

大量培養による骨格筋衛星細胞中の食肉タンパク質の 分離利用に関する基礎的研究

池 内 義 秀 (新潟大学農学部助教授)

〔研究の目的〕

筋肉組織には、分裂能力を残したまま融合せず単核の状態で筋管細胞に接着しその基底膜下に留まっている衛星細胞 (satellite cell) と呼ばれる細胞群が存在する (Mauro, 1961)。この細胞は、骨格筋中に存在する核のほんの一部を含んでいるに過ぎないが、筋肉の成長や再生に決定的な役割を果たしている。例えば、筋線維が損傷を受け変性崩壊をするといっせいに分裂を繰り返して、やがて融合して多核細胞となり新たな筋線維を形成する。その際も一部は将来に備えて衛星細胞として筋肉組織中に留まる (Bischoff, 1974)。

衛星細胞の増殖調節機構について未だ理解されていないが、この細胞を増殖させる因子やその機構が明らかにされれば、大量培養によって培養細胞から筋肉 (動物) タンパク質資源を得ることが可能となるであろう。また、牛の老化に伴う老年性萎縮による筋肉量の損失という畜産経済的な問題を軽減し、畜産物の有効利用を図ることも出来るかも知れない。

筋細胞の成長分化の過程で神経組織は栄養的な役割を果たしていると考えられるので、本研究ではまず脳由来の fibroblast growth factor (Brain FGF) を調整し、衛星細胞に対する増殖促進効果を調べた。

〔方 法〕

(1) 脳由来 fibroblast growth factor (FGF) の調製

脳由来の FGF は基本的には Gospodarowicz (1978) の方法に従って行った。牛の脳 2 kg を 0.15 M 硫酸でホモジナイズし、塩酸で pH4.5 に調整後、攪拌抽出をした。遠心後、上清を 1N NaOH で pH6.5 に調製し、さらに硫酸を加えて塩析した。透析して硫酸を除去した後 CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーにかけ、段階的溶出法により分離した。その活性分画を濃縮し、Sephadex G-75 でゲル濾過、引続きさらに CM-Cellulose イオン交換クロマトグラフィーで精製した。

精製した標品の純度は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Laemmli, 1970) で、またその濃度の決定は色素結合法 (Bradford, 1976) で行った。FGF のバイオアッセイは、Balb/c3T3 細胞を用いて行い、細胞数の増加を DNA の量から算定した。なお、DNA 量は DABA 蛍光法で求めた (Kissane and Robbins, 1958)。

(2) ラット骨格筋からの衛星細胞の分離とその細胞数の決定

ラット骨格筋挽肉に PBS-Pronase 溶液を加え、衛星細胞を筋線維から遊離させた。37℃、1 時間保温後遠心して上清画分を回収した。細胞懸濁液をコラーゲンでコーティングしていないペトリ皿に移し、血清及び抗生物質を含む培養液で 37℃ で 2 時間保温した。この操作で大部分の fibroblast はペトリ皿に結合する。衛星細胞はこの操作ではペトリ皿に結合しないので培養液を遠心して回収した。回収されたペレットを培養液に懸濁し、目的の密度になるようにコーティングしたプレートに衛星細胞を播いた。

培地の血清濃度を下げ、細胞が休止期に入のを待って FGF を含む “defined medium” に切り換えた。37°C, 5% CO₂ で一定期間 (3 日間) 保温して衛星細胞を増殖させた後、増殖を抑え細胞融合を促す “conditioned medium” を加えた。衛星細胞はこの培地で多核細胞の筋管細胞になるので、染色後顕微鏡下で融合した核と融合しなかった核の数を数え、その割合から衛星細胞の増加を算定した (Allen et al., 1984)。

〔結果を考察〕

Gospodarowicz ら (1974) は牛の下垂体以外に脳の抽出物にも FGF 活性があることを報告した。しかも、Balb/c3T3 細胞に対する増殖促進効果を比較したところ、下垂体よりもむしろ脳により高い FGF 活性を認めた。そこで、我々は脳由来の FGF を精製して、その衛星細胞増殖促進効果を検討することにした。

