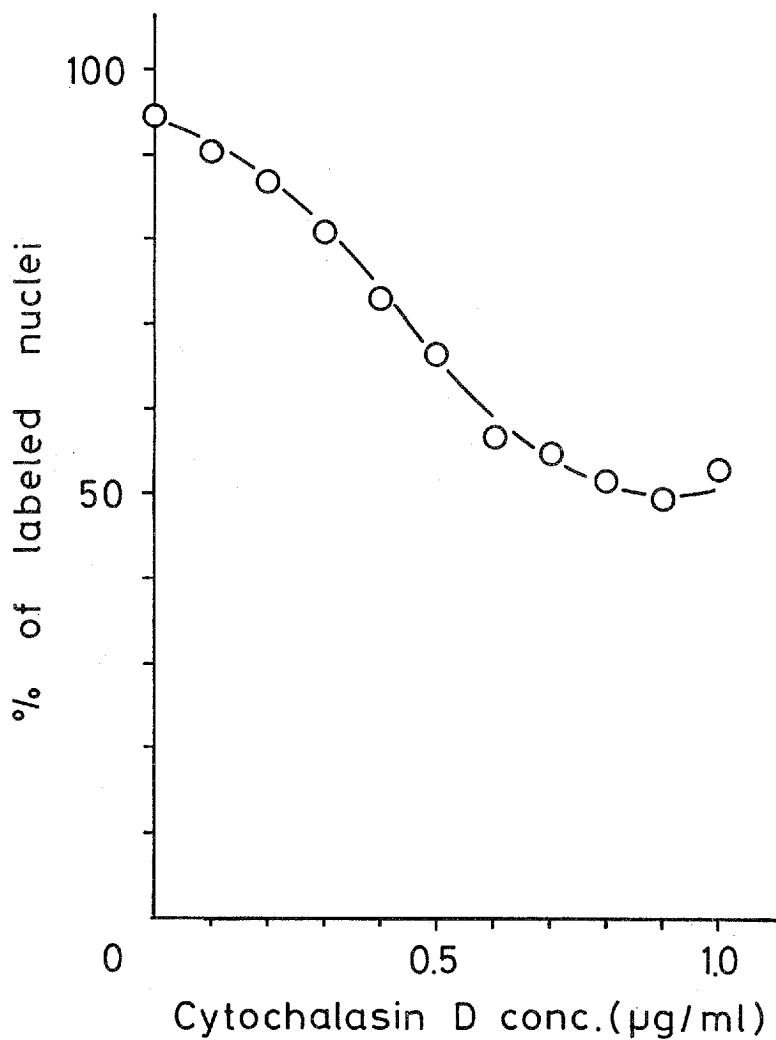


図 3. 対数増殖期の細胞のS期への進入に対するサイトカラシンDの濃度依存的阻害効果
 対数増殖期の細胞に種々の濃度のサイトカラシンDを添加し、同時に [methyl-³H] -チミジン (3 µCi/ml) で30時間標識した。その後オートラジオグラフィーを行った。

第三項 サイトカラシンDによる細胞内マイクロフィラメントの変化

増殖誘導と同時に、0～1.0 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンDを添加した場合の細胞内のマイクロフィラメントの状態の変化を、NBD-ファラシジン染色によって観察した。

増殖誘導のみ行った場合には G_0 期の細胞と顕著な差は認められず、細胞内に太いアクチンケーブルの走行が多数観察された(図 4-a)。一方、サイトカラシンDを添加した場合には、太いアクチンケーブルは消失し、細い繊維への分散あるいは細い繊維さえも消失し、細胞周辺部への凝集が観察された。しかし、細いながらもアクチンケーブルを保っている細胞も、ある程度存在していた(図 4-b～f)。この構造変化は、0～0.6 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度で特に顕著であり、使用した濃度範囲内ではさらに高濃度のサイトカラシンDを添加してもそれ以上の変化は認められなかった。これは前述のオートラジオグラフィーからの結果とも比較的良く対応した。

以後の実験には、S期への進入の阻害、マイクロフィラメントの構造変化とともに一定の効果を示すが、細胞質分裂は阻害しない0.6 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のサイトカラシンDを用いた。

さらに、アクチンケーブルの消失とS期への進入の阻害との相関を検討するために、同一の検体についてNBD-ファラシジンによる染色とオートラジオグラフィーをともに行った。

この実験においては G_0 期の細胞では、10%以下の細胞しかDNA合成を行っていなかったが、増殖誘導をおこなった細胞では90%以上がDNA合成を行っていたことがオートラジオグラフィーによって示された。増殖誘導と同時に0.6 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンDを添加した場合には、80%程度の細胞についてはDNA合成が阻害されていたが、それでも約20%の細胞はDNA合成を行っていることが示された(図 5-d, e, f)。

NBD-ファラシジンによる染色では、 G_0 期及び増殖誘導のみ行った細胞では、太いアクチンケーブルの走行が多数観察されたが、サイトカラシンDを添加した場合には、およそ70%の細胞でアクチンケーブルの消失が観察された(図 5-a, b, c)。しかし、個々の細胞について比較すると、アクチンケーブルは存在しているにもかかわらずDNA合成を行っていないもの、逆にアクチンケーブルは完全に消失している

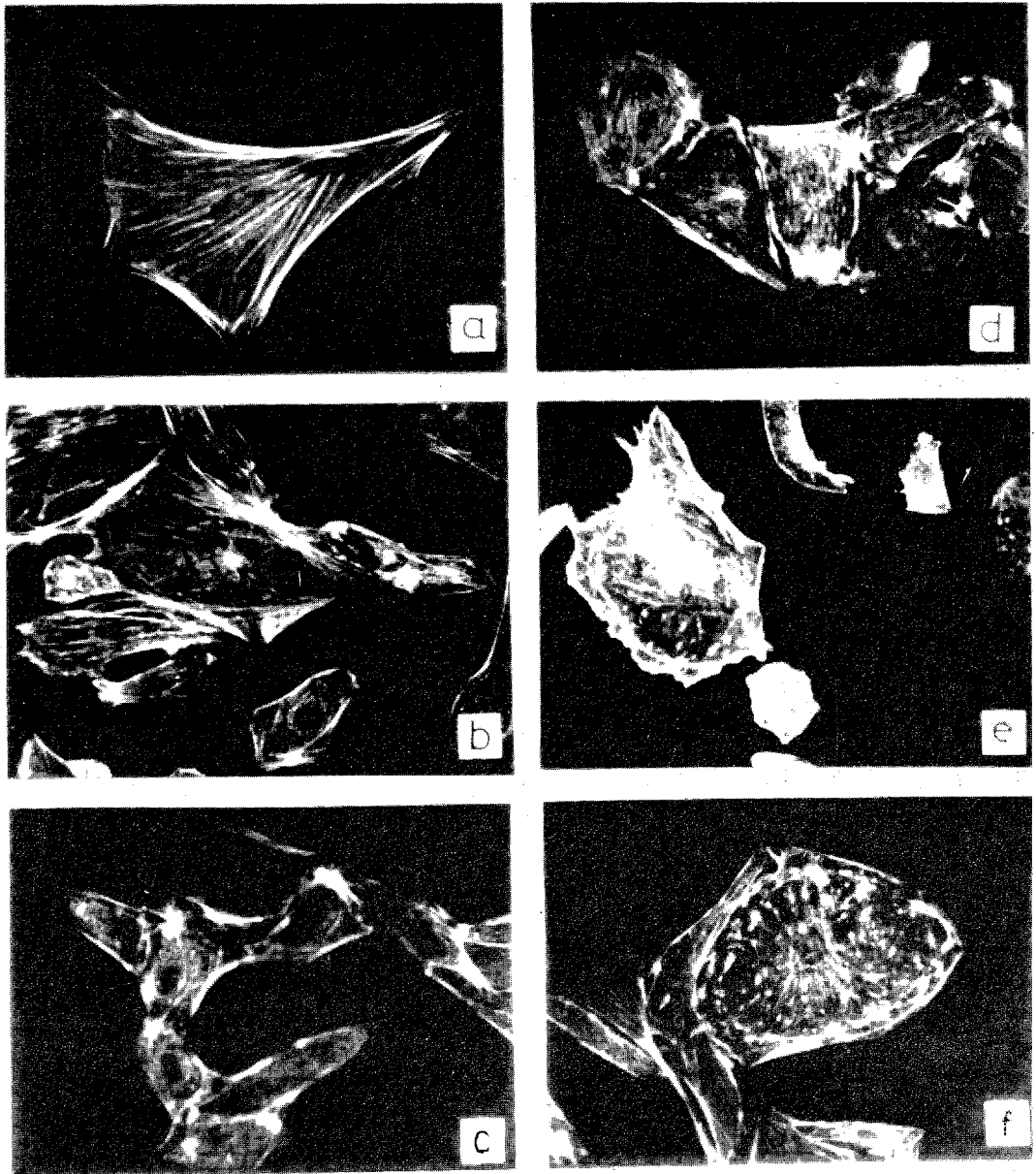


図 4. ミクロフィラメントの構造に対するサイトカラシンDの濃度依存効果

G₀ 期の細胞を10%牛血清を含む培地によって増殖誘導を行い、同時に種々の濃度のサイトカラシンDを添加した。32時間後、細胞内のミクロフィラメントをNBD-ファラシジンによって染色した。a ; 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、b ; 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、c ; 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、d ; 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、e ; 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、f ; 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサイトカラシンDで処理を行ったもの。倍率200倍

にもかかわらずDNA合成を行っている細胞が観察された。アクチンケーブルの消失とDNA合成開始の阻害との間には完全な相関関係は認められなかったが、全体として見ればアクチンケーブルの消失とDNA合成開始の阻害とは相関していた(図 5-c, f)。

サイトカラシンDによるDNA合成開始の阻害は、アクチン-マイクロフィラメント系に対する作用を介している場合と、介していない場合との可能性が考えられるが、サイトカラシンDがアクチン-マイクロフィラメント系以外に作用するということは現在のところ知られていない。逆に、サイトカラシンDの作用がアクチン-マイクロフィラメント系に対する作用を介していることは、*in vitro*及び *in vivo*における数多くの研究から明らかにされている。にもかかわらず、本実験でアクチンケーブルの消失とDNA合成開始の阻害との間に完全な相関関係が見られなかったのは、DNA合成の開始に必要なのはアクチンケーブルのような巨視的な構造ではなく、より微細なマイクロフィラメントの構造であるという可能性が考えられる。サイトカラシンDは、この微細構造を変化させたためにDNA合成の開始を阻害したものと考えられる。

さらに、増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加し、経時的にマイクロフィラメントの構造変化を観察した。サイトカラシンDを添加した後30分ですでに太いアクチンケーブルの多くが消失し、さらに時間が経過した場合でもそれ以上の大きな変化は認められなかった(図 6)。サイトカラシンDは添加直後から速やかにその効果を現わし、マイクロフィラメントの構造を変化させることが示された。

第四項 増殖誘導後のウリジンの取り込みに対するサイトカラシンDの影響

血清による増殖誘導すなわちG₀期からS期への進行は、0.6 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンDの添加によって阻害されたが、その場合増殖刺激に対する細胞の反応がすべて阻害されている可能性が考えられた。

多くの細胞では、増殖誘導後ごく初期からウリジン(56,57)、グルコース(58)等の膜輸送系の活性上昇や、イオンの流入(59~61)等主に細胞膜が関与すると考えられる一連の反応が起ることが知られている(62)。そこで、その一つであるウリジンの酸可溶性画分への取り込み

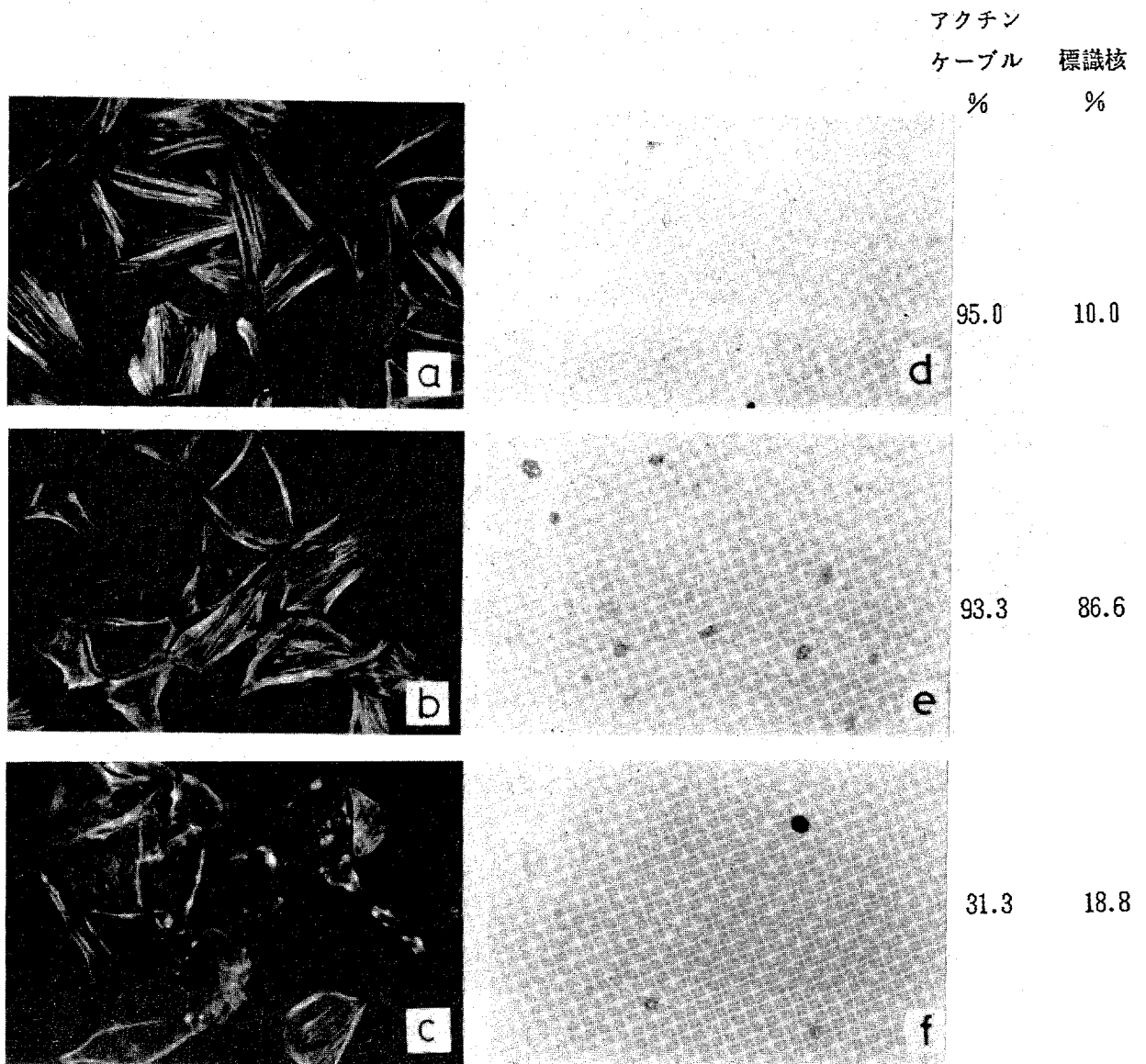


図 5. アクチンケーブルの存在とDNA合成との相関
 G₀期の細胞に増殖誘導を行うと同時に [methyl-³H] -チミジン (3
 μCi/ml) で32時間標識した。その後、NBD-ファラシジンで細胞内
 のマイクロフィラメントを染色し観察した後、オートラジオグラフィーを
 行った。同視野についてケイ光像とオートラジオグラフィー像を比較し
 た。a, b, c; NBD-ファラシジン染色によるマイクロフィラメント
 像、d, e, f; 同視野についてのオートラジオグラフィー像。a, d
 ; G₀期、b, e; 増殖誘導のみ行ったもの、c, f; 増殖誘導と同時
 にサイトカラシンD (0.6 μg/ml) を添加したもの。倍率100倍

