

腹水肝癌 AH-130 細胞表面のルテニウム赤結合糖蛋白質とその生物作用

岡山大学医学部癌研生化学部 (指導: 小田琢三教授)

松 永 和 義

(昭和53年10月9日受稿)

諸 言

癌細胞の生物学的特性は生体内で一定の環境下にありながら周囲の制御に支配されず、無制限に増殖することである。また細胞生物学的にみれば、細胞表面に何等かの変化が、多分遺伝子を介して起き、細胞相互の情報交換を失い、組織形成が乱れ、転移を起しやすく、また細胞の接触による増殖や運動の阻害が認められなくなるという特徴を持つと云える。細胞表面の生物学は現在尚その解析が進歩していないが、表面の持つ生物学的意味は数多く列挙することができる。例えば細胞相互の communication, 種々の物質に対する受容体の存在, 物質の選択的輸送, 細胞内外の情報交換, 細胞外敵に対する防禦作用等々¹⁾。従って、細胞表面の物質の解析はこれらの生物活性の生理機構の解析には極めて重要である。しかも現在比較的分析の進んでいる細胞表面の化学は殆ど赤血球で行なわれ、これをもって癌細胞表面を考察することは極めて困難である。私は細胞表面が酸性多糖体や糖蛋白でおおわれていて、それらは比較的ルテニウム赤で染色されやすく²⁾、その染色のされ方は組織培養細胞のビールスによる Transformation によっても著しく変化することや³⁾、癌細胞が特によく染色される事や⁴⁾、ある種の肝癌がルテニウム赤で凝集する事⁵⁾などから、癌細胞表面に存在するルテニウム赤結合物質が何であるかに興味を持ち、その物質の分析を試みることを計画した。即ち著者らは先に腹水肝癌細胞 AH-130 がルテニウム赤で特異的に凝集し、その凝集が細胞表面を極めて薄いパイン処理することによって失なわれる事を明らかにしたが、その際パイン処理によって遊離する可溶化成分(パパイネート)はルテニウム赤をよく結合し、ルテニウム赤による腹水肝癌細胞膜

の凝集をハプテン阻害することを明らかにした⁶⁾。さらにまたこのパパイネートの中には大別してルテニウム赤と結合する物質に2種類あり、その一つは酸性多糖体でヘパリチン硫酸様物質であることも同定した⁶⁾。しかし、今1つの糖蛋白質についてはなおその性質も明らかでなく、この糖蛋白質は現在数多くの細胞表面の生物活性に種々の役割を果しているものの1つとして特に癌化した細胞をよりよく染色することから、癌の性質解析に手がかりを与えるものと考え、この糖蛋白質の分析とその生物活性の解明をすることを目的としてこの研究を行った。

材料及び方法

材料

主として腹水肝癌 AH-130 を約 200g のドンリュウラットに移植し、移植後 7~9 日目の細胞を搾取し、生食で 7 回洗浄したものを用いた。この時洗浄にあたり混入している赤血球は低速遠心で洗浄するため、殆ど上清に止るため腹水肝癌細胞のみを分離することができる。

方法

① パパイネートの作り方

細胞表面蛋白質は 0.001% パパインで 0.15M NaCl-10mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液中に懸濁した細胞を 37°C, 15 分間処理したのち、直ちに冷却し 800×g にて遠心して上清を得る。これに 0.1mM パラクロマーキユーリーベンゾイト (PCMB) を溶かし、この上清を更に 10,000×g 30 分遠心し、得られた上清をポリエチレングリコール×6000 で濃縮する。濃縮したパパイン処理可溶化成分(パパイネート)は 30mM のグリシン緩衝液 pH 8.6 に対して透析し、得られたものをさらにポリエチレングリコール×6000 で濃縮し、グリシン緩衝液の少量に溶かし -20°C に

保持する¹⁾

② パパイネートの分画法

このようにして得られるパパイネートは1部を Sephadex G200 で分画し他の1部は0.75%の preparative disc gel electrophoresis (図1のように試作した泳動装置) で7.5%細孔ゲルおよび3.5%粗孔ゲルを用い30mM pH 8.6のグリシン緩衝液4℃で電気泳動した場合 \oplus 極に極めて速やかに泳動する糖蛋白質分画を回収する。すなわちこの preparative disc gel electrophoresis の装置はゲル相(A)と、その下部を一定の流速で流れる泳動用緩衝液相(B, D)と半透膜でしきられたこれも一定の流速をもつ \oplus 極用 KCl 溶液相(E)の三部分からなっている。泳動用試料は粗孔用ゲル上に重層し、その上槽(F)にさらに泳動用緩衝液を重層し \ominus 極をその上に挿入する(F)。 \oplus 極は図1に示すごとく、一定の流速をもつKCl溶液の流出部分に挿入する(E)。このような状態で半透膜上の泳動用緩衝液を一定の流速で流すとゲル中を移動して出て来る分画された蛋白質は、その緩衝液の流れに乗ってUV記録計の部分に流出し、それをFraction collectorに集めて分画採取することが出来る。この方法によって分画されたパターンを示すと、最も速やかに泳動する分画はかなりシャープなピークとして採取することが可能であり、本研究に必要な蛋白質部分の分画には極めて優れた方法として利用できる(図2)。また Sephadex G200 による分子篩は先の報告^{6,7)}と略同じ方法で行った。すなわち Sephadex G200 の2cm×70cmのカラムを用い、パパイネートの溶出は0.15M NaCl-10mM Tris-HCl pH7.4で溶出しフラクションコレクターで分取した。

③ ディスクゲル電気泳動による分析

クルードなパパイネートや Sephadex G200 で分画されたパパイネートあるいはgelで分画したパパイネートはさらにディスクゲル電気泳動した。そのゲル泳動物についてアミドブラックにより蛋白質を⁹⁾PAS染色により糖¹⁰⁾を、トルイジンブルーによるメタクロマジーから多糖を¹¹⁾染色し、更にそれらをルテニウムとの結合性について分析した。

