

学位 (博士) 論文要旨

広島大学大学院生物圏科学研究科

## 胚細胞における増殖調節機構の研究\*

—— ニワトリ胚強膜繊維芽細胞による解析 ——

藤 岡 美 輝

広島大学生物圏科学研究科

### Study of Regulatory Mechanism of Cell Growth in Embryonic Cell:

—— Analysis with Scleral Fibroblasts of Chick Embryo ——

Miki FUJIOKA

Graduate School of Biosphere Sciences  
Hiroshima University

一つの細胞である受精卵から個体が形成されてくる胚発生過程では、著しい細胞の増殖があり、さらに、複雑な個体を正確に作り上げるために、この細胞の増殖は厳密に制御されている。これを調べるためには、まず、胚の構成細胞における増殖調節の分子機構を理解した上で、次に、これが胚において時間的、空間的にどのように発現制御されているのかを明らかにすることが必要である。

細胞増殖調節の機構は、一般に、その細胞に特異的に働く増殖因子を明らかにすることによって理解できることがわかってきた。そして、胚発生過程における細胞増殖調節のしくみを研究するにも、胚発生の各時期、各組織での増殖因子の検索の方向に焦点が向かいつつある。

ニワトリ胚は、胚発生の各時期にわたって実験的操作が容易であり、また、研究の歴史が古いため、組織レベル、細胞レベルの発生学的知見が豊富であり、胚発生における細胞増殖調節機構の研究のよい実験系として期待されるが、増殖因子に着目した分子レベルの研究は、ほとんど進んでいないのが現状である。

筆者の研究室では、ニワトリ胚の眼を構成する強膜という組織の繊維芽細胞が、初代培養下で無蛋白条件下に増殖し、このとき、その培養上清 (conditioned medium ; CdM) 中に、同種細胞に対する増殖促進活性が認められることがわかってきた。すなわち、この細胞の増殖調節は、細胞が自らの増殖を自らの分泌する増殖因子により促進するオートクライン機構に基づいていると考えられ、このしくみは、胚の中における実際の細胞増殖調節機構をよく反映しているものと期待される。

筆者は、まず、この CdM 中の増殖調節因子が複数の蛋白質よりなることを明らかにした。次に、これらの因子の抽出、精製が、胚における細胞増殖調節の機構解析の第一歩と考え、こ

---

広島大学総合科学部紀要Ⅲ, 第13巻, 101-103, (1989)

\*: 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1989年2月25日, 学位取得日 1989年3月24日

れを行なって、複数因子のうちのひとつの精製に成功し、精製した蛋白質のN末端のアミノ酸配列の決定を行なった。さらに、一般に増殖因子の作用機序を調べるために必要な株細胞を、この細胞を用いて樹立することに成功した。これらの結果をまとめてここに報告する。

まず、この細胞を用い、トリチウムチミジンの酸不溶性画分への取り込みを指標として増殖促進活性を検出するというアッセイ系を確立した。その上で、この系を用いて、培養開始後さまざまな時期における、CdM 中の未知の増殖因子の検索を行った。

CdM 中の蛋白質を、分子量 10 kd 除去用の限外濾過膜で濃縮した後、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにより分画し、各画分の増殖促進活性を調べた。その結果、この細胞は、培養開始からサブコンフルエントに至る増殖期 (growing phase) の CdM 中に、少なくとも 1 種類の熱耐性の増殖因子を分泌し、一方、コンフルエントになった後 (定常期; stationary phase) には、少なくとも 2 種類の熱感受性の増殖因子を分泌していることを見いだした。すなわち、この細胞は、複数の増殖調節因子を増殖の段階に対応して分泌しながら、自らの増殖調節を行っていることを明らかにした。

筆者は次に、この一群の因子のうち、増殖期に分泌されて、実際にオートクライン増殖調節に関与していると考えられる熱耐性増殖因子の精製を試み、これに成功した。手順は、まず、DEAE-セファロースカラムで精製した試料を熱処理し、次に、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画する。この泳動後のゲルを等間隔に切り、それぞれのゲル片から蛋白質を溶出し、活性を測定したところ、蛋白質は多くの画分に分布したが、活性は単一のピークとして認められた。ここまでの精製で、およそ 1,100 倍の比活性の上昇が認められた。