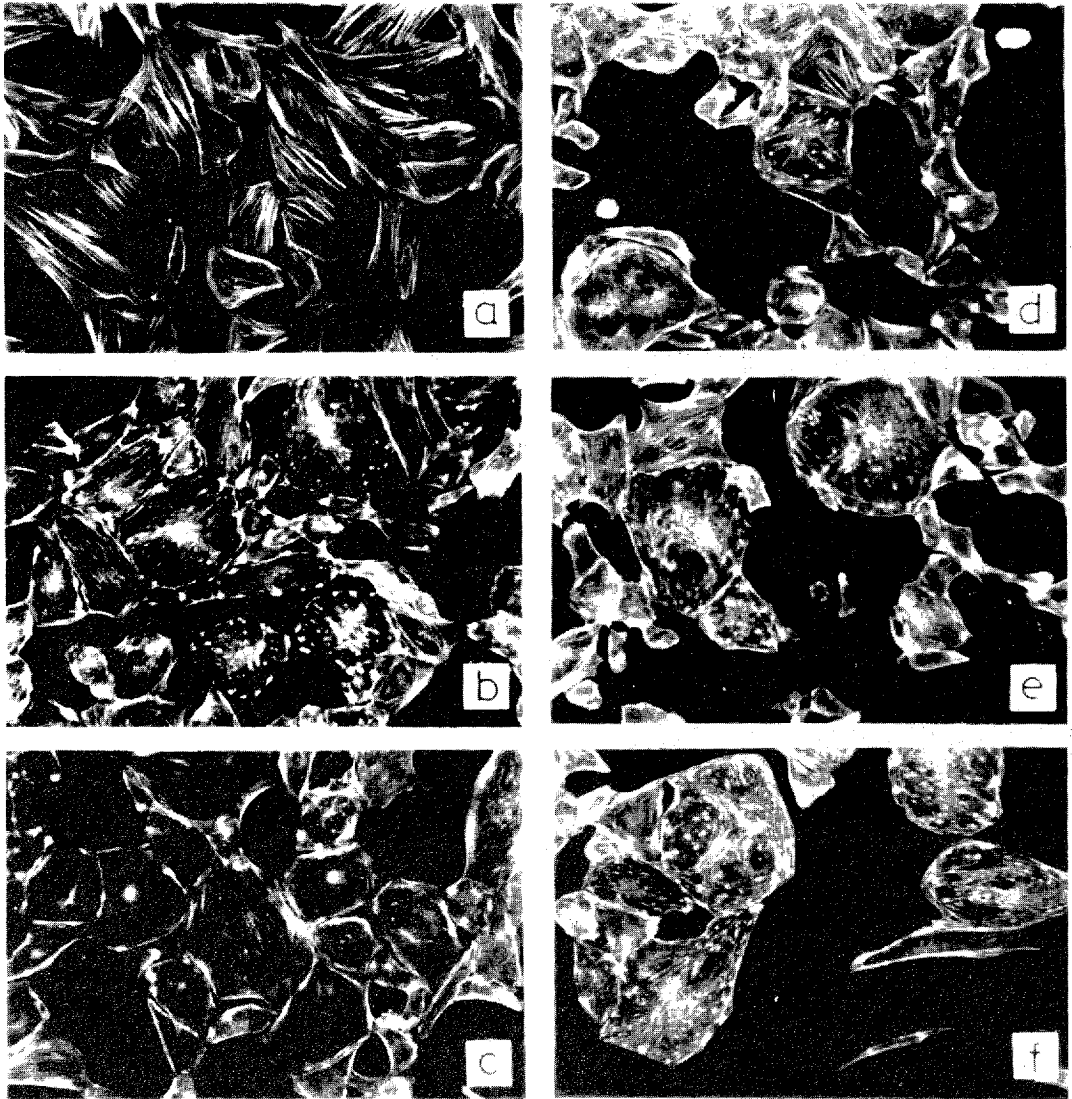


図 6. サイトカラシンD添加後のマイクロフィラメントの構造の経時変化

細胞に増殖誘導を行うと同時にサイトカラシンD ($0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、その後経時的にNBD-ファラシジンによって細胞内のマイクロフィラメントを染色した。サイトカラシンD添加後 a ; 0時間、b ; 0.5時間、c ; 3時間、d ; 10時間、e ; 24時間、f ; 32時間。倍率100倍

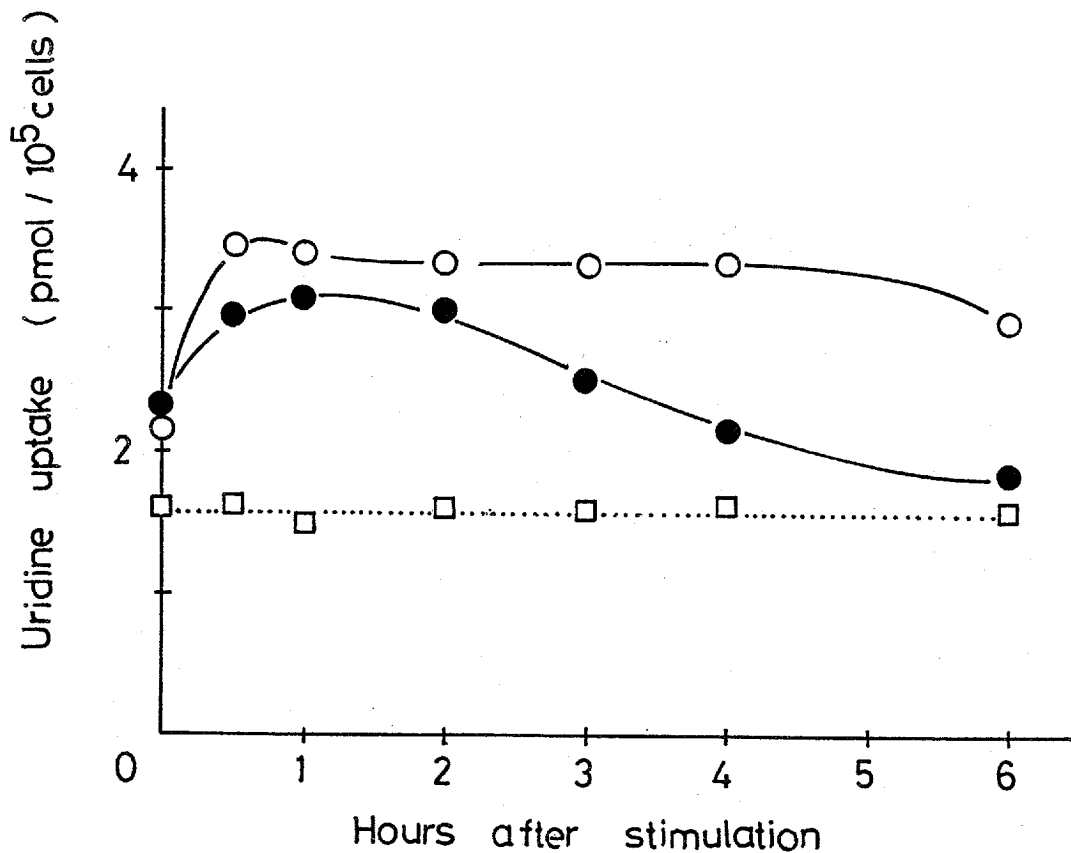


図 7. 増殖誘導後のウリジン取り込みの上昇に対するサイトカラシンDの影響

細胞に増殖誘導を行うと同時に、サイトカラシンD (0.6 μg/ml) を添加した。その後各時間で、10分間の酸可溶性画分へのウリジンの取り込みを測定した。増殖誘導を行わなかったもの (□...□)、増殖誘導のみ行ったもの (○—○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD (0.6 μg/ml) を添加したもの (●—●)。

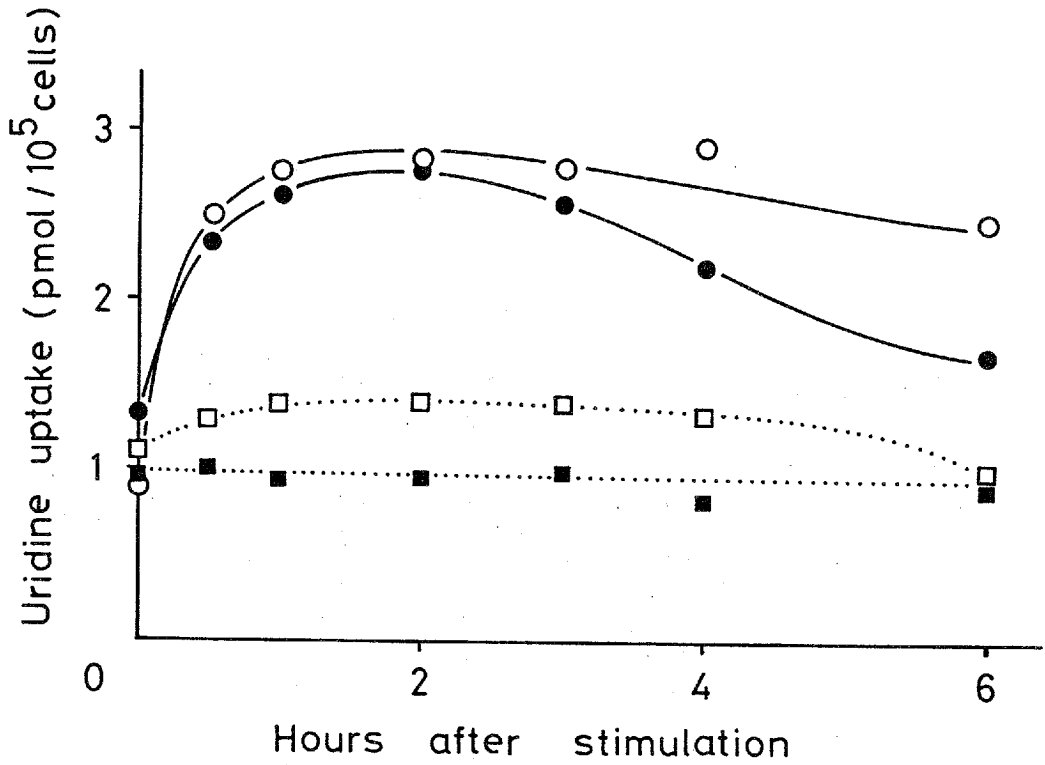


図 8. サイトカラシンD前処理による増殖誘導後のウリジンの取り込みに対する影響

G₀期の細胞をサイトカラシンD (0.6 μg/ml) で6時間処理し、その後増殖誘導を行った。各時間で10分間の酸可溶性画分へのウリジンの取り込みを測定した。サイトカラシンD存在下で増殖誘導を行わなかったもの (■-■)、前処理の後サイトカラシンDを除去し増殖誘導を行わなかったもの (□-□)、増殖誘導と同時にサイトカラシンDを除去したもの (○-○)、サイトカラシンD存在下で増殖誘導を行ったもの (●-●)。

に対するサイトカラシンDの影響を検討した。

増殖誘導直後から、ウリジンの取り込み速度は約2倍に上昇し、その後6時間まではほぼ一定に維持された。一方、サイトカラシンDを添加した場合には、増殖誘導後ごく初期の取り込みの上昇には影響を与えなかったが、3時間後付近から次第に阻害が見られるようになり、6時間後には増殖誘導を行わなかった群と同程度にまで低下した(図7)。

また、増殖誘導の前に6時間サイトカラシンDで前処理した場合にも、全体の取り込み量がやや低下しただけで、前処理を行わなかった場合と同様の結果が得られた(図8)。このことから、増殖誘導の初期にサイトカラシンDによる阻害が認められないのは、処理時間が不十分なためではないことが示された。さらに、増殖誘導直後とその後では、ウリジンの取り込み機構が異なっている可能性が考えられた。

少なくとも増殖誘導後初期のウリジンの取り込みの上昇に関する限り、G₀期からS期への進行が阻害されるような濃度のサイトカラシンDの存在下においても、細胞は増殖刺激に対して反応していることが示された。

第五項 サイトカラシンD感受性の段階の限定

先の結果より、増殖誘導後のG₀期からS期までの過程の進行がサイトカラシンDによって阻害されることが示された。その阻害がG₀期からS期までの全過程を阻害するものか、あるいは阻害を受ける特異的な段階が存在するのかを知るために以下の検討を行った。

図9はその際S期の開始時間と、サイトカラシンDにより阻害を受ける段階との時間的前後関係を知るために、増殖誘導のみ行った群を同時に示したものである。G₀期に導入した細胞に増殖誘導を行った後、サイトカラシンDを添加する時間をしだいに遅らせ、S期への進入に与える影響をオートラジオグラフィによって検討した。増殖誘導のみ行った場合は、図に示した各時間で細胞を固定した。サイトカラシンD処理群は、増殖誘導後各時間から0.6 μg/mlのサイトカラシンDを添加し増殖誘導後32時間の時点まで培養した後一斉に固定した。

増殖誘導のみ行った場合には、細胞は15時間付近からS期へと進入し始め、32時間後には80%以上の細胞がS期へと進入した。一方、増殖誘

導と同時にサイトカラシンDを添加した場合には、約70%の細胞がS期への進入を阻害された。これは、前述のようにこの濃度のサイトカラシンDの示す最大の阻害効果であった。また、S期開始の6~7時間以前、すなわち増殖誘導後8~9時間までにサイトカラシンDを添加した場合には、増殖誘導と同時に添加した場合とほぼ同様の阻害効果が認められた。しかし、それ以降に添加した場合には、サイトカラシンDの阻害効果は急速に失われ、約50%の細胞がS期に進入した後である20時間以降では、ほとんど無効であった(図9)。

これより、増殖誘導後8~9時間までの過程にサイトカラシンDに対して感受性の高い段階が存在していることが示唆された。

さらに、このサイトカラシンD感受性の段階を限定するために、増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加し、その後様々な時間でこれを除去した場合のその後のS期への進行を検討した。

増殖誘導後0~3時間または0~6時間の間サイトカラシンDを処理した場合には、増殖誘導のみ行った場合(図10-a)と同様に15時間後から細胞のS期への進入が認められた。0~9時間の間処理を行った場合には、S期への進入速度にいくぶん低下が見られたものの、S期の開始時間は増殖誘導のみ行った場合とほぼ同様であった(図10-b)。また、増殖誘導の6時間以前から6時間後まで合計12時間の間サイトカラシンDを処理した場合にも、増殖誘導のみ行った場合と同様にS期への進入が見られた(図略)。このことから、0~3時間、0~6時間、0~9時間のサイトカラシンD処理の場合にS期の開始に大きな影響が見られなかったのは、単に処理時間が短いために十分な効果が現われなかったためではないことが示された。

一方、0~12時間、0~18時間、0~24時間の間サイトカラシンDによる処理を行った場合には、S期の開始時間に遅れが認められた。すなわち、いずれの場合にもサイトカラシンDを除去した後約6時間というほぼ一定の時間の後に、細胞はS期へと進入した(図10-c)。この場合、S期への進入速度にはいくぶん低下が認められた。

以上の結果より、S期開始の6~7時間前すなわち増殖誘導後8~9時間付近の特定の段階の進行がサイトカラシンDによって可逆的に阻害され、その結果S期への進行が阻害されるものと推察された。この推定が正しければ、特異的な段階以外の時期に処理した場合には、サイトカラシンDはS期への進入に対して影響を及ぼさず、特異的な段階を包含