④ SDS ディスクゲル電気泳動

プレパラティブディスクゲル電気泳動法で分画し濃縮した試料は1%メルカプトエタノール存在下1% SDS で1夜室温で可溶化し、0.1% SDS-10%ゲル中pH7.2のリン酸緩衝液中8mA/tubeで泳動し、泳動後クーマーシブルーで染色した。標準蛋白質

としてはチトクロームC(CYT), キモトリプシン(CHT), 牛血清アルブミン(BSA)を使用した⁹⁾

⑤ 糖蛋白質のアミノ酸および糖分析

ディスクゲルで分画された試料は6N HClで120℃, 6時間加水分解し日本電子自動アミノ酸分析装置JLC-6AHおよびJLC-DKインテグレーターで分析した¹²⁾試料はpH2.2のクエン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、2カラム法で分析した。なおこの分析は日本電子(株)の好意によった。糖は試料をメタノリスしたのち¹³⁾TMS-PZ(東京化成製)でTMS化

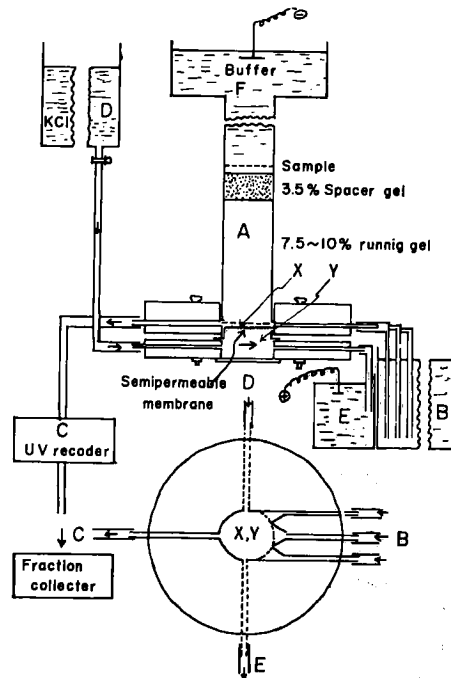


図1. 自作の分離用ディスクゲル電気泳動装置

A: 泳動用ゲル相(A)では、一般に7.5~10%の細孔ゲル8ml, 3.5%粗孔ゲル2mlよりなるゲル相を作り、試料はその上に重層し、さらにその上槽(F)に緩衝液を重層してFに \ominus 極を挿入する。

B: 泳動用電気緩衝液を満し、サイホンで三本の注入管からCに向かって一定の流速で流れ、Cで280nmの吸光度測定をしフラクションコレクターで分取する。これでX部分に泳動した蛋白質は常にCに向かって流れる。

C: Yの部分のスペースが小さいためDから常に一定の流速で電解液(KCl 0.5%)を流しEに挿入した \oplus 極の分極やY部分の発熱を防ぐようにしてある。

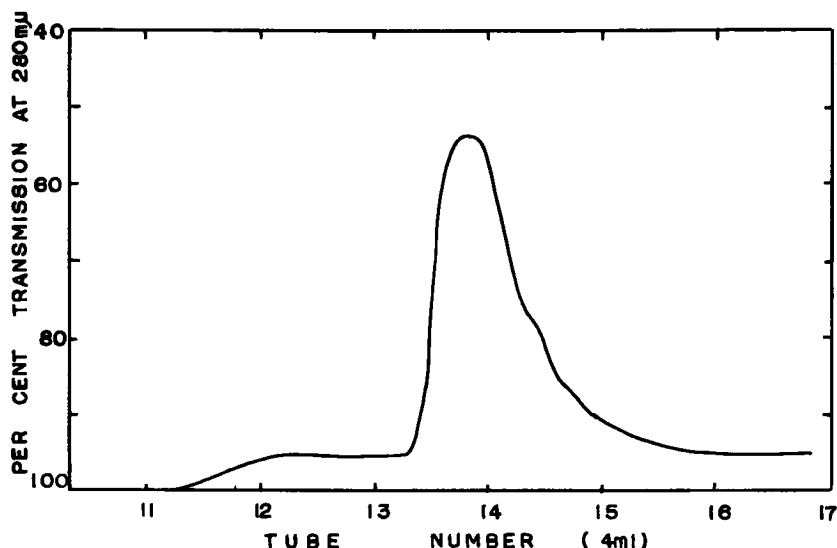


図2 図1の装置で泳動分取した AH-130 パパイネートの最も早く泳動される糖蛋白質の分離状態
泳動は 4℃で12mA 約12時間泳動したものである。

したものをガスクロマトグラフィーによって 1.5% シリコン SE-30 (カラム温度 125°~220℃, 4℃/min 昇温) を使って分析した。

⑥ ルテニウム赤の PHA によるリンパ球幼若化に対する作用

糖蛋白質の生物活性の一部を分析する目的でリンパ球の PHA による幼若化作用に対するルテニウム赤 (R, R) や、それによく似た生物作用を持つテオコバルチクロリド (Hexamine Cobalti-Chloride) や La^{3+} の作用を観察する目的で Saito 等の方法¹⁴⁾ によりモルモットリンパ球のミトゲン (インゲン豆 PHA) による幼若化に対するこれら薬物の作用を 3H -チミジンの取り込みから分析した。すなわちモルモット末梢血リンパ球を 10% の小牛血清を含む RPMI の medium 中に 10^6 /ml 入れ、これに 0.1~10 μ g/ml のルテニウム赤等試薬と 10 μ g/ml の PHA を添加し、5% 炭酸ガスインキュベーター中で 40 時間培養する。その後 3H -チミジン 0.5 μ Ci/ml を添加し、72 時間後の 3H -チミジンの取り込みから各薬物の阻害度を無添加コントロールに対する % で示した。

⑦ ルテニウム赤の腹水肝癌細胞呼吸に対する作用

糖蛋白質に親和性の強いルテニウム赤の生物作用を観察する目的で今 1 つそれらの AH-130 腹水肝癌細胞呼吸に対する作用をガルバニー電極¹⁵⁾ およびクラーク型オキシメーターで測定した。測定条件は

