

細胞内 DNA 及び蛋白合成に関する研究

I. 細胞分裂とデオキシリボ核酸 (DNA) 合成と
蛋白合成との関係

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾教授)

専攻生 上 乃 寿 子

〔昭和 35 年 10 月 10 日受稿〕

核内の DNA は細胞の遺伝子の担体と考えられ細胞の分裂には DNA 量の倍加が必要な条件と考えられる様になつた¹⁾⁻⁹⁾。1934 年 Rohn¹⁰⁾ は DNA の倍加が細胞分裂を支配すると説いているが、いくつかの実験はこの説を支持する結果を示している¹¹⁾。細胞が分裂を行うためには予め DNA 量が倍加するとする考えは成熟細胞の核内 DNA 量が細胞の種類により一定であると言う報告、即ち DNA 量一定説 (DNA constancy) に立脚している¹²⁾⁻¹⁸⁾。最近の biochemical な、或いは Cytochemical な研究の多くが DNA constancy を支持する結果を与えており Watson-Chrick¹⁹⁾ の DNA duplication の説は現実に多くの問題の解析に広く適応性を示している。この様な概念の吟味と DNA 合成の過程を追うべく著者はこの実験を企画した。

DNA 量の倍加が細胞の分裂 cycle のどの時間で行なわれるかと云う事はここに取り上げる問題の核心である。これに対しても既に多くの人々の実験があり、その多くは分裂細胞では interphase の終り頃 DNA は最も盛に合成され prophase に入る項にはすでに DNA 合成は完成していると言う結果を得ている¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾。

然しこの様な DNA constancy 及び DNA interphase 合成説も必ずしもすべての人々によつて肯定されているわけではない。著者の経験でも細胞の種類或いは生理的条件の変化により示される値には相当の deviation が見られる。この事は一見実験測定時の誤差によるものとも考えられるが、又遺伝子に関係のない metabolic DNA の存在を示すものかも知れない²⁾。又一方では細胞分裂には必ずしも完全に DNA 量の倍加が起らなくてもよい事を示すかも知れない。この実験の第一の目的はこの問題を解決する事であつた。次に細胞分裂時には必然的に細胞質内蛋白量の増加が起ることが考えられるが、蛋

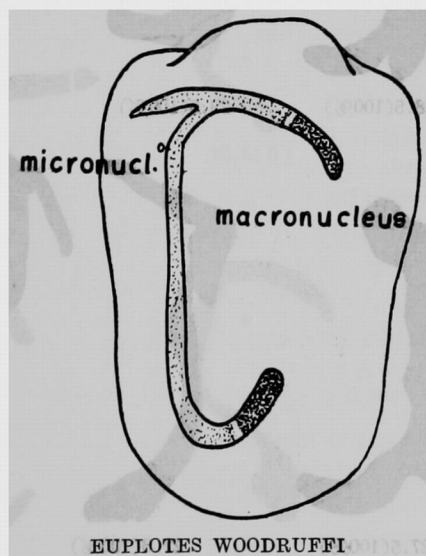
白合成は分裂 cycle のどの時期で起るか、又 DNA の場合と同様に倍加が起るかどうかを確認する事が第 2 の目的であつた。測定方法としては顕微分光測光法により材料は原生動物及び癌細胞を用いた。

実験材料及び実験方法

材料としては Euplotes (Woodruffi の W 7 株) 及び Ehrlich 腹水癌細胞を使用し、Euplotes は水 100 cc に 2 gr. の割合に小麦を加えたものを 10 分間 boiling したものを 100 cc に対して 1 roopful の Aerobacter aerogance と少量の Chilomonus parancium を加え室温 (23°C) にて培養したものをを用いた。又、Ehrlich 腹水癌細胞は純系 maus, Strong A に Ehrlich 腹水癌細胞 0.2 cc を移植し移殖後 6 日目の細胞を使用した。

これらの細胞 (Euplotes, Ehrlich 腹水癌細胞)

図 1



は何れも 24×50 mm のデッキガラス上に塗抹、すみやかに風乾し Acetic-Alcohol (1 : 3) で5分間固定、柴谷、直良²²⁾の方法にて Feulgen 反応をなし、さらに Deitch²³⁾の方法にて Naphthol yellow S で蛋白の重染色を行つた。これ等の標本に就いて DNA 測定には $546 \text{ m}\mu$ の線を、又蛋白に対しては $436 \text{ m}\mu$ の線を用いた。(水銀燈輝線)測定方法としては一波長法を用い Swift の方法に従つた⁵⁾。

