

[原著] Nil 2 細胞クローンの浮遊培養における密度
依存性糖脂質合成の消失

崎 山 比 早 子*

(昭和 48 年 12 月 26 日受付)

要 旨

ハムスター胎児線維芽細胞 Nil 2 より分離したクローン (Nil 2 C 1, Nil 2 C 2) およびそのハムスター肉腫ウイルスでトランスフォームした細胞 (HSV-2-5) を使って静置培養と浮遊培養における Forssman glycolipid (GL-5) の合成を調べた。静置培養された Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 では程度の差はあるがいずれも細胞あたりの GL-5 の量は細胞数が増加するに従って増える。このような細胞密度と GL-5 の量の相関関係は HSV-2-5 においては見られなかった。静置培養細胞で GL-5 合成における密度依存性を示した Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 も浮遊培養するとその能力を失さなくなった。

Keywords: 密度依存性糖脂質合成, Forssman glycolipid (GL-5), Contact inhibition, 浮遊培養

略語一覧: GL-5: Forssman glycolipid

序 文

腫瘍細胞は正常細胞の持つ増殖抑制機構を欠いていることがその生物学的特徴の一つとされている。すなわち *in vivo* においては自律増殖, 浸潤, 転移を起し, *in vitro* においては正常細胞の持つ Contact inhibition を示さない。このような腫瘍細胞の性質の変化が部分的に細胞膜の生化学的变化によってもたらされるであろうことは, たとえば細胞同志が接触した場合まずその情報は細胞膜をとおして伝えられるであろうことを考えても容易に想像できる。トランスフォーム細胞の細胞膜の糖質, 糖蛋白質が正常細胞のそれと異なるという報告は近年多くなされている¹⁻³⁾ がそれと同時にはっきりした差が検出されないという報告もある^{4,5)}。これはそれぞれの研究者が使用したウイルス細胞の系が異なるためとも考えられる。細胞のトランスフォーメーションにともなう糖脂質の変化はどのような系を用いても同じような結果が得られる変化の一つである。トランスフォーメーション

にともなう糖脂質の変化は, はじめて Hakomori ら⁶⁾ によって報告された。彼らは正常の BHK 細胞が腫瘍ウイルスでトランスフォームした BHK 細胞よりも蛋白あたりの hematoside を多く含むことを発見した。トランスフォーム細胞が正常細胞の持つ複合糖脂質のあるものを消失したり, 減少したりする現象はその後 Mora ら⁷⁾, Robbins ら⁸⁾ によっても確認された。しかしながら著者らの研究によって複合糖脂質の存在の有無はその細胞の腫瘍原性になんら影響を及ぼさないことが明らかとなった^{9,10)} その反面糖脂質合成における密度依存性を消失した細胞はその腫瘍原性を著しく増す¹⁰⁾。このことは腫瘍ウイルスによってトランスフォームした細胞が糖脂質合成における密度依存性を消失するという事実^{6,11,12)} と矛盾しない。従って糖脂質合成における密度依存性のメカニズムを検索することは有意義なことである。Nil 2 C 1 においては GL-5 の量は細胞数の増加に平行して増える^{12,13)}。さらにその量は細胞が分裂を行なっているか否かによっては影響されない¹³⁾。

* 千葉大学医学部微生物学教室 (主任: 桑田次男教授)

HISAKO SAKIYAMA: Loss of Density Dependent Forssman Glycolipid Synthesis by Nil 2 Clones Grown in the Suspension Culture.

Department of Microbiology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, December 26, 1973.

以下の実験において細胞と細胞の接触が GL-5 の合成にどのような影響を与えているかを検索した。

研究 方 法

1. 培養細胞:

細胞は Nil 2 ハムスター胎児線維芽細胞¹⁴⁾より分離したふたつのクローン (Nil 2 C 1, Nil 2 C 2) およびそのハムスター肉腫ウイルスによるトランスフォーム細胞を使用した。これらの細胞の形態, 飽和密度, 脂質組成^{12,13)}およびハムスターに対する腫瘍原性¹⁰⁾はほかに述べた。