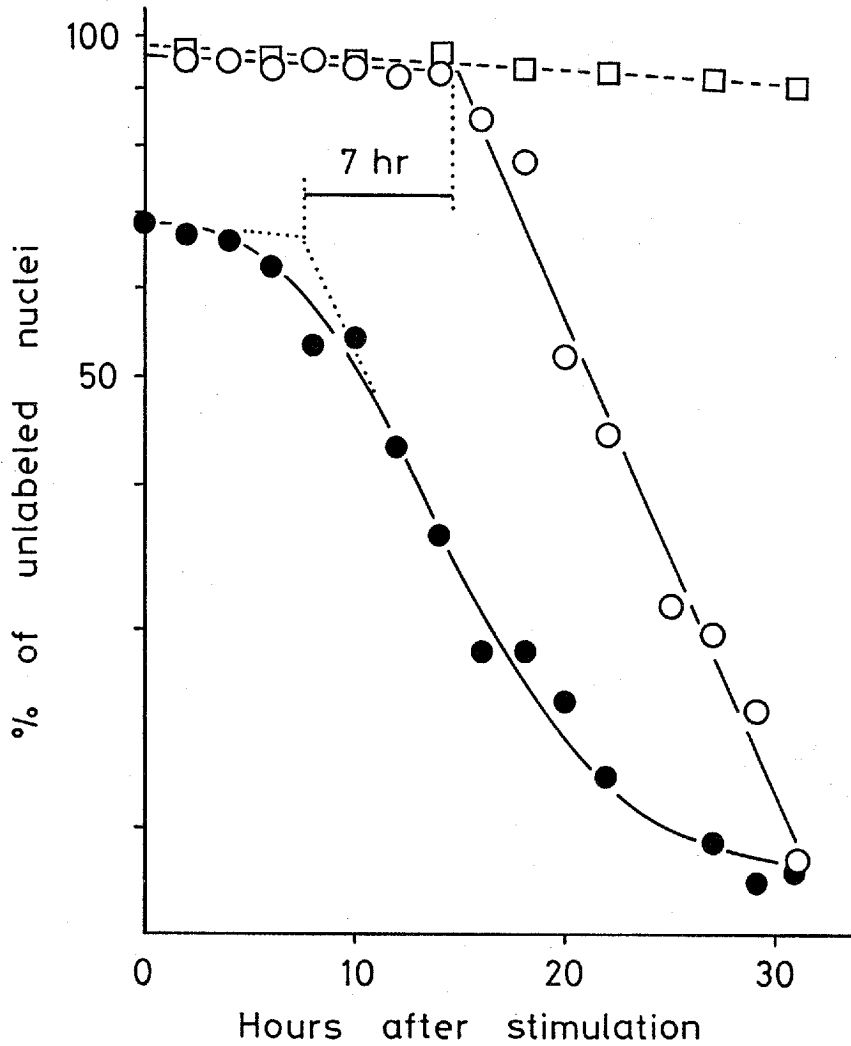


図 9. 増殖誘導後の細胞のS期への進入に対するサイトカラシンDの影響

増殖誘導と同時に [methyl-³H] -チミジン (3 μ Ci/ml) で細胞を標識し、オートラジオグラフィを行った。増殖誘導を行わなかったもの (□---□)、増殖誘導のみ行ったもの (○—○)、この2群は図の各時点で細胞を固定した。増殖誘導後図に示した各時点からサイトカラシンD (0.6 μ g/ml) を添加し、増殖誘導後32時間の時点まで培養し一斉に固定したもの (●—●)。

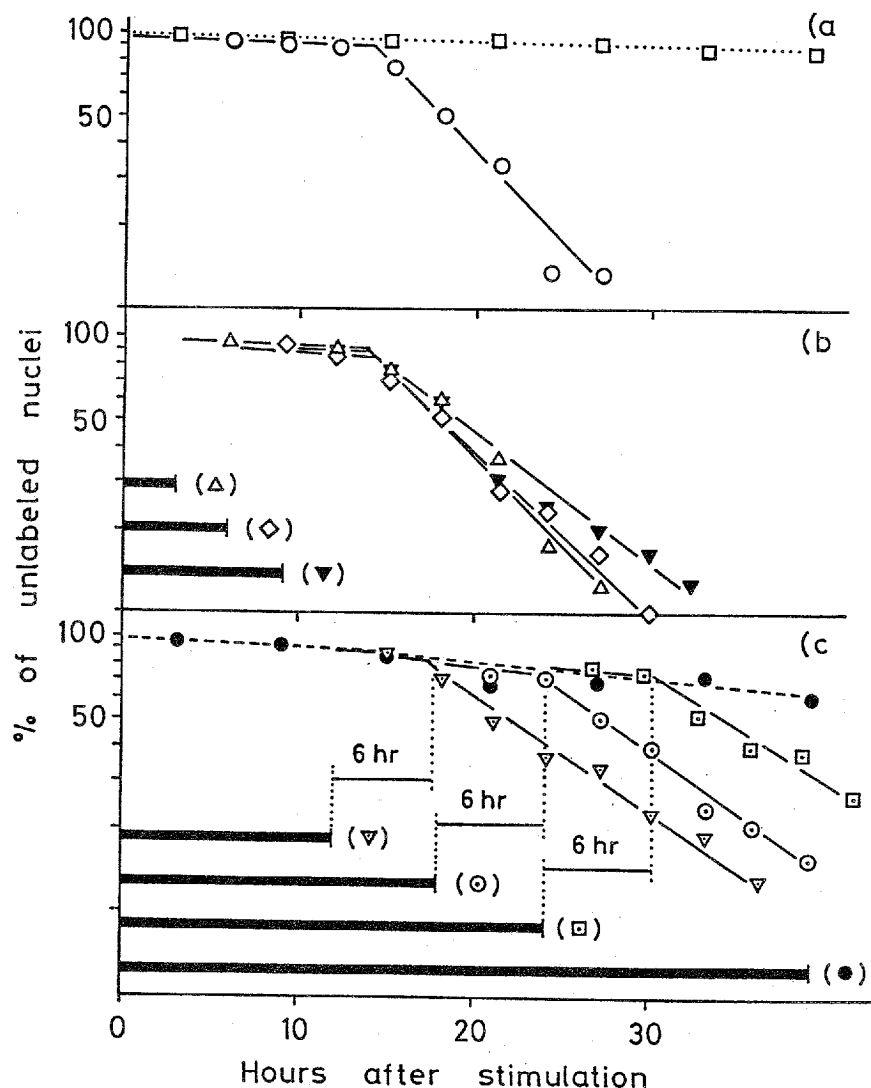


図 10. 増殖誘導後のS期への進入に対するサイトカラシンDの影響

増殖誘導と同時に [methyl-³H] -チミジン (3 μ Ci/ml) とサイトカラシンD (0.6 μ g/ml) を添加した。その後サイトカラシンDは様々な時間で洗浄除去した。細胞は図に示した各時点で固定し、オートラジオグラフィを行った。a) 増殖誘導を行わなかったもの (□---□)、増殖誘導を行ったもの (○—○)、この2群はいずれもサイトカラシンD処理を行わなかった。b) 増殖誘導後サイトカラシンDを0~3時間 (Δ—Δ)、0~6時間 (◇—◇)、0~9時間 (▼—▼) 処理したものの。c) 増殖誘導後サイトカラシンDを0~12時間 (▽—▽)、0~18時間 (○—○)、0~24時間 (□—□)、0~39時間 (●---●) 処理したものの。黒い横棒は、それぞれのサイトカラシンD処理時間を表した。

する時期に処理した場合にのみ、S期への進入が阻害されるものと考えられる。その点をさらに明らかにするために以下の検討を行った。

増殖誘導後様々な時点から一定の時間サイトカラシンDで細胞を処理し、その後のS期への進入に与える影響を検討した。サイトカラシンDに対して高感受性の段階を含まないと考えられる0～7時間及び11～18時間までの処理を行った場合には、S期の開始に遅れは認められず、細胞は増殖誘導のみ行った場合と同様に16時間後付近からS期へと進入した(図 11-a)。

一方、高感受性の段階を含んでいると考えられる5～12時間及び8～15時間の間サイトカラシンDを処理した場合には、先の実験結果と同様にサイトカラシンDを除去してからS期が開始するまでに約6時間の遅れが認められた(図 11-b)。

サイトカラシンDを除去してからS期の開始までの遅れは、サイトカラシンDの洗浄除去が不十分なためである可能性が考えられた。そこで、増殖誘導と同時に細胞にサイトカラシンDを添加し、18時間処理した後、除去した場合のマイクロフィラメントの構造の回復を、NBD-ファラジジン染色によって経時的に観察した。

サイトカラシンDを処理した細胞では、先に示したと同様に太いアクチンケーブルはほとんど観察されなかった(図 12-a)。しかし、サイトカラシンDを除去した後は30分から1時間の間に一過的な偽足の伸展が観察され、それと同時に細胞内のアクチンケーブルの再形成が起った(図 12-b, c)。3時間以降では、細胞形態及びアクチンケーブルはほぼ完全に回復した(図 12-d, e)。これは、サイトカラシンDを除去してからS期への進入開始までの時間よりもかなり早いものであった。このことから、サイトカラシンDを除去した後のS期開始時間の遅れは、洗浄の不十分なことによるのではないと推察された。

以上の結果より、サイトカラシンDは増殖誘導8～10時間すなわちS期開始前6～7時間の段階の進行を特異的にしかも可逆的に阻害することが示された。

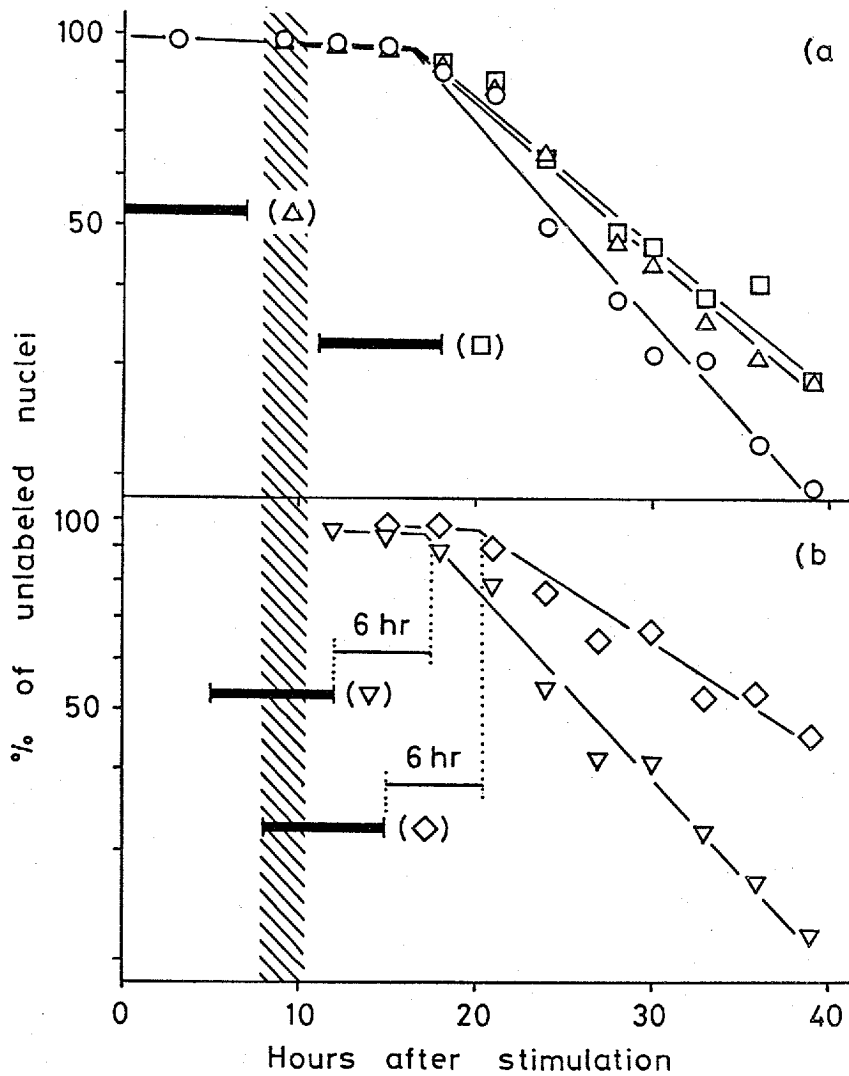


図 11. サイトカラシンD感受性の段階の限定

増殖誘導と同時に細胞を [methyl-³H] -チミジン (3 μ Ci/ml) で標識した。その後種々の時間からサイトカラシンD (0.6 μ g/ml) で7時間処理した。a) 増殖誘導のみ行ったもの (○-○)、増殖誘導後0~7時間 (△-△)、11~18時間 (□-□) サイトカラシンD処理を行ったもの。b) 増殖誘導後5~12時間 (▽-▽)、8~15時間 (◇-◇) サイトカラシンD処理を行ったもの。黒い横棒は、それぞれのサイトカラシンD処理の時期を示し、斜線部は、仮想的なサイトカラシンD感受性の段階を表した。

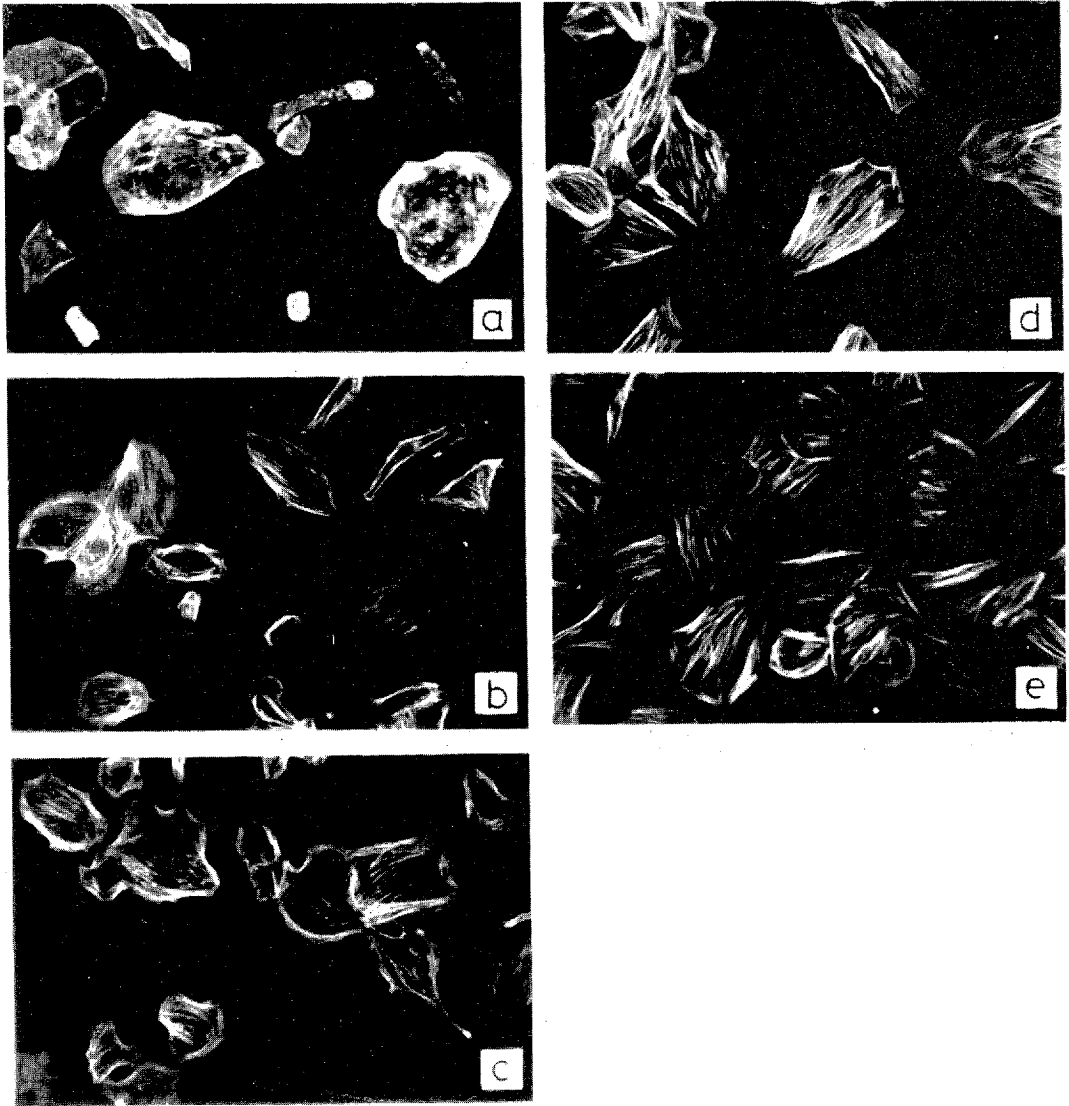


図 12. サイトカラシンD除去後の細胞内のミクロフィラメントの構造の回復

増殖誘導と同時にサイトカラシンD ($0.6 \mu\text{g/ml}$) を細胞に添加した。18時間後サイトカラシンDを除去し、その後のミクロフィラメントの構造の回復をNBD-ファラシジン染色によって観察した。サイトカラシンD除去後 a ; 0時間、b ; 0.5時間、c ; 1時間、d ; 3時間、e ; 6時間。倍率100倍

