

活性酸素による遺伝子発現と細胞増殖の制御

柴 沼 質 子

①

## 活性酸素による遺伝子発現と細胞増殖の制御

柴 沼 質 子

## 目 次

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| 目次                                                  | i   |
| 略語表                                                 | iii |
| 序章                                                  | 1   |
| 第一章 白血病細胞 U937 における活性酸素の放出と活性酸素による細胞内 pH の調節        | 3   |
| 序節                                                  | 3   |
| 第一節 活性酸素の放出とその調節機構                                  | 3   |
| 第二節 活性酸素による細胞内 pH の調節                               | 4   |
| 第一章 考察                                              | 6   |
| 第二章 増殖刺激後の培地中 $H_2O_2$ 濃度の変動と細胞増殖への影響               | 19  |
| 序節                                                  | 19  |
| 第一節 増殖刺激後の培地中 $H_2O_2$ 濃度の変動                        | 19  |
| 第二節 DNA 合成への catalase の影響                           | 19  |
| 第三節 DNA 合成への $H_2O_2$ 添加の影響                         | 20  |
| 第二章 考察                                              | 21  |
| 第三章 $H_2O_2$ の静止期の Balb/3T3 細胞に対する competence 因子様作用 | 28  |
| 序節                                                  | 28  |
| 第一節 $H_2O_2$ による静止期の Balb/3T3 細胞の DNA 合成促進作用        | 28  |
| 第二節 $H_2O_2$ による増殖関連遺伝子の発現の誘導                       | 29  |
| 第三節 $H_2O_2$ による細胞内蛋白質リン酸化の促進                       | 30  |
| 第三章 考察                                              | 31  |

|                                                                                           |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 第四章 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の Maus 骨芽細胞 MC3T3 に対する増殖抑制作用                            | 4 4  |
| 序節                                                                                        | 4 4  |
| 第一節 TGF $\beta$ 、H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による G <sub>1</sub> 後期特異的 DNA 合成抑制作用        | 4 4  |
| 第二節 TGF $\beta$ による DNA 合成抑制作用に対する catalase の効果                                           | 4 6  |
| 第三節 TGF $\beta$ による MC3T3 細胞からの H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 放出の促進                       | 4 7  |
| 第四節 静止期、及び G <sub>1</sub> 後期の細胞の TGF $\beta$ 結合能の検討                                       | 4 7  |
| 第五節 MC3T3 細胞における H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による遺伝子発現の誘導                                | 4 8  |
| 第六節 MC3T3 細胞における、TGF $\beta$ 、H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による細胞内蛋白リン酸化の促進               | 4 9  |
| 第七節 ras transform 細胞の、TGF $\beta$ 、H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による DNA 合成抑制作用に対する感受性の欠如 | 5 0  |
| 第八節 静止期の MC3T3 細胞に対する catalase の増殖促進効果                                                    | 5 1  |
| 第四章 考察                                                                                    | 5 2  |
| まとめ                                                                                       | 8 2  |
| 材料及び方法                                                                                    | 8 5  |
| 参考文献                                                                                      | 9 4  |
| 謝辞                                                                                        | 10 3 |

略 語 表

|                    |                                              |
|--------------------|----------------------------------------------|
| BCECF              | 2,7-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein |
| BHA                | butylated hydroxyanisole                     |
| BSA                | bovine serum albumin                         |
| con A              | concanavalin A                               |
| EGF                | epidermal growth factor                      |
| FBS                | fetal bovine serum                           |
| <sup>3</sup> H-Thd | <sup>3</sup> H-thymidine                     |
| HPPA               | 3-(p-hydroxyphenyl)-propionic acid           |
| IL-2               | interleukin 2                                |
| IL-3               | interleukin 3                                |
| OAG                | 1-oleoyl-2-acetyl glycerol                   |
| PDD                | phorbol 12,13-didecanoate                    |
| PDGF               | platelet-derived growth factor               |
| Serum**            | MITO + Serum Extender                        |
| SOD                | superoxide dismutase                         |
| TGF $\beta$        | transforming growth factor $\beta$           |
| TNF $\alpha$       | tumor necrosis factor $\alpha$               |
| TPA                | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate         |
| TRE                | TPA-responsive element                       |
| X                  | xanthine                                     |
| XOD                | xanthine oxidase                             |

## 序章

酸素は、生物にとって必須のものであると同時に障害性のものである。酸素の還元分子種、すなわち活性酸素 ( $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ ) は生体を構成する多くの成分の酸化過程を促進する<sup>1-3)</sup>。活性酸素は、種々の刺激により細胞から放出されるだけでなく、呼吸の過程や、放射線、酸化還元活性化薬剤への暴露により生体内に生じ、生物は常に内在性の活性酸素に曝されているといえる。それゆえ、活性酸素は、炎症をはじめとし、虚血、アレルギー、老化などの様々な病態や、発癌の initiation、promotion 過程にも深く関与しているとして注目されている<sup>4, 5)</sup>。しかし一方で、何らかの生理的意義を担っている可能性も考えられており、例えば、ウニの受精に際して  $H_2O_2$  の放出がみられるし<sup>6)</sup>、甲状腺での thyroid hormone の合成に  $H_2O_2$  による酸化反応が重要な働きをしていることが知られている<sup>7)</sup>。また、Down 症候群では superoxide dismutase 遺伝子のコピー数が増加していることから、神経発生にも活性酸素が関与することが示唆されている<sup>8)</sup>。細胞レベルにおいては、rat adipocyte において、 $H_2O_2$  は、insulin 類似の作用を持つ<sup>9, 10)</sup>。遺伝子発現に関しても、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) や血清刺激による ornithine decarboxylase<sup>11, 12)</sup>、IL-2<sup>13)</sup> の誘導に、活性酸素の関与が示唆されている。しかし、従来の研究は、細胞に与える毒性に関するものが大部分であり、細胞に対するその他の作用や、その作用機序についてはまだほとんど明らかにされていない。

本研究では、活性酸素が、単なる障害性の刺激とは異なって、積極的な刺激として、すなわちシグナル伝達物質の一つとして増殖制御に関わっている可能性を明らかにすることを目的とし、第一に、ヒト白血病細胞 U937 を用いて、TPA や血清による刺激の直後に活性酸素 ( $O_2^-$ ) が放出され、この  $O_2^-$  が  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化を起こすこと、第二に、 $H_2O_2$  が静止期の Balb/3T3 細胞の増殖に対して促進的に作用すること (DNA 合成、遺伝子発現、細胞内蛋白質リン酸化) について知見を得ることが出来た。実際、Balb/3T3 を TPA や platelet-derived growth factor (PDGF) で刺激すると、 $H_2O_2$  の放出がみられた。さらに、細胞周期の進行に伴い、 $G_1$  後期にも、培地中の  $H_2O_2$  濃度の上昇が認められ、この時期には  $H_2O_2$  は細胞増殖に対して抑制的に作用した。このような  $H_2O_2$

の細胞増殖制御における正、負両面の作用について検討を加え、増殖制御への活性酸素の関与について明らかにすることを試みた。

## 第一章 白血病細胞 U937 における活性酸素の放出と活性酸素による細胞内 pH の調節

### 序節

種々の細胞の中でも白血球、特に、マクロファージ、好中球などの食細胞は、強い活性酸素産生能を有している<sup>14)</sup>。活性酸素の細胞における生理的意義の理解を目指して、まず最初に、ヒト白血病細胞由来の U937 を用いて、活性酸素放出の機構の解析を試みた。

細胞を増殖刺激した時に、その初期に引き起こされる変化として、活性酸素の放出とならんで細胞内 pH の上昇が知られている<sup>15-24)</sup>。この細胞内 pH の上昇は、DNA 合成に向けて必要なステップの一つと考えられており<sup>18, 25)</sup>、細胞増殖への関与が議論されている。そこで、続いて、細胞増殖制御に活性酸素が関わっている具体的なメカニズムの一つとして、活性酸素が細胞内 pH の上昇のシグナルとなっている可能性を検討した。

### 第一節 活性酸素の放出とその調節機構

(1) 用いた U937 細胞は、RPMI1640 + 10% FBS で培養し、 $1.5 \times 10^5$  cells/ml で継代した後、2日、3日、4日目のものを用いた。2日目の細胞は対数増殖期、4日目のものはほぼ静止期にあるとみなした。活性酸素の測定は、培養した U937 細胞を Hanks' 液に浮遊させ、lucigenin 存在下、その化学発光により行った。

その結果、細胞を、血清、1-oleoyl-2-acetyl glycerol (OAG)、phorbol 12,13-didecanoate (PDD) で刺激すると、それぞれの刺激に応じて活性酸素の放出が認められることがわかった。血清で刺激した場合には5分前後、OAG では10分前後をピークとした一過性の活性酸素の放出がみられるのに対し、PDD の場合には比較的持続性の放出がみられた(図1)。また、血清、PDD による活性酸素の放出は、細胞の増殖状態により kinetics の変化する傾向が認められた。

Superoxide dismutase (SOD) の同時添加により、これらの化学発光は完全に抑えられたことから、放出された活性酸素は、 $O_2^-$  であると思われた。



(2) 現在、細胞内のシグナル伝達系においては、PI turnover の活性化に引き続く protein kinase C の活性化が注目されている<sup>26)</sup>。O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出を促した PDD、OAG は protein kinase C の活性化を直接引き起こす<sup>26)</sup>。そこで、U937 細胞からの O<sub>2</sub><sup>-</sup>放出に protein kinase が関与する可能性を検討する目的で、刺激に先立って、細胞を protein kinase C、calmodulin dependent kinase の阻害剤である H-7、W-7 でそれぞれ処理して、O<sub>2</sub><sup>-</sup>放出への影響を調べた。O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出は、H-7、W-7 で抑制される傾向を示した。

血清、OAG による刺激の場合には、H-7 によって部分的に、同濃度の W-7 によってほぼ完全に O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出が抑制された (図 2)。PDD による O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出は、H-7 でほぼ完全に抑えられた (図 3-(1))。一方、PDD による O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出に対する W-7 の効果は、細胞の増殖状態に依存し、対数増殖期の細胞からの O<sub>2</sub><sup>-</sup>の放出は W-7 によって抑制され、増殖の停止した細胞からの放出は促進された (図 3-(2)、(3))。

## 第二節 活性酸素による細胞内 pH の調節

(1) 細胞内 pH は、Hanks'液 (pH 7.4) 中、U937 細胞 (3×10<sup>5</sup> cells/ml) に、2,7-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein (BCECF) を取り込ませ、その蛍光の変化を 37°C で spectrofluorometer により測定した。

まず最初に、観察される蛍光が細胞内の pH (pH<sub>i</sub>) の変化を反映したものかどうかを確認するために、NH<sub>4</sub>Cl (25 mM、pH 7.4) を培地に加えて蛍光の変化を調べた。NH<sub>4</sub>Cl は、一過性に細胞質の pH をアルカリ化させることが知られている<sup>27)</sup>。その結果、報告されていると同様な蛍光の変化が認められた (図 4-A)。また、得られた蛍光強度と pH<sub>i</sub> の絶対値の関係は、K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ionophore である nigericin を用いる H<sup>+</sup>-equilibration method<sup>28)</sup> により得ることが出来た。この方法によれば、nigericin を処理すると細胞内 pH は外液 pH と等しくなり (図 4-B)、その時の蛍光強度と外液 pH の値より検量線を書くことが出来る。

NH<sub>4</sub>Cl 添加により報告されているような蛍光の変化がみられたこと、nigericin により外液 pH の変化に応じて蛍光の変化がみられたことから、観察された蛍光強度の変化は、

細胞内の pH の変化を反映しているものとみなした。

(2) 実際に細胞を刺激して、 $pH_i$  が変化するかどうかを調べた。細胞を、血清、OAG、PDD により刺激すると、 $pH_i$  の上昇が、5 分前後にみられた (図 5)。

多くの細胞は  $H^+$  を含むいくつかのイオンの antiporter を持っているが、細胞を、主に増殖刺激した時にその初期に引き起こされる細胞内のアルカリ化は、amiloride 感受性の  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化によるといわれている<sup>21)</sup>。U937 細胞において、PDD により引き起こされる  $pH_i$  の変化も amiloride により阻害されたことから (図 6-A)、 $Na^+/H^+$  antiporter によるものと思われた。

この PDD による  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化への活性酸素の関与を調べるために、培地中に SOD を加えたところ、PDD による  $pH_i$  の上昇が抑制される傾向を示した。熱処理により不活性化した SOD、また catalase ( $H_2O_2$  消去剤)、mannitol ( $\cdot OH$  消去剤) にはそのような効果はみられなかった (図 6-B、C)。従って、活性酸素種のうち  $O_2^-$  が  $pH_i$  の上昇に関与していると思われた。

次に、抗酸化剤として知られている vitamine E、butylated hydroxyanisole (BHA) にもそのような効果があるかどうかを検討した。vitamine E、BHA を 10 分間前処理後 PDD で刺激すると、 $pH_i$  の上昇は抗酸化剤が存在しない場合に比べて抑制された (図 6-D)。

以上のことから、活性酸素、中でも  $O_2^-$  が PDD による  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化に必要なシグナルの一つであることが示唆された。

(3) U937 細胞における PDD 以外の他の刺激による  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化、或いは、他の細胞における  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化にも  $O_2^-$  が関与しているかどうかを検討した。U937 細胞において血清もまた amiloride 感受性の  $pH_i$  の上昇を引き起こす (図 7)。この血清による  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化も SOD の存在により抑制される傾向を示した (図 7)。

次に、U937 細胞以外の細胞としてマウス thymocyte を用いて、この細胞を concanavalin A (con A) で刺激したときの  $pH_i$  の変化について検討した。thymocyte を con A で刺激すると刺激後 5~10 分にかけて amiloride 感受性の  $pH_i$  の上昇がみられ、

SODはこの上昇も抑制した(図8)。

従って、U937のみならず種々の細胞において、 $O_2^-$ は、増殖因子、或いはPDDのようなtumor promoterによって引き起こされる $Na^+/H^+$  antiporterの活性化のメディエーターとして作用している可能性が示唆された。

(4) 上述の実験より、 $O_2^-$ は $Na^+/H^+$  antiporterの活性化を引き起こすのに、必要なシグナルの一つになっていることが示された。そこで、次に、 $O_2^-$ 単独で $Na^+/H^+$  antiporterの活性化を引き起こすことができるかどうかを検討した。

Xanthine oxidase (XOD)は、基質であるxanthine (X)を尿酸に変化させる過程で $O_2^-$ と $H_2O_2$ を発生させる。この酵素系を用いて培地中に活性酸素を発生させたところ、1~2分のlag timeの後に $pH_i$ の上昇が認められた(図9-A)。この上昇はXOD、X各々単独ではみられず、XODの阻害剤であるallopurinolにより阻害された(図9-B)。また、SODを共存させるとこの上昇は抑制された(図9-C)。

以上のことから、X/XOD処理により観察された $pH_i$ の上昇は、Xを基質とするXODの酵素反応の結果生成した $O_2^-$ により引き起こされたものと思われる。また、amilorideに感受性であったことから、この $pH_i$ の上昇は、生成した活性酸素により非特異的に細胞膜が障害を受けてイオンの透過性が変化した結果ではなく、特異的な $Na^+/H^+$  antiporterの活性化の結果引き起こされたものであると思われた。

## 第一章 考察

この章では以下の結論が得られた。

- 1) U937細胞を血清、或いはPDD、OAGで刺激すると、10分前後に $O_2^-$ の放出が認められた。
- 2) U937細胞からの $O_2^-$ 放出には、protein kinase C、calmodulin dependent kinaseが関与していると思われた。

3) 血清、PDDによる $O_2^-$ 放出の kinetics、ならびにPDDによる $O_2^-$ 放出に対するW-7の効果は、細胞の増殖状態により異なった。

4) U937細胞を、血清、OAG、PDDで、或いは、マウス thymocyte を con A で刺激すると、5~10分後に amiloride 感受性の $Na^+/H^+$  antiporter が活性化され、 $pH_i$ の上昇が引き起こされた。

5) これらの刺激による $Na^+/H^+$  antiporter の活性化は、 $O_2^-$ を介したものであった。

6) U937細胞において $O_2^-$ は単独で $Na^+/H^+$  antiporter の活性化を引き起こした。

白血球、特に好中球などの食細胞は、その食作用時に $O_2^-$ を生成するといわれている<sup>14)</sup>。しかし、これらの細胞は、食作用時のみならず多くの可溶性物質で刺激した時にも $O_2^-$ を放出することが知られている<sup>14)</sup>。また、近年、食細胞以外の細胞からもTPAなどで刺激した時に活性酸素が放出されることが報告されている<sup>29-31)</sup>。今回、U937細胞において、血清によっても $O_2^-$ 放出が促進された。その量は、食細胞からの放出量に比べるとごく微量であり、放出の kinetics は増殖状態に依存していたことから、従来考えられていた食細胞による殺菌作用における役割以外に、比較的低濃度の活性酸素が、細胞増殖に関連した何らかの役割を担っている可能性を示唆するものと考えられた。

今回用いた刺激の中で、血清はU937細胞の増殖を促進し、PDDはマクロファージ様の細胞への分化を誘導する<sup>32)</sup>。従って、 $O_2^-$ の放出と細胞増殖との関係は単純なものではないと思われる。しかし、両者による $O_2^-$ の放出は、その kinetics が異なっており、この違いが、血清とPDDの作用の差を反映している可能性も考えられる。

今までも、食細胞における $O_2^-$ 放出の促進には、細胞内遊離 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇や protein kinase C の活性化が関与しているといわれていた<sup>14)</sup>。そして、今回のH-7、W-7を用いた実験より、やはり両者の関与が示唆された。さらに、PDD、OAGといっ

た直接 protein kinase C を活性化する薬物による  $O_2^-$  の放出に、protein kinase C だけでなく calmodulin dependent kinase の活性化が関与していることが示された。このことは、PDD、OAG は、protein kinase C を活性化するだけでなく、同時に、 $Ca^{2+}$  の関与するシグナル伝達経路の活性化も引き起こしている可能性を示唆するものと考えられる。このように、一つの反応の複数のキナーゼによる制御は、最近、kinase 間の cross talk として注目されており<sup>23)</sup>、細胞の生物作用の微妙な制御の一端を表しているといえよう。また、H-7、W-7 の効き方は、血清、OAG 刺激と PDD 刺激の場合で異なっており、 $O_2^-$  の放出に関与している機構が複雑に制御されていることを物語っている。その中で注目したいのは、PDD による  $O_2^-$  放出に対する W-7 の効果が、細胞の増殖状態により大きく異なったことである。このことは、同じ刺激による場合でも、細胞の増殖状態により  $O_2^-$  放出のメカニズムが異なることを意味しており、細胞増殖制御と  $O_2^-$  放出との密接な関係を示唆するものと思われる。

そこで、 $O_2^-$  と細胞増殖制御の関係を検討するために、増殖刺激により、やはりその初期に引き起こされる細胞内 pH の上昇と、 $O_2^-$  放出との関係を調べてみた。その結果、U937 細胞を増殖因子、或いは tumor promoter である phorbol ester で刺激すると  $O_2^-$  が放出され、その  $O_2^-$  が  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化をひきおこし、細胞内の pH を上昇させることが示された。May らは、insulin の引き起こす  $pH_i$  の上昇は、細胞膜中の NADPH oxidase の活性を介していること、GSH-oxidants、 $H_2O_2$ 、或いは tert-butyl hydroperoxide で細胞を処理すると  $pH_i$  の上昇が引き起こされることを報告しており<sup>9, 10)</sup>、活性酸素が、種々の細胞で  $pH_i$  の上昇のメディエーターになっていると思われる。

$pH_i$  の上昇は、一般には DNA 合成を引き起こすのに必要な一つのステップであると言われており、細胞の増殖制御に何らかの関与をしていると思われるが、その具体的な意味は明らかではない。U937 細胞において、血清は増殖因子、PDD は分化誘導因子として働く。 $pH_i$  の上昇は、 $O_2^-$  放出と同様に、この両者によって引き起こされた。 $pH_i$  の上昇の kinetics は、第一節における  $O_2^-$  の放出の kinetics を反映して、血清によっては一過性、PDD によっては持続性となった。この kinetics の差が、血清、PDD 両者の U937 細胞に対する最終的な作用の差を反映している可能性も考えられる。同じ変化でも、

kinetics が異なれば、細胞にとって異なった意味を持つようになるのかもしれない。

今回、 $O_2^-$  単独でも  $Na^+/H^+$  antiporter の活性化を引き起こすことが出来たのにもかかわらず、PDD、血清による antiporter の活性化は、高濃度の SOD によっても部分的に抑えられたのにすぎなかった。これは、SOD が高分子であるため細胞膜近傍にまで近づけず、完全には  $O_2^-$  を消去出来なかったためか、或いは、PDD、血清による antiporter の活性化には、 $O_2^-$  以外にさらに別の促進機構も関与しているためかもしれない。

細胞内 pH の上昇の生理的意義がまだ確立されていないので、そのメディエーターとしての  $O_2^-$  の意味づけも困難であるが、 $O_2^-$  が、生理的な刺激である血清による antiporter の活性化のメディエーターとして作用していることは、従来考えられていた cytotoxic な効果以外に、 $O_2^-$  が生理的役割を担っている可能性を強く示唆するものと思われる。

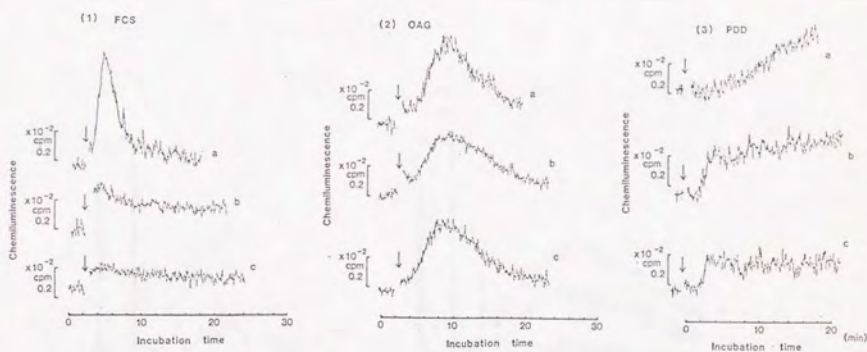


FIG.1  $O_2^-$  release induced by serum, OAG and PDD in growing and resting cultures of U937. Inducers: (1), 20% serum; (2),  $250 \mu\text{g/ml}$  OAG; (3),  $50 \text{ ng/ml}$  PDD. Confluent cultures were diluted 10 fold in fresh serum ( $5 \times 10^5$  cells/ml) and chemiluminescence was measured on the second (a), third (b) and fourth (c) day.

