



横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校

江口竜一ラファエル, 江畑利奈, 加藤小百合, 須田まなみ, 松阪亮介,
山崎 基, 渡辺武俊 (顧問: 溝上 豊)

動物細胞の培養における血清の影響と成長因子の探査

本研究は、平成23年度日本農芸化学会大会（開催地 京都）での「ジュニア農芸化学会」において発表予定であったが、東日本大震災によって大会が中止になったため、日本農芸化学会和文誌編集委員会によって発表予定の中から選定し、掲載することとなった。動物細胞の培養には増殖に必要な成長因子などが含まれる血清を用いるが、生物由来でロット差があり血清の良否が実験に影響する。本研究は、血清中に含まれる細胞増殖に必要な成長因子の探索を試みたものである。



本研究の目的、方法および結果

【目的】 動物細胞の培養には血清が用いられるが、細胞の増殖が血清の影響を受ける。一方、血清からいくつかの細胞成長因子が見いだされ、これらを含む無血清培地が開発されている。しかし、無血清培地はコスト的に高価で、使える細胞種も限られており、現在もなお一般的に血清が使われるのが現状である。血清は生物由来でロット差があり、その良否が実験に影響するためロットチェックが行なわれている。そこで本研究では、安定で安価、かつ汎用性のある血清代替品を開発することを最終目標とし、まずは血清中に含まれる細胞の増殖と機能に影響を与える因子について調べることにした。

【方法】 ロットチェック用の11種類のFBS (fetal bovine serum, ウシ胎仔血清; F-1, F-2, ……) を用いて NIH3T3細胞, Caco-2細胞をシャーレで3日間培養し、それぞれ細胞数, または酵素活性 (alkaline phosphatase) を測定した。また、FBSに含まれるタンパク質を SDS-PAGEで解析する一方、FBSをトリクロロエタン酸で除タンパク質し、その後に残るペプチドおよびアミノ酸を OPA (ortho-phthal aldehyde) 法を用いて 340 nm の吸光度を測定することにより定量した。さらに、

FBSに含まれるペプチドを調べるために LC/MS/MS 解析を行なった。

【結果と考察】 まず、11種類のFBSについて NIH3T3細胞の増殖と Caco-2細胞の酵素活性を検討した (図1)。その結果、NIH3T3の細胞増殖では F6 で最も高く、F5 で最も低いこと、またこの傾向は Caco-2 の酵素活性の結果とは必ずしも相関しないことなど、血清のロットに

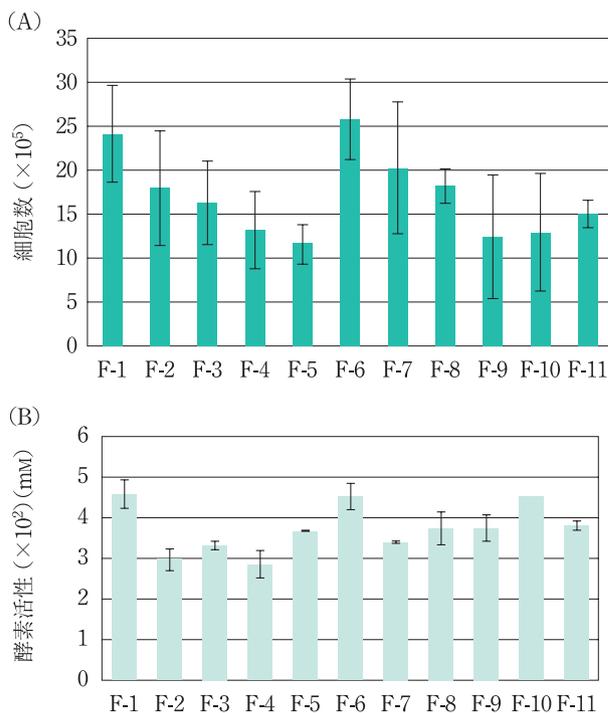


図1 ■ FBSの各ロットにおける細胞増殖および酵素活性の比較
(A) NIH3T3細胞の細胞数の比較 (3 × 10⁵個で培養を開始し、3日後の細胞数を示した)。 (B) Caco-2細胞の酵素活性の比較 (1 × 10⁵個で培養を開始し、3日後の培地中の alkaline phosphatase 活性を示した)

