1N1100

HPLCによる脊髄由来細胞増殖抑制因子の精製

○前田 梨恵、江本 由美子、太和田 勝久（九大院・理・生物）

我々の研究室で発見された脊髄由来細胞増殖抑制因子は、足場依存性(MDCK)細胞の増殖・接着・遊走運動を抑制する作用を持つ。我々はこれまで、この因子をゲルろ過、陰イオン交換、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製してきた(1)。本研究では、新たにHPLCを用いて精製を試みた。その結果、生体ポリアミンであるスベルミン、スベルミジンに由来するピークと、構造未同定の物質に由来するピークが得られた。

上の結果より、これまで精製してきた脊髄由来細胞増殖抑制因子は、生体ポリアミン(スベルミン、スベルミジン)と構造未同定の物質の混合物であることが示唆された。以前得られた次の二つの結果により、脊髄由来細胞増殖抑制因子は生体ポリアミンとは異なる抑制作用を示すといえる。すなわち、1) 脊髄由来の因子は細胞に対して可逆的に作用するが、生体ポリアミンは非可逆的に作用する。また2) 生体ポリアミンは牛血清中に含まれるアミノオキシダーゼの作用を受けやすいのに対し、脊髄由来の因子は受けにくい。したがって、未同定の物質が脊髄由来細胞増殖抑制因子としての性質を持つ、という可能性が浮上した。この可能性を検討するため、現在我々はこの未同定の物質が何であるかを突き止めようと試みている。また同時に、脊髄由来細胞増殖抑制因子と生体ポリアミンの作用の可逆性・非可逆性を比較することによって、生体ポリアミンの効果を差し引いた因子の抑制作用を知ろうと研究を進めている(2)。

- (1)Emoto et al.J Cell Physiol.186,350-356(2001)
- (2) 佐藤, 江本, 八木, 太和田. 生物物理学会第 40 回年会 (2002)

R.Maeta,Y.Emoto and K.Tawada : HPLC purification of growth inhibitors derived from pig spinal cord

1N1130

脊髄由来細胞増殖抑制因子は接着阻害誘導型アポトーシスを抑える

○江本 由美子、徳山 洋子、太和田 勝久（九大院・理・生物）

我々はこれまでに、豚脊髄から細胞増殖抑制因子を発見し、この因子の細胞増殖抑制作用が因子濃度と作用時間に依存するとともに、細胞特異的であることを示した(1)。また、昨年の年会では、この細胞増殖抑制因子がMDCK細胞のアノイーキス（接着阻害誘導型アポトーシス）を抑制することを示した。本年会では、この増殖抑制因子がアノイーキスを抑えるとともに、接着阻害された足場依存性細胞を生き延びさせることを報告する。

MDCK細胞を（基質への）接着阻害条件で培養するとアノイーキスを起こす。接着阻害培養するときに脊髄由来細胞増殖抑制因子を添加しておいて、アノイーキスへの影響を調べた。因子存在下で接着阻害培養した細胞は、（アポトーシスの指標である）ラダー状DNA断片の量が減り、（MDCK細胞のアノイーキス開始に関わるとされている）カスパーゼ8の活性化が抑えられていた。この結果は、本増殖抑制因子がアノイーキスを抑えることを示す。接着阻害培養後の生存細胞数を定量するために、細胞を回収して接着性シャーレに撒きなおし、接着した細胞数を数えるとともに細胞の還元活性を測定した。因子存在下で接着阻害培養した細胞は、細胞数、還元活性とも因子無しに比べて2倍程度多かった。この結果は、本増殖抑制因子が接着阻害状態での細胞の生存を促すことを示す。

現在、本因子がアノイーキスを抑えて細胞の生存を促す仕組みを調べている。

- (1) Emoto et al. J.Cell Physiol. 186: 350-356, 2001.

Y.Emoto, Y.Tokuyama and K.Tawada : Spinal cord derived growth inhibitor abrogates the anoikis of MDCK cells.