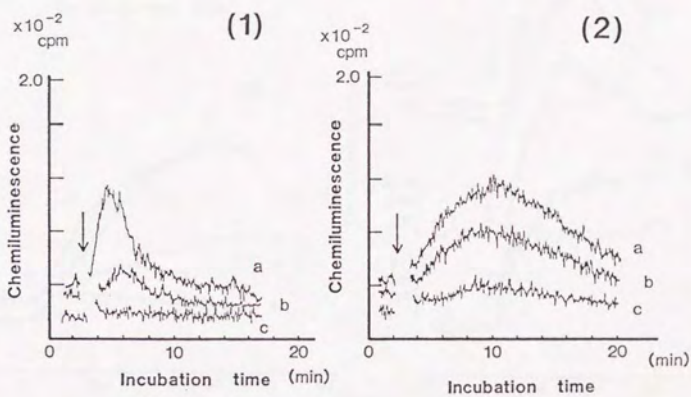
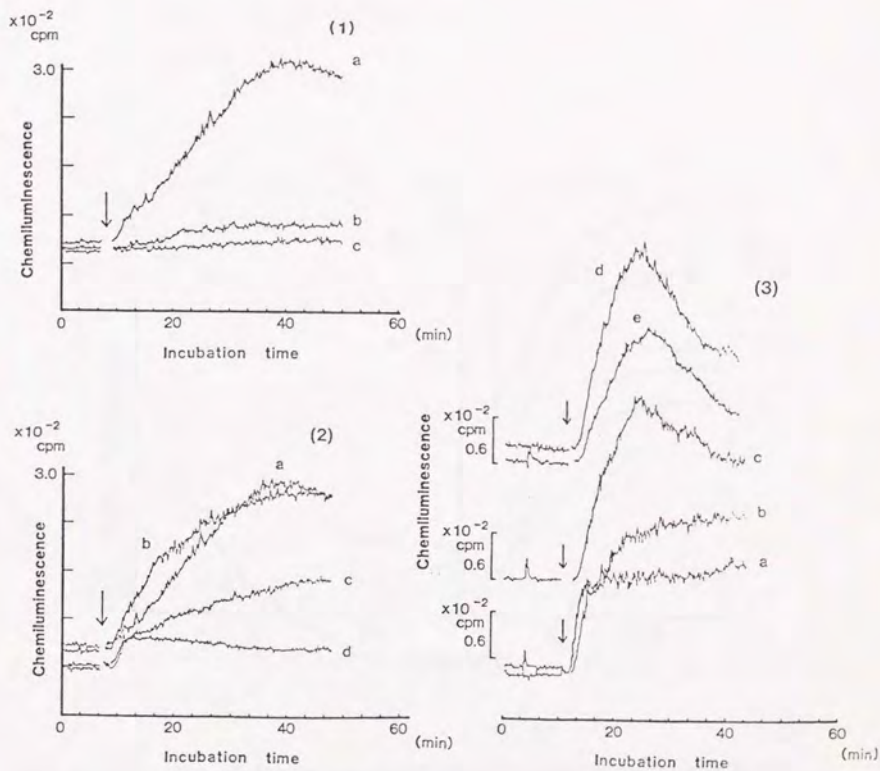
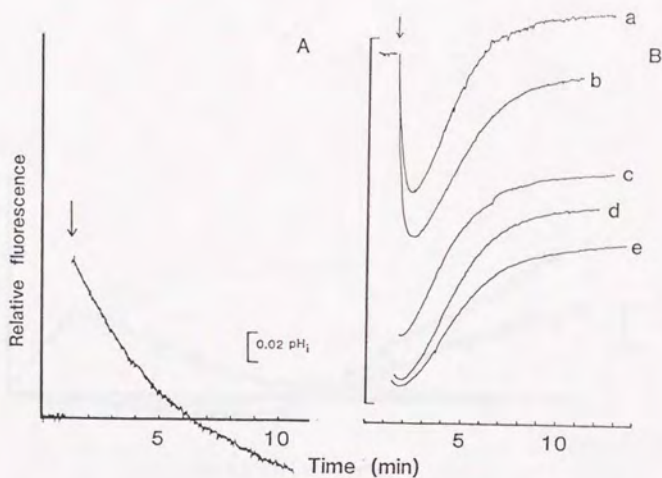


FIG.2. Inhibition by H-7 and w-7 of  $O_2^-$  release stimulated with serum, or OAG. Inducers: (1), 20% serum; (2), 250  $\mu$ g/ml OAG. Inhibitors: a, none; b, 50  $\mu$ M H-7; c, 50  $\mu$ M W-7. U937 cells of the growing phase were used.





**FIG.3** Effects of H-7 and W-7 on  $O_2^-$  release stimulated with PDD in growing and resting cells. (1): The second day-culture. Inhibitors: a, none; b,  $50 \mu M$  H-7; c,  $100 \mu M$  H-7. (2): The second day-culture. Inhibitor, W-7. a,  $0 \mu M$ ; b,  $37.5 \mu M$ ; c,  $50 \mu M$ ; d,  $100 \mu M$ . (3): The third day-culture. Inhibitor, W-7. a,  $0 \mu M$ ; b,  $25 \mu M$ ; c,  $37.5 \mu M$ ; d,  $50 \mu M$ ; e,  $100 \mu M$ . PDD was used at the concentration of  $50 \text{ ng/ml}$ .



**FIG.4** A: Time course of fluorescence change observed following addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25 mM,  $\text{pH}=7.4$ ) at the time indicated by the arrow. B: Calibration of the fluorescence intensity of intracellular BCECF as a function of  $\text{pH}_i$  according to the  $\text{H}^+$ -equilibration method previously described (Thomas et al., 1978<sup>28</sup>) . Nigercin was added ( $12.5 \mu\text{g/ml}$ ) at the time indicated by the arrow to the cell suspensions in HEPES-buffered Hanks'solution whose  $\text{pH}$  was adjusted to a, 7.67; b, 7.39; c, 6.98; d, 6.74; e, 6.61. A linear relationship between fluorescence intensity and  $\text{pH}$  of the external medium over the range of  $\text{pH}$  6.61 - 7.67 was obtained.

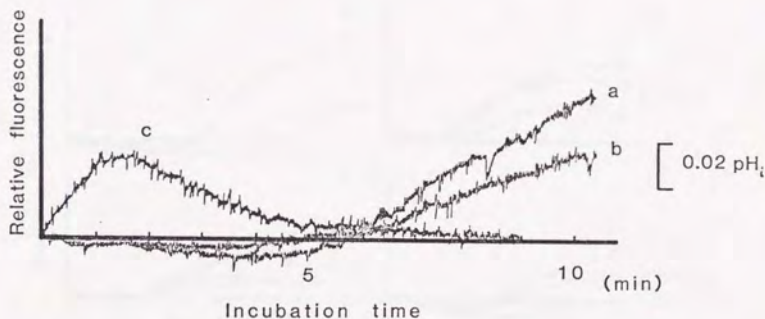


FIG.5 Time course of fluorescence change in response to a, PDD (100 ng/ml); b, OAG (50  $\mu$ g/ml); c, serum (10%). U937 cells in the growing phase were suspended in HEPES - buffered Hanks' solution (pH=7.4) at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells /ml. 2,7 - Bis(carboxyethyl) - 5,6 - carboxyfluorescein (BCECF) was loaded by incubating the cell suspension with 0.5  $\mu$  M of the the membrane - permeable ester form of BCECF. The fluorescence intensity was monitored in thermostated cell holder at 37°C by a spectrofluorometer (excitation wavelength 506 nm; emission wavelength 530 nm). The changes in fluorescence reflect those in cytoplasmic pH (pH<sub>i</sub>).

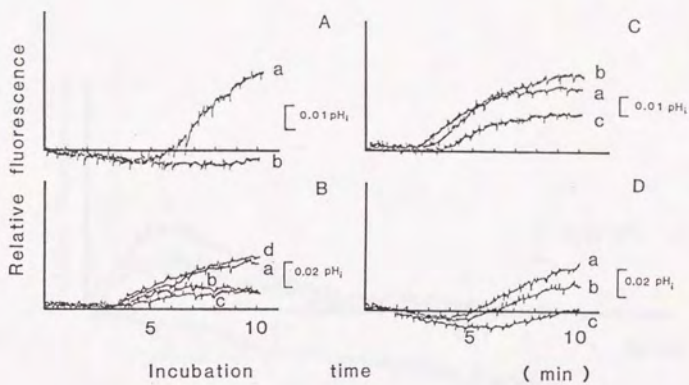
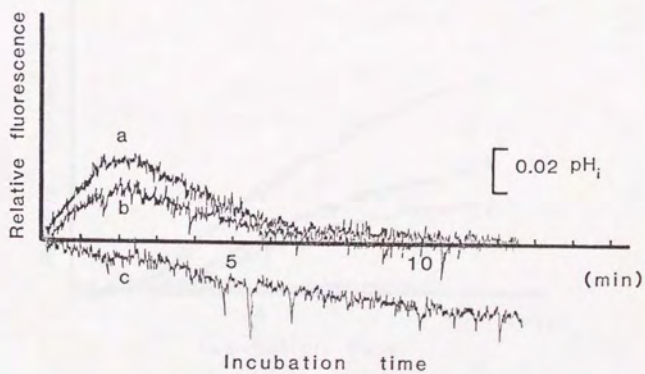


FIG.6 Effects of amiloride (A) and antioxidant (B-D) on  $pH_i$  increase induced by PDD (100 ng/ml). A: Inhibitors — a, none; b, amiloride (200  $\mu$ M). B: Inhibitors — a, none; b, SOD (25  $\mu$ g/ml); c, SOD (250  $\mu$ g/ml); d, heat -inactivated SOD (25  $\mu$ g/ml). C: Inhibitors — a, none; b, catalase (1000 U/ml); c, SOD (25  $\mu$ g/ml). D: Inhibitors — a, none; b, vitamin E (50  $\mu$ M); c, BHA (100  $\mu$ M).



**FIG.7** Effects of amiloride and SOD on serum - stimulated pH<sub>i</sub> increase in U937 cells. Inducer: Serum (10%) . Inhibitors: a, none; b, SOD (625  $\mu$ g/ml) ; c, amiloride (200  $\mu$ M) .

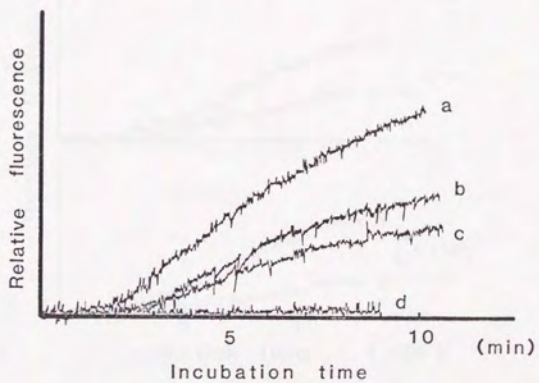
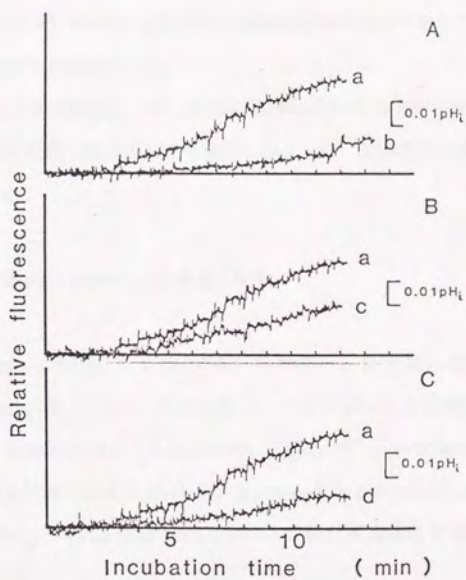


FIG.8 Effects of amiloride and SOD on concanavalin A-stimulated  $pH_i$  increase in mouse thymocytes. Inducer: Concanavalin A ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ). Inhibitors: a, none; b, SOD ( $50 \mu\text{g/ml}$ ); c, SOD ( $250 \mu\text{g/ml}$ ); d, amiloride ( $400 \mu\text{M}$ ).



**FIG.9** Induction of  $pH_i$  increase by treatment with xanthine and xanthine oxidase. Xanthine ( $2.75 \mu\text{g/ml}$ ) and xanthine oxidase ( $5 \times 10^{-3} \text{ U/ml}$ ) were used as inducers. Inhibitors: a, none; b, amiloride ( $500 \mu\text{M}$ ); c, allopurinol (inhibitor of xanthine oxidase) ( $500 \mu\text{M}$ ); d, SOD ( $125 \mu\text{g/ml}$ ).

## 第二章 増殖刺激後の培地中 $H_2O_2$ 濃度の変動と細胞増殖への影響

### 序節

先に示したように、活性酸素が増殖刺激により細胞から産生され、増殖と密接に関連する  $pH_i$  の上昇を引き起こすことがわかったので、活性酸素が細胞増殖に関与している可能性をさらに直接的に検討することを試みた。正常マウス線維芽細胞 Balb/3T3 は細胞周期の制御が厳密に行われており、細胞増殖の機構を解析するのに適していたので、材料としてこの細胞を用いて実験を行った。

この章では、まずその基礎として、増殖刺激後 S 期に至るまでの細胞周期の進行に伴う、細胞からの活性酸素の放出の有無を検討し、さらに、放出された活性酸素の DNA 合成への関与を調べた。

### 第一節 増殖刺激後の培地中 $H_2O_2$ 濃度の変動

無血清中 (Eagle's MEM + 0.1% BSA) で培養し、静止期にある Balb/3T3 細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/dish) を、TPA で増殖刺激し、一定時間経過後培地を集めて  $H_2O_2$  濃度の定量を行った。活性酸素種のうち寿命の短い  $\cdot OH$ 、や  $O_2^{\cdot -}$  の定量は困難であったので、今回は、水溶液中で比較的安定な  $H_2O_2$  を、horse radish peroxide による 3-(p-hydroxyphenyl)-propionic acid (HPPA) の酸化を指標とする蛍光法により定量することを試みた<sup>34)</sup>。

その結果、TPA で刺激すると、刺激直後 (5~10 分) と 12 時間以降とに二相性に、細胞あたり 2~4 f mole の、培地中の  $H_2O_2$  量の上昇がみられた (図 10)。

### 第二節 DNA 合成への catalase の影響

放出された活性酸素の DNA 合成への関与を、catalase を用いた間接的な方法により検



討した。Balb/3T3 細胞を  $10^4$  cells/ml の濃度で継代後、Eagle's MEM + 10% FBS 中で培養し、7日後 confluent な状態になった細胞を静止期の細胞として用いた。図 11 に示した手順に従い、この静止期の Balb/3T3 細胞を、0 時間に TPA、或いは、PDGF で増殖刺激し、その後各時間に catalase を加え、24~36 時間の<sup>3</sup>H-thymidine 取り込みを測定した。そして、その値を catalase を加えた時間に対してプロットした (図 12-A、B)。

catalase の添加時間により DNA 合成への影響が異なり、その様子から、0~3、3~12、12~18 時間の 3 つの時期に分けられた。最初の 0 時間と 3 時間の値の差より、刺激直後に放出された  $H_2O_2$  は、DNA 合成に対して促進的に働くことが示唆された。 $H_2O_2$  の放出のみられない中期 (3~12 時間) には catalase の効果はみられなかった。12~18 時間にかけては再び  $H_2O_2$  の放出がみられるが、この時期に対する catalase の効果を検討した結果、12 時間以降に放出される  $H_2O_2$  は DNA 合成に対して抑制的に作用していることが示唆された。このような catalase の効果は、labeling index の測定によってもみられ (表 1)、単に、細胞内の thymidine pool の変化によるものではなく、DNA 合成に対する影響であると考えられた。

### 第三節 DNA 合成への $H_2O_2$ 添加の影響

第二節に示した catalase を用いた間接的な結果を裏付けるために、静止期の Balb/3T3 細胞を 5% 血清で刺激後、各時間に  $H_2O_2$  を外から加え、DNA 合成への影響を検討した。図 12-C に示すように、血清刺激後初期に  $H_2O_2$  を加えると、血清単独による場合に比べて DNA 合成は促進され、10 時間以降に加えた場合には抑制された。

$H_2O_2$  による細胞障害の程度を、plating efficiency により検討した結果を表 2 に示す。ここで用いた濃度 (0.1~0.15 mM) の  $H_2O_2$  は、Balb/3T3 細胞に対して毒性は示さなかった。

TGF  $\beta$  は、増殖抑制因子として知られているが、細胞の種類、培養条件等によっては細胞増殖に対して促進的、或いは抑制的に働くことが知られている<sup>35, 36)</sup>。Balb/3T3 細胞の増殖に対しては、図 12-C に示したように、TGF  $\beta$  は、 $H_2O_2$  と同様に細胞周期に依

存した促進的、抑制的効果を持つことが示された。

## 第二章 考察

この章では以下の結論が得られた。

1) Balb/3T3 細胞を TPA などの増殖因子 (competence 因子) で刺激すると、刺激直後 (5~10 分) と 12 時間以降とに二相性に培地中への  $H_2O_2$  の放出がみられた。

2) 刺激直後 ( $G_0/G_1$  期) に放出された  $H_2O_2$  は DNA 合成に対して促進的に、12 時間以降 ( $G_1$  後期) に放出された  $H_2O_2$  は抑制的に作用していた。

元来、マクロファージ、好中球等を刺激すると活性酸素の放出のみられることが知られていた。今回、静止期のマウス線維芽細胞を TPA などの増殖因子 (competence 因子) によって増殖刺激したときにも、刺激直後と  $G_1$  後期の二度にわたって  $H_2O_2$  の放出がみられることがわかった。この放出に関与している因子や放出の機構、細胞の内と外のどこで  $H_2O_2$  が産生されるのか、また、その作用点はどこかについては今後の解明を待たねばならない。しかし、培地中に catalase を加えて  $H_2O_2$  濃度を減ずることにより、その後の DNA 合成が影響を受けたことから、このように二相性に放出される  $H_2O_2$  が、何らかのかたちで増殖制御に関与している可能性は大きい。

catalase の効果が部分的であって、完全な促進、抑制効果を示さなかったことについては、高分子である catalase による細胞膜表面の  $H_2O_2$  の消去が十分効率よくなされなかった可能性とともに、増殖因子の作用は、いくつかの異なった経路が協調して発現されるもので、 $H_2O_2$  はこのうちの一つの経路にのみ関与している可能性、或いは、細胞集団中の  $H_2O_2$  に対する反応性の何らかの heterogeneity による可能性が考えられる。

catalase を用いた間接的な実験により、 $G_0/G_1$  期に放出される  $H_2O_2$  は DNA 合成に対して促進的に、 $G_1$  後期に放出される  $H_2O_2$  は抑制的に働いていることが示唆され、次に、

直接外から  $H_2O_2$  を加えることで、実際、それぞれの時期に  $H_2O_2$  が促進的、抑制的に作用することが示された。外から  $H_2O_2$  を加える場合、細胞からの放出量より 2 桁濃い濃度の  $H_2O_2$  が必要とされたが、実際の放出量と加えた  $H_2O_2$  の濃度差は、実際にはさほど大きなものではないと思われる。何故ならば、放出された  $H_2O_2$  の細胞膜近傍での局所濃度は、測定可能な培地全体に対する濃度に比べてかなり高いものとなっていると思われるからである。

今回は、活性酸素の中で、寿命が長く、比較的安定で取扱易い  $H_2O_2$  の挙動について中心に検討した。しかし、食細胞からは、 $H_2O_2$  以外に  $O_2^-$  も同時に放出されることが知られている。そこで、図 12-A、B に示した実験を、catalase の代わりに SOD を用いて行ったところ、弱いながら catalase と同様の傾向を示した。従って、 $O_2^-$  も  $H_2O_2$  と同じ時期に放出され、DNA 合成の制御に関して同じ作用を持っていると思われる。しかし、活性酸素の分子種ごとの放出、生成の制御機構、DNA 合成への関与の仕方を明確に議論するには、さらに詳細な検討を加える必要がある。

以上のように、活性酸素が細胞の増殖制御に関わっていることが示唆されたが、さらにその増殖制御における役割を明らかにするためには、具体的な作用機序を明らかにすることが重要であると思われる。そこで、その一環として、活性酸素が具体的にどのような細胞内変化を引き起こすことが出来るのかを調べた。そしてさらに、増殖因子による変化と比較して、増殖因子のセカンドメッセンジャーとしての位置づけを試みた。活性酸素の増殖に対する作用は  $G_1$  期の時期により異なり、初期には促進、後期には抑制作用を示したので、第三章では  $G_1$  初期の細胞に対する作用を、第四章では  $G_1$  後期の細胞に対する作用をそれぞれ検討した。

Table 1. Effect of catalase on DNA synthesis induced by TPA

| Addition                    | Labeling index |
|-----------------------------|----------------|
|                             | (%)            |
| —                           | 1.1 ± 2.1      |
| TPA (10 ng/ml)              | 31.6 ± 3.9     |
| TPA + catalase* (3200 U/ml) | 50.6 ± 11.2    |
| Catalase*                   | 2.4 ± 1.4      |

Quiescent Balb/3T3 cells were stimulated with TPA at 0 hr.

\*Catalase was added at 6 hr and cells were labeled with <sup>3</sup>H-Thd (1 μ Ci/ml) between 12~36 hr. Cells were fixed at 36 hr and processed for autoradiography. Values are means of triplicate samples ± standard deviation.

Table 2. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on plating efficiency of Balb/3T3 cells

| Concentration                           | Plating efficiency |
|-----------------------------------------|--------------------|
| —                                       | 1.00               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.10 mM) | 1.07               |
| (0.15 mM)                               | 0.91               |
| (0.20 mM)                               | 0.65               |
| (0.25 mM)                               | 0.53               |

Quiescent Balb/3T3 cells were untreated or treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and after 12 hr, the cells were plated at the density of 100 cells/dish. Colonies were scored 10~14 days later.