0.15M NaCl-10mM Tris-HCl 緩衝液 3ml, 37℃である。

このほか、本実験では種々の試薬はすべて試薬特級を使用した。

実験結果

1. 腹水肝癌細胞パパイネート中の糖蛋白質および酸性多糖体のディスクゲル電気泳動パターン

すでに発表したように AH-130 腹水肝癌細胞の細胞表面パパイネートは Sephadex G200 の分子篩により図 3 に示すような 3 つの分画に分けられる^{5,6,7)} この第 I の分画には主にヘパリチン硫酸様物質が、第 II の分画には糖蛋白質が、第 III の分画には低分子物質が分画され、第 I と第 II の分画にはルテニウム赤が結合する (図 3)。

7.5% ゲル pH 8.6 の緩衝液中におけるパパイネートの電気泳動像は、その蛋白質の分画 (total) を図 4 に示すように、泳動度の遅いものから極めて泳動度の早いものまで種々のものが含まれている。そして Sephadex G200 では先に述べたごとく主として 3 つの分画に分画されるが、初めのボイドボリウムの部分に溶出してくる分画 (分画 I) は主に分子量の大きい物質で電気泳動像では泳動速度のゆるやかなものが主体をなし、第 II の Hb の溶出と前後して溶出される分画 II は図 4 に示すように泳動速度の早

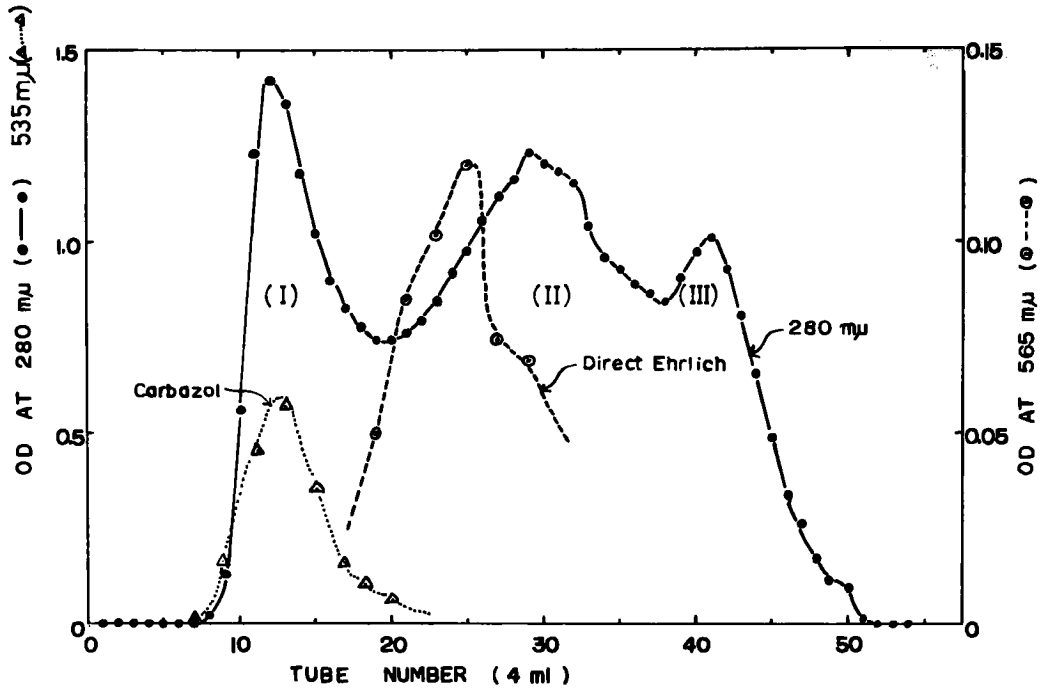


図3 AH-130腹水肝癌細胞を0.001%パパイネ処理して得られるパパイネートの Sephadex G200 による分子篩のパターン

分画Iには主に酸性多糖体(ヘパリン硫酸様物質)があり、カルバゾール反応が陽性でウロン酸の存在を示す。もちろんこの分画はルテニウム赤がよく結合する。分画IIには直接エールリッヒ反応陽性のシアル酸を持つ蛋白質が存在し、ここにもルテニウム赤がよく結合する。このほかこの分画にはいろいろの大きさの蛋白質がある。分画IIIには低分子物質特にヌクレオチドがかなり存在する。

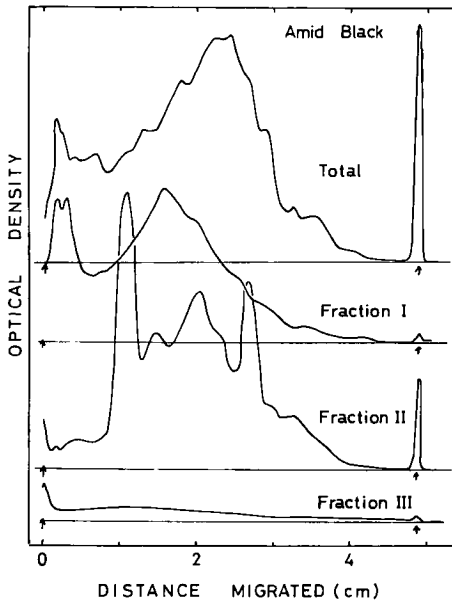


図4 AH-130 腹水肝癌細胞パパイネートのディスク電気泳動蛋白質パターン

パパイネート全体とそれらを Sephadex G200 で分画した各分画を 7.5%細孔ゲルと 3.5%粗孔ゲル中で 1 mA/tubeにてディスク電気泳動した蛋白質のアミドブラック染色をしたもののデンシトメトリーのパターンを示す。分画Iには主に泳動のゆるやかな蛋白質が、分画IIには非常に泳動度の大きいものかなり種々の蛋白質が含まれている。分画IIIには殆ど蛋白質は存在しない。

