原	著
---	---

増殖に伴う細胞表面の電気泳動的性格の変動

——コンカナバリン A による HeLa 培養細胞の反応性変化の検索——

高 木 実 石 川 梧 朗 山 田 喬*

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学教室

* 独協医科大学第一病理学教室

(1976年12月25日受付)

Electrokinetic Changes Associated with Cell Proliferation

——Different Reaction of Different Aged HeLa Cells Induced by Concanavalin A——

Minoru Takagi, Goro Ishikawa and Takashi Yamada*

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

* Department of Pathology, Dokkyo University School of Medicine

要旨: HeLa S₃ 細胞を用いて細胞増殖と細胞電気泳動度の相関関係および Con A の細胞電気泳動度に及ぼす影響について検討した。培養開始後日数と細胞電気泳動度の関係では、培養開始後細胞増殖の最も著明な 3～4 日に細胞電気泳動度も最高値を示し、両者の推移はほぼ平行関係にあった。

Con A で処理すると細胞電気泳動度は 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度では増加するが、20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度になると減少し、2 相性の変化を示した。またこの Con A による細胞電気泳動度の反応性変動の程度は、再生増殖期にある細胞に特に著明であることが判明した。

I. 緒 言

細胞の生物学的性状は細胞膜の構造や機能と密接な関係がある。細胞表面は一般に陰性荷電しており、荷電密度は細胞自体の種々の生物学的条件の変化に伴い変動するが、逆に荷電量を計測することによって細胞膜の変化や様式を知ることができる。この細胞表面荷電密度は細胞電気泳動法（細胞を浮遊させたメジウムに電圧をかけ電気泳動を行う）により測定できるが、この泳動度の測定値から相対的な荷電密度の多寡を知り得ると言われている^{1,2)}。

細胞表面荷電密度は特に細胞増殖に伴って変化するが、これに関係のあると思われる現象として、小リンパ球の DNA 合成を惹起させ芽球化をおこさせる Concanavalin A（以下 Con A）の処理によっても影響を受けることが見出されている²⁾。また Con A は細胞凝集活性のある植物性血球凝集蛋白の一種で、特に悪性腫瘍細胞を凝集することから最近注目されている³⁻⁵⁾。本実験は細胞増殖と細胞電気泳動度の相関関係および異なった増殖時期にある細胞における Con A の細胞電気泳動度への影響について HeLa 細胞を用いて検討した。

II. 実験材料および方法

実験材料とした培養細胞は HeLa S₃ 細胞（ヒト子宮癌由来細胞）であり、その培養には仔牛血清 20% 含有の Eagle の minimum essential medium を用いた。

培養した HeLa S₃ 細胞を培養瓶の壁よりラバークリーナーで剥脱させ、細胞塊として浮遊した部分はピペティングにより相互の結合を分離した後、各 1×10^6 個ずつ培養角瓶に植え込んだ。生長曲線を得るために 1, 2, 3, 4, 5, 7 日目に各培養瓶より細胞を集めて細胞数を計測した。計測は Thoma の計算盤（深さ 1/10mm, 1/400, 1/25）で測定し、 $2 \times N/9 \times 10^4/\text{ml}$ の式から求めた（N は柘目内の細胞の実数で、柘目上の細胞は 2 辺にかかるもののみを有効とした）。各培養日数で同時にニグロシン染色を行い、細胞質の不染色細胞を生細胞、可染の細胞を死細胞として生存率を計算した。

細胞電気泳動度の測定は生長曲線を得るために集めた細胞の一部を用いて同時に行った。測定は培養細胞を生理食塩水で洗浄し、等張ペロナル緩衝液（Michaelis, pH 7.0, イオン強度 0.173）に培養細胞を約 2×10^6 個/ml 懸濁させて、円筒型泳動管を用いて測定した。測定に用いた電流量は 2.5mA である。25℃における細胞の移動速度を陰陽極の方向を交換して計測し、その平均値を各培養細胞の測定値とした。そして各試料について 20 個の細胞を測定し、その平均値を求め、各試料の平均細胞電気泳動度とした。標準細胞としたラット赤血球について同様の方法で電気泳動度を計測した。電気泳動度の計算は検索細胞と同一条件下で測定した標準細胞（ラット赤血球）との泳動速度の相対比より求めた¹⁾。

Con A の細胞電気泳動度の影響を検討するために、培養後各日数の培養細胞生食浮遊液（ $2 \times 10^6/\text{ml}$ ）の 1ml に 10, 20, 40, 100 μg の各濃度の