第六項 増殖誘導後のマイクロフィラメントの変化

増殖誘導後の過程、特にサイトカラシンDに高感受性の段階の付近で、マイクロフィラメントの構造に特徴的な変化が起るか否かを見るために、NBD-ファラシジンによる染色を行った。増殖誘導後経時的に観察したが、サイトカラシンDに対して高感受性の段階である増殖誘導後8～10時間の時点においても、マイクロフィラメントの構造に顕著な変化は認められなかった(図 13)。

さらに、DNase I 阻害測定法によって、増殖誘導後の細胞内のアクチンモノマー(G-アクチン)の割合を測定した。この場合にも、アクチンモノマーの割合は増殖誘導後すべての時間を通じて40%前後と安定しており、経時的な変化は認められなかった(図 14)。

第四節 小括

低濃度(0.6 $\mu\text{g/ml}$)のサイトカラシンDによって、血清によるG₀期からS期への増殖誘導は阻害された。本章で得られた結果より以下のことが推論された。

サイトカラシンDの存在下においても、細胞は血清刺激に反応し、増殖誘導後8～10時間すなわちS期開始の6～7時間前の段階までは進行することが可能であった。サイトカラシンDは、増殖誘導後8～10時間の段階の進行のみを可逆的に阻害し、サイトカラシンDが存在する限りは細胞の進行は停止した。しかし、薬物を除去すると進行は速やかに再開され、約6時間の後に細胞はS期へと進入した。

以上より、マイクロフィラメントは増殖誘導後8～10時間すなわちS期開始の6～7時間前の段階で、細胞周期の進行に関連した重要な機能を果たしていると考えられた。

しかし、血清による増殖誘導の後においても、アクチンケーブルの形態やアクチンモノマーの割合で見える限り、マイクロフィラメントの構造に顕著な変化は認められなかった。また、サイトカラシンDによるS期への進入の阻害と、アクチンケーブルの消失とは、個々の細胞レベルでは完全な相関関係は見られなかったが、全体としては比較的良く対応した。サイトカラシンDによるS期への進入の阻害は、アクチン-マイクロフィ

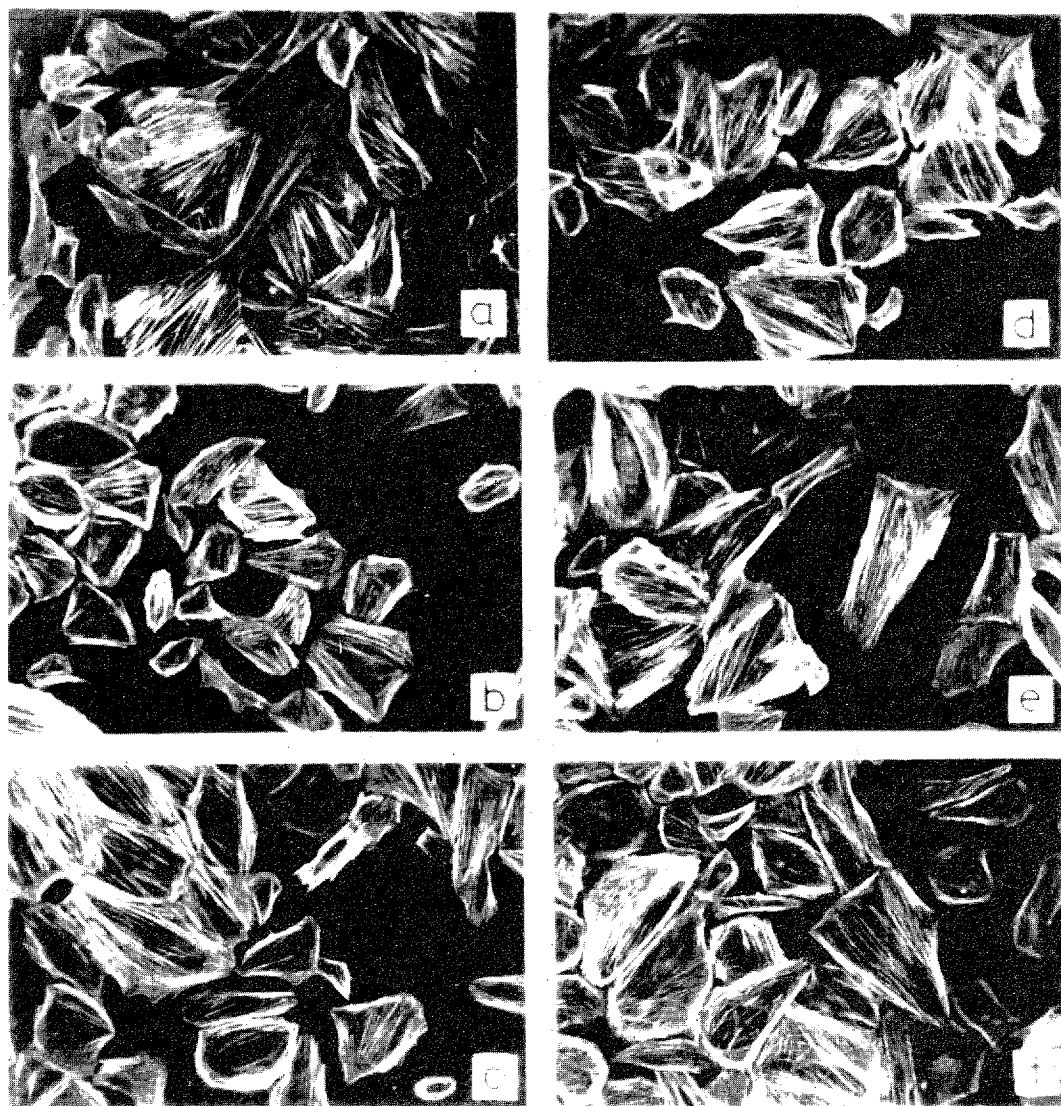


図 13. 増殖誘導後の細胞内のマイクロフィラメントの変化
 増殖誘導後の細胞内のマイクロフィラメントをNBD-ファラジン染色
 によって観察した。a ; 増殖誘導を行わなかったもの、増殖誘導後 b
 ; 0.5時間、c ; 3時間、d ; 6時間、e ; 10時間、f ; 24時間のもの。
 倍率100倍

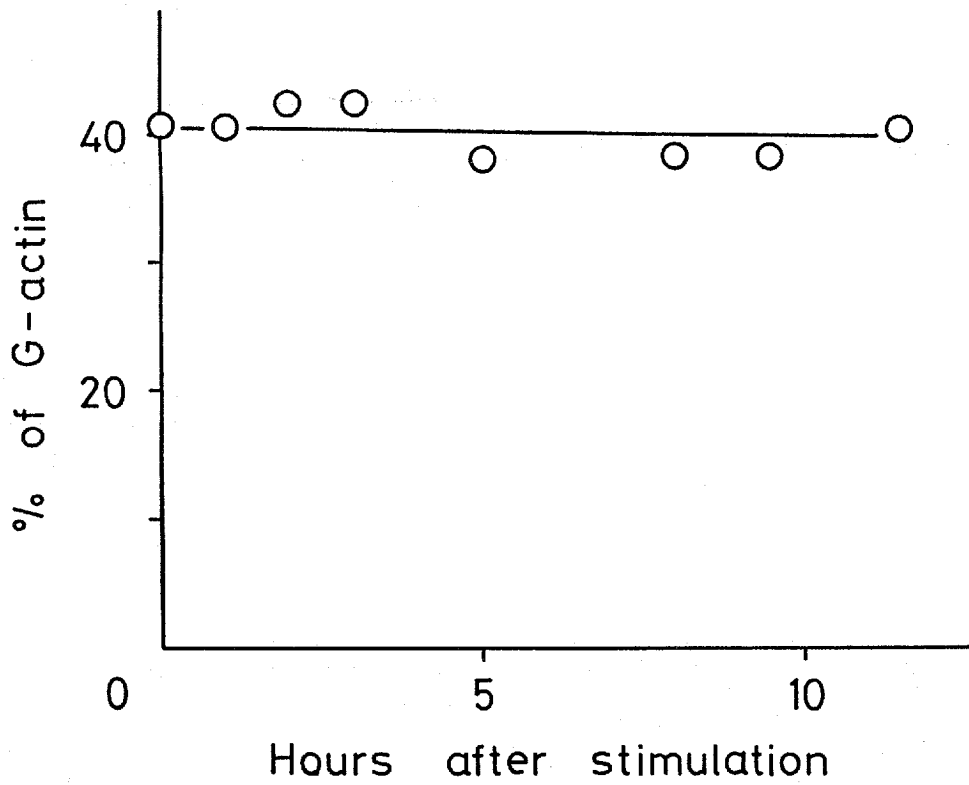


図 14. 増殖誘導後の細胞内のG-アクチンの割合の変化
増殖誘導後各時点で細胞内のG-アクチンの割合をDNase I阻害測定法によって測定した。

ラメント系への作用を介しているものと介していないものとの2つの可能性が考えられる。先に述べた様に、サイトカラシンDのアクチン-マイクロフィラメント系以外への作用は現在のところ知られていない。一方、サイトカラシンDは *in vitro* ではアクチンの重合を阻害し、アクチン繊維によるゲルを破壊する。また、*in vivo* においても細胞内のマイクロフィラメントのネットワークを破壊し、アクチン繊維を遊離させることなど数多くの例が知られており、サイトカラシンDの作用はアクチン-マイクロフィラメント系への作用を介しているとする考えが一般に受け入れられている。サイトカラシンDの作用が、アクチン-マイクロフィラメント系以外への作用を介して働いている可能性は完全には否定できないが、本研究の場合にもアクチン-マイクロフィラメント系への作用と考えるのが妥当であろう。しかし、マイクロフィラメントへの作用とDNA合成への作用とが必ずしも完全に相関しないのは、サイトカラシンDによる阻害がアクチンケーブル等の巨視的な構造変化によるものではなく、現在の方法では検出されない様な微細なマイクロフィラメントの構造変化によるものである可能性が強いように思われる。この微細構造の変化がG₀期からS期への進行に必須な機能を果しているものと考えている。

なお、先に述べた様に、増殖誘導の過程には微小管も関与していることが示唆されているが、この場合にも増殖誘導の後に特徴的な微小管の形態変化は観察されていない。本研究の場合も、これに類似しているのかもしれない。

第五章 高分子合成に対するサイトカラシンDの影響

第一節 緒言

前章の結果から、サイトカラシンDは増殖誘導後8~10時間すなわちS期開始前6~7時間という特異的な段階の進行を阻害することが示された。増殖誘導後G₀期からS期への過程では、DNA合成に向けて細胞内の様々な活性が上昇し、なかでもRNA合成、蛋白合成が顕著に上昇する。そこで、サイトカラシンDによって阻害されるS期開始前6~7時間の特異的な時点が、高分子合成の面から特徴づけられるか否かを検討した。

第二節 実験材料及び実験方法

1. 細胞

第四章と同じ。

2. 培養条件、G₀期への導入、増殖誘導

第二章と同じ。

3. 放射性前駆体の酸不溶性画分への取り込みによる高分子合成の測定

直径13mmのカバーグラス上に撒き込んだ細胞をG₀期に導入した。血清による増殖誘導を行った後所定の時間で[methyl-³H]-チミジン(5 μCi/ml)、[5-³H]-ウリジン(5 μCi/ml)、L-[4,5-³H]-ロイシン(2 μCi/ml)でそれぞれ別個に1時間標識した。なお、L-[4,5-³H]-ロイシンを添加する場合には、標識期間のみ培地を10%透折牛血清を含むロイシン欠乏MEM培地に交換した。その後、細胞をPBSで洗浄し冷5%TCAで固定、水洗後酸不溶性画分に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンター(Packard 3320型)で測定した。

4, ヒドロキシウレアによる細胞の同調

G₀ 期に導入した細胞に増殖誘導を行うと同時に、ヒドロキシウレア (1 mM) を添加し、30時間処理した後培地にて洗浄除去した。

5, 核DNAのヌクレアーゼに対する感受性

G₀ 期に導入した細胞に血清によって増殖誘導を行った後、15時間から25時間までの間 [methyl-³H] -チミジン (1 μCi/ml) で標識した。その後細胞をPBSで洗浄し、0.25% Triton X-100を含む緩衝液中でホモジナイズし細胞を分画し核を単離した。単離した核を10⁶ 個/mlに希釈し、この液100 μlに対してDNase I の場合には1 U、micrococcal nucleaseの場合には10 mUを添加し、37℃湯浴中でインキュベートした。所定の時間の後、冷5% TCAを加え反応を停止し、酸不溶性画分に回収された放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。ヌクレアーゼを加えない場合の放射活性を100%として、各時間での放射活性の比率を表しDNAのヌクレアーゼに対する抵抗性を示した。

6, ヒストンの合成量の測定

G₀ 期に導入した細胞を増殖誘導を行った後、15時間から25時間までL- [4,5-³H] -ロイシン (1 μCi/ml) で標識した。その後、前述と同様の方法で核を単離した。核より2 N硫酸によってヒストンを抽出し、-20℃エタノールによって沈殿させ、取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、核内のDNA量を測定し、単位DNA量あたりの放射活性をヒストンの合成量として表した。

7, 試薬

DNase I、micrococcal nuclease、ヒドロキシウレア、シクロヘキシミドはSigma Chemicalより購入した。

その他の試薬は、第四章と同じ。

第三節 実験結果

第一項 DNA合成に対するサイトカラシンDの影響

増殖誘導のみ行った場合、[methyl-³H]—チミジンの酸不溶性画分への取り込みは15時間付近から増加し、細胞がS期へと進入しDNA合成を開始したことが示された。増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加した場合には、S期への進入が阻害されており、[methyl-³H]—チミジンの取り込みの増加は抑えられた。しかし、S期の初期である15時間後からサイトカラシンD (0.6 μg/ml) を添加した場合には、大きな阻害効果は認められず、対照群とほぼ同様に [methyl-³H]—チミジンの酸不溶性画分への取り込みは増加した (図 15)。

DNA量は、増殖誘導後約15時間付近から増加が見られた。これは、[methyl-³H]—チミジンの酸不溶性画分への取り込み及びオートラジオグラフィからの結果と良く一致し、細胞は増殖誘導後15時間付近からS期へと進入することが確認された。サイトカラシンDは、増殖誘導と同時に添加した場合にはDNA量の増加を阻害したが、S期の初期である15時間後与えた場合にはDNA量の増加に大きな影響を与えなかった (図 16)。これは、先にオートラジオグラフィで示した増殖誘導後10時間以降ではサイトカラシンDはもはやS期への進入を阻害しないという結果 (図 9) を支持した。以上の様に、DNA合成自体はサイトカラシンDによって大きな影響を受けないことが示唆された。