脳由来 FGF の精製は基本的には下垂体 FGF の

場合と同じであり、まず、牛の脳を硫酸でホモジナイズし、塩酸で pH4.5 に調整したのち硫酸分画を行って得られた沈澱物を蒸留水で溶解した。透析後、0.1M のギ酸で pH6.0 に調製し、CM-Sephadex C-50 につけ、段階的溶出法により分離した。大部分の FGF 活性は 0.1M 磷酸緩衝液 - 0.5M NaCl の溶出液で回収されたので、その活性画分を濃縮し、Sephadex G-75 でゲル濾過を行った。そのゲル濾過の溶出パターンを Fig. 1 に示す。図に示したように、分子量の異なる 3 つのピークが得られた。そこで、得られた溶出液を 6 つのフラクションに分け各々、Balb/c3T3 細胞を用いて生物活性を調べたところ、フラクション 3 と 4 に高い活性が認められた。Gospodarowicz ら (1978) の報告と照らし合わせると、分子量の大きい方が brain FGF-1、生物活性が高く、しかも分子量が小さい方が brain FGF-2 画分と思われる。活性の高かったフラクション 4 画分を濃縮し、0.2M ギ酸アンモニウム (pH6.0) に溶かし、

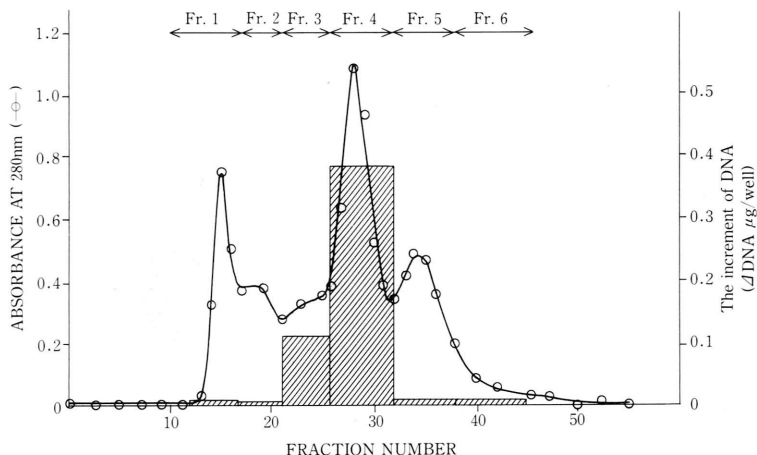


Fig. 1 Chromatographic profile of brain FGF preparation on Sephadex G-75 gel. The 0.5M NaCl elute from CM-Sephadex C-50 chromatography was loaded onto a 2.6×60 cm column of Sephadex G-75 equilibrated with 0.1M ammonium carbonate, pH8.5. The histogram shows the mitogenic activities of the different fractions upon the Balb/c3T3 cell line.

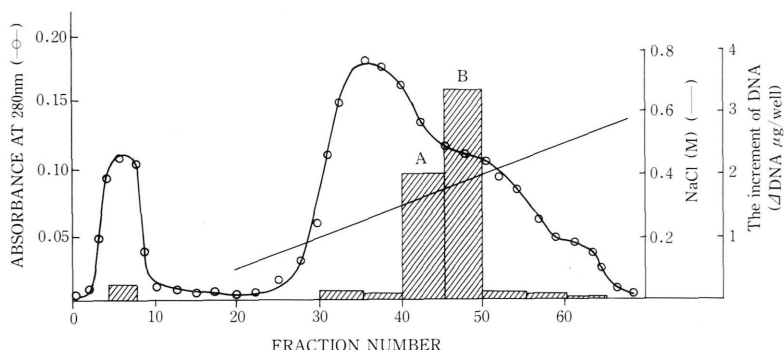


Fig. 2 Gradient elution of brain FGF on second CM-Sephadex C-50. Fraction-4 containing mitogenic activity from Sephadex G-75 gel filtration was loaded onto a second CM-Sephadex C-50 column (1×10 cm) equilibrated with 0.1M Na-phosphate, pH6.0. The column was then eluted with linear salt gradient (0.1M to 0.8M NaCl). The histogram shows the mitogenic activities of the different fractions upon the Balb/c3T3 cell line.

CM-Sephadex C-50 イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製標品を得た。**Fig. 2** にその溶出パターンと生物活性を示す。図から分かるように、塩濃度が0.3から0.4の位置に生物活性の高い画分 (画分A, B) が出現した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (**Fig. 3**) でその純度を調べたところ、画分Aには多くの混入物が存在していたが、画分Bはかなり精製されていることが分かった。その主要なバンドの分子量は、12,000前後であることから、得られた画分Bの標品は脳由来 FGF-2 であると結論した。そこで、画分Bを用いて脳由来の FGF の衛星細胞に対する増殖促進効果を調べることにした。

ラット骨格筋から分離した衛星細胞を2%の馬血清と0から250ng/mlの脳由来 FGF を含む培養液で72時間培養したのち、1%馬血清、 $1 \mu\text{M}$ insulin および $1 \mu\text{g/ml}$ linoleic acid を含む融合促進のための培養液と交換してさらに培養を続けた。48時間後固定し、Giemsa 染色をした。1mm² 当りの筋管細胞の核の数、全細胞核数及び融合割合を調べるために、顕微鏡下で同一処理をした3つ