Con A 生食溶液 1ml を加え、37℃, 10 分間保温した。処理後上澄みをすて、細胞をそのまま泳動メジウムに浮遊させ細胞電気泳動度の測定を行った。培養は 2 回に分けて行い、1 回目は 3 日、6 日目の培養細胞について、2 回目は 4 日、7 日目の培養細胞について計測した。

III. 実験結果

1. 細胞増殖に伴う変化

培養日数に伴う細胞数および細胞電気泳動度の計測値は表 1 に示す。細胞数は培養 1 日目で 3.065×10^6 個/ml に増加し、4 日目に 8.70×10^6 個/ml になって最大値を示し、5 日目より急速に減少した。培養日数 1, 2, 3, 4, 5, 7 日目の細胞電気泳動度は培養開始後、1 日目の -0.891 ± 0.015

表 1 培養日数による細胞電気泳動度の変化について

培養日数 (日)	0	1	2	3	4	5	7
細胞数 ($\times 10^6$)	1	3.065	4.14	3.72	8.70	8.62	4.69
細胞電気 泳動度 ($\mu\text{m/s/V}$)		-0.891 ± 0.015	-0.904 ± 0.014	-0.899 ± 0.012	-1.022 ± 0.011	-1.017 ± 0.015	-0.951 ± 0.012

図 1 培養日数に伴う細胞電気泳動度の変化

表2 Con A 処理後の細胞電気泳動度 ($\mu\text{m/s/V/cm}$)

培養日数 Con A 濃度 (μg)	3 日 齢	4 日 齢	6 日 齢	7 日 齢
0	-0.896	-1.066	-1.143	-1.155
5	-0.927 (+ 3.5%)	-1.082 (+ 1.5%)	-1.127 (- 1.4%)	-1.103 (- 4.5%)
10	-0.851 (- 5.0%)	-1.321 (+23.9%)	-1.175 (+ 2.8%)	-1.021 (-11.6%)
20	-0.799 (-10.8%)	-1.278 (+19.9%)	-0.956 (-16.4%)	-0.921 (-20.3%)
50	-0.836 (- 6.7%)	-1.107 (+ 3.8%)	-0.912 (-20.2%)	-0.871 (-24.6%)

() 内は Con A 濃度 0 を基準とした変動率

$\mu\text{m/s/V/cm}$ から徐々に増加して、4 日目で $-1.022 \pm 0.011 \mu\text{m/s/V/cm}$ の最大値を示し、5 日目より次第に減少して 7 日目には $-0.951 \pm 0.012 \mu\text{m/s/V/cm}$ になった。これらの計測値を図示すると図 1 のようになり、細胞数と細胞電気泳動度の増減は同一傾向の曲線を示した。

2. Con A の影響

各培養日数における細胞を種々の濃度の Con A で処理した後の細胞電気泳動度の計測値は表 2 に示す。この実験では 3 日齢、6 日齢の計測と 4 日齢、7 日齢の計測を異なった時期の培養細胞で

行っている。Con A 未処理細胞の計測では 3 日齢より 6 日齢、4 日齢より 7 日齢の方が細胞電気泳動度の値が高く、実験 1 の結果とやや異なった。Con A 未処理細胞での計測値を基準として各濃度での値を百分率の増減で示したのが図 2 である。3 日齢は $5 \mu\text{g/ml}$ で 3.5% 増加、 $10 \mu\text{g/ml}$ で 5.0%、 $20 \mu\text{g/ml}$ で 10.8%、 $50 \mu\text{g/ml}$ で 6.7% 減少した。4 日齢は $5 \mu\text{g/ml}$ で 1.5% 増加するが、 $10 \mu\text{g/ml}$ で 23.9% と著明な増加を示し、 $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ ではそれよりも減少する。6 日齢は $5 \mu\text{g/ml}$ でやや減少、 $10 \mu\text{g/ml}$ でやや増加し、 $20 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ からは明らかな減少を示す。7 日齢は $5 \mu\text{g/ml}$ より $50 \mu\text{g/ml}$ までいずれも減少した。