第二項 RNA合成に対するサイトカラシンDの影響

酸不溶性画分への [5-³H]—ウリジンの取り込みは増殖誘導直後からある程度増加し、その後S期の開始とほぼ同時にさらに増加し、RNA合成が上昇することが示された。増殖誘導直後の取り込みの増加は、先に示した様にウリジンの膜輸送系の活性が上昇したためであり (図 7)、その後の取り込みの増加がRNA合成の上昇を示しているものであろうと考えている。増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加した場合、ごく初期の取り込みの上昇は対照群と同様に見られたが、その後の取り込みは阻害された。また、S期の初期である増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを添加した場合にも、その後の取り込みの増加は抑制

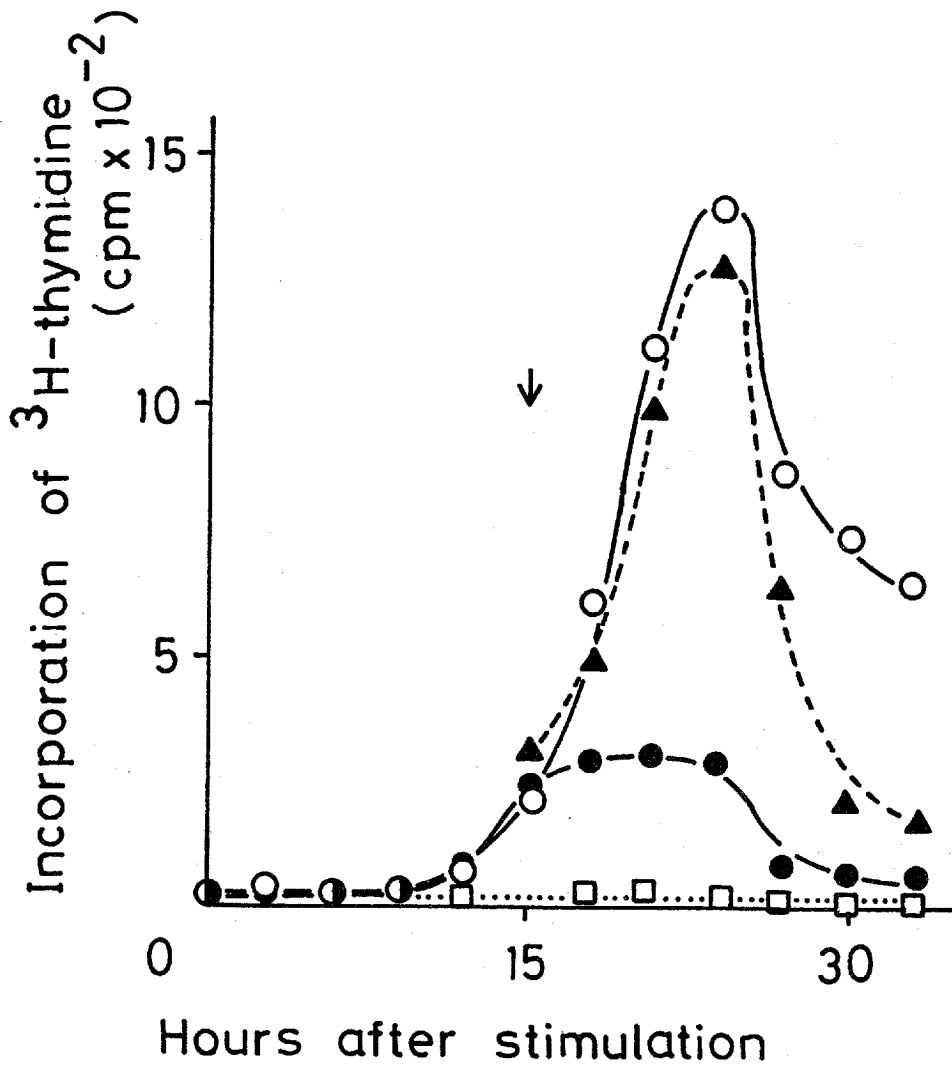


図 15. 酸不溶性画分への [methyl-³H] -チミジンの取り込み
 に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時間から [methyl-³H] -チミジン (5 μCi/ml) で細胞
 を1時間標識した。増殖誘導を行わなかったもの (□---□)、増殖誘導
 のみ行ったもの (○—○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD (0.6
 μg/ml) を添加したもの (●—●)、増殖誘導後15時間からサイトカラ
 シンDを添加したもの (▲---▲)。

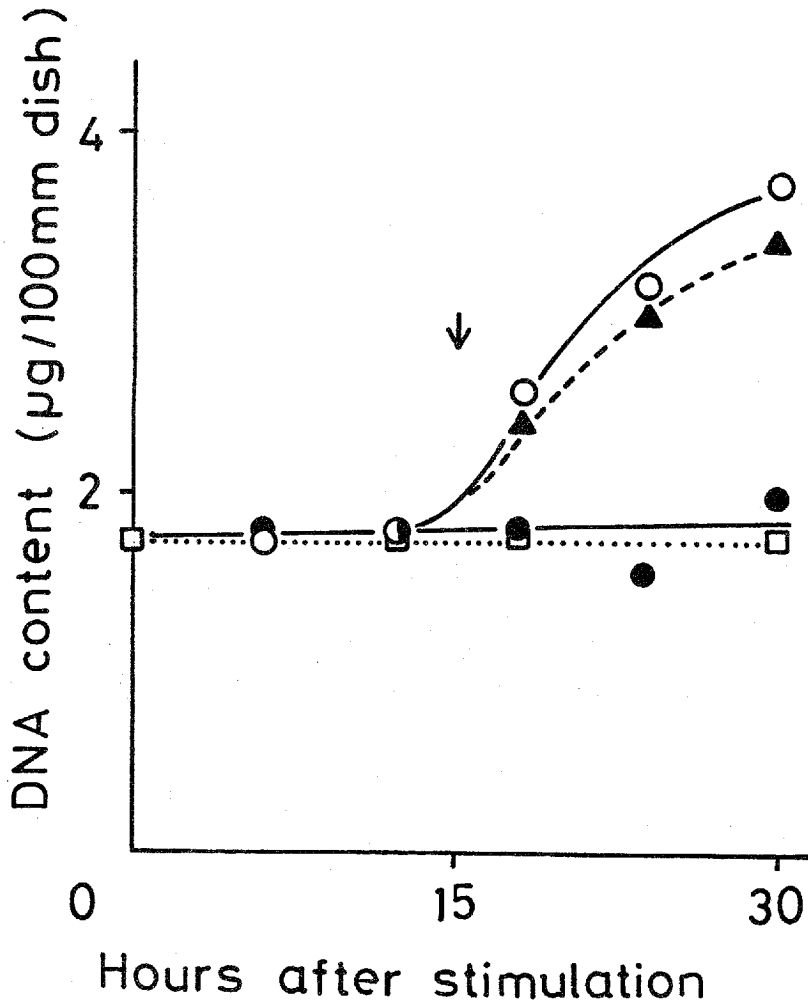


図 16. DNA合成に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時点でのDNA量を測定した。増殖誘導を行わなかったもの(□...□)、増殖誘導のみ行ったもの(○-○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD(0.6 µg/ml)を添加したもの(●-●)、増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを添加したもの(▲---▲)。

された (図 17)。

RNA量は、サイトカラシンDを増殖誘導と同時に添加した場合には、S期での増加は阻害された。ところが、S期の初期である15時間後からサイトカラシンDを与えた場合には、 $[5-^3\text{H}]$ -ウリジンの取り込みは阻害されているにもかかわらずRNA量は対照群とほぼ同様に増加した (図 18)。

以上の結果から、サイトカラシンDは増殖誘導と同時に添加した場合にはRNA合成の上昇を阻害するが、S期の初期である15時間後から加えた場合には細胞内へのウリジンの取り込みは阻害するものの、RNA合成は阻害しないことが示された。この場合、S期におけるRNAの分解をサイトカラシンDが抑制したために真の合成は阻害されているにもかかわらず、RNA合成が進行しているように見えるという可能性も考えられる。しかし、全RNAの90%以上を占めるr-RNAは比較的安定であり、特にS期において分解が促進されるという例は知られておらず、サイトカラシンDによって分解が抑制されるとは考え難い。このことから、サイトカラシンDは、RNA合成機構自体を直接阻害するものではないと考えられる。

第三項 蛋白合成に対するサイトカラシンDの影響

増殖誘導を行った細胞でのL- $[4,5-^3\text{H}]$ -ロイシンの酸不溶性画分への取り込みは、S期の開始にやや先だって増殖誘導後9~12時間から増加し始めた。サイトカラシンDは増殖誘導と同時に添加した場合にも、S期の初期である15時間後から与えた場合にも、その後の取り込みの増加を速やかに阻害した。しかし、完全には阻害せず、S期付近で増加する部分だけを阻害した (図 19)。

蛋白量に関しては、サイトカラシンDは常に添加後の蛋白量の増加を抑制した (図 20)。なお、増殖誘導直後に蛋白量が多少増加するのは、合成が上昇したためではなく培地中に含まれる血清蛋白が細胞に吸着したためであろうと考えている。

以上の結果から、サイトカラシンDは蛋白合成を阻害することが示された。

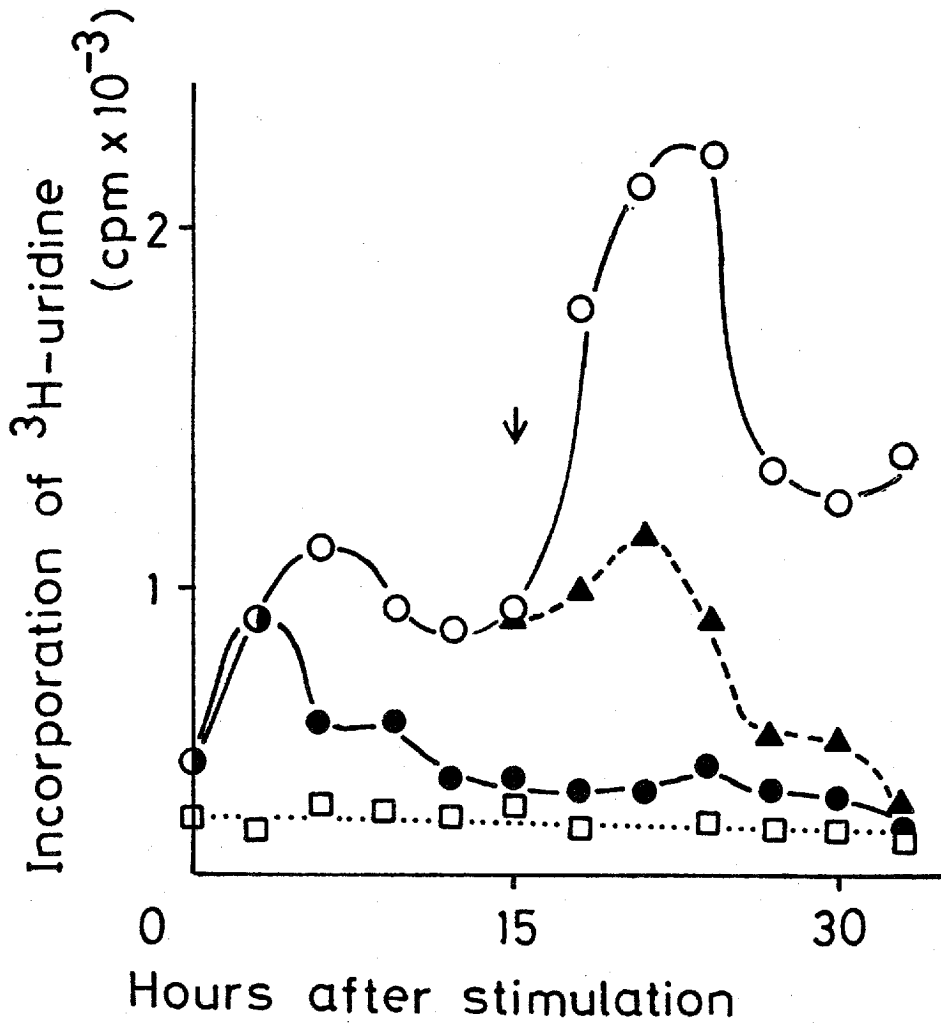


図 17. 酸不溶性画分への $[5-^3\text{H}]$ -ウリジンの取り込みに対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時間から $[5-^3\text{H}]$ -ウリジン ($5 \mu\text{Ci/ml}$) で細胞を1時間標識した。増殖誘導を行わなかったもの ($\square \cdots \square$)、増殖誘導のみ行ったもの ($\circ - \circ$)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD ($0.6 \mu\text{g/ml}$) を添加したもの ($\bullet - \bullet$)、増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを添加したもの ($\blacktriangle - \blacktriangle$)。

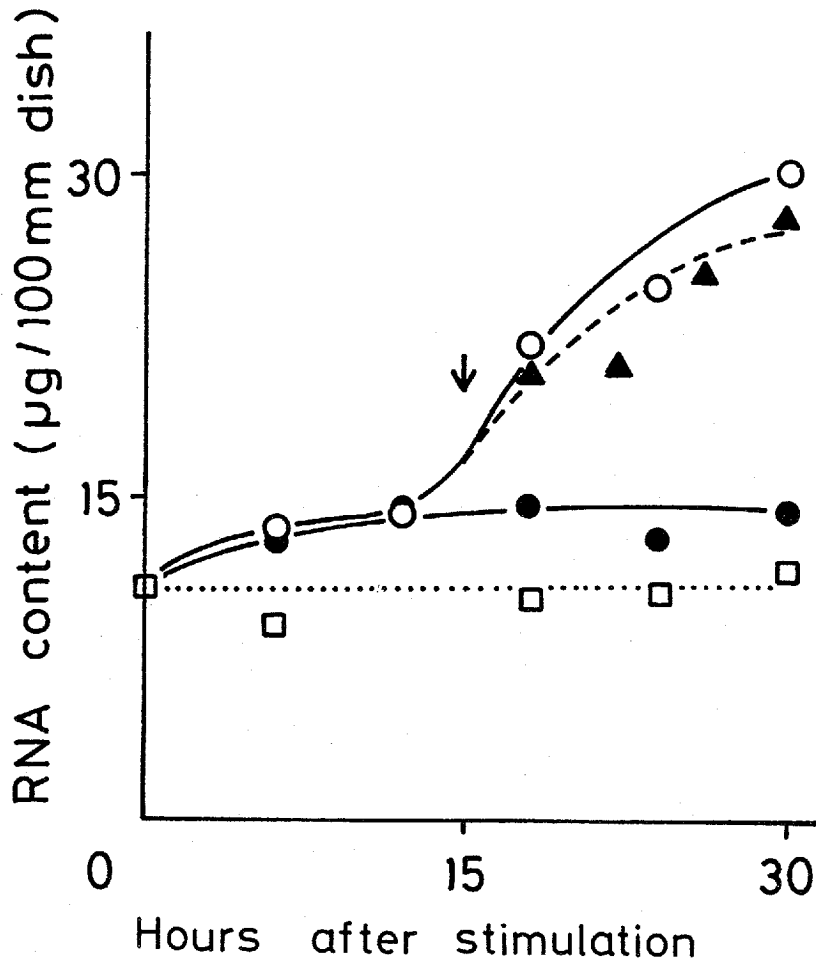


図 18. RNA合成に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時点でのRNA量を測定した。増殖誘導を行わなかったもの(□...□)、増殖誘導のみ行ったもの(○—○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD(0.6 µg/ml)を添加したもの(●—●)、増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを添加したもの(▲---▲)。