C型の Euploetes 核に就いては任意の7点から得られた平均吸光度を面積比(核の形をカメラルシン

タで一定の紙面上にスケッチし、これを切取つたものの重量)にかけ測定値とした。reorganization band を有する核では band で境された中心部と両側部とはそれぞれ別々に測定した。これは reorganization band の両側に於いて DNA 量が異なるためである。

蛋白量の測定も同様な方法で細胞質の任意の7点を測定して平均吸光度(E)を求めこれに細胞の半径(r)の2乗をかけ(r^2E)蛋白量とした。

Euploetes の分裂期の sampling は Paramecium²⁴⁾

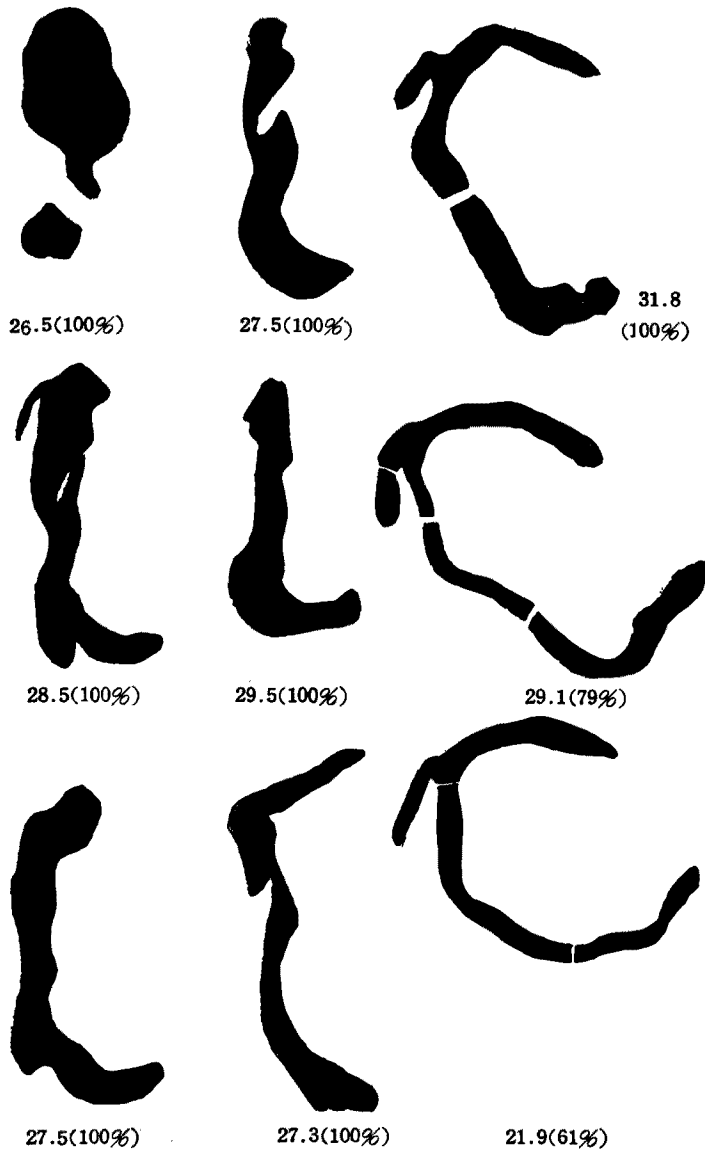
の場合と同様に行つた。即ち1個体から8個体迄分裂した single strain culture の各々を8個の凹スライドにとり、それが分裂して2個体になつた時から一定時間おきに各々の凹スライドから1個体ずつ固定し、その時の時間を相手側の虫体が分裂する迄の時間に対する比として表わし分裂 cycle の aging とした。又多くの細胞を任意に取り出しそれ等についても DNA 量と蛋白量について測定した。