IV. 考 察

細胞の表面荷電量が細胞増殖に関連して変化することは既に知られている。本実験では細胞増殖活性を各培養日数の細胞数で表したが、表面荷電量は増殖の活発な時期に増加し、また両者の増減の推移はほぼ平行関係を示した。これは従来の報告と一致する^{1,7-10)}。表面荷電量の増加が細胞周期のどの段階で最も著明かを知るには同調培養が必要である。角尾・山田¹⁾は HeLa S₃ 細胞の同調培養により各細胞周期の細胞電気泳動度の変化を検討したが、M 期に荷電量が最も増加し、その程度は S 期の 43% 増加であり、また G₁, G₂ 期には 6~7% 増加している。しかしこれらの表面荷電量の増加の機序は未だ不明である。

細胞増殖活性の亢進に伴う表面荷電量の増加の現象から考慮すると、幼若細胞や悪性腫瘍細胞は

図2 Con A 処理に伴う細胞電気泳動度の変化

正常成熟細胞に比較して表面荷電量が多いと推察されるが、事実、胎生細胞や再生肝細胞は成熟細胞より荷電量が多い。悪性腫瘍細胞については 1956 年 Ambrose et al.⁶⁾ がハムスター腎細胞とそれより Stilbroestrol で悪性化した細胞の細胞電気泳動度を比較した実験で、悪性化細胞は正常細胞の約 2 倍の泳動度をもち、この泳動度の増加は悪性腫瘍細胞の共通した特徴であると報告して以来、この方面の多数の研究がある。当初はこの考えを支持する人が多かったが^{11, 12)}、その後はむしろ反対する人が多い^{9, 13~15)}。しかし反対する人々の根拠とした実験において、比較した正常と悪性細胞の選択が不適切であったり、またそれぞれの細胞の増殖に伴う変化が検索されていなかったりしており、その他の問題点があることを指摘するものもある¹⁾。

細胞表面荷電に関与する基は細胞の種類で異なるが、シアル酸のカルボキシル基、酸性ムコ多糖類、磷脂質の磷酸基、RNA 蛋白、その他の荷電物質であり^{9, 16~19)}、表層約 1 nm 中に存在する荷電物質が電気泳動度を左右する^{20~22)}。悪性腫瘍細胞の表面荷電では、シアル酸が主体とされている。シアル酸はノイラミン酸の種々の誘導体の総称で、細胞膜では糖末端に結合していて、解離するカルボキシル基を有する。細胞膜含有のシアル酸量の定量も生化学的に示されているが^{13, 14, 23, 24)}、結果は必ずしも一定していないことから、シアル酸の悪性腫瘍細胞の細胞膜での変化は量的でなく、質的と考える人が多い。

Con A は正常細胞は凝集せず、悪性化細胞を凝集する特異な植物蛋白で、その作用は α -methyl-D-glucopyranoside によって抑制される。Con A は細胞表面受容体と結合するが、正常細胞、悪性化細胞でその結合量を比較すると、両者間に差異を認めないことから、凝集反応は Con A 受容体の分布の再編成によっておこると考慮されている⁵⁾。本実験は Con A の細胞電気泳動度への影響を HeLa 細胞を用いて行ったが、低濃度処理では増加、高濃度処理では減少という 2 相性変化を示した。Con A 類似の PHA 処理による細胞電気泳

動度の影響は Vassar & Culling (1964)²⁵⁾, Currie (1967)²⁶⁾ により検討されている。両者ともに泳動度は減少すると報告しているが、低濃度での実験がなされていない。2 相性分布を最初に明らかにしたのは山田である。2 相性変化のおこる機序について Yamada & Yamada (1973)²⁾ は低濃度では細胞表面受容体に Con A が結合すると、細胞膜のシアル酸に作用して細胞表面 1 nm より深部の通常は電気泳動に関与しないシアル酸のカルボキシル基を表層へ転位させたり、蛋白で被覆されたシアル酸を露出して電気泳動度を増加させるが、高濃度では Con A が陰性荷電基に結合してしまい、表面荷電量を減少させるのではないかと推定している。また Con A で処理した後にノイラミナーゼで酵素処理すると、Con A 低濃度で処理する方が泳動度の減少が大きく、培養上清中に析出するシアル酸量が多いという実験もこの考え方を支持する。Con A は凝集反応とともに増殖活性を有するが、細胞電気泳動度への影響は細胞膜への Con A 直接作用によりおこるもので、特に本来活発に増殖している細胞表面が、Con A により反応しやすく変化しているものと考えられる。

謝 辞

本研究は東京医科歯科大学須藤由美子君、独協医科大学第一病理学教室角屋堯英学士の協力によるもので、謝意を表する。

なお、本研究は文部省科学研究費の補助による。

文 献

- 1) 山田 喬編：細胞電気泳動実験法。東京，1973，文光堂。
- 2) Yamada, T. & Yamada, M.: Changes in distribution of electric charges in the surface membrane of rat ascites hepatocarcinoma cells induced by Con A. *Nature*, 244: 297-299, 1973.
- 3) Inbar, M. & Sachs, L.: Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature*, 223: 710-712, 1969.
- 4) Inbar M. & Sachs, L.: Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 63: 1418-1425, 1969.