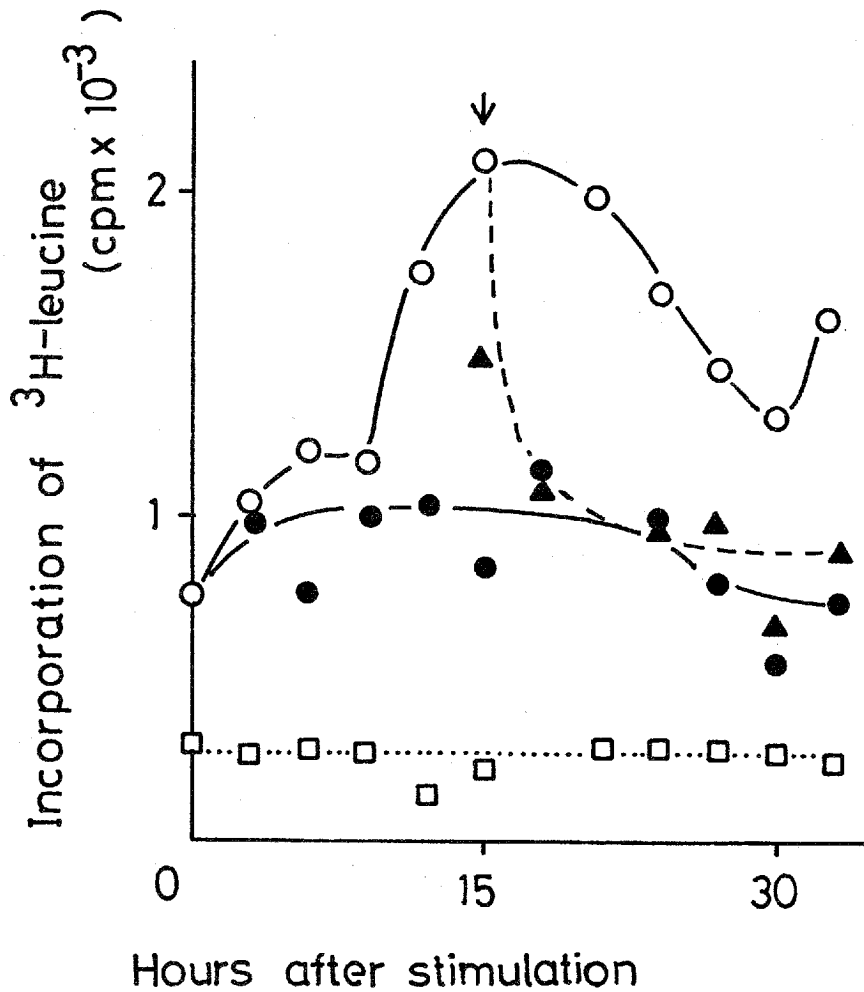


図 19. 酸不溶性画分への L-[4,5-³H]-ロイシンの取り込み
 に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時間から L-[4,5-³H]-ロイシン (2 μ Ci/ml) で細胞
 を1時間標識した。増殖誘導を行わなかったもの (□---□)、増殖誘導
 のみ行ったもの (○—○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD (0.6
 μ g/ml) を添加したもの (●—●)、増殖誘導後15時間からサイトカラ
 シンDを添加したもの (▲---▲)。

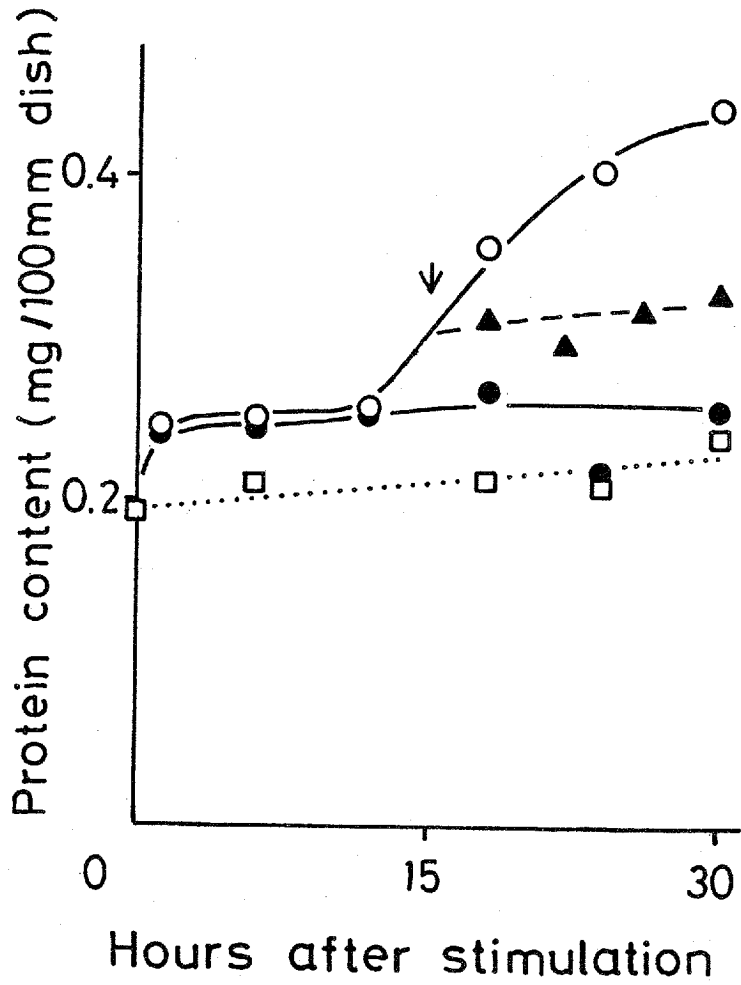


図 20. 蛋白合成に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導後各時点での蛋白量を測定した。増殖誘導を行わなかったもの
 (□····□)、増殖誘導のみ行ったもの(○—○)、増殖誘導と同時にサ
 イトカラシンD (0.6 μ g/ml)を添加したもの(●—●)、増殖誘導後
 15時間からサイトカラシンDを添加したもの(▲---▲)。

第四項 ヒドロキシウレアによる細胞のS期への同調

S期の進行に対するサイトカラシンDの効果をより明らかにするために、ヒドロキシウレアによって細胞をS期に同調し、高分子合成に対するサイトカラシンDの影響を検討した。ヒドロキシウレアは、DNA合成を阻害し細胞をS期のごく初期に停止させることが知られている(63, 64)。そこで、G₀期の細胞に増殖誘導を行うと同時にヒドロキシウレア(1 mM)を処理し、S期の初期に同調した。その後ヒドロキシウレアを洗浄除去し、同時にサイトカラシンDを添加してその後の放射性前駆体の酸不溶性画分への取り込みを検討した。

[methyl-³H]ーチミジンの取り込みは、サイトカラシンDの有無にかかわらずヒドロキシウレアを除去した直後から増加が見られ、その後の過程もほぼ同様に進行した(図 21-c)。

また、[5-³H]ーウリジン、L-[4,5-³H]ーロイシンの酸不溶性画分への取り込みも、ヒドロキシウレア除去直後から増加が見られた。なお、この二者に関しては、ヒドロキシウレア存在下においてもかなり高い取り込みが見られた。これは、細胞としてはすでにS期の状態にあり、膜輸送系またはRNA、蛋白の合成系が高くなっているためであろうと考えている。サイトカラシンDは、先の結果と同様にこの二者の取り込みを阻害した(図 21-a, b)。

ヒドロキシウレアによって細胞をS期に同調した系においても、サイトカラシンDはDNA合成を阻害せず、S期の進行には影響を与えないことが示された。

第五項 サイトカラシンD存在下におけるクロマチン蛋白の供給

従来、蛋白合成が停止すると直ちにDNA合成も停止することから(65)、DNA合成は蛋白合成に強く依存していると言われている。ところが、先に示したようにサイトカラシンDをS期の細胞に与えた場合には、蛋白合成が低下したにもかかわらずDNA合成は大きな影響を受けなかった。この場合、DNA合成に必要な蛋白はすでに合成されており、DNAの合成は新たな蛋白の供給がない状態においても進行する、また

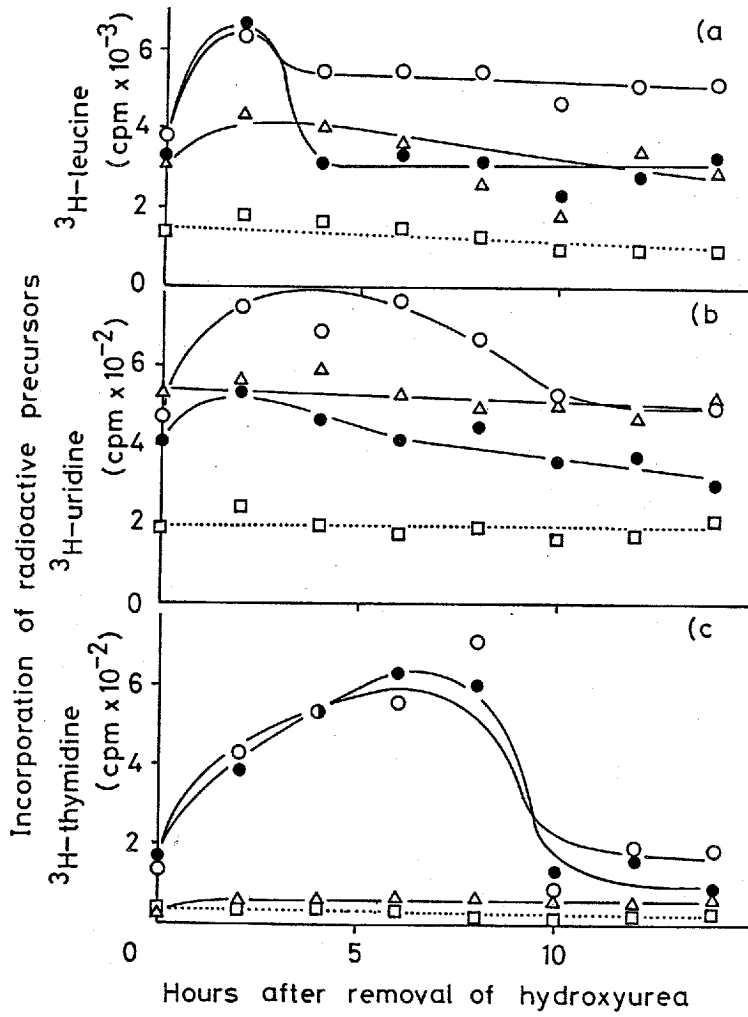


図 21. ヒドロキシウレアにより細胞をS期に同調した場合の放射性前駆体の酸不溶性画分への取り込みに対するサイトカラシンDの影響

増殖誘導と同時にヒドロキシウレア (1 mM) を細胞に添加し30時間培養してS期に同調した。その後ヒドロキシウレアを除去し、各時点から1時間 [methyl- ^3H] -チミジン (5 $\mu\text{Ci/ml}$)、[5- ^3H] -ウリジン (5 $\mu\text{Ci/ml}$)、L-[4,5- ^3H] -ロイシン (2 $\mu\text{Ci/ml}$) でそれぞれ標識した。a) L-[4,5- ^3H] -ロイシン、b) [5- ^3H] -ウリジン、c) [methyl- ^3H] -チミジンの取り込み。増殖誘導を行わず、ヒドロキシウレア処理も行わなかったもの ($\square \cdots \square$)、増殖誘導を行いヒドロキシウレアを除去しなかったもの ($\triangle - \triangle$)、ヒドロキシウレアを除去したもの ($\circ - \circ$)、ヒドロキシウレア除去と同時にサイトカラシンD (0.6 $\mu\text{g/ml}$) を添加したもの ($\bullet - \bullet$)。

は、DNA合成に關与する酵素やクロマチン蛋白等DNAの合成に必要な蛋白の合成だけは維持されているという可能性が考えられた。しかし、従来DNA合成とヒストンの合成とは同調的に起ることが知られている(66)。DNAは核内でヒストン等のクロマチン蛋白と結合し、ヌクレオソーム構造をとり、さらにクロマチンを形成している(67,68)。蛋白合成阻害剤によって蛋白合成を低下させた条件下では、わずかに合成されたDNAはクロマチン蛋白の供給が充分ではなく、完全なヌクレオソームが形成できないためにDNAが露出しており、各種ヌクレアーゼに対して感受性が増していることが知られている(69)。本実験において、サイトカラシンD存在下クロマチン蛋白の合成が低下しているならば、その条件下で合成されたDNAはヌクレアーゼに対して感受性が増していることが予想された。

単離した核をDNase Iを用いて処理したところ、DNAは経時的に分解された。代表的な蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド(1 μ g/ml)によって処理した群では、DNase Iに対して明らかに感受性が増していることが示され、クロマチン蛋白の不足が推察された。しかし、サイトカラシンDによる処理を行った場合には、わずかに感受性が増しているだけで顕著な差は見られなかった(図 22)。

さらに、別種のヌクレアーゼであるmicrococcal nucleaseに対する感受性をも検討した。この場合にも、対照群とサイトカラシンD処理群との間に感受性の差は認められなかった(図 23)。

また、細胞の核より2N硫酸によってヒストンを多く含むと思われる画分を抽出し、その合成量を比較した。L-[4,5- 3 H]-ロイシンの取り込みによる合成量は、シクロヘキシミド処理群にのみ顕著な低下が認められたが、サイトカラシンD処理の場合には対照群との間に顕著な差は認められなかった(表 2)。

以上の結果より、サイトカラシンDの存在下細胞全体としての蛋白合成が低下した状態においてもクロマチン蛋白の供給には大きな変化はなく、DNAはヌクレオソーム構造を形成していることが示唆された。これは、通常用いられている蛋白合成阻害剤とは大きく異なる作用であった。

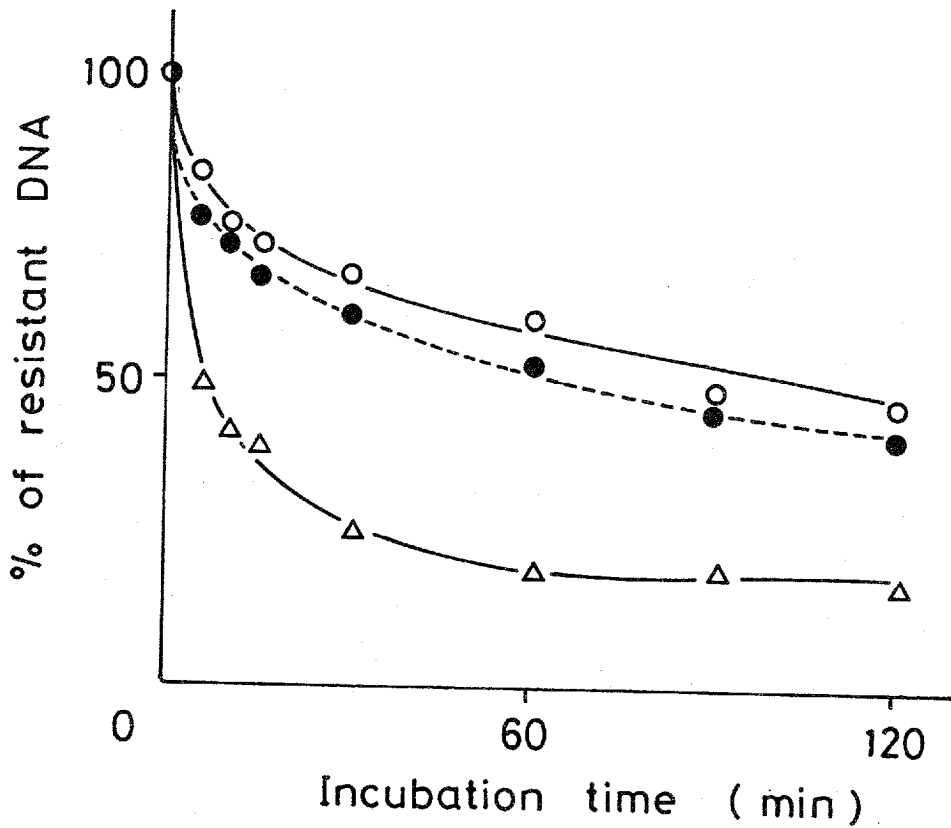


図 22. サイトカラシンD存在下合成されたDNAのDNase I に対する感受性
 増殖誘導後 15時間から 25時間までサイトカラシンD (0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) またはシクロヘキシミド (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を細胞に添加し、同時に [methyl- ^3H] -チミジン (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) で標識した。その後核を単離し、DNase I (1 U/ 10^5 核/ $100\mu\text{l}$) と共に 37°C でインキュベートした。増殖誘導のみ行ったもの (○-○)、サイトカラシンDを処理したもの (●-●)、シクロヘキシミドを処理したもの (△-△)。