一次元目として非変性ゲルによる電気泳動を、二次元目として SDS ゲルによる電気泳動を行なって、活性画分の分子量を調べると、活性のピークが認められた領域に相当する位置に、32 kd の分子量をもつ蛋白質が存在していた。実際にこの 32 kd 蛋白質が活性を持つかを調べるため、蛋白質を直接 SDS ゲル電気泳動で分画し、このゲル片から、非変性ゲルの場合と同様の方法で蛋白質を溶出して活性を測定すると、この 32 kd 蛋白質が最も高い非活性を示した。つまり、この細胞の分泌する増殖因子のうちの一つは、32 kd の分子量を持ち、二次元電気泳動で単一スポットになるまでに精製できたわけである。

この精製した蛋白質のN末端アミノ酸配列の決定を試みた。まず、SDS ゲルから蛋白質を最も効率よくプロットングするために、以下の条件を決定した。プロットング用の膜は、ポリビニリデンジフロリド膜 (PVDF 膜) を用いた。SDS ゲルは、50 V、2 時間のプレランを行なった。ゲルから PVDF 膜への蛋白質のプロットングは、セミドライプロットング装置により、トリス-ほう酸緩衝液中で、11 V、3 時間行なった。プロットング後、PVDF 膜をクマシーブリリアントブルー染色し、目的とする 32 kd 蛋白質のスポットを切り出し、アミノ酸配列分析装置によりアミノ酸分析を行なった。その結果、N 末端から 20 残基までの配列 (N 末端から、Ala(Pro)-Gln-Ile-Asn-Pro-Met-Ile-Asp-Pro-Gly-Ile-Gln-Val-Asn-Pro-Gly-Ser-?(Cys)-Asp-Leu) を決定することができた。

さて、この研究と同時に、ニワトリ胚から細胞株を樹立することができた。これまでニワトリ胚細胞の株化は困難とされていたが、この強膜繊維芽細胞は、蛋白質を加えない培養液で培養を開始することにより、培養系に順化させることができ、長期間にわたる継代を繰り返すことが可能となった。5 ヶ月目になると増殖率の低下が認められたので、1% 牛胎児血清を含む培養液を用いて継代を続け、培養開始後 1 年 8 ヶ月経過し、100 世代を越えて安定に増殖しているので株化したと見なした (1989 年、1 月現在、120 世代)。この細胞は、(1)血清存在下で、世代時間は約 36 時間であり、コンフルエントになると増殖を停止し、多層にはならない。(2)血

清がないと、増殖はできないが、一ヶ月以上生存可能である。(3)コンフルエントに達した後、培養液から血清を除くと、細胞が寄り集まって盛り上がり、あたかも形態形成が起こっているように見える。(4)この細胞の CdM は、この細胞自身、および、強膜繊維芽細胞の初代培養細胞に対して増殖促進活性を示す、という特徴を持っている。

以上の研究から、ニワトリ胚強膜繊維芽細胞の無蛋白条件下での増殖は、自らの分泌する複数の因子により調節されていることが示されたが、次に、これら複数の増殖調節因子が、どのように相互作用しあってこの細胞の増殖を調節しているのか、そして、胚の中で実際にどのように働いているのか、興味深い今後の課題となった。この蛋白質の、胚における分布、機能、発現調節を研究していくために、この蛋白質の動態を探るためのプローブを作ることが当面の課題である。また、株化した細胞は、常に安定した増殖率を示し、さらに、条件により、細胞の形態の変化と形態形成をうかがわせる細胞行動を示すことから、ニワトリ胚細胞における細胞増殖調節の機構や、細胞分化、形態形成の機構を研究するよい材料となることが期待される。今回得られた結果は、これまでニワトリ胚で蓄積されてきた発生学上の知見と照らし合わせて応用することにより、ニワトリ胚の増殖調節機構の解明におおいに役立つことが期待される。