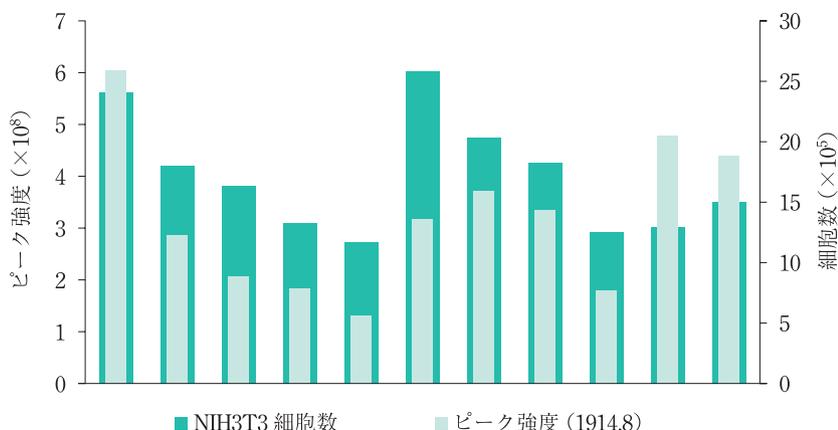


図2 ■ FBS各ロットにおける細胞増殖数と特定ペプチド含量の比較

NIH3T3細胞の細胞数(図1-A)と分子量1914.8のLC/MS/MSのピーク強度を示した。

よって含まれている成長因子の働きが異なることが確認できた。次に、SDS-PAGEによりFBSに含まれるタンパク質に差があるか検討したが、6.5～225 kDaの範囲では大きな差は認められなかったため、ペプチド因子に絞り、FBSに含まれるペプチドの定量を行なった。F3, F7, F9が他に比べて高濃度のペプチドを含むことがわかったが、どのようなペプチドがこの差や細胞増殖の差をひき起こすのかを決定するために、LC/MS/MSを用いることにした。その結果、FBSに含まれている分子量1914.8のペプチドの含量と、NIH3T3細胞の細胞増殖との間に強い相関がみられた(図2)。本研究では、このペプチドのアミノ酸配列を決定するには至らなかったが、異なる分析法を用いて特定・抽出を試み、また、いくつかのペプチドが関係する場合は、それらの組み合わせなども調べることを提案した。



本研究の意義と展望

FBSには動物細胞の増殖に必要な多種多様な因子が含まれている。50年以上も前からFBSに含まれる因子の探索と代替無血清培地の研究が行なわれ、いくつかの因子の同定や培地の開発が進められたが、汎用性やコスト面から、いまだに動物細胞の培養には一般的にFBSが用いられるのが現状である。本研究では、動物細胞の培養でFBSを使わなければならないという基本的な問

題点を指摘し、安定で安価、かつ汎用性のある血清代替品を開発することを最終目標としているが、このような取り組みは、一方で、近年ES細胞やiPS細胞の登場に伴い、特に必要とされる安全性を担保できる完全合成培地の開発などにも通じるものであろう。

本研究のメンバーは、「生命」をキーワードに将来生命科学や医療関係の仕事に携わることを目指す若者である。科学研究の原点の一つは「なぜ」である。細胞培養の初体験で、培養に有効な成分やそれらの含量が明確でない、いわば「魔法の薬」のようなFBSについて「なぜFBS、なぜロットで違う」という素朴な疑問をもち、この点を明確にするという課題を設定した点は研究者の卵としての素質をうかがわせる。彼らは、FBSのロットにより含まれている因子の働きが様々であることを確認し、細胞増殖に有効な成分を決めることは、培養せずに迅速にロットチェックができる可能性を指摘している。また、ペプチド探索にLC/MS/MSという最新機器を利用している。指導教員の助言によると思われるが、大学および企業の専門家との連携によって高校レベルでは到達できない研究レベルの展開が可能であることを体験できた点も、産業界の協力を含む高大連携を通じた広い視野をもつ若者の育成という点に資する新しいスタイルであろう。

(文責「化学と生物」編集委員)