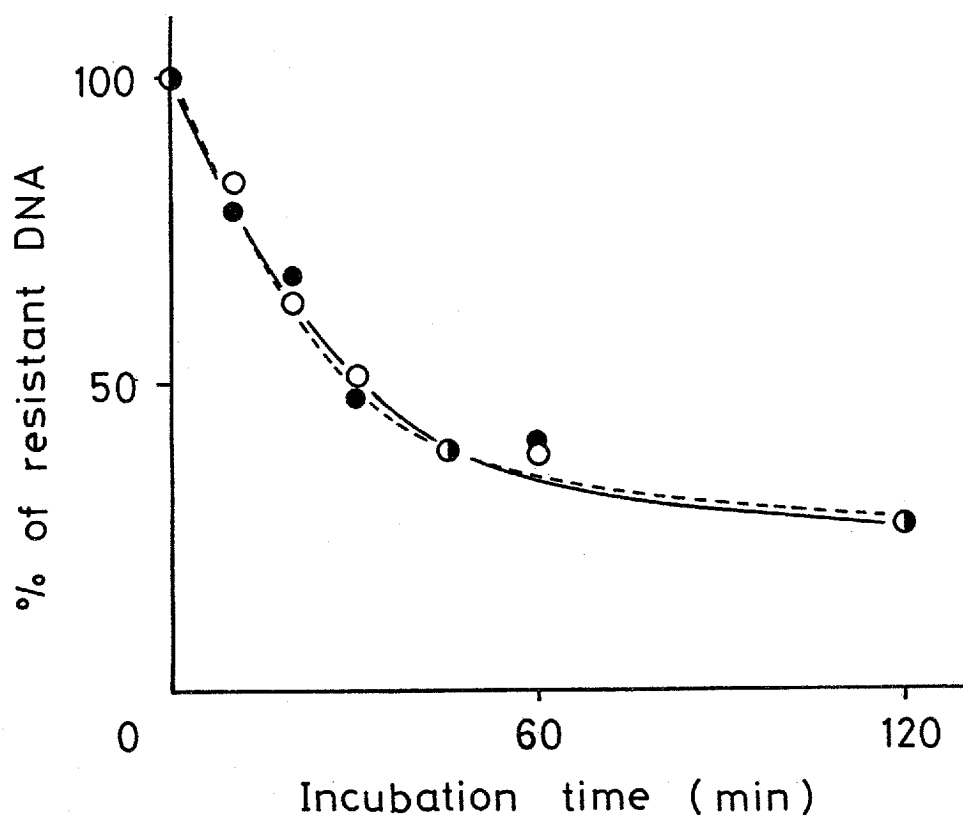


図 23. サイトカラシンD存在下において合成されたDNAの micrococcal nucleaseに対する感受性
 増殖誘導後15時間から25時間までサイトカラシンD (0.6 μ g/mlまたはシクロヘキシミド (1 μ g/ml) を細胞に添加し、同時に [methyl- 3 H] -チミジン (1 μ g/ml) で標識した。その後核を単離し、micrococcal nuclease (10 mU/ 10^5 核/ 100μ l) と共に37℃でインキュベートした。増殖誘導のみ行ったもの (○—○)、サイトカラシンDを処理したもの (●---●)。

表 2. サイトカラシンD存在下におけるヒストン蛋白の合成
増殖誘導後15時間から25時間までサイトカラシンD (0.6 $\mu\text{g/ml}$) またはシクロヘキシミド (1 $\mu\text{g/ml}$) を細胞に添加し、同時にL- [4,5- ^3H] -ロイシン (1 $\mu\text{Ci/ml}$) で標識した。その後核よりヒストン画分を抽出した。

Treatment	Incorporation of ^3H -leucine (cpm/ μg DNA)
None	77.9
Cytochalasin D (0.6 $\mu\text{g/ml}$)	63.9
Cycloheximide (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	17.3

第四節 小括

0.6 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンDによっても、DNA合成及びRNA合成は阻害を受けなかった。高分子合成の中では、蛋白合成だけが阻害されたが、ヒストン蛋白の供給には大きな変化は認められなかった。

近年、蛋白合成は細胞骨格に結合したポリソームによって行われていると考えられている(70~72)。本研究において、サイトカラシンDを細胞に添加することによって蛋白合成が阻害されたのは、その足場となる細胞骨格おそらくはマイクロフィラメントの構造を破壊したために、ポリソームの遊離を生じたためである可能性が考えられる。サイトカラシンBによってポリソームが細胞骨格から遊離するという報告もあり(70, 73)、本研究の結果を支持するものと考えられる。また、前章で示した様に、サイトカラシンDを添加した後のマイクロフィラメントの構造変化は30分以内に起り、蛋白合成の低下が速やかなこととも符合した。

これより、先に示したサイトカラシンDによる増殖誘導後8~10時間すなわちS期の6~7時間前の段階の阻害が、蛋白合成の阻害を介して作用している可能性が考えられた。また、S期においてはサイトカラシンDによって蛋白合成が低下しているにもかかわらず、ヒストン蛋白の供給には大きな変化は認められずDNA合成が進行することが示された。このことは、サイトカラシンDによる蛋白合成の阻害は、すべての蛋白質に対して同様に阻害するものではないことが示唆された。ヒストン蛋白などのDNA合成に必要な蛋白については、サイトカラシンDによる合成阻害を受けないためにDNA合成は進行するという可能性が考えられる。ヒストン蛋白とそれ以外の蛋白の合成系については以下の違いが知られている。真核生物の蛋白のm-RNAはその3'端にpoly(A)配列を有しているが、ヒストン蛋白のm-RNAにはpoly(A)配列が欠如している(74)。また、ヒストン蛋白の合成に関わるポリソームは、他の蛋白のポリソームよりもショ糖勾配密度遠心における沈降速度が小さい(75)。これは単にヒストンが蛋白として小さいためであるかもしれないが、これらm-RNAの構造の違いやポリソームの大きさの違いなどがサイトカラシンDによる蛋白合成の阻害に対して他の蛋白とは異なる阻害を受ける理由であるかもしれない。すなわち、シクロヘキシミド等の蛋白合成阻害剤では、リボソームの機能を直接阻害するために無差別に蛋白合成を阻害するが、サイトカラシンDの場合には、マイクロフィラメントの構造変化を介することが蛋白合成の阻害における選択性の理

由であるかもしれない。サイトカラシンDによって阻害される蛋白質と阻害されない蛋白質としてどのようなものが存在し、またその違いがどのような機構によって生じているのかについてはさらに検討を要するものと考える。

第六章 G₂ 期、M 期におけるサイトカラシン D の影響

第一節 緒言

前述の結果より、サイトカラシン D は増殖誘導後 8～10 時間すなわち、G₁ 期のうちで S 期開始の 6～7 時間前の段階でのみその進行を阻害し、その後の S 期の進行は阻害しないことが示された。本章では、S 期以降の過程である G₂ 期（S 期終了から細胞分裂開始までの期間）、その後の M 期（細胞分裂期）の進行に対するサイトカラシン D の影響を、細胞分裂指数及び細胞数の増加を指標として検討した。

第二節 実験材料及び実験方法

1. 細胞

第四章と同じ。

2. 培養条件、G₀ 期への導入、増殖誘導

第二章と同じ。

3. 細胞分裂指数

直径 13mm のカバーガラス上に撒き込んだ細胞を、G₀ 期に導入した。増殖誘導を行った後、細胞を光学顕微鏡で観察し、一定の視野あたり染色体の凝集が観察された分裂細胞と全細胞数を計数し、分裂期の細胞の頻度を計算した。

4. 試薬

第四章と同じ。

第三節 実験結果

増殖誘導のみ行った場合には、27時間後付近から分裂像の増加が認められ、細胞がM期へと進入したことが示された。その後分裂像は増加し、30時間付近を頂点とし35時間後には細胞はM期を通過したことが示された。増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加した場合には、前述の様にS期への進入が阻害されており、当然その後の過程であるM期への進入は僅かしか見られなかった。一方、S期の初期である15時間後からサイトカラシンDを添加した場合には、対照群よりはやや低いもののほぼ対照群と同様に分裂像の増加が認められ、細胞はS期からG₂期を経てM期へと進行していることが示された(図 24)。

また、ヒドロキシウレア処理によって細胞をS期の初期に同調しその後S期に進行させた場合にも、同時に添加したサイトカラシンDは分裂像の出現に大きな影響を与えなかった(図 25)。

さらに、増殖誘導後細胞が完全にM期を通過し終え、次の細胞周期へと進行したと思われる37時間後での細胞数を比較した。増殖誘導のみ行った場合には、細胞数は約2.3倍に増加しており、細胞が完全にM期を終了していることが示された。増殖誘導と同時にサイトカラシンDを添加した場合には、細胞数は約1.5倍に増加した。この実験条件では、サイトカラシンDの存在下においても約30%の細胞はG₀期からの脱出を阻害されないことから、細胞数は1.3倍程度には増加するはずであった。一方、S期の初期である増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを与えた場合には、細胞数は約2.6倍に増加し細胞数の増加に対する阻害は全く認められなかった(表 3)。また、この時点においては二核の細胞の増加は認められず、本実験で用いた濃度(0.6 μg/ml)のサイトカラシンDでは細胞質分裂は阻害されないことが示された。

第四節 小括

0.6 μg/mlのサイトカラシンDをS期の初期から細胞に添加した場合には、S期からG₂期を経てM期を終了するまでの過程は阻害されなかった。

これより、G₂期及びM期の進行におけるマイクロフィラメントの重要

性は、G₁ 期におけるよりも比較的低いものであろうと考えられた。

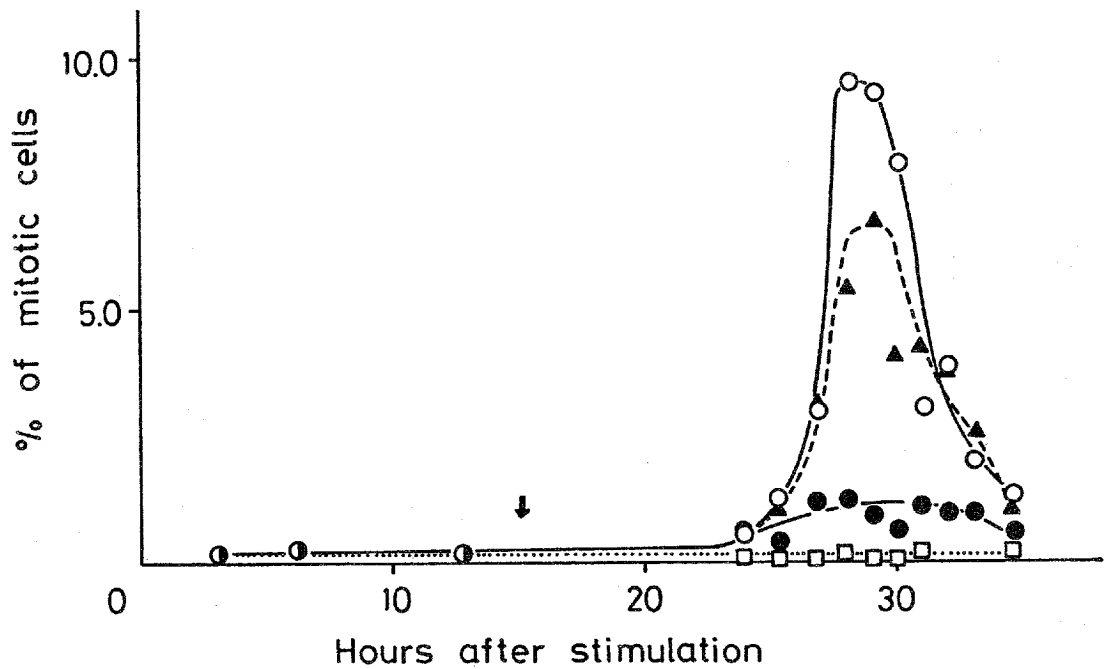


図 24. 増殖誘導後のM期への進行に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導を行っていないもの(□...□)、増殖誘導のみ行ったもの(○—○)、増殖誘導と同時にサイトカラシンD(0.6 μg/ml)を添加したもの(●—●)、増殖誘導後15時間からサイトカラシンDを添加したもの(▲---▲)。

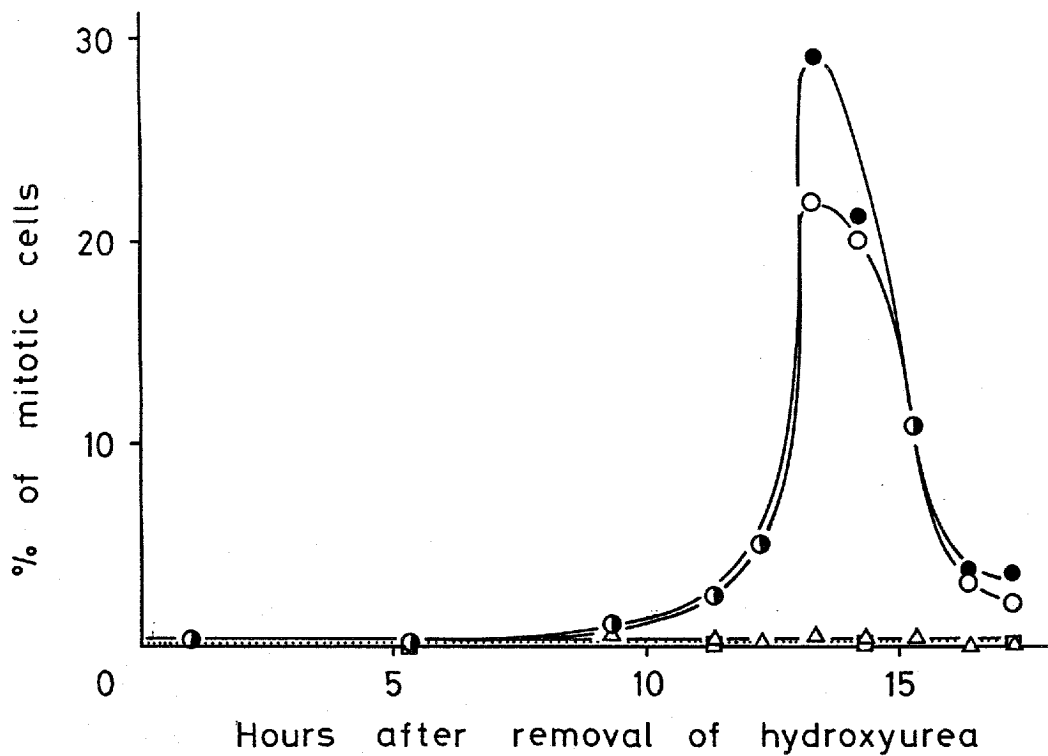


図 25. ヒドロキシウレアによって細胞をS期に同調した場合のM期への進行に対するサイトカラシンDの影響
 増殖誘導と同時に細胞にヒドロキシウレア (1 mM) を添加し、30時間培養してS期に同調した後ヒドロキシウレアを除去した。増殖誘導を行わず、ヒドロキシウレア処理も行わなかったもの (□……□)、増殖誘導を行いヒドロキシウレアを除去しなかったもの (Δ—Δ)、ヒドロキシウレアを除去したもの (○—○)、ヒドロキシウレア除去と同時にサイトカラシンD (0.6 μ g/ml) を添加したものの (●—●)。

表 3. 細胞分裂に対するサイトカラシンDの影響
 G₀の細胞に増殖誘導を行うと同時に、または15時間後からサイトカラシンD (0.6 μg/ml)を添加し、37時間後に細胞数を測定した。