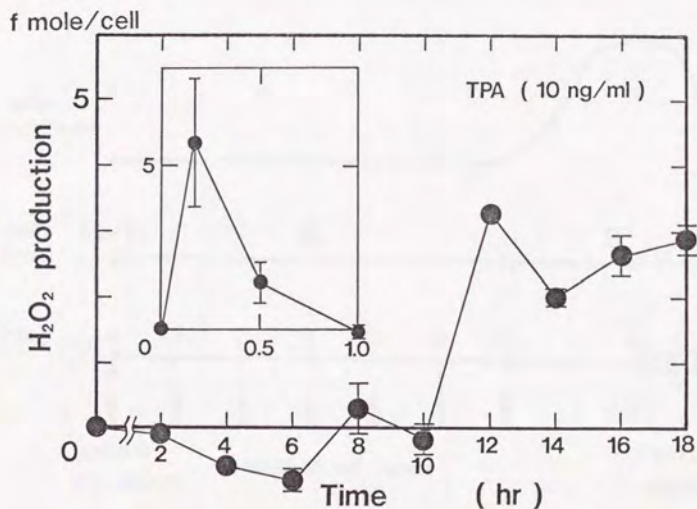


FIG.10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the medium of Balb/3T3 cells stimulated with TPA. Balb/3T3 cells were seeded in collagen-coated dishes at the density of  $1 \times 10^6$  cells/dish and incubated in Eagle's MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. After 2~3 days, the culture fluids were replaced with serum-free medium (Eagle's MEM containing 1 mg/ml BSA) and incubation was continued for another 1 day. Cells were treated with TPA (10 ng/ml) and after the indicated times, the medium was collected. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was determined as described in Materials and Methods.

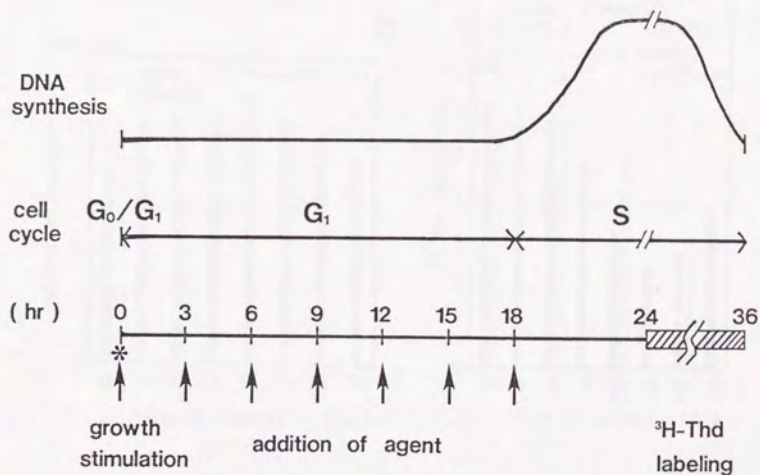


FIG.11 Procedure for investigating the effects of agents added at various times of  $G_1$  phase on DNA synthesis. Quiescent cells were stimulated to proliferate at 0 hr with growth factors and then treated with various agents at each time indicated by the arrows. The cells were then labeled with  $^3\text{H}$ -Thd between 24 and 36 hr and acid-precipitable radioactivity was measured.

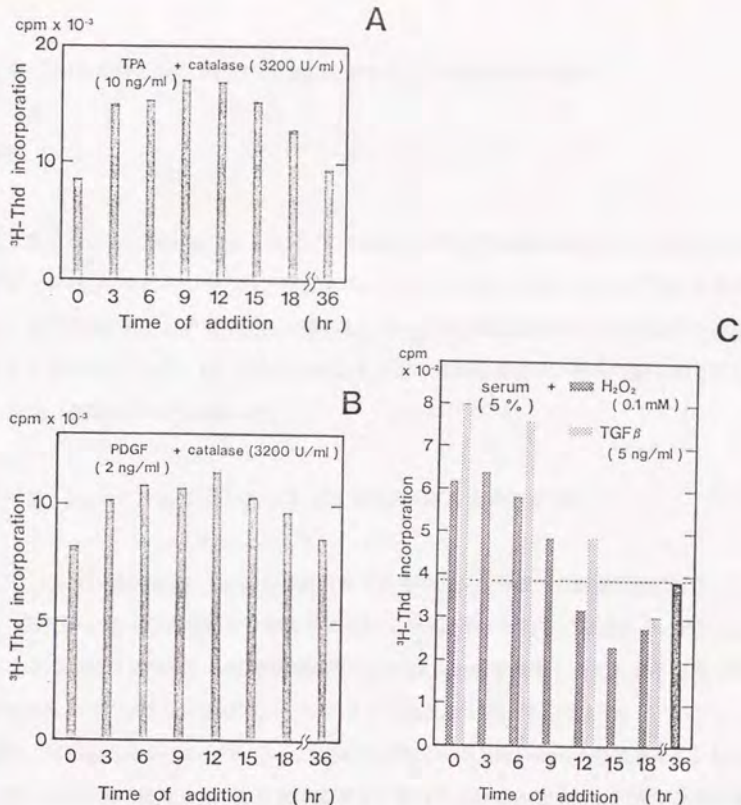


FIG.12 Effects of catalase,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and TGF  $\beta$  on DNA synthesis of Balb/3T3 cells stimulated with growth factors. A: Effect of catalase (3200 U/ml) on DNA synthesis stimulated with TPA (10ng/ml) . B: Effect of catalase (3200 U/ml) on DNA synthesis stimulated with PDGF (2ng/ml) . C: Effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1 mM) (dark meshed bar) and TGF  $\beta$  (5ng/ml) (light meshed bar) on DNA synthesis stimulated with serum (5%) . All experiments were done according to the procedure illustrated in FIG.11.



### 第三章 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の静止期の Balb/3T3 細胞に対する competence 因子様作用

#### 序節

第二章において、静止期にある Balb/3T3 細胞を TPA で増殖刺激すると、その直後に培地中への H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の放出がみられ、放出された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は DNA 合成に対して促進的に作用することが示唆された。そこで、静止期にある Balb/3T3 細胞を用いて、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用を、DNA 合成、遺伝子発現、細胞内蛋白質リン酸化の観点から検討し、TPA、血清の作用と比較した。

#### 第一節 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による静止期の Balb/3T3 細胞の DNA 合成促進作用

先ず、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を作用させたときの DNA 合成への影響を検討した。第二章、第二節に記した方法により静止期においた Balb/3T3 細胞を、増殖因子、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、或いは X/XOD で処理し、一定時間経過後 <sup>3</sup>H-thymidine を加えて、その酸不溶画分への取り込み、ならびに autoradiography による labeling index を測定した。

図 13 に pulse label による <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みの time course の結果を示した。静止期の Balb/3T3 細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独で処理した場合にはほとんど DNA 合成の促進はみられなかった。insulin も単独ではこの細胞に対して DNA 合成促進効果は弱い。しかし、両者を同時に投与すると、刺激後 24~36 時間にかけて 10% 血清に匹敵する DNA 合成の上昇がみられた。同じ条件で labeling index を検討したところ、やはり、insulin、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を同時投与した場合に、値の上昇がみられた (表 3)。同様の結果は X/XOD の酵素反応によって生ずる活性酸素種を用いたときにも得られた (表 4)。X/XOD による labeling index の上昇は、X、XOD 各々単独ではみらず、XOD の阻害剤である allopurinol の同時添加によりみられなくなった。以上 2 つのことは、X/XOD によって引き起こされた labeling index の上昇は、増殖因子等の不純物によるものではなく、X を基質とする XOD の酵素反応によるものであることを示している。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるDNA合成促進が、Balb/3T3以外の細胞でみられるかどうかを、ヒトの皮膚の線維芽細胞JHU-1を用いて検討した。その結果を図14に示す。Balb/3T3の場合と同様、JHU-1細胞においても、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はinsulinの存在下DNA合成を促進した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で細胞を処理すると、細胞内DNA鎖の切断が起こることが知られている<sup>37, 38)</sup>。そこで、観察した<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みが、単なるDNA修復によるものではなく、細胞周期の進行を伴ったものであることを示すために、静止期のBalb/3T3細胞を刺激して36時間後に細胞を集め、propidium iodideでDNAを染色し、flowcytometryを用いて細胞周期の解析を行った。その結果図15に示すように、<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みの結果と同様に、insulin、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、各々単独では細胞周期の進行はみられないが、両者同時投与により顕著な細胞周期の進行が認められた。

## 第二節 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による増殖関連遺伝子の発現の誘導

第一節より、活性酸素が、Balb/3T3細胞の増殖に対してinsulin存在下DNA合成を促進し、competence因子<sup>39, 40)</sup>様の作用を示すことがわかったので、次に、遺伝子発現のレベルで増殖因子と同様の変化を引き起こしうるかどうかを検討した。c-fos、c-myc、KC、JEなどの遺伝子は、いずれもcompetence因子により発現が誘導されることが知られている<sup>41-43)</sup>。そこで、静止期のBalb/3T3細胞をX/XODで刺激し、c-fos、c-mycの発現をnorthern blotにより調べた結果が図16であり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で刺激し、c-fos、KC、JEの発現を調べたのが図17である。

X/XOD処理によりc-fos、c-mycの誘導がみられ、発現の程度、time courseとも10%血清と同等であった。この誘導はX、XOD各々単独ではみられず、allopurinolに感受性であった。また、第四章で後述するように、活性酸素によるこれらの遺伝子発現はprotein kinase C特異的阻害剤H-7により完全に阻害された。しかし一方、TPAで4時間処理してTPAに対する感受性を失った細胞においてもX/XODにより誘導がみられたことから、protein kinase C以外のH-7感受性のkinaseが関与していると思われた。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>単独処理によっても、c-fos、KC、JEといった増殖関連遺伝子の発現が引き起

こされた。

### 第三節 $H_2O_2$ による細胞内蛋白リン酸化の促進

増殖因子のシグナル伝達機構上、その初期に、細胞内の蛋白リン酸化の促進が重要な働きを担っているといわれている<sup>47)</sup>。 $H_2O_2$ は、第一、二節より、DNA合成、遺伝子発現において増殖因子(competence 因子)様の作用をもつことがわかったので、 $H_2O_2$ による細胞内蛋白リン酸化の変化を、二次元電気泳動法により検討した。

静止期の Balb/3T3 細胞を無機リンでラベル後、0.2 mM の  $H_2O_2$  で 30 分処理して、細胞内蛋白のリン酸化の変化を検索したところ、p78 (pI 6.1) の蛋白のリン酸化が特異的に促進していることがわかった(図 18)。その p78 のリン酸化の  $H_2O_2$  濃度依存性と time course を調べたのが図 19 である。p78 は 3 つのスポットからなっていて、時間の経過とともにアルカリ側のスポットが薄くなり、酸性側のスポットが濃くなる傾向にあった。

次に、この p78 のリン酸化の促進は、 $H_2O_2$  に特異的なものなのか、他の増殖刺激でも引き起こされるのかを検討した。図 20-a に示したように、p78 のリン酸化は TPA、血清によっても促進された。TPA、血清によっては、p78 以外にも protein kinase C の内在性基質として知られる p80<sup>48, 49)</sup> などの他の蛋白質のリン酸化の促進もみられた。

第二章、第一節に示したように、静止期の Balb/3T3 細胞を増殖刺激すると、その初期に  $H_2O_2$  の放出がみられること、p78 のリン酸化の促進は、 $H_2O_2$ 、TPA、血清、三者で共通に引き起こされたことから、TPA、血清による p78 のリン酸化の促進は、 $H_2O_2$  を介したものである可能性が考えられた。そこで、catalase を用いて TPA、血清による p78 のリン酸化の促進への  $H_2O_2$  の関与を検討してみた。血清による p78 のリン酸化の促進は catalase の同時添加により約半分に抑制された(図 20-b)。TPA による p78 のリン酸化の促進に関しても同様の結果を得た。

### 第三章 考察

この章では以下の結論が得られた。

1)  $H_2O_2$ 、X/XOD は、insulin 存在下、静止期の Balb/3T3 細胞に作用して、細胞周期の進行を伴った DNA 合成の促進を促した。

2)  $H_2O_2$ 、X/XOD、単独処理により、静止期の Balb/3T3 細胞において、c-fos、c-myc、KC、JE といった増殖関連遺伝子の発現が引き起こされた。

3)  $H_2O_2$  単独処理により、細胞内蛋白 p78 のリン酸化が特異的に促進され、また、TPA、血清による p78 のリン酸化の促進には、 $H_2O_2$  が関与していることが示唆された。

今回この章で、第二章の結論に基づき、 $H_2O_2$  の静止期の Balb/3T3 細胞に対する増殖促進作用について検討し、 $H_2O_2$  が insulin の共存下で Balb/3T3 細胞の DNA 合成を促進することを見出した。用いた  $H_2O_2$  濃度 (0.1~0.15 mM) では、細胞内 DNA 鎖の切断が引き起こされることが知られており、この観察された DNA 合成が DNA 修復によるものである可能性が考えられた。しかし、以下の点から、 $H_2O_2$  により促進された DNA 合成は、DNA 修復によるものではないと結論した。1) 0.1~0.15 mM の  $H_2O_2$  処理では Balb/3T3 細胞の plating efficiency の減少は認められなかった。2)  $^3H$ -thymidine でラベルした細胞の autoradiography の結果、 $H_2O_2$  処理細胞は、DNA 合成に際して、細胞あたり血清処理のものと同程度の grain 数の増加を示した。3)  $H_2O_2$  処理後、 $^3H$ -thymidine の取り込みは 24 時間以降にピークに達した。不定期 DNA 合成による取り込みの場合は、処理後数時間でピークに達する。4)  $H_2O_2$  によって DNA 合成のみならず細胞周期の進行も促進された。

Balb/3T3 細胞以外に、ヒト皮膚線維芽細胞 JHU-1 においても、insulin 共存下  $H_2O_2$

による DNA 合成の促進がみられた。しかし、マウス骨芽細胞 MC3T3 に対しては促進効果を示さず (図 22 参照)、静止期の細胞に対する  $H_2O_2$  の増殖促進効果には、何らかの細胞特異性が存在するものと思われた。

$H_2O_2$  単独処理によって、増殖関連遺伝子 c-fos、KC、JE の誘導がみられた。しかし、KC、JE の誘導に関しては、10% 血清、或いは TPA と比較して、若干その程度が弱く、時間的にも遅れて発現が誘導された。TPA、血清によるこれら遺伝子の発現に関わっている経路と、 $H_2O_2$  の場合のそれとは異なっているのかもしれない。これら遺伝子の増殖への関与の直接的証明はまだなされておらず、 $H_2O_2$ 、或いは、血清、TPA によるこれらの遺伝子の発現誘導と、これらの因子による DNA 合成の促進作用との関係について議論することは現時点では困難である。むしろ、KC、JE に関しては、これらは platelet factor 4 の super family として捉えられていることから<sup>50, 51)</sup>、 $H_2O_2$  による KC、JE の誘導は、増殖との関係よりも炎症における生物学的反応という観点から捉えるべきものかもしれない。しかし、何れにしても、 $H_2O_2$  により遺伝子発現のレベルで、TPA、血清と同じような変化が引き起こされることは、間違いないと思われる。

種々の細胞を様々な増殖因子で刺激したときに、それぞれいくつかの細胞内蛋白質のリン酸化が促進されることが報告されており<sup>47, 52, 53)</sup>、それらのリン酸化が増殖因子のシグナル伝達において重要な働きをしていると考えられている。X/XOD による c-fos の誘導は H-7 感受性であり、活性酸素による遺伝子の発現誘導にも何らかの protein kinase の活性化の関与が示唆された。そこで、二次元電気泳動法により  $H_2O_2$  による細胞内蛋白質のリン酸化の変化を検討したところ、p78 (pI 6.1) の蛋白質のリン酸化が特異的に促進された。このことは、細胞内で  $H_2O_2$  によって、ある種の protein kinase 活性が上昇したことを示唆しているが、 $H_2O_2$  によっては、protein kinase C の内在性基質とされる p80 のリン酸化は促進されなかったことから、 $H_2O_2$  は、protein kinase C 以外の H-7 感受性の kinase の活性化を引き起こすものと思われる。そして、この kinase の活性化が p78 のリン酸化、遺伝子の発現を誘導したのではないかと考えられる。今回のこの p78 以外に、Cerutti らは、 $H_2O_2$  によってリボソーム蛋白質の S6 のリン酸化が促進されることを報告している<sup>54)</sup>。

$H_2O_2$  は、TPA、血清によってリン酸化の促進されるいくつかの蛋白のうち、p78 のみのリン酸化を促進した。逆に、catalase は、TPA、血清による蛋白リン酸化のうち p78 のリン酸化のみを抑制した。この結果は、TPA、血清による p78 のリン酸化促進は  $H_2O_2$  を介したものであることを示唆するとともに、 $H_2O_2$  は、増殖因子によって活性化される様々なシグナル伝達機構のうちで一つの経路のセカンドメッセンジャーとして働いていることを示すものと思われる。

第二章、第三章の結果より、Balb/3T3 細胞を PDGF、TPA で増殖刺激したときに初期に放出される  $H_2O_2$  は、これらの増殖因子のセカンドメッセンジャーの一つとして、増殖因子による遺伝子発現、細胞内蛋白のリン酸化の促進に関与し、DNA 合成の促進に寄与しているものと結論される。

Table 3. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on induction of DNA synthesis  
in quiescent Balb/3T3 cells

| Addition                                | Labeling index<br>(%) |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| —                                       | 0                     |
| Insulin (1 $\mu$ M)                     | 15.3 $\pm$ 3.5        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.15 mM) | 0                     |
| Insulin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 29.1 $\pm$ 8.0        |
| Serum (10%)                             | 33.5 $\pm$ 7.6        |
| TPA (10 ng/ml)                          | 18.0 $\pm$ 6.0        |

Values are means of triplicate samples  $\pm$  standard deviations. Quiescent cells were treated with the inducers. <sup>3</sup>H - Thd was added 12 hr after addition of inducers and cells were fixed 24 hr later.

Table 4. Increase in labeling index by X/XOD

| Addition                                                             | Labeling index<br>(%) |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| —                                                                    | 0                     |
| Serum (5%)                                                           | 49.7 ± 9.3            |
| Serum (5%) + allopurinol (0.05 mM)                                   | 48.5 ± 4.2            |
| XOD ( $1.3 \times 10^{-2}$ U/ml) + X (0.1 mM)                        | 13.0 ± 1.7            |
| XOD + X + allopurinol (0.05 mM)                                      | 0.02 ± 2.0            |
| Insulin ( $1 \mu$ M)                                                 | 8.5 ± 2.7             |
| Insulin ( $1 \mu$ M) + XOD ( $1.3 \times 10^{-2}$ U/ml) + X (0.1 mM) | 36.0 ± 1.4            |

Quiescent cells were treated with chemicals and  $^3\text{H}$ -Thd was added 12 h after the treatment. Cells were fixed at 36 h and processed for autoradiography. Values are means of triplicate samples  $\pm$  standard deviation.



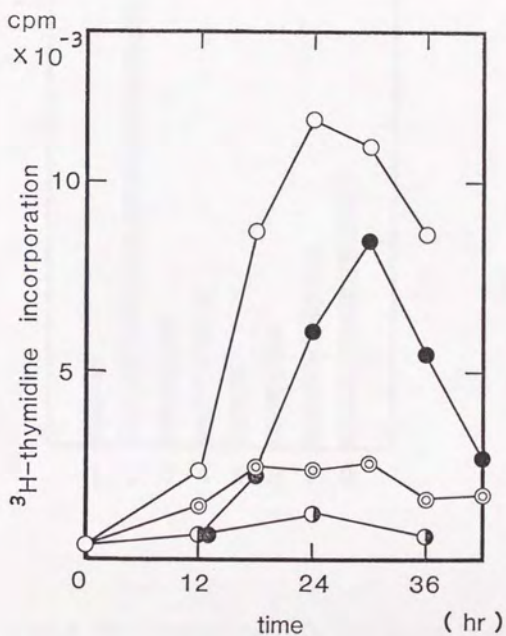


FIG.13 Time course of  $^3\text{H}$ -Thd incorporation. Quiescent Balb/3T3 cells were treated at 0 hr with 10% fetal bovine serum (○), 1  $\mu\text{M}$  insulin (⊙), 0.15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (●) or 1  $\mu\text{M}$  insulin plus 0.15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (●⊙).  $^3\text{H}$ -Thd was added at each time point at a concentration of 0.2  $\mu\text{Ci/ml}$ . The cells were incubated for 3 hr, and then acid-precipitable radioactivity was measured.