いものを含む種々の泳動度を持つ蛋白分画より成っている。そしてカラムポリウムに溶出する分画ではアミドブラックで染色される物質は極めて少ない(図4 分画III)。

このようなパパイネートを、全分画および Sephadex G200 で分けられる分画 I, II, III のディスクゲル泳動物を PAS で糖染色を行ってみると図5 のようである。すなわち PAS 陽性物質はほぼ4ヶ所に観察され、その中最も早く泳動する物質と中等度の泳動度を示す物質は主に分画IIに回収され、泳動度のおそい酸性多糖体と考えられるものを含む物質は分画Iに回収される。

これらのゲル泳動物をトルイジンブルーで染色し、その泳動度合や染色度から酸性多糖体や糖蛋白と見られる¹²⁾最も早い泳動と最も遅い泳動を示す2物質が染色されることが明らかにされた(図6)。従って Sephadex G200 によるパパイネートの分画によりトルイジンブルー可染の2物質は完全に分画され、ヘパリチン硫酸様物質を主体とする酸性多糖体は殆ど完全に分画Iの分画に回収され、糖蛋白は主に分画IIに回収される。またこの酸性ムコ多糖体はこの

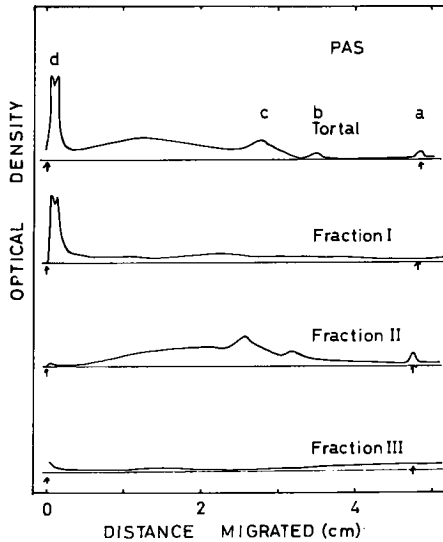


図5 AH-130 腹水肝癌細胞パパイネートのディスク電気泳動 PAS 陽性物質のパターン

図4と同じ物質について糖の検出をするため PAS 染色を行ったもので、PAS 陽性物質は4ヶ所に示される。即ち極めて早く泳動する a, 中等度の泳動速度を示す b, c, 及び殆ど泳動しない d である。a, b, c は殆ど分画IIに含まれ、d は分画Iに存在する。

ゲル泳動像から極めて分子量が大きく、現在知られている既知のヘパリチン硫酸とはかなり異なる物質と考えられる。また同じ様なゲル泳動物をルテニウム赤で染色すると、このトルイジンブルー染色にほぼ同様の染色像が観察され、パパイネートに関する限りルテニウム赤の染色がトルイジンブルー可染部、即ち酸性ムコ多糖及び特殊な糖蛋白を中心にした物質が染色されていることを示している。

2. 分離用ゲル電気泳動によるパパイネートの分画
ルテニウム赤可染の電気泳動度の早い物質を分析する目的で、自作の preparative disc gel 電気泳動装置を用い、pH8.6 のグリシン緩衝液中で泳動し分画される物質は SDS ディスク中で電気泳動し

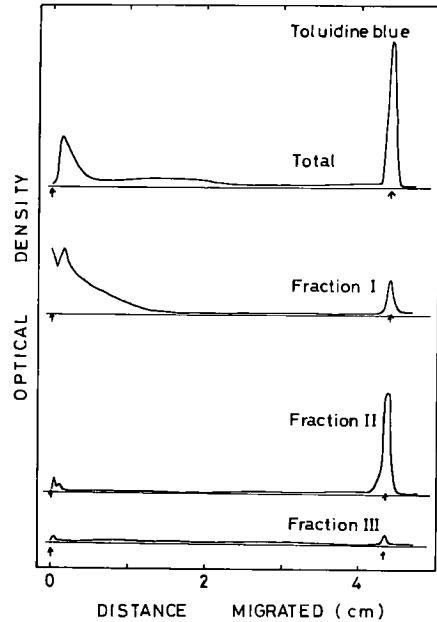


図6 AH-130 の腹水肝癌細胞パパイネートのディスク電気泳動トルイジン青可染物質のパターン

図4と同じ物をトルイジン青で染色し、その可染性やメタクロマジーから酸性多糖体の存在を知ることが目的とするが、この図では2つの物質が染色されている。即ち、1つは図5のaであり、他は図5のdである。しかもこれで染色される物質はルテニウム赤によっても全く同じ様に染色される。以上のことは図5のaは酸性糖を大量に含む糖蛋白が主体を成し、dはヘパリチン硫酸が主体を成す事を示唆する。又dに関しては同じ様な酸性多糖体のコンドロイチン硫酸をディスクゲル電気泳動してもほぼ同様の泳動像を示すことからこれがヘパリチン硫酸様物質を示すことはほぼ間違いない。

た場合 BSA よりやゝゆるやかな泳動度を示し、それがかなり巨大分子（分子量約7万）であることがうかがえる（図7）。この物質を加水分解してアミノ酸組成を調べてみると表Iのように、その組成は酸性アミノ酸が多く、特に特徴的なのは芳香族アミノ酸が少ないことである。また現在多くの Ca^{2+} 結合蛋白質が色々の細胞組成から分離され、それらのアミノ酸組成には極めて類似したものがあるが¹²⁾ここで得られた糖蛋白質のアミノ酸組成はそれら Ca^{2+} 結合蛋白質のそれと極めてよく似ている。またこの糖蛋白質の糖部分を TMS 化し、ガスクロマトグラフィーで分析してみると図8のごとくである。この糖の中にはフコース、ガラクトース、ガラクトサミン、グルコサミン、シアル酸が含まれているがマンノースが含まれていない。しかしこの含有組成はなお実験条件で一定した値を得るにいたっていないので、マンノース含有の有無については確かでない。