培養液には F-10 培養液に 10% の割合で仔牛血清, ペニシリン 100 単位/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えたものを使用した。静置培養された Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 を 70 ml の培養液に浮遊し, 浮遊攪拌培養ビンで培養した。増殖曲線を得るために, 培養液の交換は, 交換したい容量の培養液を取り出し 1000 rpm, 5 分遠心し細胞を同量の新しい培養液中に浮遊して行なった。静置培養における増殖曲線を得るためには 5 cm のプラスチックシャーレに 1×10^4 の細胞をまいた細胞が分裂期にある間は 2~3 日おきに, 飽和密度に達した後は毎日培養液の交換を行なった。

2. 脂質の分離:

適当な密度に達した浮遊培養液の 2~3 ml を取り出し 2000 rpm 5 分遠心し細胞を集める。さらにこの細胞を Phosphate buffered saline (PBS) で 1 回洗ってから脂質を抽出した。浮遊培養および静置培養された細胞からの脂質の抽出は Robbins らの方法⁹⁾に従った。抽出された脂質は使用まで -20° に保存された。

3. GL-5 の測定:

上述のようにして細胞から抽出された脂質の一定量を試験管にとり窒素ガス下で乾燥させる。それを 0.02 ml メタノールに再び溶かし, 0.98 ml のマグネシウム食塩水を加えて攪拌する。これを原液としてこの液をマグネシウム食塩水で 2 倍段階希釈する。この希釈液に 80,000 倍に希釈した溶血素 (東芝製) を 0.25 ml ずつ加え 38° に 10 分間おく。さらにこの混合液に 1% 羊血球を 0.25 ml 加え室温に 10 分間静置する。その後十分量の補体 (東芝製乾燥補体 40 倍希釈液) を 0.5 ml 加え 38° C の湯ぶねに 30 分間おく。反応の最後に赤血球を 2000 rpm で 5 分間遠心し上清のヘモグロビン量を波長 555 m μ で調

べる。対照として脂質を全く含まないサンプルを作りこの吸収を最高値とし, 最高値の半分の溶血阻止を示す希釈倍数をその試料の GL-5 の量とした。この値に原液を作る時の希釈倍数をかけ, その脂質を抽出した時の細胞数で割った値を GL-5 の量とし unit/cell として表わした。

実 験 成 績

1. 静置培養細胞の増殖と GL-5 の合成:

仔牛血清 10% を加えた F-10 培養液での細胞の分裂時間は通常量の 4 倍の amino 酸およびビタミンを含んだ Eagle 液に牛胎児血清 10% を加えた培養液におけるそれよりも長びく。すなわち前者においては 24 時間であるが (図 1) 後者では 18 時間であった¹⁵⁾。図 1 に示すごとく Nil 2 C 1 のシャーレあたりの細胞数は最高 ($\sim 7 \times 10^6$) に達した後減少する。この現象は牛胎児血清を加えた Eagle 培養液を使用していた時は見られなかった¹⁵⁾。飽和密度に達した後の細胞数の減少は同じ培養液を使用した Nil 2 C 2 および HSV-2-5 では見られなかった (図 2, 3)。図 1 に示すごとく Nil 2 C 1 におい

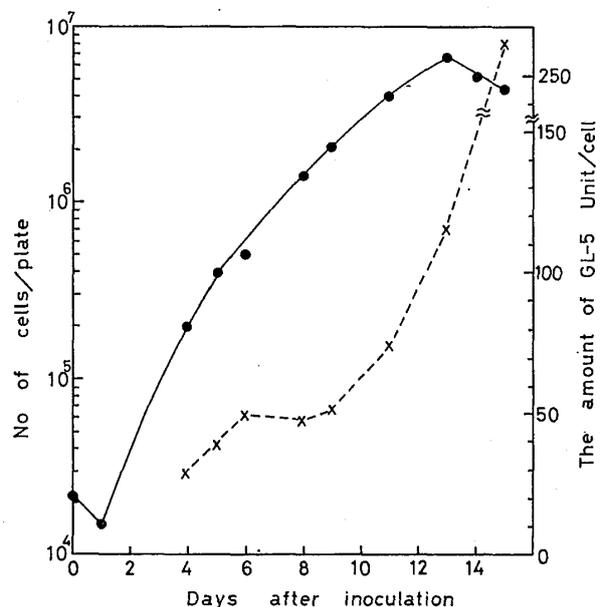


図 1. 静置培養における Nil 2 C 1 の増殖と GL-5 の合成。シャーレあたり 1×10^4 の細胞をまき, 細胞の分裂期の間は 2~3 日おきに, 細胞密度が高くなったら毎日培養液を交換した。細胞数は Coulter Counter で調べた。GL-5 の量は 2 回測定しその平均値を現わした。GL-5 の抽出および測定については研究方法を参照のこと。●—●細胞数, ×……× GL-5 量