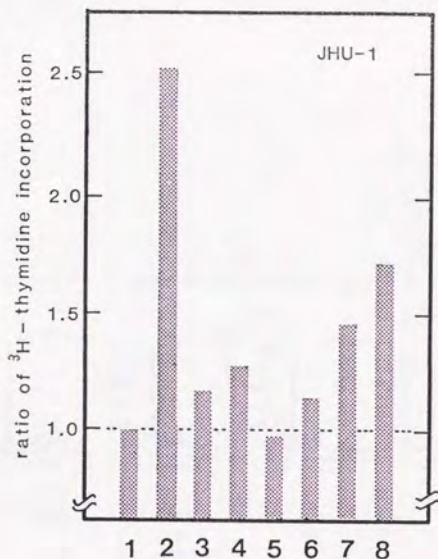
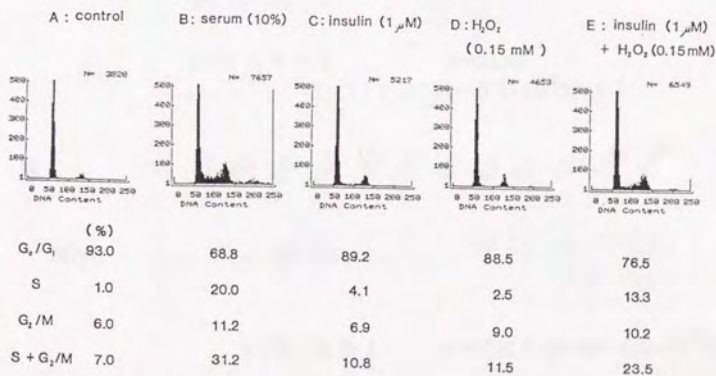
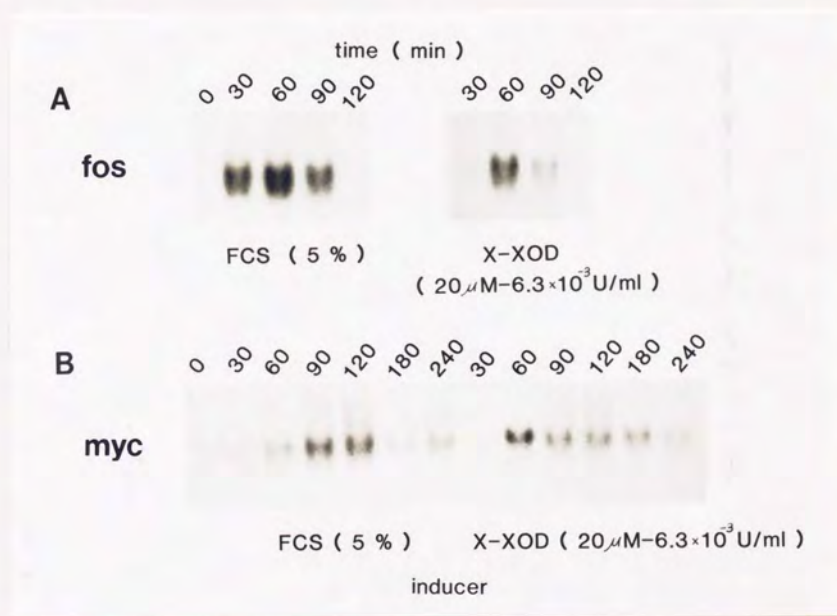


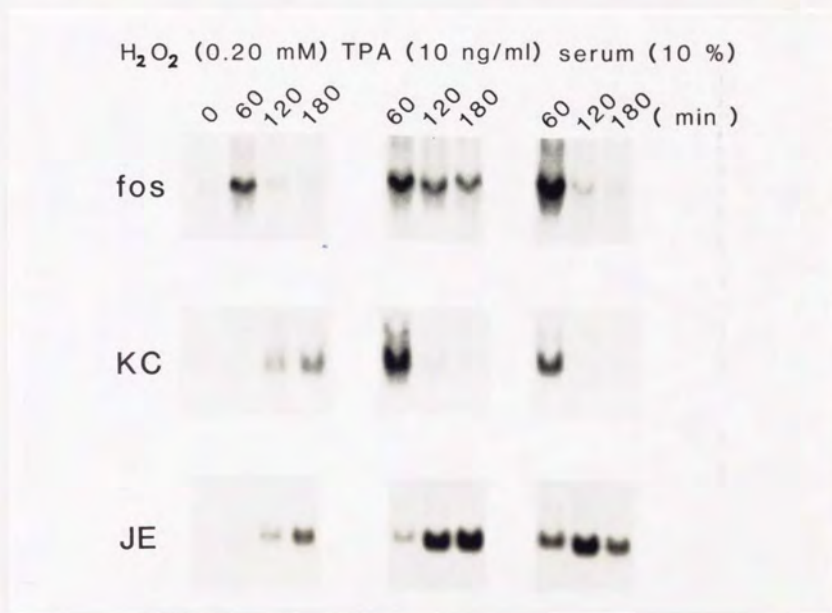
FIG. 14 Stimulation of DNA synthesis by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and insulin in JHU-1 cells. The confluent culture of human skin fibroblast, JHU-1 cells, were incubated with serum-free medium (Eagle's MEM + 0.1% BSA) for 24 hr to make the culture quiescent and then treated at 0 hr with none (1), 10% serum (2), 10 ng/ml TPA (3), 1 μM insulin (4), 0.075 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5), 0.10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6), 0.075 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 μM insulin (7), 0.10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 μM insulin (8). The cells were labeled with <sup>3</sup>H-Thd (0.1 μCi/ml) between 24 and 36 hr, and acid-precipitable radioactivity was measured. The result was indicated as a ratio to the value of untreated cells.



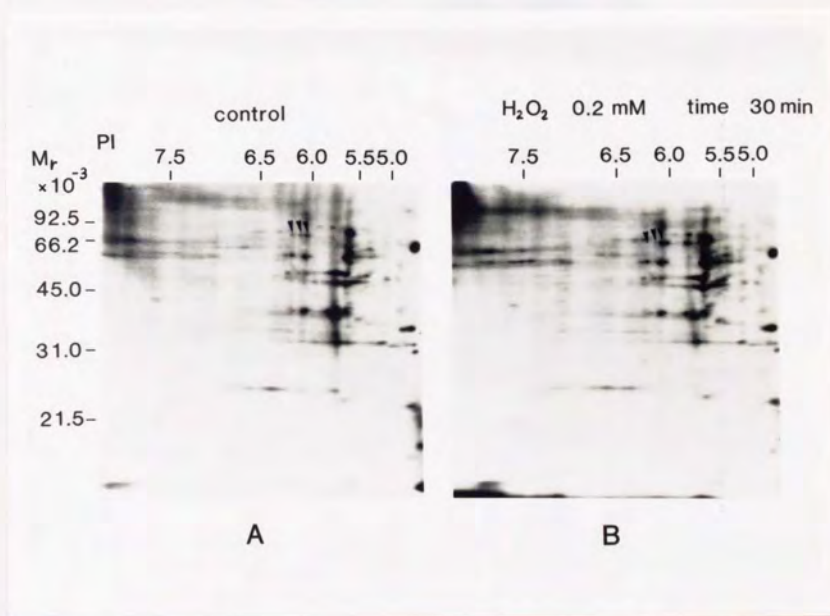
**FIG.15** Cell cycle analysis after stimulation with serum, insulin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or insulin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quiescent cells were untreated (A) or treated with 10% fetal bovine serum (B), 1  $\mu$ M insulin (C), 0.15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D), or 1  $\mu$ M insulin + 0.15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E). After 36 hr, the cells were harvested, stained with propidium iodide and analyzed. Totals of about  $5 \times 10^3$  cells were analyzed for each histogram.



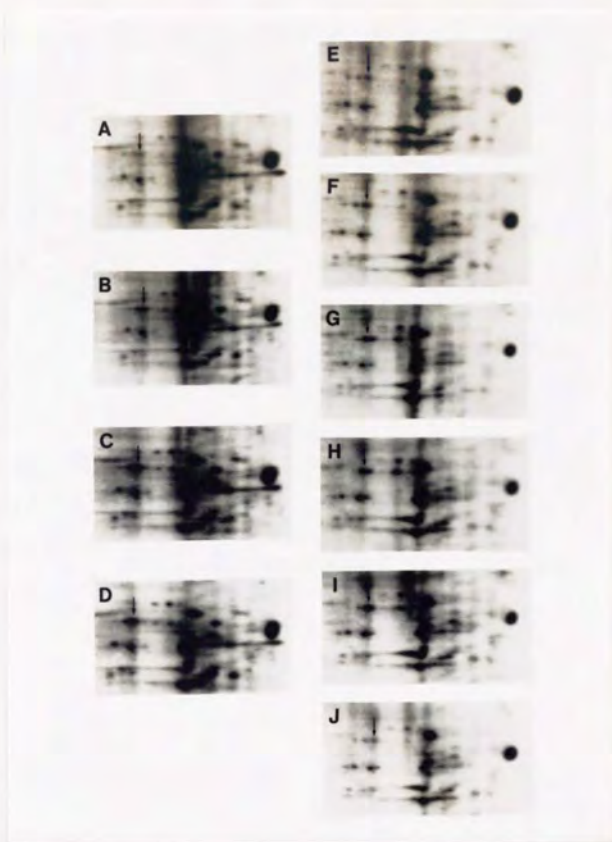
**FIG.16** Inductions of *c-fos* and *c-myc* mRNA by X/XOD. Cells were cultured either with 5% fetal bovine serum or with X/XOD (20 μM/6.3 × 10<sup>-3</sup> U/ml) for indicated times. Total RNA (20 μg/lane) was extracted, run on an agarose gel containing formaldehyde and transferred to a membrane filter. The filters were hybridized with <sup>32</sup>P-*c-fos* (A) or *c-myc* (B) probes.



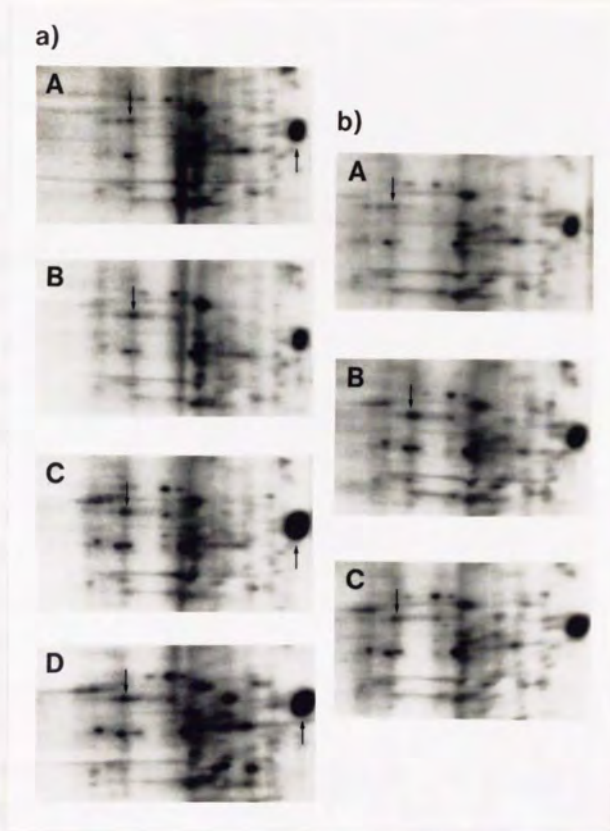
**FIG. 17** Inductions of *c-fos*, KC, and JE mRNA by  $H_2O_2$ . Quiescent cells were treated with 10% fetal bovine serum, 10 ng/ml TPA, or 0.20 mM  $H_2O_2$  for the indicated times. Total RNA (20  $\mu$ g/lane) was extracted, run on agarose gel containing formaldehyde and transferred to a membrane filter. The filters were hybridized with  $^{32}P$ -*v-fos*, KC, or JE probes.



**FIG.18** Phosphorylation of proteins induced by  $H_2O_2$ . Quiescent Balb/3T3 cells were labeled by addition of [ $^{32}P$ ]orthophosphate at a concentration of 0.3 mCi/ml to the medium and incubated for 6 hr. Then, the cells were stimulated with 0.20 mM  $H_2O_2$  for 30 min, lysed, and subjected to 2-dimensional gel electrophoresis. Each gel contained 50  $\mu$ g of proteins. Three downward arrowheads indicate the position of p78. A: Control quiescent cells. B: Cells treated with 0.20 mM  $H_2O_2$ .



**FIG. 19** Dose dependency and kinetics of phosphorylation. Quiescent cells were labeled by addition of [ $^{32}$ P]orthophosphate at a concentration of 0.3 mCi/ml to the medium and incubated for 6 hr. Then, the cells were stimulated with 0 mM  $H_2O_2$  (A), 0.10 mM  $H_2O_2$  (B), 0.15 mM  $H_2O_2$  (C), or 0.20 mM  $H_2O_2$  (D), for 30 min, or 0.20 mM  $H_2O_2$  for 0 min (E), 5 min (F), 15 min (G), 30 min (H and J), and 60 min (I) in the presence (J) or absence (others) of catalase (3200 U/ml). Arrowheads indicate the position of phosphoprotein of  $M_r=78,000$ .



**FIG.20** Phosphorylation of proteins induced by TPA and serum. a, Quiescent cells without stimulation (A), stimulated with 0.20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), 10 ng/ml TPA (C), and 10% fetal bovine serum (D) for 30 min were labeled with 0.3 mCi/ml of [<sup>32</sup>P] orthophosphate. Downward arrowheads indicate the position of phosphoprotein of M<sub>r</sub>=78,000, and upward ones indicate those of M<sub>r</sub>=80,000. b, Labeled cells were untreated (A) or treated with 10% fetal bovine serum in the absence (B) or presence (C) of catalase (3.2 × 10<sup>4</sup> U/ml) for 15 min. Arrowheads indicate the position of phosphoprotein of M<sub>r</sub>=78,000.



## 第四章 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のマウス骨芽細胞 MC3T3 に対する増殖抑制作用

### 序節

第三章においては、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期における増殖促進因子のメディエーターとしての H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の役割について論じた。一方、第二章に示したように、静止期の Balb/3T3 細胞を増殖刺激して細胞周期を進行させると、刺激直後 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期) のみならず、G<sub>1</sub>後期にも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の培地中への放出がみられ、この時期には H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は増殖に対して抑制的に作用することが示唆された。この章では、この G<sub>1</sub>後期における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の DNA 合成抑制作用についてさらに具体的な検討を加えた。

以下実験を進めるにあたって、Balb/3T3 細胞においては、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって、G<sub>1</sub>後期における DNA 合成抑制作用に加えて G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期には促進作用がみられ、抑制作用の解析には適さなかったため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による DNA 合成の抑制が顕著にみられたマウス骨芽細胞 MC3T3 を用いることにした。

一方、TGF β は、増殖抑制因子として知られている<sup>5,6)</sup>。第二章で触れたように (図 12-c)、Balb/3T3 細胞の増殖に対しては、TGF β は細胞周期に依存して促進的、抑制的に働いていた。MC3T3 細胞に対しては、TGF β は顕著な DNA 合成抑制作用を示した。このような TGF β の細胞増殖に対する作用は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用と酷似していた。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の DNA 合成抑制作用とともに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が、G<sub>1</sub>後期には、増殖抑制因子 TGF β のメディエーターとなっている可能性を合わせて検討した。

### 第一節 TGF β、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による G<sub>1</sub>後期特異的 DNA 合成抑制作用

初めに、対数増殖期にある MC3T3 細胞を用いて、この細胞に対し、TGF β、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が DNA 合成抑制作用を示すことを確認した (表 5)。両者とも濃度依存的に DNA 合成を抑制した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は、用いた 0.15 mM 前後の濃度で細胞内 DNA 鎖の切断を引き起こす。その他に

も細胞膜成分の酸化等を起こすことが考えられ、 $H_2O_2$ によるDNA合成抑制は、細胞にその様な障害性の変化を与えた結果とも考えられる。そこで、細胞に対する毒性の指標としてplating efficiencyを選び、種々の濃度の $H_2O_2$ で細胞を処理して、DNA合成抑制の程度とplating efficiencyの減少の関係を検討した。その結果、図21に示すように、細胞毒性があらわれるよりはるかに低い濃度でDNA合成の抑制がみられた。

次に、静止状態からS期に至る $G_1$ 期上のどこに、 $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ のDNA合成抑制作用の作用点があるのかを検討した。MC3T3細胞をDMEM + 10% FBS中でconfluentになるまで培養した後、無血清(DMEM + 0.1% BSA)で24時間以上培養し、静止状態にあるMC3T3細胞を用いた。

第二章の図11に示したのと同様の手順で、静止期の細胞を0時間に5%血清で増殖刺激して細胞周期を進行させ、 $G_1$ 期上の各時間に $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ を加えて、24~36時間にかけての $^3H$ -thymidineの取り込みを測定した。その結果、図22に示すように、加えた時間により $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ のDNA合成に及ぼす影響は異なり、 $G_1$ 初期に作用させたのでは、その後のDNA合成には殆ど影響を及ぼさず、 $G_1$ 後期に作用させたときのみ $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ ともに顕著なDNA合成抑制作用を示した。

その抑制の様子をtime courseを追って調べたのが図23である。静止期のMC3T3細胞を5%血清で刺激後15時間に $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ を加え、同時に、各時間に $^3H$ -thymidineを加えて3時間pulse labelし、DNA合成を測定した。静止期の細胞を血清で刺激すると24時間前後にDNA合成の上昇がみられる。しかし、図22に示唆されたように、 $G_1$ 後期に $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ を加えると、24時間前後のDNA合成の上昇のピークが抑制されていた。このことは、 $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ によるDNA合成の抑制が、その速度の低下によるものでないことを示している。

次に、 $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ によるDNA合成抑制作用の濃度依存性を検討した。静止期の細胞を、血清で3時間、12時間刺激して、それぞれ $G_1$ 初期、 $G_1$ 後期にあると思われる2種類の細胞を、各濃度の $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ で刺激し、24~36時間のDNA合成を測定した。その結果、図22の結果に示唆されたように、 $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$ によるDNA合成の抑制作用に対する各時期の感受性の差を反映して、 $G_1$ 後期の細胞に対しては、 $TGF\beta$ 、 $H_2O_2$

とも低濃度で DNA 合成を抑制したが、G<sub>1</sub> 初期の細胞には、TGF  $\beta$  で 4 倍、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の場合にはそれ以上の濃度を必要とした (図 24)。

以上のような検討を加えた結果より、MC3T3 細胞は、G<sub>1</sub> 後期にのみ TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成抑制作用に感受性をもっており、この時期に TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を作用させると顕著に DNA 合成が抑制されることがわかった。そこで、次に、細胞増殖に関係した他の因子に対しても同じ挙動を示すのかどうかを調べてみた。

G<sub>1</sub> 初期 (血清刺激 3 時間)、G<sub>1</sub> 後期 (12 時間) の細胞に各因子を加え、血清処理のものに比べて DNA 合成がどの程度促進、或いは抑制されるかを調べたのが表 6 である。TPA が似た作用を示した以外は、調べたものの中で、G<sub>1</sub> 後期に特異的に顕著な DNA 合成抑制作用を示すものは、TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> だけであった。

## 第二節 TGF $\beta$ による DNA 合成抑制作用に対する catalase の効果

前節に示したように、TGF  $\beta$  と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、その MC3T3 細胞に対する DNA 合成抑制作用において類似性を示す。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が TGF  $\beta$  の DNA 合成抑制作用のメディエーターになっているという仮説を実証することを試みた。

対数増殖期にある MC3T3 細胞を TGF  $\beta$  で処理すると、12~24 時間以降に DNA 合成の抑制がみられるが、TGF  $\beta$  と同時に catalase を添加しておくと DNA 合成の抑制が回復する傾向にあった。このような作用は、失活させた catalase、SOD、mannitol にはみられず、活性酸素種の中で特に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が TGF  $\beta$  の DNA 合成抑制作用に関与している可能性が示唆された (表 7)。

TGF  $\beta$  の DNA 合成抑制作用は、前節に示したように G<sub>1</sub> 後期に特異的にみられる。そこで今度は、同調した細胞を用いて、G<sub>1</sub> 後期における TGF  $\beta$  の DNA 合成抑制作用に対する catalase の効果を検討した。表 8 に示すように、この時期における TGF  $\beta$  の抑制作用に対しても catalase が回復効果を示した。同様の結果は、酸不溶性画分への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みのみならず、labeling index の測定によっても確認出来た (表 9)。

また、rat osteosarcoma の細胞株である ROS 細胞も、TGF  $\beta$  によって濃度依存的に

DNA 合成が抑制され、その抑制も catalase の同時添加により回復した (図 25)。

以上より、TGF  $\beta$  の DNA 合成抑制作用は、 $H_2O_2$  を介したものである可能性が強く示唆された。

### 第三節 TGF $\beta$ による MC3T3 細胞からの $H_2O_2$ 放出の促進

$H_2O_2$  が TGF  $\beta$  のセカンドメッセンジャーとなっている可能性をさらに裏付けるために、TGF  $\beta$  で細胞を刺激したときに、実際に  $H_2O_2$  が産生されるかどうかを検討した。

静止期、 $G_1$  後期の細胞をそれぞれ TGF  $\beta$  で刺激し、一定時間経過後培地を集め、前述の HPPA 法により  $H_2O_2$  濃度を測定した。その結果、図 26 に示したように、血清刺激後 14 時間の細胞を刺激した時のみ、細胞あたり 1 f mole 前後の  $H_2O_2$  の放出がみられ、その放出は TGF  $\beta$  で刺激後 1 時間以降持続的であった。静止期の細胞からは、 $H_2O_2$  の放出はほとんどみられなかった。

### 第四節 静止期、及び $G_1$ 後期の細胞の TGF $\beta$ 結合能の検討

前節で述べたように、静止期と  $G_1$  後期の細胞で、TGF  $\beta$  刺激による  $H_2O_2$  の放出の有無に顕著な差がみられた。静止期の細胞で、 $H_2O_2$  の放出、ならびに DNA 合成の抑制作用に関して TGF  $\beta$  に対する反応性が認められないのは、この時期の細胞では TGF  $\beta$  に対するレセプターを発現していないからかもしれない。そこで、 $^{125}I$  でラベルした TGF  $\beta$  を用い、静止期、 $G_1$  後期の細胞に対する binding assay を行った。

その結果を scatchard plot したのが図 27 である。この図から明らかなように、静止期の細胞 (0 時間) の細胞も TGF  $\beta$  結合能を有している。静止期、 $G_1$  後期の細胞の間で結合数にはほとんど違いはみられず、解離定数に若干の差が認められた。 $10^6$  個の細胞あたりの結合数は、0 時間の細胞で 38.0、14 時間の細胞で 41.4、解離定数はそれぞれ 2.06、2.80 pM であった。

#### 第五節 MC3T3 細胞における $H_2O_2$ による遺伝子発現の誘導

以上のように、 $H_2O_2$  は  $G_1$  後期の細胞に作用して MC3T3 細胞の DNA 合成を抑制していることが示唆された。そこでさらに、MC3T3 細胞に対する  $H_2O_2$  の作用を具体的に明らかにする手掛かりとして、 $H_2O_2$  による既知の遺伝子の発現を検討した。細胞はすべて対数増殖期にある MC3T3 を用いた。

細胞を  $H_2O_2$  で一定時間処理して集め、*v-fos*、*c-jun* をプローブとして northern blot analysis を行った結果が図 28 の A であり、nuclear run-on assay した結果が B である。 $H_2O_2$  単独処理により、*c-fos* の場合は 30 分、*c-jun* では 1 時間をピークとした発現が誘導され、nuclear run-on assay の結果より、その誘導は転写レベルであることが示唆された。これら  $H_2O_2$  による遺伝子の発現への protein kinase の関与を protein kinase の阻害剤を用いて検討したところ、図 29 に示すように、 $H_2O_2$  による *c-fos*、*c-jun* の誘導は、protein kinase C に比較的特異的な阻害剤である H-7 に感受性であった。しかし、24 時間 TPA で処理して protein kinase C が down regulate されている細胞でも、 $H_2O_2$  により未処理の細胞と同程度の誘導が引き起こされたことから (TPA による誘導は弱くなる)、関与している protein kinase は protein kinase C 以外の H-7 に感受性の kinase であると思われた (図 30)。

最近、*c-jun* 産物は、互い同士、或いは *c-fos* 産物と結合して、dimer を形成し、種々の遺伝子上流に存在する TRE (TPA-responsive element) に結合して遺伝子の発現の制御を行っていることが明らかとなった<sup>97)</sup>。 $H_2O_2$  を処理した細胞からの核抽出液中に、TRE 配列に結合する蛋白質の存在することが gel shift assay により示唆されたので、 $H_2O_2$  によって誘導される *c-fos*、*c-jun* の産物も、TRE に結合してその下流の遺伝子の発現を活性化する能力を有するかどうかを検討した。