3. モルモットリンパ球の PHA による幼若化に対するルテニウム赤、ルテオコバルチクロリドの影響

末梢血リンパ球は PHA 処理により非特異的に幼

若化を起し、DNA合成さらに細胞分裂が誘起される。図9はモルモット末梢血リンパ球の PHA による幼若化に対するルテニウム赤やそれと同じ作用を持つと考えられている Luteo-Cobalti-Chloride¹⁶⁾ の作用を示したものであるが、何れも高濃度において幼若化作用が阻害される。ルテニウム赤はリンパ球のうち特に胸腺由来のリンパ球を特異的によく染色し脾細胞に比較して胸腺細胞がはるかに厚く染色されることが明らかにされている¹⁷⁾しかも PHA の幼若化は T-cell のみを幼若化することが知られている¹⁸⁾従ってもし細胞表面をペパイン処理すればルテニウム赤の結合は消失し、PHA の作用が消失するの否か、あるいは PHA の作用がペパイン処理でどのようになるのか興味ある問題が残されている。

4. 細胞呼吸に対するルテニウム赤の作用

D. Romeo ら¹⁹⁾により細胞表面蛋白質に結合する ConA が細胞の糖代謝の調節に変化を与え、ConA により polymorph の白血球、マクロファージの HMP shant の糖代謝を促進することが明らかにされ、細胞表面の修飾がどのようにして細胞内エネルギー代謝を変えるか、そのメカニズムに興味を持たれた。

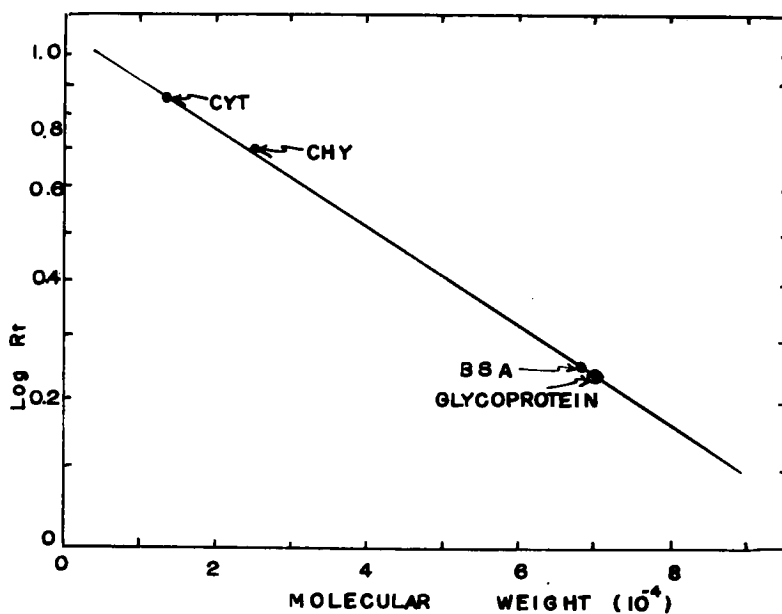


図7 AH-130 腹水肝癌細胞表面ペパイン処理中の泳動度の最も早い糖蛋白質の SDS ディスクゲル電気泳動度

糖蛋白質であるため SDS ディスクゲル電気泳動度から直接分子量は測定できないが、この糖蛋白質はかなり大きい物質であることを示す。CYT: チトクロームc, CHY: キモトリプシン, BSA: 牛血清アルブミン

Carbohydrates and amino acids in a glyco-protein isolated from AH-130 ascites hepatoma cell surface

Substance	μg/mg protein
Hexosamine	50-110
Sialic acid	58-60
Lys	95.2
His	48.5
Arg	25.0
Asp	163.0
Thr	51.3
Ser	46.9
Glu	250.0
Pro	27.2
Gly	87.0
Ala	48.0
Val	51.7
Met	6.1
Ileu	25.6
Leu	45.1
Phe	29.6

表1 AH-130 腹水肝癌細胞表面パパイネート中の電気泳動度の最も早い糖蛋白質のアミノ酸組成

糖蛋白質を加水分解してアミノ酸アナライザーで分析した値をμg/mg蛋白質で示した。この糖蛋白質のアミノ酸組成は、現在多くの組織から分離されているCa²⁺結合蛋白質のアミノ酸組成に極めて類似し、特に酸性アミノ酸を多く含むことや芳香族アミノ酸の少ないことが特徴的である。

癌細胞は特にConAでよく凝集するので同じような糖代謝の変動が予期される。これと同じことはルテニウム赤でも考えられルテニウム赤のAH-130腹水肝癌細胞の呼吸活性に対する作用を観察すると図10のごとくルテニウム赤の微量により呼吸活性がむしろ促進された。この促進はグルコースの存在するとしないうに無関係であるが、パパイン処理細胞ではルテニウム赤の作用は著しく低下し、ルテニウム赤の結合が細胞呼吸活性を上げていることは明らかなようである。しかしその細胞呼吸促進機構については更に今後の研究が待たれる。

考 察

緒言にも述べた如く癌細胞のPhenotypic expressionとして最も特徴ある性質は細胞膜或は細胞

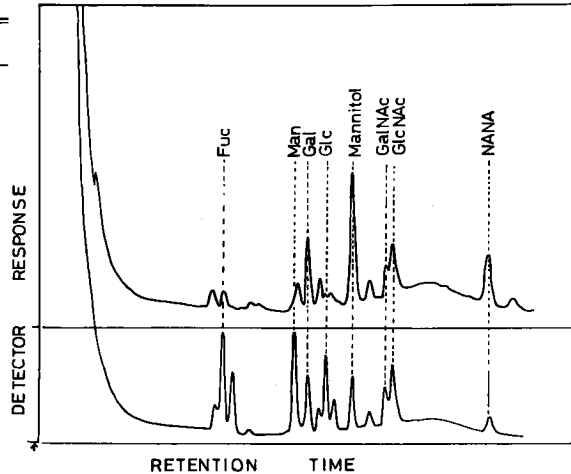


図8. AH-130 腹水肝癌細胞表面パパイネート中の電気泳動度の最も早い糖蛋白質の糖組成

この糖蛋白質の糖組成はGal, GalNAc, GlcNAc, NANAを含み、特徴的なことはManがないことであるが、実験分離条件で少しずつパターンが変化し定量化するにはなお問題がある。

