

無血清培地における初代培養ラット肝細胞の DNA 合成の誘起

長谷川薫, 大竹英樹, 古閑睦好 (独協医大・第一生理)

Induction of DNA synthesis in adult rat hepatocytes cultured in a serum-free medium

KAORU HASEGAWA, HIDEKI OHTAKE, MUTU-YOSI KOGA

細胞増殖の調節機構を知る目的で, 無血清培地を用いて正常成熟ラットより得られた肝細胞の初代培養を行ない, DNA 合成を誘起する条件を調べた。

培養期間を P1 (~4h), P2 (4~22h), P3 (22~48h) に分け, 4h, 22h に培地交換を行なった。P1 に FD, P3 にグルカゴン (G) とインシュリン (I) を基本培地に加えると顕著な DNA 合成の上昇がみられた。G や I 単独では効果は小さかった。G と I は P3 に加えることが必要で, P1, P2 だけに加えても効果は無かった。G の代わりに cAMP やメチルキサンチンを用いても同じ結果が得られたので G の作用は cAMP を介していると思われる。我々の *in vivo* での実験から, 肝 DNA 合成の誘起には 2 段階必要と考えられ, G や I は第 2 段階に属する。第 1 段階に属するものは多いが, 第 1 段階に必要な細胞内変化の 1 つはイオン化であるという可能性を調べるために Na⁺ の細胞内流入を阻害する amiloride を用いて調べたところ, 培養前期に amiloride を加えると DNA の合成は誘起されることがわかった。培地の構成成分について DNA 合成に及ぼす影響を調べたところ, ビルビン酸 (Na 塩) を 10mM 以上で用いると肝細胞は無血清でも生存した。10mM 以上では濃度依存的に DNA 合成を高めた。DNA 合成のピークは 40mM で観察された。ビルビン酸の効果は六炭糖では置き換わらなかった。高濃度のビルビン酸の詳しい役割については不明である。

以上の結果より, 高濃度のビルビン酸を用いることによって無血清培地で肝細胞の初代培養が可能であり, また肝 DNA 合成の誘起には, 培養初期の Na⁺ の細胞内流入と, その後に起こる細胞内の cAMP 量の増加が必要であることがわかった。

粘菌の細胞周期に伴う細胞内 pH の変動

森沢正昭(東大・海洋研), Richard A. Steinhardt, (カルフォルニア大・パークレー校・動物)

Change of intracellular pH during mitotic cycle in *Physarum polycephalum*

MASAAKI MORISAWA, RICHARD A. STEINHARDT

近年動物細胞の細胞周期と細胞内 pH との関連が注目されている。たとえばウニ卵では受精時に卵内の pH が増し, それに伴い蛋白質合成等が開始すると考えられている。異常分裂をするガン細胞では細胞内 pH が正常細胞に比べ低いと言われている。真性粘菌の変形体は 1 個の巨大な多核の細胞で栄養培地上では正確な同調核分裂が進行し細胞周期の研究に格好の材料である。Thomas 型微小ガラス pH 電極で測定した変形体細胞内 pH は, 中間期では 7.0 で分裂期に近づくにつれ上昇する。分裂の 3 時間前には小ピークを示し, 分裂期には pH7.5 に達する。以後次第に下降し分裂後 6 時間では pH7.0 に戻る。酢酸ナトリウムを栄養培地に加えると人為的に細胞内 pH を下降させることができる。細胞内 pH を 6.7 に保つと核分裂は阻止される。この細胞を正常栄養培地に戻すと細胞内 pH は上昇し pH7.3—7.4 に達すると分裂する。一方生長期の変形体を非栄養培地に移すと網目状の飢餓変形体となる。飢餓状態への移行過程では細胞内 pH は次第に下降し 15 時間後には pH6.5 となる。それに伴い核の分裂周期は著しく遅れ, 分裂の同調性は失なわれる。飢餓変形体を正常培地に移すと再び円盤状の生長変形体となる。それに伴い細胞内 pH は上昇し, 数時間後には pH7.4 に達し正常な同調核分裂を行なう。加えて, 酢酸ナトリウムで細胞内 pH を低くした変形体では, 細胞内 pH の低い飢餓変形体と同様, 網目状構造に変化することが観察された。以上の結果から細胞内 pH が細胞同期, 特に核分裂の開始およびその同調性に重要な役割を果していることは明らかである。また細胞内 pH が変形体の形態変化にも影響をおよぼすことも今後の研究課題として興味深い。