IL-3 のプロモーターを持つ CAT 遺伝子上流に、コラーゲナーゼ遺伝子上流に存在する TRE 配列をつないだプラスミドを作成し、このプラスミドを MC3T3 細胞にリン酸カルシウム法で導入し、 $H_2O_2$  で処理して CAT assay を行った。

その結果、 $H_2O_2$  (0.1 mM) 処理により、TPA (50 ng/ml) 処理の場合を上回る CAT

活性の上昇がみられたことから (図 31)、 $H_2O_2$  によって誘導される c-fos、c-jun の産物も、TRE 活性化能を持つ機能的にも正常なものと考えられた。

#### 第六節 MC3T3 細胞における TGF $\beta$ 、 $H_2O_2$ による細胞内蛋白リン酸化の促進

遺伝子発現に引き続き、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  による DNA 合成抑制作用に関連した細胞内の変化を捕らえるために、細胞内蛋白のリン酸化の変化を検討した。

MC3T3 細胞を無機リンで 4 時間ラベル後、TGF  $\beta$  (10 ng/ml)、或いは、 $H_2O_2$  (0.1 mM) で処理し、一定時間経過後細胞を集め、二次元電気泳動法により蛋白リン酸化の変化を検索したところ、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  ともに、分子量 30 KDa 付近の 2 つの蛋白のリン酸化を促進することがわかった (図 32、33-A)。この蛋白のリン酸化の上昇は、TGF  $\beta$  で処理後 2 時間、 $H_2O_2$  で処理後 15 分以内にみられた。しかし、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  両者によるこのリン酸化の上昇は、 $G_1$  後期 (15 時間) の細胞を刺激した場合のみみられ、静止期 (0 時間) の細胞の場合にはみられず、 $G_1$  後期に特異的な現象と思われた (図 33-B)。

$G_1$  後期の細胞において、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  により 2 つずつ (T-a、T-b と H-a、H-b)、30 KDa 付近の蛋白質のリン酸化が促進されるが、TGF  $\beta$  と  $H_2O_2$  によりリン酸化される蛋白が同一のものであるかどうかを peptide mapping により確認することを試みた。同時に、a、b の蛋白が isoform である可能性も検討した。細胞を無機リンでラベルして蛋白を二次元電気泳動法により分離後、それぞれのスポット部分の gel を切り出し、V8 protease で消化し、fragments を SDS-PAGE で分離した。その結果 (図 34)、それぞれのスポットは V8 の濃度依存的に fragments に消化され、そのパターンが一致したことから、4 つの蛋白はすべて同一蛋白であると考えられた。また、この時、ラベルはリンで行っていることから、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  により同一蛋白の同じ位置にリン酸基が導入されたと考えられる。phosphoamino acid analysis から、主にリン酸化されていたのは ser 残基であることがわかった。

この p30 のリン酸化は、 $G_1$  後期の細胞において TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  で共通に引き起こさ

れ、TGF  $\beta$  は、G<sub>1</sub> 後期の細胞に作用させた時に細胞からの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の放出を促進することから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が、TGF  $\beta$  の p30 のリン酸化促進のセカンドメッセンジャーになっている可能性を catalase を用いて検討した。その結果、catalase の共存により、TGF  $\beta$  による p30 のリン酸化が抑制される傾向にあることがわかった (図 35、表 10)。その時、TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によりリン酸化の促進のみられない他の蛋白のリン酸化は、殆ど catalase により影響を受けなかった。

第七節 ras transform 細胞の、TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 抑制作用に対する感受性の欠如

一般に癌細胞は、正常細胞に比べて増殖因子に対する依存性が低くなっており、自律的に増殖し続ける傾向がある<sup>58, 59</sup>。これは、増殖促進因子に対する感受性、或いは、抑制因子に対する感受性の欠如の結果と考えられる。そこで、TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成抑制作用に対する感受性を、正常と癌細胞とで比較してみた。正常細胞としては MC3T3 細胞、癌細胞としては MC3T3 細胞に H-ras、或いは K-ras を導入して癌化させた 3 つの clone を用いた。図 36 は、対数増殖期にあるこれらの細胞を、各濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理したときの DNA 合成の抑制の割合を示したものであるが、MC3T3 に比べて ras で transform した細胞では、何れも抑制作用に対する感受性が低下していた。これらの細胞では、同時に、TGF  $\beta$  による DNA 合成の抑制にたいする感受性もなくなっていた。その中で、clone H-2 を選んで、種々の濃度での DNA 合成の抑制の割合と、plating efficiency の関係を調べてみると (図 37)、MC3T3 の場合 (図 21) と異なって、両者は、ほぼ同じ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度依存性を示した。各濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する plating efficiency の低下は MC3T3 と clone H-2 とで殆ど変わらなかった。従って、以上の結果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による単なるストレスに対する感受性は MC3T3 と ras transform 細胞で差はなく、ras transform 細胞では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成抑制作用に関わっている何らかの機構が作用しなくなっていることを示唆していると思われる。

#### 第八節 静止期の MC3T3 細胞に対する catalase の増殖促進効果

ここまででは、外から積極的に TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  を加えて DNA 合成を抑制した時の解析であった。一方、第二章では、細胞周期上にある細胞は、 $G_1$  後期に、自ら産生した  $H_2O_2$  により増殖を自ら制御されているという結果を得ている。これらの結果を考え合わせると、増殖刺激を受けて細胞周期上にある細胞は、 $G_1$  後期には、培地中にある、或いは自ら作り出した TGF  $\beta$  様の物質による刺激を受けて  $H_2O_2$  を産生し、その結果、外から TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  を加えなくても、自然にある割合の細胞が増殖を停止しているのではないかと思われる。

そこで、継代後 4~5 日経過して、confluent な状態で静止期にさしかかったと思われる細胞集団に対する catalase の効果を検討してみた。その結果、表 11 に示すように、catalase を加えることで顕著な DNA 合成の誘導がみられた。しかし、この catalase の増殖因子様の作用は、catalase 試薬中に増殖因子が共存していたためとも考えられる。そこで、Sephedex G-200 を用いて、catalase 試薬中に含まれる物質を分離し、DNA 合成の誘導活性を持つ分画と、catalase の酵素活性を持つ分画が一致するかどうかを検討した。図 38 に明らかなように、両方の活性を持つ分画が一致した。従って、継代後、自然に増殖を停止する時にも、 $H_2O_2$  が、その DNA 合成抑制に関与していることが示唆された。なお、外から TGF  $\beta$  を加えた場合の、TGF  $\beta$  による DNA 合成抑制に対する回復効果を示す分画も、catalase の酵素活性を持つ分画と一致した。



#### 第四章 考察

この章では以下の結論が得られた。

- 1) TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  は、MC3T3 細胞において、 $G_1$  後期の細胞に特異的に作用して DNA 合成を抑制した。
- 2) TGF  $\beta$  による DNA 合成抑制作用は、catalase の添加により回復した。
- 3) TGF  $\beta$  は、 $G_1$  後期の細胞に作用したときのみ、細胞に  $H_2O_2$  の産生を促した。
- 4) 静止期、 $G_1$  後期の細胞ともにほぼ同数の TGF  $\beta$  に対するレセプターを発現していたが、解離定数に若干の違いがみられた。
- 5)  $H_2O_2$  は、単独で、MC3T3 細胞において、転写レベルで c-fos、c-jun の発現を誘導し、その産物は TRE 配列を持つ遺伝子の発現を促進した。
- 6) TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  は、 $G_1$  後期の MC3T3 細胞に作用したときに、どちらも細胞内蛋白 p30 のリン酸化を促進し、TGF  $\beta$  によるそのリン酸化の促進は catalase により阻害される傾向にあった。
- 7) ras で transform した細胞は、TGF  $\beta$ 、 $H_2O_2$  による DNA 合成抑制作用に対して感受性を著しく減じていた。
- 8) 細胞分裂を繰り返した後、静止期にさしかかった細胞集団に対して、catalase は DNA 合成を誘導した。

MC3T3細胞は、 $H_2O_2$ の添加により、著しくDNA合成を抑制された。 $H_2O_2$ がこの抑制作用を示す濃度は、細胞毒性を与える濃度よりはるかに低く、従って、このDNA合成の抑制は、単なる細胞毒性に関係した機構とは性質を異にした機構によるものと思われる。そして、この $H_2O_2$ によるDNA合成の抑制は、 $G_1$ 期のなかでも $G_1$ 後期に特異的にみられる。同じ低分子物質でも、cAMP、 $A_{23187}$ にはそのような作用はみられず、 $H_2O_2$ は、細胞内にcAMP、 $A_{23187}$ による変化とは異なった変化を引き起こしていると考えられる。また、高濃度(1 mM以上)の $H_2O_2$ が細胞毒性を及ぼす一つの原因に、細胞内Caのホメオスタシスの乱れが挙げられているが<sup>80)</sup>、 $A_{23187}$ は、どちらかといえば $G_1$ 後期よりも $G_1$ 初期に作用したほうがDNA合成抑制作用が強いことから、細胞毒性につながるようなCaの動きは、 $H_2O_2$ による $G_1$ 後期に特異的なDNA合成抑制作用には関与していないことが想像される。

TGF $\beta$ は、個体の発生から細胞の増殖制御にいたるまで、多様な生物作用に関与していることから、最近、多方面から注目を集めている<sup>85, 86)</sup>。しかし、TGF $\beta$ のシグナル伝達系については、最近、G蛋白質の関与が示唆された以外には<sup>81, 82)</sup>、まだ殆どなにもわかっていない。 $H_2O_2$ 同様、TGF $\beta$ もMC3T3細胞のDNA合成を $G_1$ 後期特異的に抑制し、その作用がcatalaseの添加により弱められたことから、 $H_2O_2$ が、TGF $\beta$ のDNA合成抑制作用に関して重要なセカンドメッセンジャーとして働いている可能性が示された。この結果は、TGF $\beta$ のシグナルに関して、新たな重要な知見を与えるものと考えられる。

実際TGF $\beta$ を細胞に作用させると $H_2O_2$ の産生を促すが、その産生も $G_1$ 後期に特異的であった。このように、TGF $\beta$ に対する反応性は、 $G_1$ 初期と後期で顕著に異なるが、静止期の細胞も、 $G_1$ 後期の細胞とほぼ同数のTGF $\beta$ に対するレセプターを発現している。しかし、解離定数に若干の差が認められたことから、各々の時期で発現しているレセプターの性質が異なることが予想される。発現しているレセプターが異なれば、以下のシグナル伝達経路にも違いを生じることが考えられ、 $H_2O_2$ の産生の有無もそのような違いのうちの一つであろうと思われる。TGF $\beta$ は、細胞の種類や培養条件によりその作用が異なり、細胞増殖に対して複雑な挙動を示す。そのような複雑な作用を示す一つの理由とし

て、細胞周期によって発現しているレセプターが異なり、レセプターのレベルでシグナル伝達系の切り換えを行っている可能性が示唆されたことになり、興味深い。何れにしても、自然に存在する TGF  $\beta$  による DNA 合成抑制作用の場合には、細胞側の感受性の差に加えて、細胞が感受性である時期にのみ効率的に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生するように、レセプターのレベルでそのシグナル伝達系が制御されているものと考えられる。

対数増殖期の細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独で、c-fos、特に、c-jun が転写レベルで強く誘導された。c-fos、c-jun 遺伝子は、静止期の細胞を血清などの増殖因子で刺激したときに、その初期に誘導されることがよく知られており、今までのところ、一般には、増殖の促進に関与しているのではないかと考えられている<sup>87)</sup>。しかし、最近、TNF  $\alpha$  で血管内皮細胞を刺激したときに、c-jun が強く誘導されることが報告された<sup>88)</sup>。TNF  $\alpha$  は血管内皮細胞の増殖に対しては抑制的に働くことから、筆者らは、c-jun は増殖の促進機構のみならず、抑制機構にも関与しているのではないかと議論している。このような例を考え合わせると、MC3T3 細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成抑制作用に、誘導された jun が関与している可能性も十分考えられる。また、TRE が活性化されることから、TRE を介してさらに多くの遺伝子の発現に影響を及ぼしていることが予想される。

もう一つの細胞内変化として、TGF  $\beta$  と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> がともに共通に p30 のリン酸化を促進することを見出した。リン酸化は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で刺激した場合は 15 分以内にみられたのに対して、TGF  $\beta$  の場合はピークに達するのに 2 時間かかった。この TGF  $\beta$  によるリン酸化の time course は、TGF  $\beta$  による細胞からの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の放出の kinetics と一致していた。また、catalase を同時に添加すると TGF  $\beta$  によるリン酸化の促進が弱められたことから、この TGF  $\beta$  による p30 のリン酸化は、DNA 合成抑制作用の場合と同じく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を介したものであると考えられた。さらにこの p30 のリン酸化は、DNA 合成の抑制作用に非感受性の静止期の細胞では、TGF  $\beta$  と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のいずれで刺激してもほとんどみられない。これが、静止期の細胞には p30 の蛋白自身が存在しないためか、或いは静止期と G<sub>1</sub> 後期でリン酸化のシグナル伝達系が異なっているためかは、現時点ではわからない。何れにしても、この p30 のリン酸化の挙動は、種々の点で TGF  $\beta$ 、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成の抑制作用と密接に関係しており、この蛋白の性質、ならびに細胞内での働きと、DNA 合成の抑制作用

への関与の有無に興味を持たれる。一方、多くの増殖因子については、その因子で細胞を処理したときに特異的な蛋白のリン酸化的促進がみられることが既に報告されているが<sup>52, 53)</sup>、TGF $\beta$ についてはまだそのシグナル伝達経路に関してほとんど何も明らかにされておらず、この p30 のリン酸化が、初めて、TGF $\beta$  による特異的な蛋白リン酸化の関与を示したことになる。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理したときの遺伝子の発現、蛋白のリン酸化に至る H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用機序に関しては、さらに多くの検討を要するが、遺伝子の発現が H-7 に感受性であったこと、p30 の ser 残基のリン酸化がみられたこと、から protein kinase C 以外の H-7 に感受性の serine kinase が関与していることはほぼ確実と思われる。

最近、癌遺伝子である oncogene に対して antioncogene の概念が提唱され、antioncogene、すなわち癌抑制遺伝子の欠損が癌化の過程の一つの重要なプロセスであると考えられるようになった<sup>64-67)</sup>。一般には、癌抑制遺伝子は、細胞の増殖に対して抑制的に働くものと考えられており、増殖抑制機構の欠如が癌化につながると推測されている。実際、この考えを支持する実験結果が報告され始めている<sup>68)</sup>。今回見出した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成の抑制作用も ras で transform した細胞で欠如していたことから、この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成の抑制作用の喪失もある種の細胞の癌化に関与していることが考えられる。この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成の抑制機構の欠如は、ヒト扁平上皮癌の細胞である A431 細胞でもみられ、癌細胞一般にみられる現象である可能性があり、細胞の癌化の観点からも非常に重要な機構である可能性がある。

今回、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 合成の抑制作用と癌化との関係を、主に、ras で transform した細胞を用いて検討した。MC3T3 細胞では、細胞毒性の現れるよりはるか低濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で DNA 合成の抑制がみられるのに対して、ras で transform した細胞では、DNA 合成の抑制と細胞毒性がほぼ同じ濃度でみられた。このことは、ras で transform した細胞でみられる DNA 合成の抑制は細胞毒性と等価であり、MC3T3 細胞において低濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で引き起こされる DNA 合成の抑制は、何らかの積極的な抑制機構によるものであることをさらに裏付けている。細胞毒性のみられる濃度は両細胞間でほぼ一致しており、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性、耐性そのものは両細胞で差がないと思われ、ras で transform し

た細胞では、 $H_2O_2$ による積極的な抑制機構が欠如していると考えられる。

ras 遺伝子の活性化は、多くのヒトの癌で見出されており<sup>69)</sup>、ヒトの癌を考えるうえで重要な遺伝子であると思われる。ras 遺伝子の活性化の細胞の癌化への関与の仕方について、Weinberg らは、ras 遺伝子の活性化が生じている細胞は、tumor promoterである TPA によって clonal に増殖を促進されやすく、従って、癌化する確率がたかくなるのではないかと考えている<sup>70)</sup>。ras 遺伝子の活性化により増殖を促進されやすくなる理由の一つに、おそらくこの  $H_2O_2$ による DNA 合成の抑制作用の欠如が関与しているのではないかと思われる。正常細胞では、 $G_1$ 後期に  $H_2O_2$ の産生が高まり、その  $H_2O_2$ により DNA 合成が抑制されるのに対して、ras で transform した細胞ではその抑制がかからないことから、結果的に、ras で transform した細胞が優先的に増殖することになると考えられるからである。以上のようなメカニズムで、今回見出した  $H_2O_2$ による DNA 合成の抑制作用が、癌化に関わっている可能性が十分考えられる。

最後に、自然に近い状態で増殖を続け、定常状態に入るときにも  $H_2O_2$ がその DNA 合成の抑制に関与していることが示唆された。このときにも、細胞は、TGF $\beta$ 様の物質による刺激を受けて  $H_2O_2$ を産生し、同様の機構で DNA 合成が抑制されているのではないかと考えられるが、実際のところは不明である。しかし、少なくとも、自然な増殖停止機構にも  $H_2O_2$ が関与していることは確かであると思われ、興味深い。

Table 5. Inhibition of  $^3\text{H}$ -Thd incorporation by TGF  $\beta$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  in growing MC3T3 cells.

| Addition                        | $^3\text{H}$ -Thd incorporation<br>(cpm) |
|---------------------------------|------------------------------------------|
| —                               | 12373                                    |
| TGF $\beta$ (1 ng/ml)           | 9303                                     |
| (10 ng/ml)                      | 2141                                     |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ (0.1 mM) | 8684                                     |
| (0.2 mM)                        | 5004                                     |

Experiment was done under the same condition as Table 7.

Table 6. Differential sensitivity to growth stimulation or inhibition by various growth factors and chemicals

| Addition                                 | <sup>3</sup> H - Thd incorporation (ratio) |      |       |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|------|-------|
|                                          |                                            | 3 hr | 12 hr |
| —                                        |                                            | 1.00 | 1.00  |
| PDGF (1 U/ml)                            |                                            | 1.65 | 1.29  |
| EGF (10 ng/ml)                           |                                            | 1.33 | 1.16  |
| TPA (10 ng/ml)                           |                                            | 1.26 | 0.61  |
| Insulin (2 μM)                           |                                            | 0.68 | 0.62  |
| dBT cAMP (1 mM)                          |                                            | 0.74 | 0.68  |
| A <sub>23187</sub> (0.01 μM)             |                                            | 0.72 | 0.94  |
| TGF β (2 ng/ml)                          |                                            | 0.85 | 0.31  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.075 mM) |                                            | 0.84 | 0.42  |

Quiescent MC3T3 cells were stimulated with 5% serum at 0 hr, and growth factors and chemicals were added 3 hr or 12 hr after the serum - stimulation. The cells were labeled with <sup>3</sup>H - Thd (0.1 μCi/ml) between 24~36 hr and then acid - precipitable radioactivity was measured. Values were indicated as ratios to those of cells stimulated only with serum.

Table 7. Effect of catalase on growth inhibition by TGF  $\beta$  in MC3T3 cells.

| Addition                           | $^3\text{H}$ -Thd incorporation<br>(cpm) |
|------------------------------------|------------------------------------------|
| —                                  | 7463                                     |
| TGF $\beta$ (10 ng/ml)             | 2270                                     |
| TGF $\beta$ + catalase (3200 U/ml) | 5690                                     |
| + SOD (80 U/ml)                    | 2143                                     |
| + mannitol (10 mM)                 | 1967                                     |
| catalase                           | 8824                                     |

Logarithmically growing MC3T3 cells pre-incubated in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 3 hr were treated with TGF  $\beta$  or scavengers.  $^3\text{H}$ -Thd (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) was added 24 hr after the addition, cells were incubated for 12 hr and then acid-precipitable radioactivity was measured.



Table 8. Effect of catalase on inhibition of DNA synthesis by TGF  $\beta$  in MC3T3 cells

| Addition                               | $^3$ H - Thd incorporation<br>(cpm) |
|----------------------------------------|-------------------------------------|
| —                                      | 1484                                |
| Serum* (10%)                           | 6242                                |
| + TGF $\beta$ (2 ng/ml)                | 3334                                |
| + TGF $\beta$ + catalase (3200 U/ml)   | 4400                                |
| + TGF $\beta$ + catalase (inactivated) | 3185                                |
| + TGF $\beta$ + SOD (50 $\mu$ g/ml)    | 3135                                |
| + TGF $\beta$ + mannitol (10 mM)       | 3129                                |
| + catalase (3200 U/ml)                 | 6165                                |

\*Serum\* was used instead of fetal bovine serum. Quiescent MC3T3 cells were stimulated with 10% serum\* at 0 hr and TGF  $\beta$  and scavengers were added at 12 hr.  $^3$ H - Thd incorporation was measured in the same way as Table 6.

Table 9. Effect of catalase on inhibition of DNA synthesis by TGF  $\beta$  in MC3T3 cells

| Addition                             | Labelig index<br>(%) |
|--------------------------------------|----------------------|
| —                                    | 6.0 $\pm$ 1.5        |
| Serum* (20%)                         | 47.6 $\pm$ 5.7       |
| + TGF $\beta$ (5 ng/ml)              | 27.6 $\pm$ 4.3       |
| + TGF $\beta$ + catalase (3200 U/ml) | 54.7 $\pm$ 6.2       |
| + catalase                           | 56.2 $\pm$ 9.0       |

\*Serum\*\* was used instead of fetal bovine serum. Cells were treated under the same condition as Table 8.  $^3\text{H}$ -Thd ( $1\ \mu\text{Ci/ml}$ ) was added at 12 hr, and the cells were fixed at 36 hr and processed for autoradiography. Values were means of triplicate samples  $\pm$  standard deviation.

Table 10. Effect of catalase on  
protein phosphorylation  
stimulated with TGF  $\beta$

| Spot | ratio |
|------|-------|
| a'/a | 0.77  |
| b'/b | 0.62  |
| c'/c | 0.98  |
| d'/d | 1.23  |
| e'/e | 0.91  |
| f'/f | 0.93  |
| g'/g | 1.07  |

The position of each spot marked with a~g, or a'~g' in FIG.35  
was scanned with densitometer and ratio, x'/x, was calculated.

Table 11. Effect of catalase on DNA synthesis of MC3T3 cells in confluent culture

| Addition            | <sup>3</sup> H - Thd incorporation<br>(cpm) |       |
|---------------------|---------------------------------------------|-------|
|                     | Exp.1                                       | Exp.2 |
| —                   | 2534                                        | 6016  |
| Catalase(3200 U/ml) | 7719                                        | 13869 |

Experiment was performed under the same condition with Table 7, except that cells were nearly confluent and stopped growing.