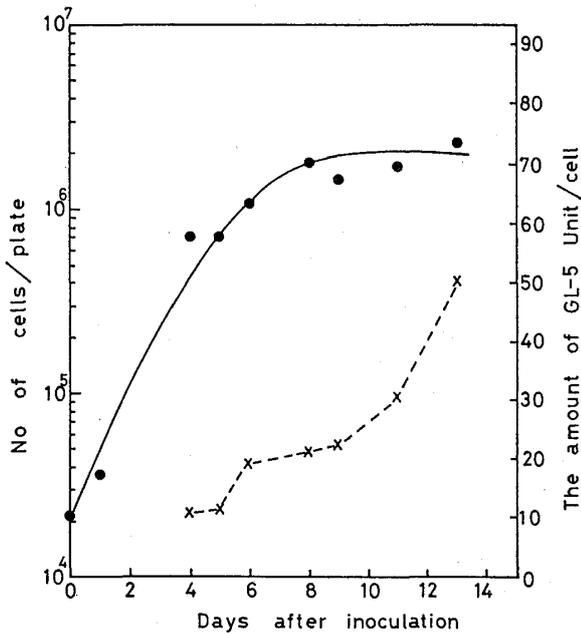


図 2. 静置培養における Nil 2 C 2 の増殖と GL-5 の合成。GL-5 の量は 3 回測定しその平均値を現わした。方法は図 1 の説明および研究方法を参照。●——●細胞数, ×……× GL-5 量

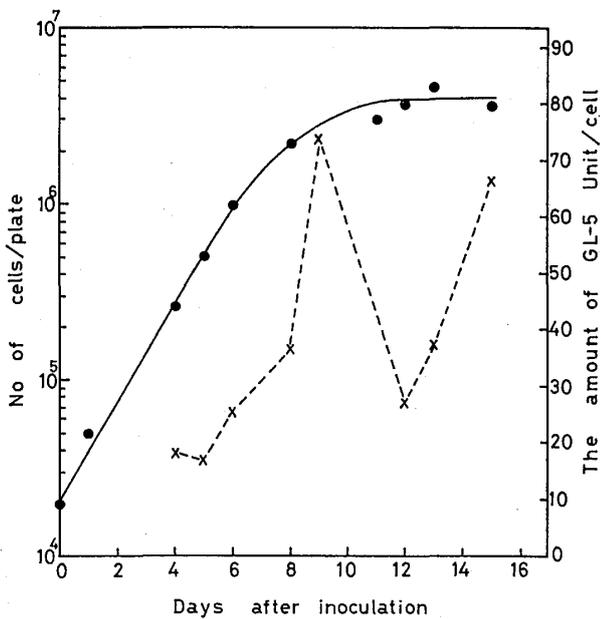


図 3. 静置培養における HSV-2-5 の増殖と GL-5 の合成。GL-5 の量は 2 回測定しその平均値を現わした。方法は図 1 の説明および研究方法を参照。●——●細胞数, ×……× GL-5 量

て細胞あたりの GL-5 の量は細胞数が増すと増加する。その増加の割合は細胞数がシャーレあたり 2×10^6 をすぎると急激に増加する。対数分裂期をすぎて細胞の分裂