の培養ウエルの各々10地点を無作為に選び、その視野の中の核を数えた。その結果を **Table 1** に示す。

融合した細胞中の核数は加えた FGF の濃度に

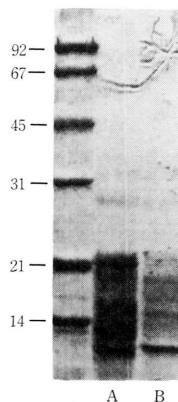


Fig. 3 SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of fractions(A,B) obtained from second CM-Sephadex C-50 chromatography. Molecular mass markers are indicated by bars: phosphorylase b (92kd), BSA (67kd), ovalbumin (45kd), carbonic anhydrase (31kd), soybean trypsin inhibitor (21kd) and lysozyme (14kd).

Table 1 Proliferative response of satellite cells to brain FGF

FGF (ng/ml)	unfused nuclei	fused nuclei	total nuclei	%fusion
0	179	10	189	5.3
25	234	13	247	5.3
75	314	12	326	3.7
150	383	32	415	7.7
200	541	50	591	8.5
250	673	108	781	13.8

Satellite cell cultures were exposed for 72 h to medium containing 2% horse serum plus various concentrations of FGF (0-250 ng/ml). Cultures then received fusion medium for 48h. FGF stimulation of satellite cell proliferation is reflected in the increase in myotube nuclei (fused nuclei) per mm² as brain FGF is increased.

依存して顕著な増加を示した。これらは明らかに衛星細胞が脳由来の FGF によって増殖したことを示している。その増殖促進効果は 150ng/ml 以上で認められた。しかしながら、Balb/c3T3 細胞に対する脳由来 FGF の増殖促進効果と比べるとその活性は 1/10 程度であった。これは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から分かるように得られた標品の純度がやや低いことに依るのか、それとも線維芽細胞と比べて衛星細胞の脳由来 FGF に対する感受性が低いことに依るのか不明である。最近、ヘパリンアフィニティーカラムによる細胞成長因子の分離法が報告されているので (Kimura and Goto, 1987), 純度の高い脳由来 FGF 標品を精製して再度検討する必要があると考える。一方, Table 1 から分かるように, 融合していない細胞の核も脳由来 FGF の濃度に依存して同様に増加した。また, 融合割合も期待したほ

ど高くなかった。これは明らかに衛星細胞分離の過程で混入した線維芽細胞の増殖が脳由来の FGF によって刺激されたためである。従って, 今後は衛星細胞の分離方法も改良する必要があると思われる。

文 献

- 1) Allen, R.E., Dodson, M.V. and Luiten L.S. (1984) *Experimental Cell Res.*, 152 : 154
- 2) Bischoff, R. (1974) *Anat. Rec.*, 180 : 645
- 3) Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72 : 248
- 4) Gospodarowicz, D. (1974) *Nature*, 249 : 123
- 5) Gospodarowicz, D. Bialecki, H. and Greenberg, G. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253 : 3736
- 6) Kissane, J.M. and Robins, E. (1958) *J. Biol. Chem.*, 233 : 184
- 7) Kimura, I and Goto, Y (1987) *細胞*, 19 : 34
- 8) Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227 : 680
- 9) Mauro, A. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9 : 493

Skeletal Muscle Satellite Cell Proliferation

by Bovine Brain Fibroblast Growth Factor

Yoshihide Ikeuchi (Department of Animal Science, Niigata University)

We have examined to purify brain fibroblast growth factor (Brain FGF) from bovine brain tissue using this procedure involving ammonium sulfate fractionation, followed by chromatography on CM-Sephadex C-50, Sephadex G-75 and second CM-Sephadex C-50. The fraction eluting from second CM-Sephadex C-50 column at 0.35-0.4M NaCl was active in stimulating DNA synthesis in Balb/c3T3 cells. It mainly consisted of a polypeptide of 12,000 molecular weight when analysed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The combined data (molecular weight and biological activity) suggested that the fraction isolated using this procedure contained a large quantity of brain FGF purified by Gospodarowicz et al. (1978).

Skeletal muscle satellite cells were cultured from mature rats and were treated in vitro with the isolated brain FGF. Morphological observations and quantitative data indicated that the brain FGF increased the number of nuclei. The new nuclei seemed to result from satellite cell proliferation and from the fusion of some of them. But, a part of new nuclei originated from growth of fibroblast contaminated in cultures. In the range of 150-250ng/ml, this factor promoted the level of proliferation and subsequent myotube formation when satellite cells were induced to differentiate. However, the biological activity for satellite cells was fairly lower than we had imagined. This may be due to impurities present in the FGF preparation.