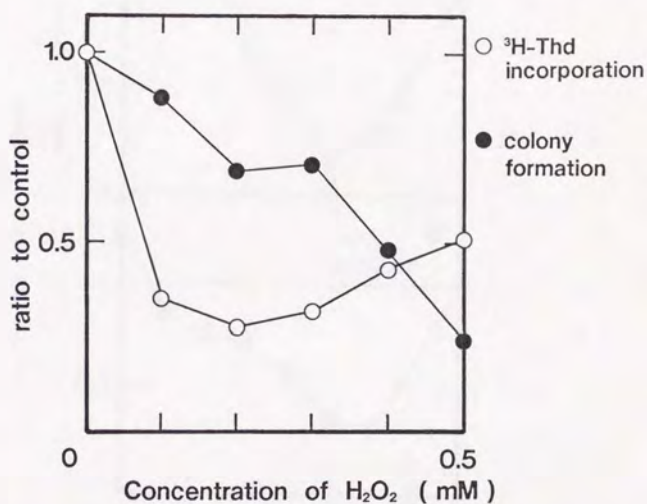


FIG.21 Dose dependency of inhibition of <sup>3</sup>H - Thd incorporation and colony formation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MC3T3 cells. Logarithmically growing MC3T3 cells were incubated in serum free medium (DMEM + 0.1% BSA) for 3 hr and then treated with various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 hr. One group of the culture was labeled with <sup>3</sup>H - Thd (0.1 μCi/ml) for another 12 hr and then acid - precipitable radioactivity was measured.

Another group was re - seeded at the density of 200 cells /dish and colonies were scored 10~14 days later. Values are means of duplicate samples for <sup>3</sup>H - Thd (○) and four dishes for colony formation (●).

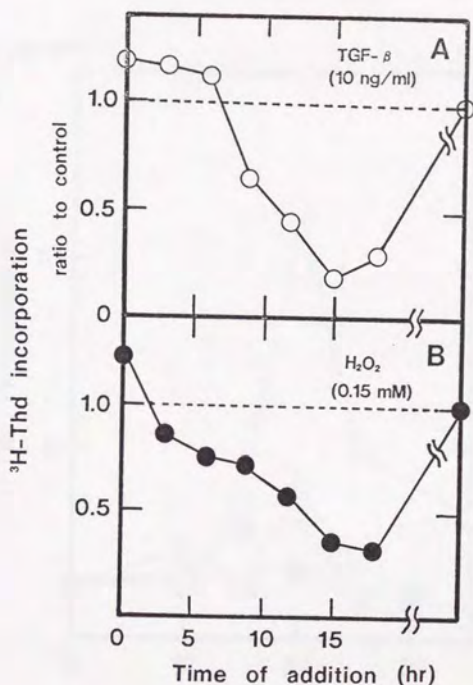


FIG. 22 Differential sensitivity to growth inhibition by TGF  $\beta$  or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Confluent culture of MC3T3 cells was incubated in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 12~24 hr and then cells were stimulated with 5% fetal bovine serum at 0 hr. After stimulation, TGF  $\beta$  (10 ng/ml)(A) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 mM)(B) were added at the various times and <sup>3</sup>H-Thd incorporation between 24~36 hr was measured.

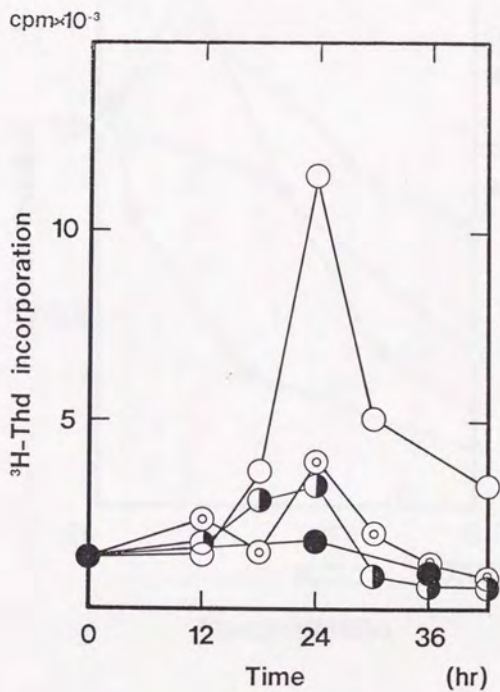


FIG. 23 Time course of  $^3\text{H}$ -Thd incorporation inhibited by TGF  $\beta$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Confluent culture of MC3T3 cells was incubated in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 12~24 hr. cells without stimulation (●) or those stimulated with 5% fetal bovine serum (○) at 0 hr were treated with TGF  $\beta$  (10 ng/ml)(◐) or  $\text{H}_2\text{O}_2$  (◑) at 15 hr.  $^3\text{H}$ -Thd was added at each time point at a concentration of 0.2  $\mu\text{Ci/ml}$ . The cells were incubated for 3 hr, and then acid-precipitable radioactivity was measured.

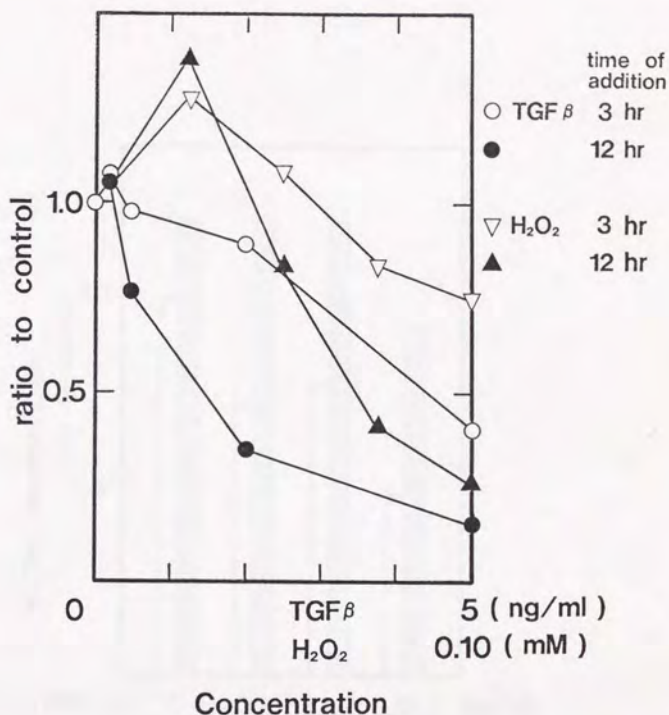
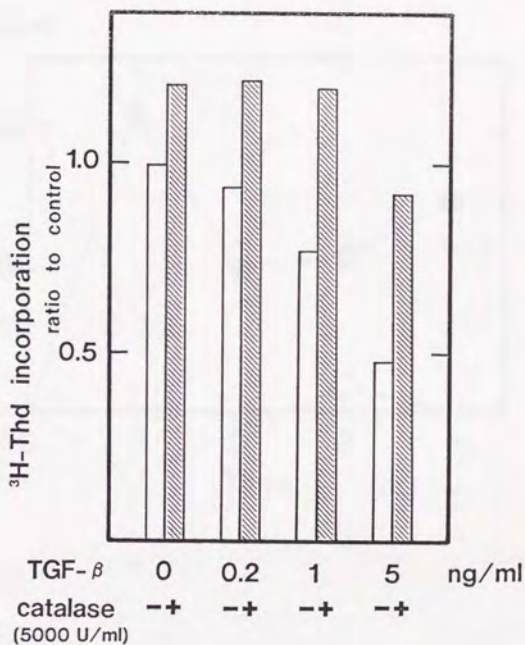


FIG.24 Dose dependency of inhibition of DNA synthesis by  $H_2O_2$  and  $TGF\beta$  in MC3T3 cells. MC3T3 cells were made quiescent by incubating in DMEM + 0.1% BSA for more than 24 hr. Cells were stimulated with 5% serum at 0 hr and various concentrations of  $H_2O_2$  and  $TGF\beta$  were added 3 hr (○, △), or 12 hr (●, ▲) after the serum stimulation. Cells were labeled with  $^3H$ -Thd (0.1  $\mu$ Ci/ml) between 24 hr and 36 hr and acid-precipitable radioactivity was measured. The each result was indicated as a ratio to the value of cells treated only with 5% serum.





**FIG.25** Effect of catalase on DNA synthesis in ROS cells. Logarithmically growing ROS cells pre - incubated in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 3 hr were treated with TGF  $\beta$  (0 - 5 ng/ml) or catalase (5000 U/ml).  $^3\text{H}$ -Thd (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) was added after 24 hr, the cells were incubated for 12 hr and then acid - precipitable radioactivity was measured.

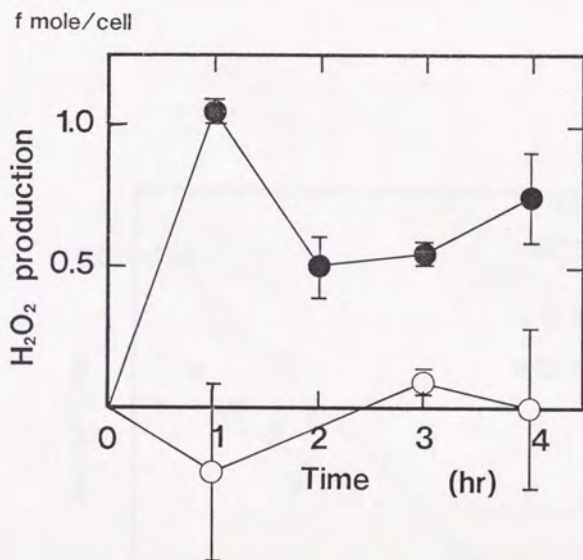


FIG. 26 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production into the medium of MC3T3 cells stimulated with TGF  $\beta$ . Quiescent MC3T3 cells were untreated (○) or treated with 5% fetal bovine serum (●) for 12 hr and then the culture fluids were replaced with Eagle's MEM containing 1 mg/ml BSA. After incubation for another 2 hr, cells of both cultures were treated with TGF  $\beta$  (5 ng/ml) at 0 hr. After the indicated times, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the medium was determined as described in Materials and Methods. Values are means of triplicate samples  $\pm$  standard deviation.

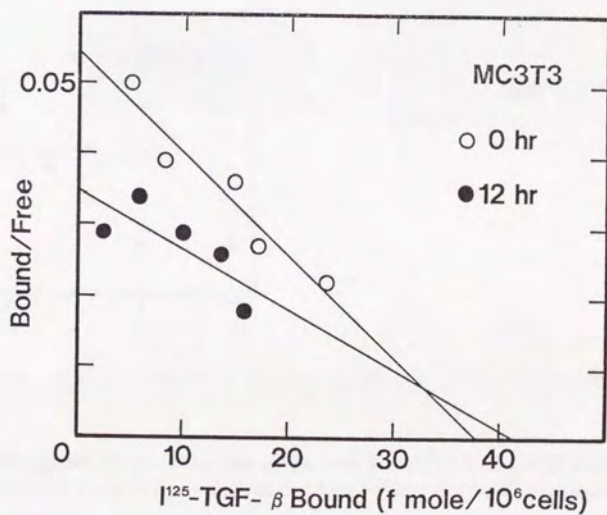
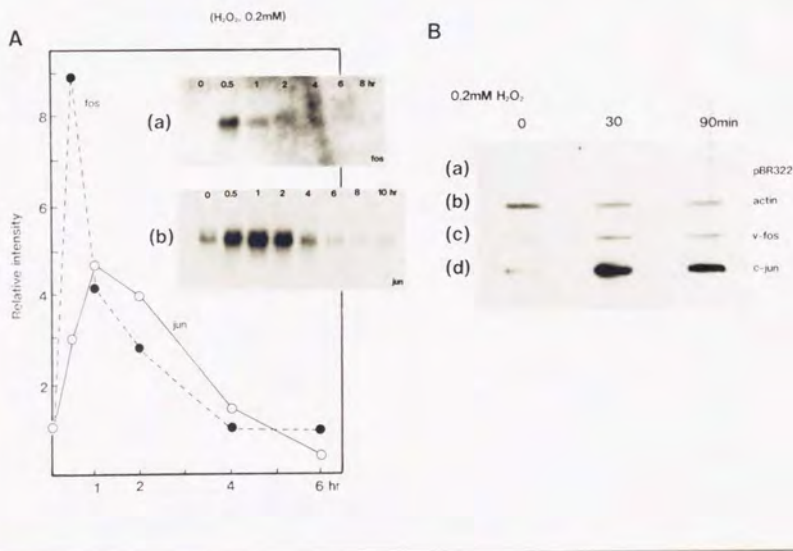
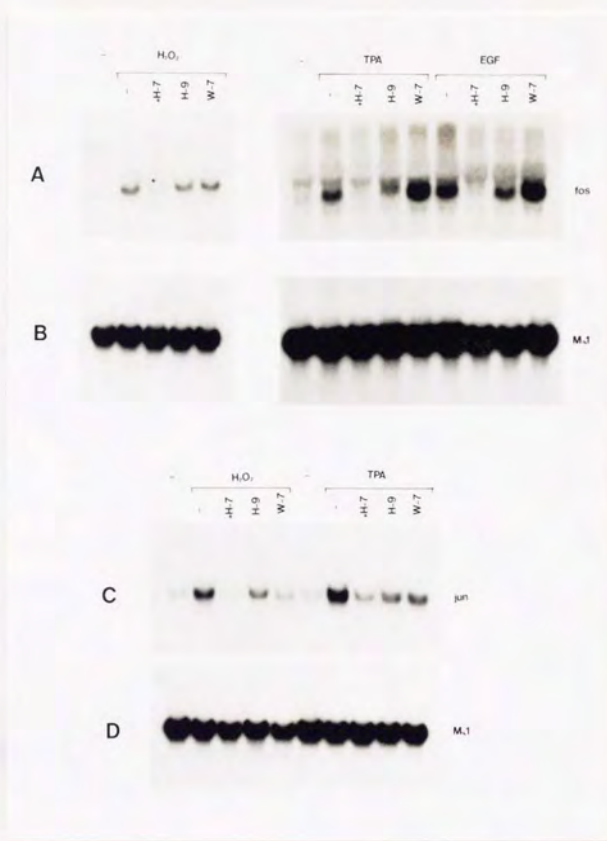


FIG. 27 Scatchard plots of  $^{125}\text{I}$ -TGF  $\beta$  binding to MC3T3 cells. Quiescent MC3T3 cells were treated (●) or untreated (○) with 5% serum for 12 hr. Binding assay was performed as described in Materials and Methods. Values are means of duplicate samples.



**FIG. 28 A:** Time course of the induction of *fos* and *jun* mRNA. MC3T3 cells were treated with 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated times. Total RNA (20  $\mu$ g/lane) was extracted, run on agarose gel containing formaldehyde and transferred to a membrane filter. The filters were hybridized with <sup>32</sup>P-*v-fos* (a), *c-jun* (b) probes. The autoradiogram was scanned with a densitometer and the intensities of the *fos*-specific band (●) and *jun*-specific band (○) were expressed in arbitrary units. **B:** Nuclear run-on transcription. MC3T3 cells were treated with 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated times. Nuclei were isolated and incubated in reaction mixtures with  $\alpha$  <sup>32</sup>P-UTP. Labeled transcripts were extracted and hybridized with pBR322 (a),  $\beta$ -actin (b), *v-fos* (c) and *c-jun* (d) probes immobilized on membrane filters.



**FIG. 29** Effects of protein kinase inhibitors on fos, jun induction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MC3T3 cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM), TPA (50 ng/ml) or EGF (10 ng/ml) in the presence or absence of 50  $\mu$ M H-7, H-9 or W-7. Total RNA (20  $\mu$ g/lane) was extracted after 30 min (A, B) or 90 min (C, D), run on an agarose gel containing formaldehyde and transferred to a membrane filter. The filters were hybridized with <sup>32</sup>P-v-fos (A),  $\alpha$ -tubulin (B, D) or c-jun (C) probes.

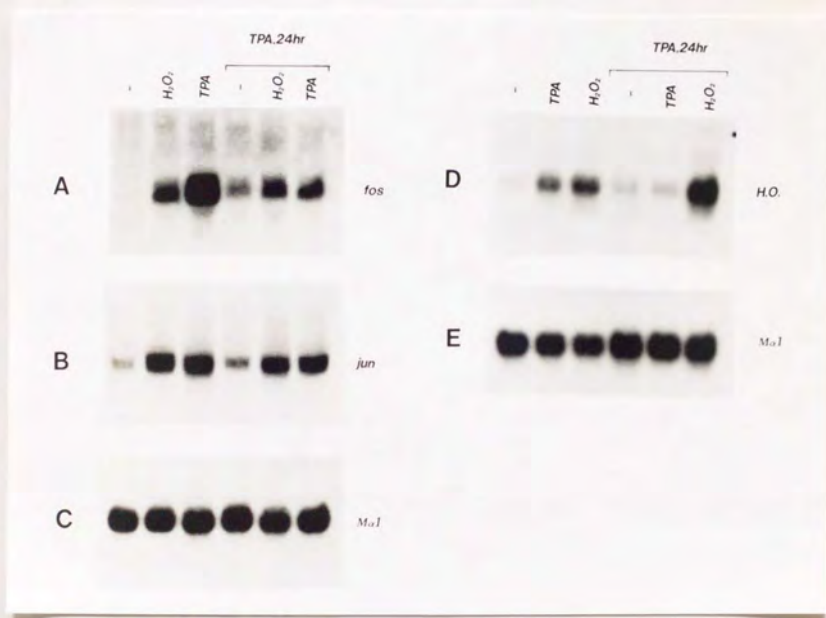
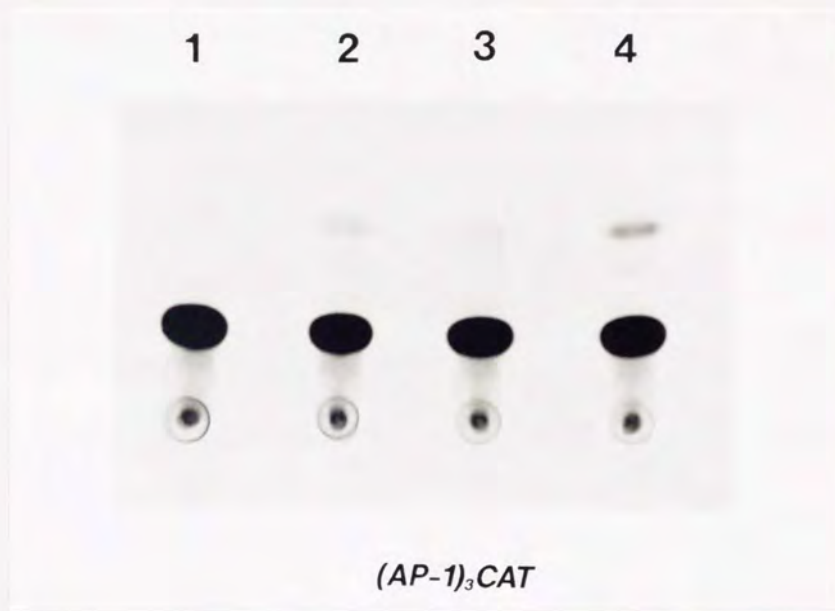


FIG.30 Induction of *fos*, *jun* and heme oxygenase mRNA in protein kinase C down regulated cells. MC3T3 cells treated with or without TPA (50 ng/ml) for 24 hr were stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 mM) or TPA (50 ng/ml) for 30 min (A, C), 120 min (B, D, E). Total RNA (20  $\mu$ g/lane) was extracted, run on agarose gel containing formaldehyde and transferred to a membrane filter. The filters were hybridized with <sup>32</sup>P-v-*fos* (A), c-*jun* (B),  $\alpha$ -tubulin (C, E) or heme oxygenase (D) probes.



**FIG.31** Stimulation of TRE - CAT activity by  $H_2O_2$ . TRE - CAT construct used in this assay contained synthesized oligonucleotides of TRE sequence which was found in 5' -franking region of collagenase gene. This TRE sequence was ligated to 5'upstream region of IL-3 promoter -CAT. MC3T3 cells were transfected with this plasmid ( $20 \mu g/100$  mm dish) by Ca - phosphate method. After 6 hr, cells were subjected to 20% DMSO shock for 30 sec and then placed in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 1 day. Cells were un - treated (1), stimulated with TPA (50 ng/ml)(2),  $H_2O_2$  (0.05 mM)(3) or  $H_2O_2$  (0.1 mM)(4) twice at intervals of 24 hr and cells were harvested for CAT assay 24 hr after the second stimulation.