時間が延長しはじめるころは GL-5 の合成はほぼ横ばい状態を示す。同じ現象は Nil 2 C 2 においても見られる。しかしこの細胞の場合は飽和密度に達した後の GL-5 の急激な上昇は見られず、その最高値は Nil 2 C 1 のその約 5 分の 1 にすぎない (図 2)。Nil 2 C 2 細胞あたりの GL-5 の量の最高値と最低値の差は約 5 倍であり細胞密度依存性 GL-5 合成の増加が見られると言ってよい。HSV-2-5 細胞においては GL-5 の量と細胞密度との関係は Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 におけるそれのごとく明らかではない (図 3)。以上の結果は ^{14}C -palmitate の 24 時間ラベルで得た結果と一致する^{12,13)}。ただし、Nil 2 C 1 の細胞密度と GL-5 合成の関係がラベルによると対数増殖期においてほとんど平行して増加しているのに反し、補体結合阻止反応で調べた結果はそれと一致しない。これはラベルで得た結果が必ずしも細胞の GL-5 の絶対量をしてはいないことを示すものである。

2. 浮遊培養細胞における密度依存性 GL-5 合成の消失:

ガラスビンに培養した Nil 2 C 1 をトリプシンでバラバラにして $\sim 1.5 \times 10^5$ cells/ml の濃度で培養液に浮遊し、浮遊攪拌培養を開始した。図 4 に示すようにはじめの 10 日間は細胞を希釈することなく培養液のみを交換した。この間細胞数はわずかに減少したが、この細胞を希釈すると 24 時間後には細胞数が 1.6 倍、48 時間後には 3.5 倍になっていることからみてこれらの細胞のほとんどが生細胞であると考えられる。Nil 2 C 1 の浮遊培養における最高密度は 2×10^5 /ml をこえることはなかった。細胞の増殖曲線と細胞あたりの GL-5 量の関係は予想に反して複雑であった。しかしながらつぎの二つのことは結論できると考えられる。第 1 には Nil 2 C 1 の静置培養で見られたような細胞密度増加にともなう GL-5 の増加は見られなかった。第 2 に浮遊培養にうつしてから時間がたつにつれて細胞あたりの GL-5 の量は減少してゆく。浮遊培養における密度依存性 GL-5 合成の消失は細胞が浮遊培養されることによって遺伝的に変化して (あるいは変異して) その能力を失ったのではなく、細胞同志の接触がないという外的条件によるものであることを調べる必要がある。浮遊培養にうつしてから 22 日目の細胞を静置培養し、分裂期の細胞と飽和密度に達した細胞の GL-5 の量を測定した。細胞あたりの GL-5 の量はいずれの場合においても非常に減少してはいるが密度依存性は示した。

浮遊培養における Nil 2 C 2 の増殖は Nil 2 C 1 よ

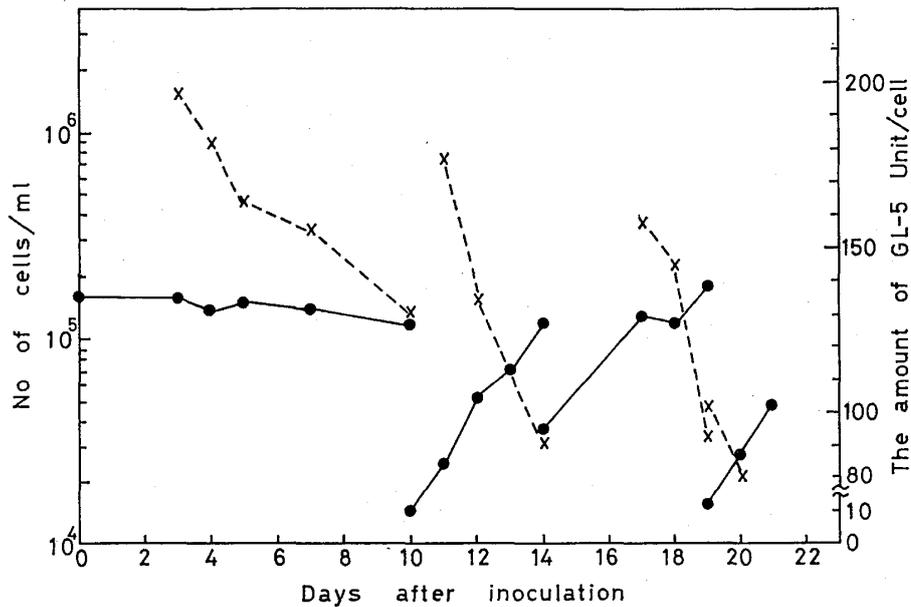


図 4. 浮遊培養における Nil 2 C 1 の増殖と GL-5 の合成。静置培養された Nil 2 C 1 をトリプシンではがして $1.5 \times 10^5/ml$ の濃度で培養液に浮遊し浮遊培養を開始した。はじめの10日間は細胞を希釈することなく培養液の交換のみを行なった。その後も飽和密度にある細胞を得たい時は培養液のみを交換した。その方法および GL-5 の測定については研究方法を参照。GL-5 の量は2回測定しその平均値を現わした。●——●細胞数, ×……× GL-5 量