- 5) Nicolson, G. L.: Difference in topology of normal and tumour cell membranes shown by different surface distributions of ferritin-conjugated concanavalin A. *Nature*, 233: 244-246, 1971.
- 6) Ambrose, E. J., James, A. M. & Lowick, J. H. B.: Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature*, 177: 576-577, 1956.
- 7) Simon-Reuss, I., Cook, G. M. W., Seaman, G. V. F. & Heard, D. H.: Electrophoretic studies on some types of mammalian tissue cell. *Cancer Res.*, 24: 2038-2043, 1964.
- 8) Eisenberg, S., Ben-Or S. & Doljanski, F.: Electrokinetic properties of cells in growth processes. *Exp. Cell Res.*, 26: 451-461, 1962.
- 9) Mayhew, E.: Electrophoretic mobility of Ehrlich ascites carcinoma cells grown in vitro or in vivo. *Cancer Res.*, 28: 1590-1595, 1968.
- 10) Yamada, T.: The electrophoretic changes of mammalian cells associated with malignant transformation. *Acta Path. Jap.*, 22: 1-10, 1972.
- 11) Forrester, J. A., Ambrose, E. J. & Macpherson, J. A.: Electrophoretic investigations of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. *Nature*, 196: 1068-1070, 1962.
- 12) Forrester, J. A., Ambrose, E. J. & Stoker, M. G. P.: Microelectrophoresis of normal and transformed clones of hamster kidney fibroblasts. *Nature*, 201: 945-946, 1964.
- 13) Cook, G. M. W. & Jacobson, W.: The electrophoretic mobility of normal and leukaemic cells of mice. *Biochem. J.*, 107: 549-557, 1968.
- 14) Mehrishi, J. N. & Thomson, A. E. R.: Relationship between pH and electrophoretic mobility for lymphocytes circulating in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 219: 1080-1081, 1968.
- 15) Patinkin, D., Schlesinger, M. & Doljanski, F.: A study of surface ionogenic groups of different types of normal and leukemic cells. *Cancer Res.*, 30: 489-497, 1970.
- 16) Cook, G. M. W., Heard, D. H. & Seaman, G. V. F.: Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature*, 191: 44-47, 1961.
- 17) Ben-Or, S., Eisenberg, S., & Doljanski, F.: Electrophoretic mobilities of normal and regenerating liver cells. *Nature*, 188: 1200-1201, 1960.
- 18) Eylar, E. H., Madoff, M. A., Brody, O. V. & Oncley, J. L.: The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 237: 1992-2000, 1962.
- 19) Weiss, L. & Mayhew, E.: Ribonucleic acid within the cellular peripheral zone and the binding of calcium to ionogenic sites. *J. Cell. Physiol.*, 69: 281-292, 1967.
- 20) Bangham, A. D., Pethica, B. A. & Seaman, G. V. F.: The charged groups at the interface of some blood cells. *Biochem. J.*, 69: 12-19, 1958.
- 21) Wallach, D. F. H. & Esandi, M. V. P.: Sialic acid and the electrophoretic mobility of three tumor cell types. *Biochim. Biophys. Acta*, 83: 363-366, 1964.
- 22) Forrester, J. A. Salaman, M. H.: Cell electrophoretic mobilities in Friend virus disease. *Nature*, 215: 279-280, 1967.
- 23) Kimura, A., Nagai, Y., Turumi, K-I., Kawashima, Y. & Sato, H.: Hesosamine and sialic acid contents in cells. *Nature*, 191: 596, 1961.
- 24) Cook, G. M. W., Heard, D. H. & Seaman, G. V. F.: The electrokinetic characterization of the Ehrlich ascites carcinoma cell. *Exp. Cell Res.*, 28: 27-39, 1962.
- 25) Vassar, P. S. & Culling, C. F. A.: Cell surface effects of phytohaemagglutinin. *Nature*, 202: 610-611, 1964.
- 26) Currie, G. A.: Effect of phytohaemagglutinin on the surface charge of human and murine lymphocytes. *Nature*, 216: 694-695, 1967.