表面の性質の変化である。この性質を解析するには現在極めて多くの方法が用いられているが、著者らは先に細胞表面の酸性多糖体とよく結合する事で知られているルテニウム赤が腹水肝癌細胞(AH-130)を特異的に凝集し、それが細胞表面のルテニウム赤結合性ヘパリン硫酸様物質とある種の糖蛋白質であることを明らかにしたが、⁶⁾本研究から癌細胞表面パパイネート中の糖蛋白質は分子篩ではヘモグロビンと前後して溶出し、この蛋白質はPAS陽性、トリインブルーでメタクロマジーを示す物質で、しかもルテニウム赤で染色されるかなり特異な物質であり、これが細胞表面のルテニウム赤可染物質の今1つの物質である。しかもこの糖蛋白質は電気泳動ではpH8.6の中で最も早く泳動する物質で、それを構成するアミノ酸はかなりの酸性アミノ酸を持ち、ヘキソサミンとシアル酸を大量に含有する。この種の糖蛋白質として知られているものに種々の組織から分離されたCa²⁺結合蛋白質がある。^{12,20,21)}しかも非常に共通して構成アミノ酸の組成が互に極めて類似し、この糖蛋白質もCa²⁺結合性の可能性が示唆される。一般にルテニウム赤はミトコンドリア^{22,23,24)}やサル

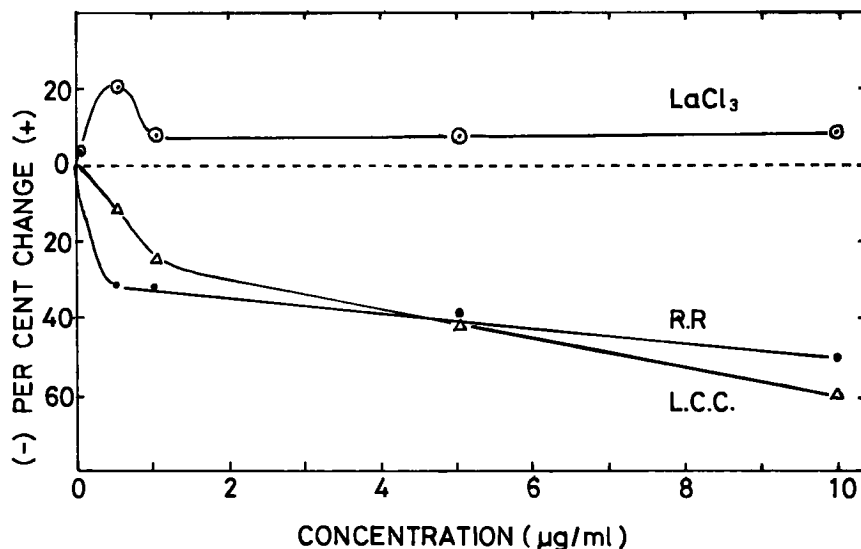


図9 ルテニウム赤, ルテオコバルチクロリド, La^{2+} のモルモットリンパ球のPHAによる幼若化に対する作用

縦軸はPHA添加により促進(+)あるいは阻害(-)された ^3H -チミジンの取込に対する種々薬物添加に伴う変化の百分率を示す。横軸は添加薬物の濃度を示す。PHAはモルモットリンパ球に対して強い幼若化作用を示すが、ルテニウム赤 (R, R) やルテオコバルチクロリド (L. C. C.) はその幼若化作用を阻害する。しかしその阻害はこれら薬物の濃度を上げて、それ以上あまり阻害度が高くない。これはPHAのリンパ球幼若化に Ca^{2+} の要求性が示されているが、完全に Ca^{2+} のない状態でもかなりの ^3H -チミジンの取込みが残っているのに対比して何か Ca^{2+} 結合と関係があることが示唆される。

コプラズミックレティキュラム²⁵⁾の Ca^{2+} 結合を阻害し、その能動輸送を阻害したり、細胞膜では Ca^{2+} -ATPase 活性を特異的に阻害する²⁶⁾ことが報告されている。従ってここで分離された糖蛋白質もルテニウム赤を結合し、 Ca^{2+} 結合蛋白質としての性質を備え、この蛋白質が細胞膜表面で Ca^{2+} を結合し、細胞内代謝調節に重要な働きをしていることが示唆される。このような考えに立脚してPHAによるリンパ球の幼若化作用には Ca^{2+} が要求される²⁷⁾ことを考え合せるとルテニウム赤やそれとほぼ同様にミトコンドリアの Ca^{2+} 輸送を阻害するルテオコバルチクロリド¹⁶⁾のPHAによるリンパ球の幼若化阻害作用は1部には Ca^{2+} 結合の阻害をするためかも知れない。勿論この外に細胞表面の糖蛋白受容体へのPHAの結合に対して阻害的に作用することも考えられる。しかしこれらPHA受容体とここで取扱う糖蛋白とは次の点で明らかに異ると考えられる。即ち、PHAと同じ作用を示す ^{125}I -Con Aの細胞表面への結合数は、0.001%という極めて稀い濃度のパパイニンによって

は殆ど変化を受けず、むしろ増加する傾向にある²⁸⁾ことから否定されよう。

次にルテニウム赤が細胞表面へ結合する時に呼吸活性が増大するが、これに関しては予備的実験から、ルテニウム赤が細胞内 K^+ の漏出を防ぐ作用と何等かの関係をもつと考えられる²⁹⁾。即ち、Moroffらの報告³⁰⁾によれば腹水癌細胞は何度も洗浄している間に細胞内 K^+ を漏出し、それに伴って細胞呼吸活性が低下する。従ってルテニウム赤が細胞内 K^+ の漏出を阻害すれば呼吸活性が対照に比して増加することになるとも考えられる。そして細胞表面を除去すれば呼吸活性の増大作用が失われることからこの蛋白が何らかの形で代謝調節と関係していると考えられる。更にまたルテニウム赤は癌細胞やビールスによる形質転換細胞をよりよく染色すること³⁾からこのルテニウム結合糖蛋白質が癌細胞代謝異常と何らかの関係があるものとも考える。