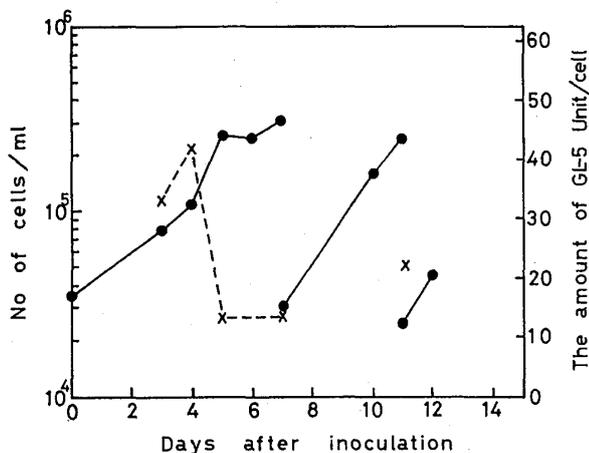


図 5. 浮遊培養における Nil 2 C 2 の増殖と GL-5 の合成。静置培養された Nil 2 C 2 を $2.5 \times 10^4/ml$ の濃度で培養液に浮遊し浮遊培養を開始した。培養方法, GL-5 の測定については図 4 の説明および研究方法を参照。GL-5 の量は2回測定しその平均値を現わした。
●——●細胞数, ×……× GL-5 量

りもよく細胞密度も $3 \times 10^5/ml$ に達した。この細胞の場合も Nil 2 C 1 におけると同様に静置培養細胞で見られた密度依存性 GL-5 の増加は浮遊培養細胞では見られなかった (図 5)。

考 察

細胞数の増加にともなって GL-5 の量が増えるという事実は ^{14}C -palmitate のラベル実験で明らかであった^{12,13}。その事実を上の実験で示したように免疫学的方法による測定でうらずけた。この方法はラベルによるそれと異なり、細胞のアイソトープの取りこみや代謝速度の変化による見せかけの値を考慮する必要がなく、化学的方法で測定した値に匹敵する。またこの反応は非常に敏感であるため少量のサンプルでも測定が可能であることは、化学的測定法にまさる点であろう。

Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 において GL-5 の量が細胞密度に依存して増加するという事実は、合成の上に細胞同志の接触がある刺激的要素となるであろうことを暗示していた。細胞と細胞が長く接触している状態のほとんど考えられない浮遊培養において Nil 2 C 1 および Nil 2 C 2 が GL-5 の合成に密度依存性を示さなかったことは上の可能性をさらに強めたと言って良い。

Roth らは糖を含む高分子の合成に関与する酵素が細胞質膜表面に局在しており、正常細胞においてはその合成は細胞同志が接触することが必要であると言っている^{15,16}。上の実験は彼らの主張を裏づける事実となるかもしれない。ただし彼らが調べているのは UDP-galactose を donor とする galactose transferase とその

acceptor との関係であり GL-5 の合成を直接見ているのではない。GL-5 の密度依存性合成は飽和密度に達した細胞表面には分裂期にある細胞表面よりも transferase activity は高いが acceptor 数が少ない¹⁰⁾ という彼らの主張と矛盾する。密度依存性糖脂質合成と一般的に言っても、個々の細胞により、また個々の糖脂質によって増加の仕方は非常に異なる¹⁷⁾。それゆえ数少ない系を使って限られた物質の合成を見てその現象を一般化することは危険であろう。

本論文は学位論文の一部である。

本論文をご校閲下さいました微生物学教室桑田教授に感謝致します。また実験に関しいろいろ便宜をはかって下さいました、放射線医学総合研究所寺島東洋三博士に感謝致します。