Treatment	Cell No. (x10 ⁻⁵ /60 mm dish)
Unstimulated	1.98±0.20 ^{a)}
Stimulated	4.48±0.42
Stimulated + cytochalasin D (0.6 μg/ml) added at 0 hr	2.95±0.31
Stimulated + cytochalasin D (0.6 μg/ml) added at 15 hr	5.15±0.63

a) Mean±S.D. (n=8)

第七章 結論及び考察

培養細胞における、血清によるG₀期からの増殖誘導後の過程に与えるサイトカラシンDの影響を検討し、以下の知見を得た。

- 1, 増殖誘導後のS期への進入はサイトカラシンDによって濃度依存的に阻害された。0.6 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンDによって約60%の阻害が見られ、より高濃度においても1 $\mu\text{g/ml}$ 以下ではさらに大きな阻害は示さなかった。
- 2, サイトカラシンDによるS期への進入の阻害と細胞内のアクチンケーブルの消失とは、個々の細胞レベルでは完全な相関関係は見られなかった。しかし、全体としては比較的良い相関が認められた。
- 3, サイトカラシンD存在下においても、増殖誘導後の初期反応の一つであるウリジンの取り込みに影響は見られなかった。
- 4, サイトカラシンDは、増殖誘導後の全過程を阻害するのではなく、増殖誘導後8~10時間すなわちS期開始の6~7時間前の過程の進行のみ特異的かつ可逆的に阻害した。サイトカラシンDが存在する限り、細胞はその段階に留まった。
- 5, それ以後のS期、G₂期、M期の進行はサイトカラシンDによって阻害されなかった。
- 6, 高分子合成に関しては、DNA合成、RNA合成自体はサイトカラシンDによって阻害されず、蛋白合成だけが阻害された。
- 7, サイトカラシンDによって細胞全体の蛋白合成が低下した状態においても、ヒストン蛋白の供給に大きな変化は認められなかった。

サイトカラシンDによる効果は、ミクロフィラメントに対する作用を介している場合と、他の作用点に対する作用によっている場合との2つの可能性が考えられる。しかし、先にも述べた様に、ミクロフィラメントに対する作用と考えるのが妥当であると思われる。そうであれば、本研究におけるG₀期からS期への進行の過程において、ミクロフィラメントは重要な役割を果たしているものと考えられる。その場合、G₀期からS期への進行に必要なミクロフィラメントの構造は、アクチンケーブル等の巨視的なものではなく、より微細な構造であろうと推察される。

さらに、G₀期からS期までの過程の中で、ミクロフィラメントはS期開始の6~7時間前の段階において特に重要な機能を果たしており、そ

れが完全に機能しない場合には、その後の周期の進行が阻害されるものと考えられる。また、細胞がその段階を通過してしまえば、細胞周期の進行におけるマイクロフィラメントの重要性は低下し、マイクロフィラメントの構造が変化した状態においても、細胞は次の周期にまで進行すると考えられる。

マイクロフィラメントが特に重要な機能を果たすと思われるS期開始前6~7時間の段階は、高分子合成という面から考えると、S期の開始に向けてm-RNAや蛋白の合成が顕著に増加する時期である(76)。サイトカラシンDによって蛋白合成が阻害されることから、マイクロフィラメントは細胞周期の進行に必須な蛋白の合成を介して関与している可能性が考えられる。

マウス3T3細胞では、増殖誘導後培地中のグルタミン酸、イソロイシンなどのアミノ酸を欠乏させることによって、S期開始の6時間前で進行が停止することが報告され(77,78)、この点はV pointと呼ばれている。また、BHK細胞では、増殖誘導後に低濃度のシクロヘキシミドによって蛋白合成を弱く阻害すると、S期への進行が阻害され、やはりS期開始の6時間前で進行が停止することが報告され(79~81)、この点はrestriction pointと呼ばれている。しかしこれらの報告では、増殖誘導初期からこの時点までの継続的な蛋白合成または蛋白の蓄積が、この段階の通過に必要なのであろうと結論されているだけである。この段階だけが蛋白合成阻害に対して感受性が高い、もしくはこの段階での蛋白合成だけが周期の進行に特に必要であるということの意味するものではない。

本研究におけるサイトカラシンD感受性の段階がこのV pointあるいはrestriction pointに関係している可能性は否定できない。しかし、この二者の場合には、いずれも増殖誘導後その時点までの持続的な蛋白の合成が必要であると言われていたのに対して、本研究では、サイトカラシンDに対して感受性の高い時点が、S期開始の6~7時間前に限定されるという点で前二者とは異なる知見である。サイトカラシンDの阻害効果が蛋白合成の阻害を介して作用しているとしても、この特定の時点で合成される限られた蛋白がG₀期からS期への進行の過程において重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。

従来G₀期からS期までの過程の中期から後期には、細胞が増殖するか停止するかを決定する点が存在するものと考えられていた。しかし、

この時期に起る特徴的な現象を生化学的に捉えることができず、物質レベルでの研究は著しく遅れていた。今回、マイクロフィラメントが関与すると考えられる特異的な時点を捉えたことによって、その段階で起る生化学的な事象を集中的に解析し、特にそこで合成される蛋白の種類及びその機能を追求できる可能性を示したことは意義のあるものとする。

一方、S期においては蛋白合成を阻害するとDNA合成も停止すると言われてきた。ところが、サイトカラシンDによって蛋白合成を阻害した場合には、ヒストンの合成は抑えられず、DNA合成に必要な蛋白は優先的に合成されている可能性が示された。先に述べた様に、ヒストン蛋白はそのm-RNAの構造やポリソームのサイズが他の蛋白のものとは異なっていることが知られている。このような違いによって、マイクロフィラメントの構造に合成が密接に関連している蛋白と、マイクロフィラメントの構造に依存しない蛋白が存在する可能性が考えられる。このような合成系での区別が実際に存在するのか、また存在するとすればどのような蛋白が各々に含まれるのか、さらにその区別がどのような機構によって生じているのかについては、今後さらに検討を要するものとする。

今後、G₀期からS期への進行過程の中で、本研究によって示された特定の段階におけるマイクロフィラメントの役割及び蛋白合成との関連などについて研究を進めることにより、G₀期からS期への進行、ひいては細胞周期全体を制御する物質的根拠を解明する可能性が考えられる。

これらの点で、本研究によって得られた知見は、細胞増殖の制御を解析する上で意義のあるものとする。

参考文献

- 1) Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. & Kletzien, R. F. ; *Ann.Rev.Biochem.* (1978) **47**, 715-750
- 2) Hochhauser, S. T., Stein, J. L. & Stein, G. S. ; *Int. Rev.Cytol.* (1981) **71**, 96-243
- 3) Lindgren, A. & Westermark, B. ; *Exp.Cell Res.* (1976) **99**, 357-362
- 4) Holley, R. W., Baldwin, J. H., Kiernan, J. A. & Messmer, T. O. ; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1976) **73**, 3229-3232
- 5) Epifanova, O. I., Abuladze, M. K. & Zosimovskaya, A. I. ; *Exp.Cell Res.* (1975) **92**, 23-30
- 6) Martin, R. G. & Stein, S. ; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1976) **73**, 1655-1659
- 7) Nicolini, C., Kendall, F., Baserga, R., Dessaive, C., Clarkson, B. & Fried, J. ; *Exp.Cell Res.* (1977) **106**, 111-118
- 8) Robinson, J. H. & Smith, J. A. ; *J.Cell.Physiol.* (1976) **89**, 111-122
- 9) Skehan, P. ; *Exp. Cell Res.* (1976) **97**, 184-192
- 10) 日本組織培養学会編 ; "細胞成長因子 - Growth Factors -"
(1984) 朝倉書店 , 東京
- 11) Lindgren, A. & Westermark, B. ; *Exp.Cell Res.* (1977) **104**, 293-299
- 12) Rubin, H. & Steiner, R. ; *J.Cell.Physiol.* (1975) **85**, 261-270
- 13) Porter, K. R., Byers, H. R. & Ellisman, M. H. ; *The Neuroscience* (eds. Schmitt, F. O., Warden, F. G.) The MIT Press, Cambridge, Mass. (1979) pp. 703-722
- 14) Mohri, H. ; *Biochim.Biophys.Acta* (1976) **456**, 85-127
- 15) 黒川正則 ; "微小管" (1978)
講談社ニューサイエンティフィック , 東京

- 16) Ishikawa, H. ; Cell Motility : Molecules and Organization
(eds. Hatano, S., Ishikawa, H., Sato, H.) Univ. of Tokyo
Press, Tokyo (1979) pp. 417-444
- 17) Ishikawa, H., Bischoff, R. & Holtzer, H. ; J.Cell Biol.
(1969) **43**, 312-328
- 18) Lazarides, E. ; Ann.Rev.Biochem. (1982) **51**, 219-250
- 19) Henderson, D. & Weber, K. ; Exp.Cell Res. (1981) **132**,
297-311
- 20) Crossin, K. & Carney, D. H. ; Cell (1981) **23**, 61-71
- 21) Crossin, K.L. & Carney, D. H. ; Cell (1981) **27**, 341-350
- 22) Carley, W. W., Barak, L. S. & Webb, W. W. ; J.Cell Biol.
(1981) **90**,797-802
- 23) Boshek, C. B., Jockusch, B. M., Friis, R. R., Back, K.,
Grundmann, E. & Bauer, H. ; Cell (1981) **24**, 175-184
- 24) Edelman, G. M. & Yahara, I. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.
(1976) **73**, 2047-2051
- 25) Rifkim, D. B., Crowe, R. M. & Pollack, R. ; Cell (1979)
18, 361-368
- 26) Schlessinger, J. & Geigen, B. ; Exp.Cell Res. (1981) **134**,
273-279
- 27) Euteneuer, U. ; J.Cell Biol. (1984) **99**, 1045-1059
- 28) Leavitt, J. & Kakunaga, T. ; J.Biol.Chem. (1980) **255**,
1650-1661
- 29) Vandekerckhove, J., Leavitt, J., Kakunaga, T. & Weber, K.
; Cell (1980) **22**, 893-899
- 30) Leavitt, J., Kakunaga, T., Hamada, H., Hirakawa, T.,
Goldman, D. & Merrill, C. ; Cell (1982) **28**, 259-268
- 31) Naharro, G., Robbins, K. C. & Reddy, E. P. ; Science
(1984) **223**, 63-66
- 32) Tannenbaum, S. W. ed. ; The Cytochalasins (1978) North
Holland, Amsterdam

- 33) Brown, S. S. & Spudich, J. A. ; J.Cell Biol. (1981) **88**, 487-491
- 34) MacLean-Fletcher, S. & Pollard, T. D. ; Cell (1980) **20**, 329-341
- 35) Brenner, S. L. & Korn, E. D. ; J.Biol.Chem. (1979) **254**, 9982-9985
- 36) Pollard, T. D. & Mooseker, M. S. ; J.Cell Biol. (1981) **88**, 654-659
- 37) Phillips, M. J., Oda, M., Yousef, I. M. & Funatsu, K. ; J.Cell Biol. (1981) **91**, 524-527
- 38) Weihing, R. R. ; J.Cell Biol. (1976) **71**, 303-307
- 39) Schliwa, M. ; J.Cell Biol. (1982) **92**, 79-91
- 40) Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K. & Natori, S. ; J.Cell Biol. (1982) **72**, 69-78
- 41) Plagemann, P. G. W., Groff, J. C. & Wohlhueter, R. M. ; J.Biol.Chem. (1977) **252**, 4191-4201
- 42) Lin, S. & Snyder Jr., C. E. ; J.Biol.Chem. (1977) **252**, 5464-5471
- 43) Estensen, R. D. & Plagemann, P. G. W. : Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. (1972) **69**, 1430-1434
- 44) Jung, C. Y. & Rampal, A. L. ; J.Biol.Chem. (1979) **252**, 5456-5463
- 45) Edelman, G. M. ; Science (1976) **192**, 218-216
- 46) Clarke, M. & Spudich, J. A. ; Annu.Rev.Biochem. (1977) **46**, 797-820
- 47) Silverstein, S. C., Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. ; Annu. Rev.Biochem. (1977) **46**, 669-722
- 48) Liou, R. S. & Anderson, S. ; Biochemistry (1980) **19**, 2684-2688
- 49) Arnold, H. & Pette, D. ; Eur.J.Biochem. (1968) **6**, 163-171

- 50) Barak, L. S., Yocum, R. R. & Webb, W. W. ; J.Cell Biol. (1981) **89**, 368-372
- 51) Lindberg, U. ; Biochim.Biophys.Acta (1964) **82**, 237-248
- 52) Lazarides, E. & Lindberg, U. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1974) **71**, 4742-4746
- 53) Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T. & Lindberg, U. ; Cell (1978) **15**, 935-943
- 54) Perry, M. M., John, H. A. & Thomas, N. S. T. ; Exp.Cell Res. (1971) **65**, 249-253
- 55) Schroeder, T. E. ; Exp.Cell Res. (1968) **53**, 272-276
- 56) Quinlan, D. C. & Hochstadt, J. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1974) **71**, 5000-5003
- 57) Rozengurt, E. & Stein, W. D. ; Biochim.Biophys.Acta (1977) **464**, 417-432
- 58) Klezian, R. F. & Perdue, J. F. ; J.Biol.Chem. (1974) **249**, 3383-3387
- 59) Rozengurt, E. & Heppel, L. A. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1975) **72**, 4492-4495
- 60) Smith, G. L. ; J.Cell Biol. (1977) **73**, 761-767
- 61) Morris, J. D. H., Metcalfe, J. C., Smith, G. A., Hersketh, T. R. & Taylor, M. V. ; FEBS Letters (1984) **169**, 189-193
- 62) Rozengurt, E. ; Curr.Top.Cell.Regul. (1980) **17**, 59-88
- 63) Young, C. W. & Hodas, S. ; Science (1964) **146**, 1172-1174
- 64) Young, C. W., Schochetman, G. & Karnofsky, D. A. ; Cancer Res. (1967) **27**, 526-534
- 65) Weintraub, H. & Holtzer, H. ; J.Mol.Biol. (1972) **66**, 13-
- 66) Borum, T. W., Scharff, M. D. & Robbins, E. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1967) **58**, 411-416 35
- 67) Kornberg, R. D. ; Science (1974) **184**, 868-871

- 68) Olins, A. L. & Olins, D. E. ; Science (1974) **183**, 330-334
- 69) Searle, R. & Simpson, R. ; J.Mol.Biol. (1975) **94**, 479-501
- 70) Lenk, R., Ransom, L., Kaufmann, Y. & Penman, S. ; Cell (1977) **10**, 67-78
- 71) Ben-Ze'ev, A., Duerr, A., Solomon, F. & Penman, S. ; Cell (1979) **37**, 859-865
- 72) Cervera, M., Dreyfuss, G. & Penman, S. ; Cell (1981) **23**, 113-120
- 73) Howe, J. G. & Hershey, J. W. B. ; Cell (1984) **37**, 85-93
- 74) Kedes, L. H., Gross, P. R., Congetti, G. & Hunter, L. ; J.Mol.Biol. (1969) **45**,337-351
- 75) Adesnik, M. & Darnell, J. E. ; J.Mol.Biol. (1972) **67**, 397-406
- 76) Farmer, S. R., Wan, K. M., Ben-Ze'ev, A. & Penman, S. ; Mol.Cell Biol. (1983) **3**, 182-189
- 77) Tobey, R. A. & Crissman, H. A. ; Exp.Cell Res. (1972) **75**, 460-464
- 78) Ley, K. D. & Tobey, R. A. ; J.Cell Biol. (1970) **47**, 453-459
- 79) Pardee, A. B. & James, L. J. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1975) **72**, 4994-4998
- 80) Rossow, P. W., Riddle, V. G. H. & Pardee, A. B. ; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1979) **76**, 4446-4480
- 81) Brooks, R. F. ; Cell (1977) **12**, 311-317

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導を賜りました広島大学医学部教授、石橋貞彦博士、同助教授、井出利憲博士に深く感謝いたします。

ならびに、本研究に御協力戴きました広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座石橋研究室の皆様感謝いたします。