1N1115

脊髄由来細胞増殖抑制因子の可逆的作用

○佐藤 健太郎、江本 由美子、八木 雅治、太和田 勝久（九大院・理・生物）

我々は、以前に、ブタ脊髄の塩抽出物中に動物培養(MDCK)細胞の増殖・接着・遊走運動を抑制する因子が存在すること、および、その粗精製について報告した(Emoto et al. 2001)。この粗精製抑制因子をさらに精製した結果、この抑制因子は、生体ポリアミンであるスベルミジンとスベルミン、および構造未同定の抑制性因子の混合物らしいことが判明した(前田ら、本年会)。現在、これらの混合物から、未同定の抑制性因子を精製する努力をしている。生体ポリアミンの抑制作用は、それらの毒作用のためであり、非可逆であるといわれている。一方、以前の我々の研究により、脊髄由来の粗精製抑制因子を比較的薄い濃度で作用させたとき、抑制作用は可逆であることがわかっている。

BLB3T3細胞は、MDCK細胞より、ずっと薄い濃度(約1/10)の粗精製抑制因子によって抑制作用を受け、細胞の還元活性が完全にゼロになった場合でも、因子を除くと、細胞は、丸い形から広がった形に戻り、増殖と遊走運動を再開する；つまり、抑制因子の作用は完全に可逆なのである。本研究では、このように抑制因子に対して感度の高いBLB3T3細胞を用いて、脊髄由来の粗精製抑制因子の作用と生体ポリアミン(スベルミジン、スベルミン)の抑制作用を、特に、作用の可逆性・非可逆性の観点から、比較する。その比較から、従来我々が脊髄由来の抑制因子の作用として観察していた結果のうち、どれが、生体ポリアミンの作用であるのかが判明する。その結果、未同定の抑制因子の作用がより詳しくわかるはずである。

Emoto et al. J Cell Physiol. 186: 350-356, 2001

K.Sato, Y.Emoto, M.Yagi and K.Tawada. : Reversible effects of cell growth inhibitors derived from spinal cord.

1N1145

ガラス微小毛細管浸透圧計を用いたゾウリムシ細胞質と収縮胞液の浸透圧のリアルタイム計測

○内藤 豊（ハワイ大・マノア・太平洋生物医学研）

ガラス微小毛細管浸透圧計を開発し、ゾウリムシ細胞と収縮胞内の浸透圧を数秒の時間分解能で測定した。この浸透圧計では、10 ミクロン以下の細胞の細胞質浸透圧変化のリアルタイム計測が可能で、regulatory volume decrease (RVD) や regulatory volume increase (RVI) のしくみの研究に役立つと考えられる。多少の改变で組織内や血管内の浸透圧計測が可能になるので、医、環境生物、そして工学等広い分野での応用が期待される。この浸透圧計は浸透圧センサーと圧力フィードバックシステムよりなる。浸透圧センサーは先端約1 ミクロンのガラス微小毛細管で、先端に半透性物質を詰め、次に浸透圧標準液を入れ、最後にミネラルオイルを入れる。このセンサーの先端を細胞内に挿入すると、細胞質と標準液との浸透圧差にしたがって水が毛細管に入りし、標準液とミネラルオイル間のメニスカスが移動する。この移動は光センサーで電気信号に変換され、高増幅度反転増幅器を介して電気－圧力変換器にかけられ、浸透圧センサー内にメニスカスの移動を妨げる圧力を発生させる。こうして浸透圧センサー内圧力は細胞質と浸透圧標準液の浸透圧差にクランプされる。細胞質の浸透圧は標準液の浸透圧とこの圧力の差で与えられる。浸透圧センサー内圧力は圧力センサーでモニターされ記録される。現在ゾウリムシ細胞を用いて予備的実験を行いながら浸透圧計の改良を行っている。ゾウリムシを低浸透圧溶液にさらした時、細胞質浸透圧の低下速度（水濃度増大速度）と収縮胞からの水排出の活性化と形質膜のRVDの活性化の潜在時間とそれぞれの活性度との量的な関係を求めている。なおこのガラス微小毛細管浸透圧計は特許申請作業中である。特許に関する連絡はA. Park, Technology Licensing Executive, Univ. Hawaii, 2800 Woodlawn Drive, Suite 280, Honolulu, Hawaii 96822, USA

Y. Naitoh : Real time measurements of osmolarities of the cytosol and the contractile vacuole fluid in Paramecium by using a microcapillary osmometer