Phosphorylation of p30 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MC3T3

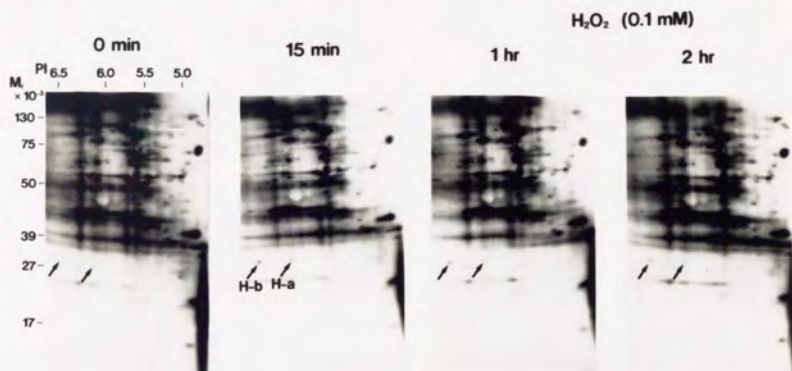
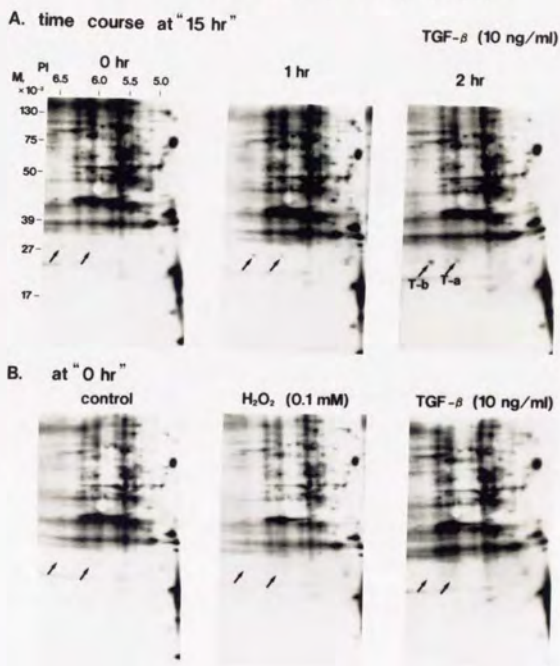


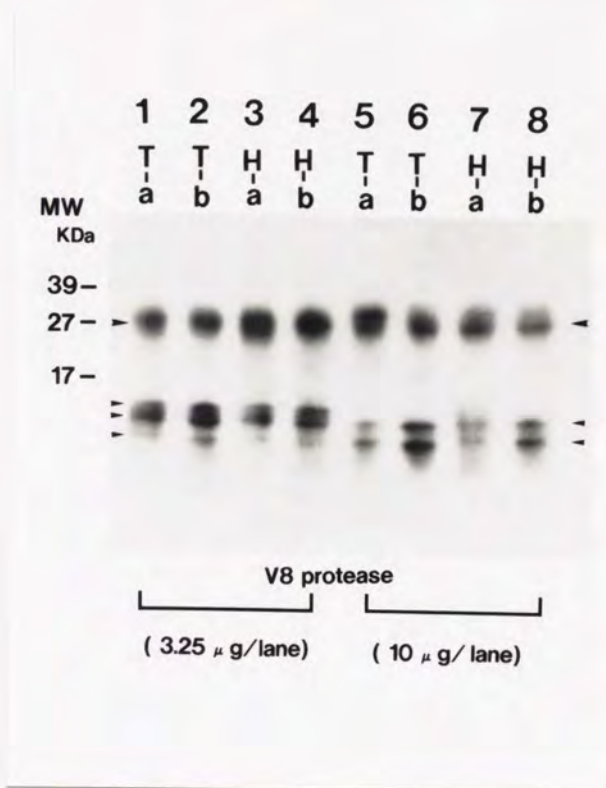
FIG. 32 Phosphorylation of p30 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MC3T3 cells. Quiescent MC3T3 cells were stimulated with 5% serum for 11 hr and then, labeled with [<sup>32</sup>P]orthophosphate (0.2 mCi/ml) for 4 hr, treated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated times, lysed and subjected to 2-dimensional electrophoresis. The arrows indicate the position of p30.



### Phosphorylation of p30 by TGF- $\beta$



**FIG.33** Phosphorylation of p30 by TGF  $\beta$  in MC3T3 cells. A: Quiescent MC3T3 cells were stimulated with 5% serum for 11 hr and then, labeled with [<sup>32</sup>P]orthophosphate (0.2 mCi/ml) for 4 hr, treated with TGF  $\beta$  (10 ng/ml) for the indicated times, lysed and subjected to 2-dimensional electrophoresis. The arrows indicate the position of p30. B: Quiescent MC3T3 cells were labeled in a similar way to A, treated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min or 10 ng/ml TGF  $\beta$  for 2 hr, lysed, and subjected to 2-dimensional electrophoresis. The arrows indicate the position of p30.



**FIG.34** Proteolytic peptide map of p30. Quiescent MC3T3 cells were stimulated, labeled in a similar way as in FIG.33 A and treated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min or 10 ng/ml TGF β for 2 hr. Then, cells were lysed, and subjected to 2-dimensional electrophoresis. Gel pieces corresponding to p30 were excised and inserted in the wells of SDS-polyacrylamide gels (17.5% acrylamide concentration), and overlaid with buffer containing 3.25 μg (lane 1~4), 10 μg (lane 5~8)/lane of V8 protease as described by Cleveland et al.<sup>77</sup>. The large arrows indicate the position of original p30 uncleaved, small ones indicate the digested fragments. Lane 1, 3, 5, 7: Spots corresponding to <sup>32</sup>P<sub>i</sub>-labeled p30-a form from TGF β - (lane 1, 5), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - (lane 3, 7) treated cells. Lane 2, 4, 6, 8: Spots corresponding to <sup>32</sup>P<sub>i</sub>-labeled p30-b form from TGF β - (lane 2, 6), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - (lane 4, 8) treated cells.

Effect of catalase on phosphorylation of p30  
induced by TGF  $\beta$

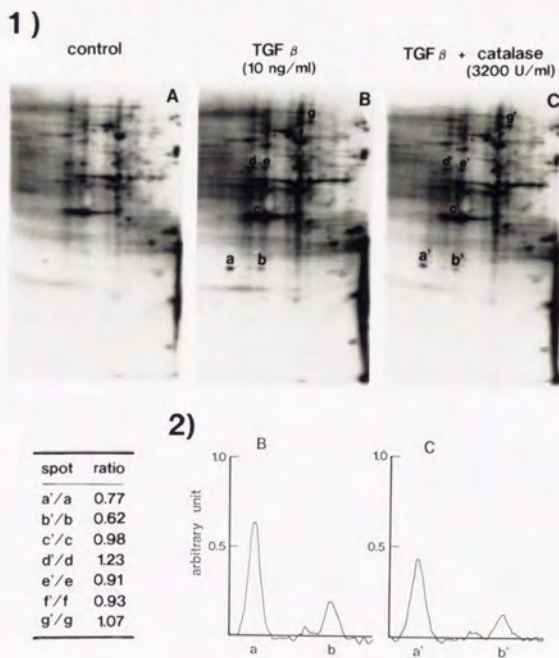


FIG.35 Effect of catalase on phosphorylation of p30 induced by TGF  $\beta$ . Experiment was done in the same condition as described in the legend of FIG.33 A. Cells were untreated (A), treated with TGF  $\beta$  (10 ng/ml)(B), and with TGF  $\beta$  (10 ng/ml) + catalase (3200 U/ml)(C) for 2 hr. 1): The result of autoradiography. 2):Spots, a, b and a', b', were scanned with densitometer.

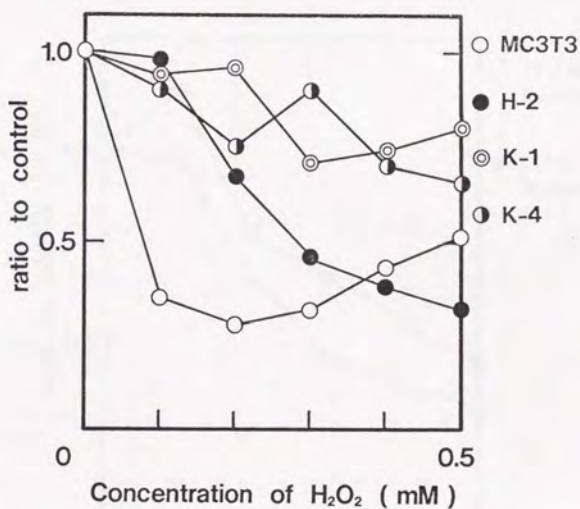


FIG.36 Dose dependent inhibition of <sup>3</sup>H - Thd incorporation by H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> in MC3T3 cells and its transformants. Logarithmically growing MC3T3 cells and its transformed were pre - incubated for 3 hr in DMEM + 0.1% BSA and treated with various concentrations of H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> at 0 hr. After 12 hr, <sup>3</sup>H - Thd (0.1 μCi/ml) was added and cells were incubated for another 12 hr. Acid-precipitable radioactivity was measured. ○: MC3T3 cells, ●: H - ras transformed cell line; H - 2, ⊙, ⊚: K - ras transformed cell lines; K - 1, K - 4.

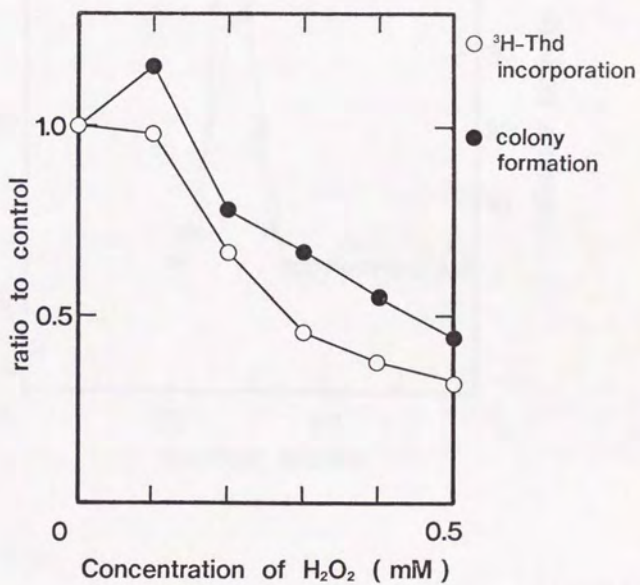


FIG.37 Dose dependency of inhibition of <sup>3</sup>H-Thd incorporation and colony formation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H-ras transformed cell. Experiment was performed exactly according to the procedure described in the legend of FIG.21.

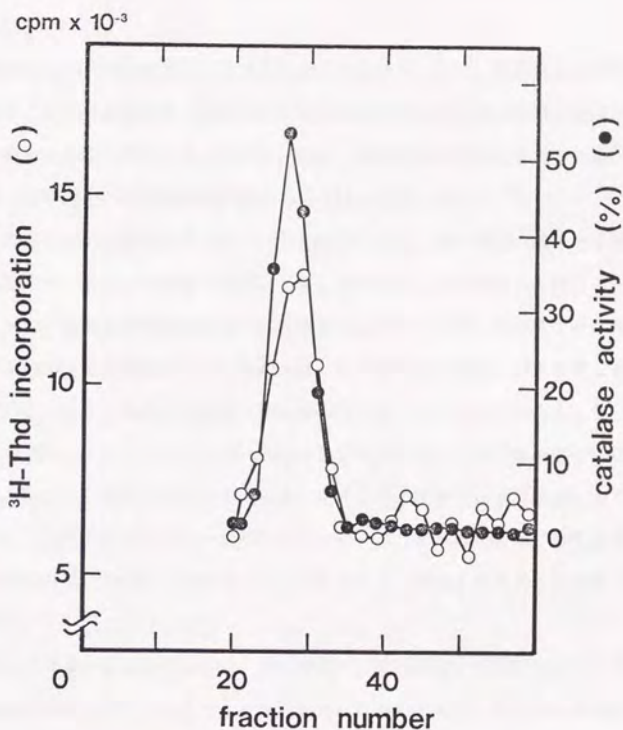


FIG.38 Co-fractionation of catalase activity and stimulatory activity of  $^3\text{H}$ -Thd incorporation. Aqueous solution of catalase obtained from Sigma Chemical, Co. was fractionated by Sephadex G-200 in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). For assay of catalase activity, aliquots of each fraction were added to 0.02 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) and reduction of absorbance at 240 nm in 30 sec was measured. For  $^3\text{H}$ -Thd incorporation, aliquots of each fraction were added to the confluent cultures of MC3T3 cells in DMEM + 0.1% BSA, and  $^3\text{H}$ -Thd incorporation was measured between 24~36 hr.

## まとめ

現在までのところ、活性酸素は、生体との関係において、主に、障害性のものとして捉えられており、従来の活性酸素と細胞に関する研究は、ほとんど活性酸素の障害性からの防御という観点からなされている。しかし、今回、増殖刺激時に活性酸素の放出がみられたことから、増殖制御への活性酸素の関与の可能性が考えられた。

外界から刺激を受けて細胞が何らかの反応を起こすとき、第一義的刺激はあくまで刺激的でなければ意味がなく、そのような刺激は、もし極端に至れば障害性を持つことになるであろう。逆に、高濃度で障害性を持つ活性酸素のようなものが、低濃度では、刺激として別の意味を持って不思議はないと思われる。この地球上の生物に対する最も原始的でありふれていて、しかも刺激的な刺激は活性酸素なのではないかと思われる。その活性酸素が、進化の過程で、シグナルとして、生物として根本的な営みである増殖の制御機構に組み込まれ、利用されるに至ったと考えても、さほどのはずれなことではないように思われる。このような考え方にたてば、増殖因子とそのレセプターの出現は、活性酸素のような非特異的な刺激に、時間的、空間的な特異性を与えるためのものであったのではないかと考えられる。

本研究は、上のような仮説のもとに、活性酸素が、増殖促進、抑制因子のシグナルの一部として利用されていることを示すことを目的としたものである。そして、増殖因子による細胞内 pH<sub>i</sub> の上昇や、蛋白のリン酸化、DNA 合成が、活性酸素の消去剤の添加により、部分的に抑制されることを見出した。

活性酸素は、一般には反応性が高く、細胞膜表面での完全な消去は困難であり、さらに細胞膜内に生じたもの的人偽的な消去はほぼ不可能に近い。従って、増殖因子の引き起こす反応にどれだけ活性酸素が関与しているかを正確に把握することは困難であるが、少なくとも部分的なセカンドメッセンジャーとして利用されていることは確かなようである。一方で、増殖因子は、活性酸素がつかさどっているシグナル伝達系以外にもいくつかのシグナル伝達系をもっていることも確かであり、増殖因子とそのレセプター系の発達は、活性酸素、或いは、やはりありふれていて利用されやすかったと思われる  $\text{Ca}^{2+}$  などのいく

つかのシグナル伝達系を組合せて、より精緻な制御機構を築き上げる歴史であったのではないと思われる。

活性酸素が増殖因子のメディエーターとなっていたことから、活性酸素は、細胞周期と密接な関係にあることが予想された。細胞周期のなかで、 $G_1$  期が、特にその制御に重要な時期であると考えられている。そこで、 $G_1$  期を中心に活性酸素と細胞周期の関係を検討を加えた結果、 $H_2O_2$  が、細胞周期の進行に伴って、 $G_1$  前期と後期の一定の時期に産生されることを見出したのを初めとして、活性酸素の消去剤を用いた実験、外から  $H_2O_2$  を加える実験により、 $G_1$  期はその前期と後期で大きく性質を異にしていることが明らかとなった。今までにも、細胞周期に関する研究から、その制御上、S 期に至るまでの  $G_1$  期上にいくつかの重要な点の存在することが示唆されていたが<sup>89, 71-73)</sup>、これらは、主に、増殖因子に対する依存性の有無についての観点からなされたものであり、それ以外の観点から、 $G_1$  期を分析した例はあまりない。 $G_1$  前期には、 $H_2O_2$  は、insulin などの他の増殖因子の存在下、DNA 合成に対して促進的に作用する。 $G_1$  後期には、 $H_2O_2$  単独で、DNA 合成に対して抑制的に作用する。このような  $H_2O_2$  の時期による作用の差が、細胞の中の、或いは、外の、 $H_2O_2$  によるどういう変化の差によってもたらされるのかは、今後明らかにされるべき大きな問題である。このように、作用機序は明らかではないが、p30 のリン酸化の差にみられたように、 $H_2O_2$  によって、両方の時期で細胞内で違った変化が引き起こされることは確かであり、 $G_1$  期を具体的に分子レベルで解析する独自の手掛りを得られたものと考ええる。

このように、細胞は、 $G_1$  前期には  $H_2O_2$  に対して正の感受性、 $G_1$  後期には負の感受性を持っているわけだが、 $H_2O_2$  に対して感受性を持つこれらの時期に、各々、実際、 $H_2O_2$  の産生がみられる。 $G_1$  前期の  $H_2O_2$  は、増殖因子のなかでも competence 因子の刺激をうけて産生されるものであり、後期の  $H_2O_2$  は、TGF  $\beta$  のような増殖抑制因子の刺激をうけて産生されるものではないかと考えられる。一方で、細胞を PDGF のような増殖因子で刺激すると、増殖を促進するための様々な遺伝子が活性化されるが、その中には interferon  $\beta$  のような、逆に増殖に負に作用するようなものも含まれていることが報告されている<sup>74)</sup>。TPA や血清で刺激した場合に、interferon  $\beta$  と同様に、刺激後 4-6 時間以



降 TGF $\beta$  の mRNA の発現の上昇もみられる。このような観察からすると、細胞を増殖因子で刺激すると、増殖促進因子自身により G<sub>1</sub> 前期に引き起こされる反応に続き、G<sub>1</sub> 後期には、今度は、増殖因子の作用の一環として合成されてきた増殖抑制因子が細胞に作用して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生を促し、増殖を抑制的に制御しているのではないかと考えられる。このような、G<sub>1</sub> 前期、後期における、増殖促進、抑制因子による、正、負、二重の制御の結果、バランスのとれた細胞増殖の制御がなりたっているであろう。或いは、様々な増殖因子で刺激したときに観察される最終的な DNA 合成の上昇量、すなわち、各増殖因子の増殖促進因子としての強さは、個々の因子の持つ DNA 合成を促進する力と、G<sub>1</sub> 後期の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による普遍的な抑制的制御のかかり方の総和で決まるということになる、という言い方も可能であろう。今回、このように、活性酸素という窓を通して検討を加えた結果、G<sub>1</sub> 期における増殖制御について、その前期と後期の性質の違い、増殖促進因子と抑制因子による各々の時期での増殖制御について、新たな概念を提唱できたものと考えている。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、G<sub>1</sub> 期の前期と後期の両方の時期にそれぞれ促進、抑制的制御に関係していることが示唆されたが、単独で増殖に影響を及ぼしうる点で、G<sub>1</sub> 後期の抑制的制御により深く関わっていると考えられる。in vivo においては、細胞の増殖に関して、促進的制御とともに抑制的制御が重要な役割を担っていると思われ、この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による抑制的制御は、特に、in vivo での morphogenesis などの過程で重要な役割を担っているものと思われる。

以上のように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞増殖制御、特に抑制的制御は、細胞の癌化、老化現象の解明にもつながる重要な問題を提起しているように思われる。今後は、今回見出した現象を、さらに分子レベルで理解することを目指し、細胞の増殖、癌化、老化の接点をもとめて研究を続けていきたいと考えている。

## 材料および方法

### (1) 試薬類

#### 1) 培地

RPMI1640、Eagle's MEM、Dulbecco's modified MEM、Hanks'液はすべて日水製薬、bovine serum albumin (BSA)(essentially fatty acid-free prepared from Fraction V albumin) は Sigma Chemical Co. より購入し、通常、これらの培地に 10% になるように fetal bovine serum、或いは、0.1% になるように BSAを加えて使用した。

#### 2) Fetal bovine serum

Gibco 社より購入した。

#### 3) Isotope 化合物

[methyl-<sup>3</sup>H]thymidine(86 Ci/mmole)、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP(3000 Ci/mmole)、<sup>32</sup>P]orthophosphate(65 mCi/ml)は Amersham より、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP(3000 Ci/mmole)、<sup>14</sup>C]chloramphenicol(60 mCi/mmole)、は New England Nuclear 社より購入した。

#### 4) 試薬

以下の試薬は、それぞれつぎのところより購入した。

#### 増殖因子類

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| OAG            | Serdary Research Lab.    |
| PDD            | Sigma Chemical Co.       |
| TPA            | 同上                       |
| concanavalin A | E. Y. Laboratories, Inc. |

|                               |                              |
|-------------------------------|------------------------------|
| insulin                       | Sigma Chemical Co.           |
| PDGF                          | Takara Biomedicals           |
| EGF                           | 同上                           |
| TGF $\beta$                   | アース製薬                        |
| serum **                      | Collaborative Research, Inc. |
| dBtcAMP                       | 第一化学薬品                       |
| A <sub>2</sub> 3187           | Sigma Chemical Co.           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Mitsubishi Gas Co.           |

Protein kinase inhibitors

|       |                           |
|-------|---------------------------|
| H - 7 | Seikagaku kogyo Co., Ltd. |
| H - 9 | 同上                        |
| W - 7 | 同上                        |

活性酸素消去剤

|           |                      |
|-----------|----------------------|
| SOD       | Ube Industries, Ltd. |
| catalase  | Sigma Chemical Co.   |
| mannitol  | 和光純薬                 |
| BHA       | Sigma Chemical Co.   |
| vitamin E | 同上                   |

蛍光試薬

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| lucigenin | Sigma Chemical Co.       |
| BCECF     | HSC Research Development |

その他

|          |                    |
|----------|--------------------|
| xanthine | Sigma Chemical Co. |
|----------|--------------------|

|                  |                                   |
|------------------|-----------------------------------|
| xanthine oxidase | 同上                                |
| amiloride        | 同上                                |
| allopurinol      | 同上                                |
| acetyl - CoA     | Pharmacia LKB Biotechnology, Inc. |
| Sephadex G - 200 | 同上                                |

〔2〕 細胞

1) U937

RPMI1640 に fetal bovine serum を 10% になるように添加した培地中で、suspension の状態で培養し、3~4 日おきに 10 倍に希釈した。

2) mouse thymocyte

Balb/c マウスより胸腺を取り出し、細かくちぎった後、Hanks' 液で洗浄して得られた細胞を thymocyte として用いた。

3) Balb/3T3

Eagle's MEM に fetal bovine serum を 10% になるように添加した培地中で培養し、3~4 日おきに 3 倍になるように subculture した。

4) JHU-1

Balb/3T3 と同様にして培養した。

5) MC3T3

Dulbecco's modified MEM に fetal bovine serum を 10% になるように添加した培地中で培養し、3~4 日おきに 3 倍になるように subculture した。

6) H-2、K-1、K-4

Kirsten murine sarcoma virus(MSV) clone 4E (K-1、k-4の場合) 或いは、Harvey-MSV clone H1 (H-2) のプラスミドを Ca-phosphate 法で MC3T3 細胞に導入し、5 週間後に、morphologically transformed foci を clone 化してこれらの細胞を得た。培養は、MC3T3 と同様の条件で行った。

## 7) ROS

MC3T3 と同様にして培養した。

### 〔3〕 chemiluminescence の測定

細胞を  $5 \times 10^5$  cells/ml の密度になるように Hanks' 液 (10 mM Hepes pH 7.4) に懸濁し、lucigenin (100  $\mu$ g/ml) を加えて、37°C で、Berthold Biolumat LB9505 にて測定した。阻害剤を加える場合は、阻害剤を加えて 10 min 間放置後、刺激剤を加えた。

### 〔4〕 細胞内 pH ( $pH_i$ ) の測定

細胞を  $3 \times 10^5$  cells/ml の密度になるように Hanks' 液 (10 mM Hepes pH 7.4) に懸濁し、0.5  $\mu$ M の BCECF を加えて 32°C で 30 min 放置して、細胞内に BCECF を取り込ませた。その後、細胞を洗浄して同量の Hanks' 液に懸濁してストックとした。測定に際しては、ストックより、そのつど 1 ml 取り出して遠心後、再び 1 ml の Hanks' 液に懸濁して用いた。蛍光の測定は、37°C で、FP-770 spectrofluorometer、Jasco、Japan を用い、波長 506 nm で励起し、530 nm の発光を測定した。阻害剤を加える場合は、阻害剤を加えて 10 min 間放置後、刺激剤を加えた。