Ehrlich 腹水癌細胞は腹水と共にガラスキャピラリーで取り出しカバーガラス上に塗抹、乾燥し上記の方法で固定、染色したものについて一波長法で DNA 量、蛋白量を測定した。測定は同一の細胞について両者の測定を行い DNA の測定値は $546 \text{ m}\mu$ の光で核の大きさの光束を作り、それが示す吸光度(E_1)に核の平均半径の2乗(r_1)をかけ $r_1^2 E_1$ で表わし、又蛋白量の測定値は $436 \text{ m}\mu$ の光で細胞の大きさの光束を作りその光で示される吸光度(E_2)と細胞の平均半径の2乗(r_2)を $r_2^2 E_2$ にて表わした。

実験結果

Euploetes の大核は図1に

図 2



示す如く C 型で分裂に先立つて核の両端にそれぞれ一つの reorganization band と呼ばれる Feulgen

反応陰性の分界線が現われる。この band は両側から中心に向つて移動しその両者が合一すると band

図 3

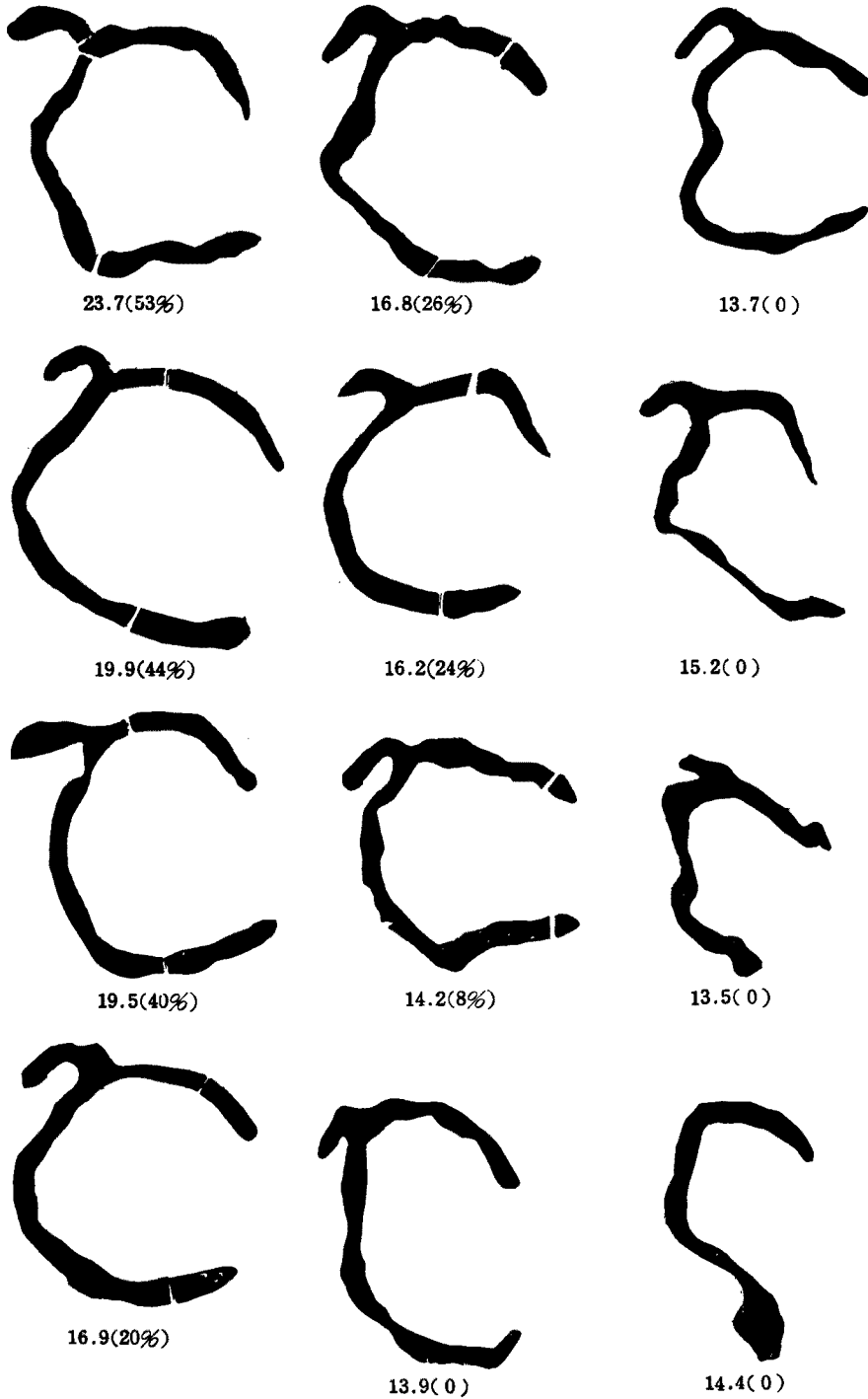
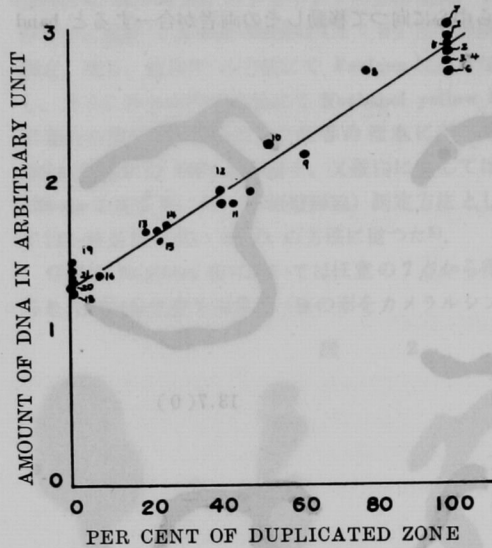