SUMMARY

The synthesis of Forssman glycolipid (GL-5) was examined in two clones (Nil 2 C 1 and Nil 2 C 2) of Nil 2 line and hamster sarcoma virus transformed derivatives of Nil 2 C 1 (HSV-2-5). Cells were grown both on the plastic plate and in suspension culture. The amount of GL-5 of those cells was examined during the cell growth by the complement fixation inhibition test. GL-5 increased with cell growth in both Nil 2 C 1 and Nil 2 C 2 grown on the plastic plate but not in HSV-2-5. Neither Nil 2 C 1 nor Nil 2 C 2 grown in the suspension culture, however, showed this density dependent increase of GL-5. Possible mechanisms of density dependent synthesis of GL-5 was discussed.

文 献

- 1) Wu, H. C., Meezan, E., Black, P. H. and Robbins, P. W.: Comparative studies on the carbohydrate containing membrane components of normal and virustransformed mouse fibroblasts. I. Glucosamine labeling patterns in 3 T 3, spontaneously transformed 3 T 3 and SV₄₀-transformed 3 T 3 cells. *Biochemistry*, 8, 2509-2517. 1969.
- 2) Gimes, W. J.: Sialic acid transferases and sialic acid levels in normal and transformed cells. *Biochemistry*, 9, 5083-5092, 1970.
- 3) Buck, C. A., Glick, M. C., and Warren, L.: A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed hamster cells. *Biochemistry*, 9, 4567-4576, 1970.
- 4) Sakiyama, H. and Burge, B. W.: Comparative studies of the carbohydrate-containing components of 3 T 3 and SV₄₀-transformed 3 T 3 mouse fibroblasts. *Biochemistry*, 11, 1366-1377, 1972.
- 5) Burge, B. W., Sakiyama, H. and Wickus, G.: Alteration of protein components of transformed cell membranes in two virus-cell systems. 32nd Symposium of the society for developmental biology. Developmental aspects of carcinogenesis and immunity, Academic Press, in press.
- 6) Hakomori, S. and Murakami, W. T.: Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 254-261, 1968.
- 7) Mora, P. T., Brady, R. O., Bradley, R. M. and McFarland, V. W.: Gangliosides in DNA virus-transformed and spontaneously transformed tumorigenic mouse cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 63, 1290-1296, 1969.
- 8) Robbins, P. W. and Macpherson, I.: Glycolipid synthesis in normal and transformed animal cells *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 177, 49-58, 1971.
- 9) Sakiyama, H. and Robbins, P. W.: The glycolipid patterns and tumorigenicity of clones of the Nil cell hamster line. *Fed. Proc. Abs.* 438, 1972.
- 10) Sakiyama, H. and Robbins, P. W.: Glycolipid synthesis and tumorigenicity of clones isolated from the Nil 2 line of hamster embryo fibroblasts. *Fed. Proc.* 32, 86-90, 1973.
- 11) Hakomori, S.: Density-dependent changes of glycolipids in fibroblasts (BHK and 8166), and loss of this response in the transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 67, 1741-1747, 1970.
- 12) Sakiyama, H., Gross, S. K. and Robbins, P. W.: Glycolipid synthesis in normal and virus-trans-

- formed hamster cell lines. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69, 872-876, 1972.
- 13) Sakiyama, H. and Robbins, P. W.: The effect of Dibutyl adenosin 3':5'-cyclic monophosphate on the synthesis of glycolipids by normal and transformed cells. Arch Biochem. Biophys. 154, 407-414, 1973.
- 14) Diamond, L: Two spontaneously transformed lines derived from the same hamster embryo culture. Int. J. Cancer. 2, 143-152, 1967.
- 15) Roth, S., McGuire, E. J. and Roseman, S.: Evidence for cell-surface glycosyltransferases. Their potential role in cellular recognition. J. Cell. Biol. 51, 536-547, 1971.
- 16) Roth, S. and White, D.: Intercellular contact and cell-surface galactosyl transferase activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69, 485-489, 1972.
- 17) Sakiyama, H. and Robbins, P. W.: The effect of transformation by hamster sarcoma virus on the glycolipid composition of secondary hamster embryo cells and the Nil Cell line. In vitro. in press.
-