### 〔5〕 培地中の $H_2O_2$ 濃度の測定

測定は、Zaitu & Ohkura らの方法に準じた<sup>34)</sup>。培地 (phenol red 不含) 2 ml を Tris-HCl で pH 8.5 に合わせた後、HPPA を 5 mM、さらに horse radish peroxidase を 1 unit を加えて、5 min 間室温で反応させ、320 nm で励起したときの 404 nm の蛍光を測定した。 $H_2O_2$  濃度 (0.2  $\mu$ M ~ 10  $\mu$ M) と蛍光強度の間には、直線関係が成り立った。

### 〔6〕 $^3H$ -Thd の取り込みの測定

培地に  $^3H$ -Thd を加えて培養後、細胞を phosphate-buffered saline で洗浄して集め、冷 5% trichloroacetic acid を加えて超音波で細胞を破壊した。30 min 放置して、沈澱を glass filter (Whatmann, GF/C) 上に集め、液体シンチレーションカウンターで、沈澱中の  $^3H$  のカウントを測定した。

#### 〔7〕 Labeling index の測定

カバーガラス上で細胞を培養し、培地に  $^3\text{H}$ -Thd を加えて培養を続けた後、細胞を phosphate-buffered saline で洗浄し、カルノア液 (ethanol:AcOH, 3:1) で細胞を固定した。その後、カバーガラスを冷 5% trichloroacetic acid で 15 min 間、3 回処理、脱イオン水で洗浄後、オートラジオグラフィ用エマルジョン (Sakura, NR-M2) でコートした。6~10 日間暗所で感光させたのち現像、Giemsa 液で染色し、100 個以上の grain 数を示した核の数をかぞえた。

#### 〔8〕 Cytofluorometry による細胞周期の解析

細胞をトリプシン処理してはがして集め、70% methanol で 30 min 処理して固定した。ついで、0.18 M NaCl を含む 0.18 M Tris (pH 7.5) に細胞を懸濁し、RNase 処理して 0.25 % Triton X-100 を加えた後、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の propidium iodide を加えて細胞内の DNA を染色した。そして、蛍光を flow cytometer (Spectrum III, Ortho Diagnostic System) で測定した。

#### 〔9〕 Northern blot analysis の方法<sup>79)</sup>

細胞から total RNA を guanidium thiocyanate/hot phenol 法で抽出し、抽出した RNA をホルマリンゲル中で電気泳動後、ナイロン膜上に transfer し、nick translation 法で  $^{32}\text{P}$ -ラベルしたプローブと hybridization を行った。hybridization の条件は、50% formamide、5 $\times$ SSPE (0.9 M NaCl, 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HP0}_4$ , 5 mM EDTA, pH 7.7)、1 $\times$  Denhardt 液、denatured salmon testis DNA 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1% SDS 中で、42°C 36 hr である。その後、フィルターを洗浄し、X 線フィルムにて放射線強度を detect した。洗浄の条件は、0.1% SDS を含む 2 $\times$ SSC 中、室温で 5 min 間 3 回、その後 0.1% SDS を含む 0.2 $\times$ SSC 中、45°C 1 hr 3 回である。

#### 〔10〕 二次元電気泳動法<sup>79)</sup>

ラベルした細胞を冷 phosphate-buffered saline で洗浄して集め、9.5 M urea、2%

CHAPS(Sigma Chemical Co.)、5% ampholine(Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.)、71 mM dithiothreitol(Wako Pure Chemical Industries, Ltd)、1 mM sodium orthovanadate 中で可溶化した。その後、9.5 M urea、pH 3.5~10 の ampholyte 中、7000 V.h で isoelectric focusing を行い、続いて 12% の SDS-polyacrylamide ゲル中で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを 50% methanol/12% AcOH で固定し、乾燥して X 線フィルムにて放射線強度を detect した。

#### [ 1 1 ] Peptide mapping<sup>7,71)</sup>

二次元電気泳動後のゲルを固定、Coomassie で染色した後、spot の部分を切り取り、digestion buffer(0.125 M Tris-HCl、pH 6.8、0.1% SDS、1 mM EDTA) 中に 30 min 浸した後、ゲルの well の底に挿入し、V8 protease、20% glycerol を含む digestion buffer を上からかぶせて 15 min おく。その後、50~70 V で bromphenol blue dye が stacking gel の下端にくるまで一旦泳動した後、1.5 hr 電源を切って静置し、その後引き続き 220 V で泳動した。泳動後のゲルは [ 1 0 ] に記したのと同様に処理した。

#### [ 1 2 ] <sup>125</sup>I-TGF β binding assay

##### 1) Radioiodination of TGF β

Bolton and Hunter reagent を用い、彼らの方法に従ってヨード化を行った<sup>7,81)</sup>。

##### 2) Binding assay<sup>79, 80)</sup>

60 mm dish に培養した細胞を、Binding buffer(DMEM + 0.1% BSA、0.1% NaHCO<sub>3</sub>) で 2 回洗浄した後、<sup>125</sup>I-TGF β と種々の濃度の cold の competitor を含んだ Binding buffer を 2 ml 加えて、5% CO<sub>2</sub>、37°C で 1 hr incubation した。その後、冷 Wash buffer (Hanks' 液 + 0.1% BSA) で 3 回洗浄し、0.25% trypsin で細胞をはがして集め、<sup>125</sup>I のカウントを gamma counter で測定した。<sup>125</sup>I-TGF β の細胞への非特異的吸着は 100 倍の cold の TGF β を加えて測定した。



### 〔13〕 Nuclear run-on transcription assay

Greenberg and Ziff らの方法に従って行った<sup>81)</sup>。細胞を Dounce homogenizer で TMD buffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dithiothreitol) + 0.25 M sucrose, 0.1% Triton X-100 中で破砕し、核を 0.5 M sucrose を含む TMD buffer 中 1500 g で 10 min 遠心しておとし、40% glycerol, 0.1 mM ethylenediamide tetraacetic acid を含む TMD buffer 中に  $5 \times 10^8$  nuclei/ml になるように懸濁した。200  $\mu$ l の反応液 (12.5 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 各々 4 mM の ATP, GTP, CTP, 0.16 M KCl, 0.5 mM spermidine, 100  $\mu$  Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (3000 Ci/mmmole)) と核懸濁液 200  $\mu$ l を混ぜて 30°C で 20 min 反応させた後、反応を 4 M guanidium thiocyanate 液を加えて停止し、転写産物を hot phenol 法にて抽出した。抽出した転写産物を 0.2 M NaOH で 5 min 氷上で処理し、0.5 M Hepes, pH 7.0 で中和した後、予め、アルカリで処理し、ナイロン膜上に固定しておいたプローブと 68°C で 48 hr 間 hybridize させた。その後、filter は〔9〕に記したのと同様に処理した。

### 〔14〕 CAT assay

細胞を 100 mm dish あたり  $3 \times 10^8$  の密度でまき、24 hr 後に Ca-phosphate 法で、plasmid を導入した。生じた沈澱を 6 hr 後に除き、20% dimethylsulfoxide で細胞を処理し、24 hr 培養を続けた。その後、刺激剤を加え、48 hr たってから cell lysate を Gorman らの方法により調整し<sup>82)</sup>、0.15 M Tris/HCl, pH 7.6 中、0.5  $\mu$  Ci [<sup>14</sup>C] chloramphenicol, 1 mM acetyl-CoA と 37°C で 1 hr 反応させた。その後、ethyl acetate で抽出して薄層クロマトグラフィーで展開し、chloramphenicol acetyltransferase の活性を測定した。

### 〔15〕 catalase のゲル濾過による分画

Sigma Chemical Co. 社より購入した twice-crystallized beef liver catalase を、20倍の 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 に溶かし、40% w/v の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて、沈澱を集め、2 ml の 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 に溶かして、ゲル濾過した。カラムは

Bio-Rad の Econo-Column、 $1.5 \times 75$  cm に Sephadex G-200 を充填したものを、流速  $2 \text{ ml/cm}^2/\text{hr}$  で  $0.01 \text{ M}$  phosphate buffer、pH 7.0 で elute させ、75 drops ずつ集めて、各 fraction とした。

〔16〕 catalase の酵素活性の測定

$0.02 \text{ M H}_2\text{O}_2$  を含む  $0.01 \text{ M}$  phosphate buffer、pH 7.0 に、適当に希釈した catalase 溶液を加えて、240 nm の吸光度の減少を測定した。

### 参考文献

- 1) Davies, K.J.A. : Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 262, 9895-9901, 1987.
- 2) Kellogg, E.W. and Fridovich, I. : Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 250, 8812-8871, 1975.
- 3) Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Halsey, W.A.Jr., Schraufstatter, I.V., Sauerheber, R.D., Spragg, R.G., Jackson, J.H., and Cochrane, C.G. : Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. *J. Biol. Chem.*, 263, 1665-1675, 1988.
- 4) Sies, H. (ed.): Oxidative stress. Academic Press: London, 1985.
- 5) Cerutti, P.A. : Oxidant tumor promoters. Growth factors, tumor promoters, and cancer genes, 239-247, 1988.
- 6) Foerder, C.A., Klebanoff, S.J., and Shapiro, B.M. : Hydrogen peroxide production, chemiluminescence, and the respiratory burst of fertilization; interrelated events in early sea urchin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3183-3187, 1978.
- 7) Corvilain, B., Sande, J., and Dumont, J.E. : Inhibition by iodide of iodide binding to proteins; the "Wolef-Chaikoff" effect is caused by inhibition of  $H_2O_2$  generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 1287-1292, 1988.
- 8) Elory-Stein, O., and Groner, Y. : Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase-implication for gene dosage effects in Down syndrome. *Cell*, 52, 259-267, 1988.
- 9) Mukhwejee, S.P., Land, R.H., and Lynn, W.S. : Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl

- reagents. *Biochem. Pharmac.*, 27, 2589-2594, 1978.
- 10) May, J.M., and De Haen, C.: The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 254, 9017-9021, 1979.
- 11) Friedman, J., and Cerutti, P.: The induction of ornithine decarboxylase by phorbol 12-myristate 13-acetate or by serum is inhibited by antioxidants. *Carcinogenesis*, 4, 1425-1427, 1983.
- 12) Kensler, T.W., Bush, D.M., and Kozumbo, W.J.: Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. *Science*, 221, 75-77, 1983
- 13) Harrison, J.R., Rillema, D.P., and Ham IV, J.H., and Sando, J.J.: Inhibition of phorbol ester stimulated interleukin 2 production by copper(II) complexes. *Cancer Res.*, 46, 5571-5575, 1986.
- 14) 中野稔、浅田浩二、大柳善彦: 活性酸素、p 2744-2755、蛋白質核酸酵素、1988.
- 15) Besterman, J.M., and Cuatrecasas, P.: Phorbol esters rapidly stimulate amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in human leukemia cell line. *J. Cell Biol.*, 99, 340-343, 1984.
- 16) Hesketh, T.R., Moore, J.P., Morris, J.D.H., Taylor, M.V., Rogers, J., Smith, G.A., and Metcalfe, J.C.: Common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature*, 313, 481-484, 1985.
- 17) Cassel, D., Rothenberg, P., Zhuang, Y.X., Deuel, T.F., and Glaser, L.C.: Platelet-derived growth factor stimulates  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and induces cytoplasmic alkalinization in NR6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6224-6228, 1983.
- 18) L'Allemain, G., Franchi, A., Cragoe, E. jr., and Pouyssegur, J.: Blockade of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 259, 4313-4319, 1984.
- 19) L'Allemain, G., Paris, S., and Pouyssegur, J.: Growth factor action and

- intracellular pH regulation in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 259, 5809-5815, 1948.
- 20) Mills, G.B., Cragoe, E.J. II Jr., Gelfand, E.W., and Grinstein, S.: Interleukin 2 induces a rapid increase in intracellular pH through activation of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. *J. Biol. Chem.*, 260, 12500-12507, 1985.
- 21) Moolenaar, W.H.: Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu. Rev. Physiol.*, 48, 363-376, 1986.
- 22) Moolenaar, W.H., Tsien, R. Y., Van Der Saag, P.T., and De Laat, S.W.:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and cytoplasmic pH in the activation of growth factors in human fibroblasts. *Nature*, 304, 645-648, 1983.
- 23) Rothenberg, P., Glaser, L., Schlesinger, P., and Cassel, D.: Activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange by epidermal growth factor elevates intracellular pH in A431 cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 12644-12653, 1983.
- 24) Schuldinger, S., and Rozengurt, E.:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in Swiss 3T3 cells; Mitogenic stimulation leads to cytoplasmic alkalinization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7778-7782, 1982.
- 25) Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S.: A specific mutation abolishing  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4833-4837, 1984.
- 26) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308, 693-698, 1984.
- 27) Rink, T.J., Tsien, R.Y., and Pozzan, T.: Cytoplasmic pH and free  $\text{Mg}^{2+}$  in lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 95, 189-196, 1982.
- 28) Thomas, J.A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A., and Racker, E.: Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*, 18, 2210-2218, 1978.

- 29) Cerutti, P.S. : Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227, 375-381, 1985.
- 30) Fischer, S.M., and Adams, L.M. : Suppression of tumor promoter-induced chemiluminescence in mouse epidermal cells by several inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Cancer Res.*, 45, 3131-3136, 1985.
- 31) Bonser, R.W., Dawson, J., Thompson, N.T., Hodson, H.F., and Garland, L.G. : Inhibition of phorbol ester stimulated superoxide production by 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol(OAG); fact of artifact? *FEBS Lett.*, 209, 134-138, 1986.
- 32) Nilsson, K., Andersson, L.C., Gahmberg, C.G., and Forsbeck, K. : Differentiation in vitro of human leukemia and lymphoma cell lines. In: B. Serrou and C. Rosenfeld (eds.), *International Symposium on New Trends in Human Immunology and Cancer Immunotherapy*, pp271-282, Paris: Doin Editeurs, 1980.
- 33) Otte, A.P., Run, P., Heideveld, M., Driel, R., and Durston, A.J. : Neural induction is mediated by cross-talk between the protein kinase C and cyclic AMP pathways. *Cell*, 58, 641-648, 1989.
- 34) Zaitso, K., and Ohkura, Y. : New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Anal. Biochem.*, 109, 109-113, 1980.
- 35) Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., and Sporn, M.B. : TGF $\beta$  transforming growth factor; A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 119-123, 1985.
- 36) Centrella, M., McCarthy, T.L., and Canalis, E. : Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.*, 262, 2869-2874, 1987.
- 37) Imlay, J.A., Chin, S.M., and Linn, C.S. : Toxic DNA damage by hydrogen

- peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240, 640-642, 1988.
- 38) Filho, A.C.M., Hoffmann, M.E., and Meneghini, R.: Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.*, 218, 273-275, 1984.
- 39) Rozengrut, E.: Early signals in the mitogenic response. *Science*, 234, 161-166, 1986.
- 40) Scher, C.D., Shepard, R.C., Antoniades, H., and Stiles, C.D.: Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 560, 217-241, 1979.
- 41) Cochran, B.H., Zullo, J., Verma, I.M., and Stiles, C.D.: Expression of the c-fos gene and of a fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, 226, 1080-1082, 1984.
- 42) Greenberg, M.Z., and Ziff, J.B.: Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311, 433-437, 1984.
- 43) Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T., and Verma, I.M.: Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature*, 312, 711-716, 1984.
- 44) Muller, R., Bravo, R., Buckhandt, J., and Curran T.: Induction of c-fos gene and proteins by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, 312, 716-720, 1984.
- 45) Zullo, J.N., Cochran, B.H., Huang, A.S., and Stiles, C.D.: Platelet-derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell*, 43, 793-800, 1985.
- 46) Cochran, B.H., Reffel, A.C., and Stiles, C.D.: Molecular cloning of gene sequence regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*, 33, 939-947, 1983.

- 47) Hunter, T., Angle, P., Boyle, W.J., Chiu, R., Freed, E., Gould, K.L., Isacke, C.M., Karin, M., Lindberg, R.A., and Van der Geer, P.: Targets for signal-transducing protein kinase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 53, 131-142, 1988.
- 48) Chida, k., Hashiba, H., Sasaki, K., and Kuroki, T.: Activation of protein kinase C and specific phosphorylation of a Mr 90,000 membrane protein of promotable BALB/3T3 and C3H/10T1/2 cells by tumor promoters. *Cancer Res.*, 46, 1055-1062, 1986
- 49) Rozengurt, E., Rodriguez-Pena, M., and Smith, K.A.: Phorbol esters, phospholipase C, and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7244-7248, 1983.
- 50) Kawahara, R.S., and Thomas, F.D.: Platelet-derived growth factor-inducible gene JE is a member of a family of small inducible genes related to platelet factor 4. *J. Biol. Chem.*, 264, 679-682, 1989.
- 51) Rollins, B.J., and Morrison, E.D., and Stiles, C.D.: Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3738-3742, 1988.
- 52) Kohno, M.: Diverse mitogenic agents induce rapid phosphorylation of a common set of cellular proteins at tyrosine in quiescent mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 1771-1779, 1985.
- 53) Chamberd, J.C., and Franchi, A., Le Cam, A., and Pouyssegur, J.: Growth factor-stimulated protein phosphorylation in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-arrested fibroblast. Two distinct classes of growth factors with potentiating effects. *J. Biol. Chem.*, 258, 1706-1713, 1983.
- 54) Larsson, R., and Cerutti, P.: Oxidant induce phosphorylation of ribosomal



- protein S6. *J. Biol. Chem.*, 263, 17452-17458, 1988.
- 55) Sporn, M.B., and Roberts, A.B., Wakefield, L.M., and Crombrugge, B.: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-Beta. *J. Cell Biol.*, 105, 1039-1045, 1987.
- 56) Massague, J.: The TGF- $\beta$  family of growth and differentiation factors. *Cell*, 49, 437-438, 1987.
- 57) Curran, T., and Franza, R. Jr.: Fos and Jun; The AP-1 connection. *Cell*, 55, 395-397, 1988.
- 58) Goustin, A.S., Leof, E.B., Shibly, G.D., and Moses, H.L.: Growth factors and cancer. *Cancer Res.*, 46, 1015-1029, 1986.
- 58) Pardee, A.B.: G<sub>1</sub> events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246, 603-608, 1989.
- 60) Hyslop, P., Hinshaw, D.B., Schraufstatter, I.U., Sklar, L.A., Spragg, R.G., and Cochrane, C.G.: Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D<sub>1</sub> cells. *J. Cell. Physiol.*, 129, 356-366, 1986.
- 61) Howe, P.H., and Leof, E.B.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 treatment of AKR-2B cells is coupled through a pertussis-toxin-sensitive G-protein(s). *Biochem. J.*, 261, 879-886, 1989.
- 62) Howe, P.H., Bascom, C.C., Cunningham, M.R., and Leof, E.B.: Regulation of transforming growth  $\beta$ 1 action by multiple transducing pathways; Evidence for both G protein-dependent and -independent signaling. *Cancer Res.*, 49, 6024-6031, 1989.
- 63) Dixit, V.M., Marks, R.M., Sarma, V., and Prochownik, E.V.: The antimutagenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription. *J. Biol. Chem.*, 264, 16905-16909, 1989.
- 64) Green, M.R.: When the products of oncogene and anti-oncogene meet. *Cell*, 56

1-3, 1989.

- 65) Knudson, A.G. Jr.: Hereditary cancer, oncogene, and antioncogenes. *Cancer Res.*, 45, 1437-1443, 1985.
- 66) Sager, R.: Genetic suppression of tumor formation; A new frontier in cancer research. *Cancer Res.*, 46, 1573-1580, 1986.
- 67) Fearon E.R., and Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767, 1990.
- 68) Huang, H.J.S., Yee, J.K., Shew, J.Y., Chen, P.L., Bookstein, R., Friedmann, T Lee, E.H.P., and Lee, W.H.: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science*, 242, 1563-1566, 1988.
- 69) Bos, J.L.: Ras oncogenes in human cancer; A review. *Cancer Res.*, 49, 4682-4689, 1989.
- 70) Dotto, G.P., and Parada, L.F., and Weinberg, R.A.: Specific growth response of ras-transformed embryo fibroblasts to tumor promoters. *Nature*, 318, 472-475, 1985.
- 71) Pardee, A.B.: A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1286-1290, 1974.
- 72) Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N., and Scher, C.D.: An ordered sequence of events is required before BALB/C-3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2839-2843, 1978.
- 73) Zetterberg, A., and Larsson, O.: Kinetic analysis of regulatory events in G<sub>1</sub> leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5365-5369, 1985.
- 74) Resnitzky, D., Yarden, A., Zipori, D., and Kimchi, A.: Autocrine  $\beta$ -related interferon controls c-myc suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation. *Cell*, 46, 31-40, 1986.

- 75)Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Jambrook, J. (eds.): A laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory; New York, 1982.
- 76)O' Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of  
proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007-4021, 1975.
- 77)Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.: Peptide  
mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by  
gel. J. Biol. Chem., 252, 1102-1196, 1977.
- 78)Bolton, A.E., and Hunter, W.M.: The labelling of proteins to high specific  
radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing acylating agent.  
Biochem. J., 133, 529-539, 1973.
- 79)Tucker, R.F., Branum, E.L., Shipley, G.D., Ryan, R.J., and Moses, H.L.:  
Specific binding to cultured cells of  $^{125}\text{I}$ -labeled type  $\beta$  transforming  
growth factor from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6757-  
6761, 1984.
- 80)Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M., and Sporn, M.B.:  
Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- $\beta$   
in normal rat  
kidney fibroblasts. J. Biol. Chem., 259, 10995-11000, 1984.
- 81)Greenberg, M.E., and Ziff, E.B.: Stimulation of 3T3 cells induces  
transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature, 311, 433-437, 1984.
- 82)Gorman, C.M., Moffat, L.F., and Howard, B.H.: Recombinant genomes which  
express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell.  
Biol., 2, 1044-1051, 1982.

## 謝 辞

本論文の研究は、東京大学医科学研究所 癌細胞学研究部 においてなされたもので、恵まれた研究の場と励ましと助言を与え続けてくださった黒木登志夫教授に深く感謝します。また、著者は、野瀬清助教授に生物学を基礎から御指導いただきました。先生の5年間にわたる御指導、御薫陶に深く感謝します。その間、許南浩助手、千田和広助手をはじめ、癌細胞学研究部に所属なされた皆様にも、励ましと多方面にわたる御指導、御助言をいただきました。どうもありがとうございました。

最後に、終始理解と協力を示してくれた柴沼敏郎氏に感謝します。