結 論

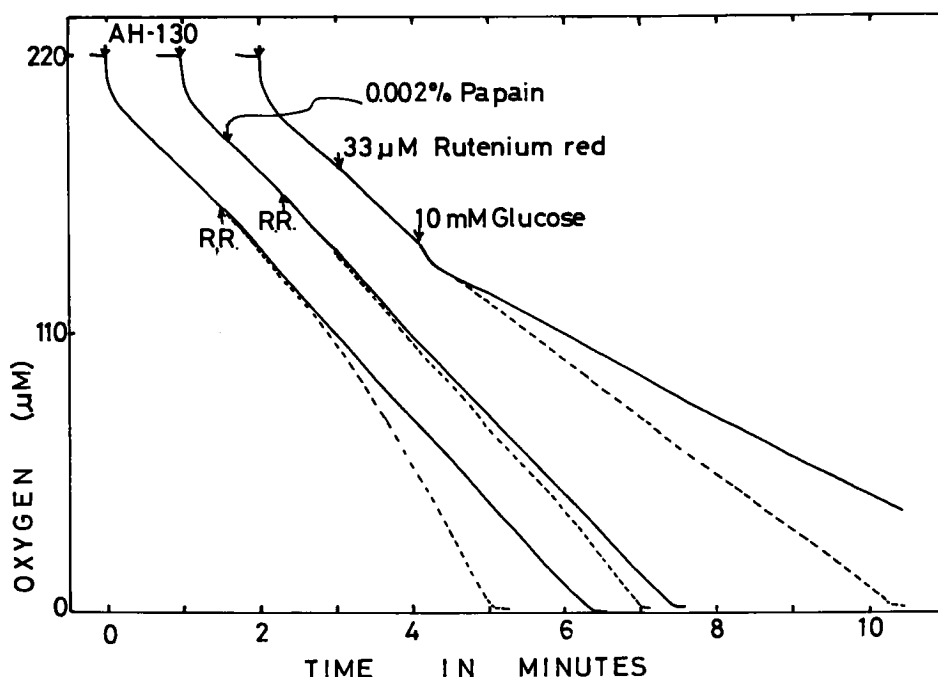


図10 ルテニウム赤のAH-130 腹水肝癌細胞呼吸活性に対する作用

AH-130 を 0.15M NaCl-10mM Tris-HCl 緩衝液中37℃でガルバニー電極を使用して呼吸活性を測定した。ルテニウム赤の添加でグルコースの有無にかかわらず呼吸活性は促進されるが、細胞をパパイン処理するとその促進作用は減少する傾向を示す。

使用したAH-130 腹水肝癌細胞は移植後9日目の細胞で未処理細胞および0.002%パパインを含む0.15M NaCl-10mM Tris buffer (pH 7.4) 中で37℃, 15分間処理し、冷0.15M NaCl-10mM Tris-buffer (pH 7.4) 液で2回洗浄したもの各々20μg protein/mlになるように添加し測定した。

AH-130 腹水肝癌細胞はルテニウム赤で特異的に凝集する。この凝集には細胞表面の酸性多糖体の1種ヘパリチン硫酸と今1つ糖蛋白質が関与している。本研究では主としてこの糖蛋白質の分離精製及びその性質の分析とそれらのもつ生物活性について検討し、次のような結果を得た。

1. 0.001%パパイン処理で得られるAH-130 腹水肝癌細胞の可溶性成分(パパイネート)にはSephadex G 200 でHbよりやや早く溶出する糖蛋白質があり、それにはルテニウム赤が強く結合する。
2. この糖蛋白質はpH8.6のグリシン緩衝液中で電気泳動するとき、最も早く泳動され、トリジンブルーでメタクロマジーを示す。
3. この糖蛋白質のアミノ酸組成は多くのCa²⁺結合蛋白のそれと極めて類似し、酸性アミノ酸が多く、またガラクトース、ヘキソサミン、シアル酸を含む

かなり分子量の大きい蛋白質から成る。

4. この蛋白質に結合するルテニウム赤はPHAによるモルモットリンパ球の幼若化を阻止する作用がある。
5. ルテニウム赤はまたAH-130 腹水肝癌細胞の内呼吸活性を増加するが、これは細胞内K⁺の漏出を阻止するためと考えられる。

以上の結果から、ルテニウム赤結合性糖蛋白質は細胞表面にあって細胞の代謝調節と密接に関係し、癌細胞の代謝異常とも関係するものと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み御指導、御校閲を賜った恩師小田琢三教授に深甚の謝意を捧げますと共に、本実験中終始御懇切なる御援助を賜った内海耕随助教授(現高知医科大学教授)に厚く感謝いたします。また種々の御便宜をいた

いただきました岡山県環境保健センター所長石田立夫先生に 心から感謝いたします。

文 献

- 1) G.G. M. W. Cook and Stoddart: Surface carbohydrates of the eukaryotic cell. Academic press. London & N. Y. 1973.
- 2) 山元寅男: ムコ多糖類 I Ruthenium red 医学のあゆみ, **76**, 315-320, 1971.
- 3) S. H. Kingohury: Cell surface properties and the expression of SV₄₀-induced transformation. Nat, New Biol. **245**, 67-69, 1973.
- 4) A. Martinez-palomo, C. Braislovsky and W. Bernhard: Ultrastructural modification of the cell surface and intracellular contacts of some transformed cell strains. Cancer Res. **29**, 925-937, 1969.
- 5) 内海耕造, 板谷房子, 松永和義, 小田琢三: 酸性多糖体結合試薬による細胞凝集と腹水腫瘍細胞からの凝集素受容体の分離. 細胞生物学シンポジウム, **23**, 217-224, 1972.
- 6) 内海耕造, 松永和義, 小田琢三: ルテニウム赤による細胞凝集機構の解析. 細胞生物学シンポジウム, **24**, 19-28, 1973.
- 7) P. G. Scholefield: Studies of fatty acid oxidation, The effect of fatty acid metabolism of Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer Res. **18**, 1026-1032, 1958.
- 8) Kozo Utsumi and Takuzo Oda: Ruthenium-red-induced cell agglutination and surface glycoprotein and mucopolysaccharide. J. Cell Sci. **13**, 901-911, 1973.
- 9) H. R. Maurer: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. In Walter de Gruyter, Berlin & New York. p. 72-79, 1971.
- 10) G. Fairbanks, T. L. Stech and D. F. H. Wallach: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry **10**, 2606-2608 1971.
- 11) O. M. Renert: Disc electrophoresis of acid mucopolysaccharides. Nature, **213**, 1133, 1967.
- 12) E. Carafoli, P. Gazzotti, C. Saltini, C. S. Rossi, G. L. Sottocassa, G. Sandri, E. Panfili and B. de Bernard: Further studies on mitochondrial Ca²⁺-binding glycoprotein, In Mechanism in Bioenergetics ed. S. F. Azzone, L. Ernster, S. Papa, E. Quagliariello and N. Siliprandi, Academic press, New York & London, 1973. p. 293-307.
- 13) 池中徳治, 蛋白質核酸酵素 “糖質実験法” 共立出版, p. 50-59, 1968.
- 14) M. Saito, T. Yoshizawa, T. Aoyagi and Y. Nagai: Involvement of proteolytic activity in early events in lymphocyte transformation of phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Res. Comm. **52**, 569-575, 1973.
- 15) 内海耕造, 小田琢三, 倉橋研吾, 宮原正信, 保田雅夫: ガルバニー電極による溶存酸素測定—酸素電極としての応用と取扱方法—蛋白質核酸酵素, **14**, 75-78, 1969.
- 16) B. A. Tashmukhamedov, A. I. Gagelgans, Kh Mamatkulov and E. M. Makhmudova: Inhibition of Ca²⁺ transport in mitochondria by selective blockage of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltchloride. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) lett. **28**, 239-242, 1972.
- 17) V. Santer, R. E. Cone and J. J. Marchalons: The glycoprotein surface coat on different class of murine lymphocytes. Exp. Cell Res. **79**, 404-416, 1973.
- 18) A. Winkelstein: Failure of lymphocytes from guinea pig bone marrow to respond to phytohemagglutinin (35315) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **136**, 578-583, 1971.
- 19) D. Romeo, G. Zabucchi and F. Rossi: Reversible metabolic stimulation of polymorphonuclear

- leukocytes and macrophages by concanavalin A. *Nat. New Biol.* **243**, 111-112, 1973.
- 20) D. H. McLennan and P. T. S. Wong: Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1231-1235, 1971.
 - 21) R. H. Wasserman, R. A. Carradino and A. N. Taylor; Vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* **243**, 3978-3986, 1968.
 - 22) C. L. Moore: Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 298-304, 1971.
 - 23) A. Gomez-puyou, M. T. de Gomez-puyou, G. Becher and A. L. Lehninger: An insoluble Ca^{2+} binding factor from rat mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 814-819, 1972.
 - 24) K. Utsumi and T. Oda: Mechanism of Ca^{2+} transport inhibition by ruthenium red and the action of a water-soluble fraction of mitochondria. In *Organization of Energy Transducing Membrane*, ed. M. Nakao and L. Pacher. Univ. Tokyo press, p. 261-277, 1973.
 - 25) M. G. P. Vale and A. P. Carvalho; Effect of ruthenium red on Ca^{2+} uptake and ATPase of sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 29-37, 1973.
 - 26) E. L. Watson, F. F. Vincenzi and P. W. Davis: Ca^{2+} -activated membrane ATPase: Selective inhibition by ruthenium red. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 606-610, 1971.
 - 27) R. B. Whitney and R. M. Stherland: Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. *J. Cell Physical.* **80**, 329-338, 1973.
 - 28) M. Inoue: Cell agglutination mediated by concanavalin A and the dynamic state of the cell surface. *J. Cell Sci.* **14**, 107-202, 1974.
 - 29) K. Utsumi, M. Inoue, H. Ishii, and T. Oda: An analysis of the metabolic control of the cells by the chemical modification. *Physiol. Chem. Phys.* **8**, 529-542, 1976.
 - 30) G. Morff and E. Gordon: Effect of K^+ deficiency on oxidative metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 406-412, 1973.

**Ruthenium red-binding glycoprotein of the AH-130
ascites hepatoma cell surface and its biological activity**

Kazuyoshi MATSUNAGA

Department of Biochemistry, Cancer Institute,

Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Prof. Takuzo Oda)

In order to examine the surface structure of cancer cells, ascites hepatoma cells (AH-130) were treated with ruthenium red known to interact readily with certain acidic carbohydrates. This treatment induces specific cell agglutination, which has been shown to depend upon the cell surface acidic mucopolysaccharide and glycoprotein. In the present study, an attempt was made to isolate the ruthenium red-binding glycoprotein and to examine its biochemical properties and biological characteristics.

Ruthenium red-binding glycoprotein was solubilised by treating AH-130 ascites hepatoma cells with a low concentration of papain, then fractionated by Sephadex G-200. This glycoprotein eluted as the fastest band on gel electrophoresis (glycine buffer pH 7.8) and showed a positive reaction for metachromatic toluidine blue. This fraction was isolated. The purified glycoprotein had a molecular weight a little higher than that of bovine serum albumin.

There was a high content of acidic amino acid similar to that of Ca^{++} -binding proteins described by other investigators. A considerable amount of galactose, hexosamine and sialic acid was also present. The glycoprotein bound strongly to ruthenium red. Ruthenium red inhibited PHA-induced blastoid transformation of lymphocytes and increased the endogenous respiratory activity of AH-130 ascites hepatoma cells. It was concluded that the ruthenium red-binding glycoprotein on the cell surface was related to the metabolic regulation of cells and to the metabolic disorder of cancer cells.