図 4



次に Euplates の division cycle に於ける DNA 合成の時間的変化を示せば図 5 の如くである。即ち分裂 cycle の時間が 9 時間の時には DNA 合成は分裂後 5 時間頃から始まり 8 時間後には DNA 量は倍加されその後 30 分~1 時間を経て分裂する。即ち intephase 後期でほとんどの DNA 合成は完了する。この様な DNA 合成の過程は reorganization band の出現と進行によつて形態学的に追跡出来る。この DNA 合成の進行に対し蛋白合成の進行状態は全く異つた経路を辿り細胞分裂直後から始まりその進行には時期的な偏差がなく略々直線的な増加を示す。然しこの場合蛋白量の変動は DNA 量のそれに比して非常に大である (図 6)。然し兎に角 DNA 合成と蛋白合成には一定のずれがあり模式的に示せば図 7 A の如くである。今これ等 DNA 合成と蛋白合成の二つの値から両者の

はやがて消失し核は球形化し二つにくびれて分裂が行なわれる。reorganization bands の進行状態は写真 1 の中央部に見られる如くである。写真から判る様に reorganization band の通過した後は Feulgen 反応は極めて強く現われ単位面積に於ける DNA 量の測定値では band の前方にある部分の単位面積の DNA 量の約 2 倍の値を示している。今 reorganization band より大核の中心に向つて進行する種々の段階に於いて reorganization band の後方にある核の部分の面積百分率 (核の全面積に対する) と核の DNA 量との関係を示せば図 2, 3 の如くであり、その関係をグラフに示せば図 4 の如くである。即ち reorganization band の通過した後の核 (今これを duplicated zone と呼ぶ) の面積と DNA 量の間には完全な直線関係が成立する。そしてその値は個々の reorganization band の後方にある核の部分の DNA 量は倍加されている事を示している。

図 5

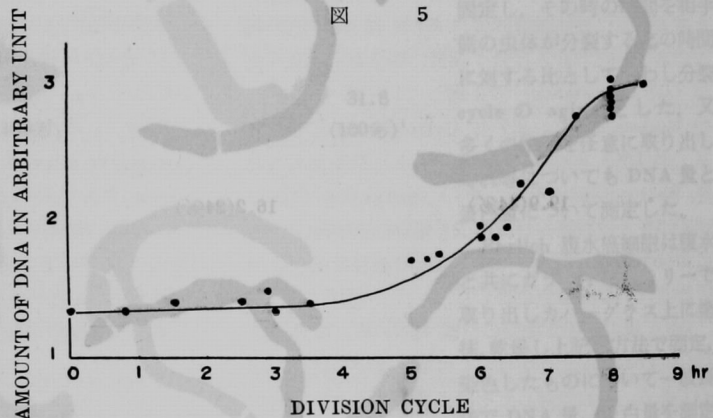


図 6

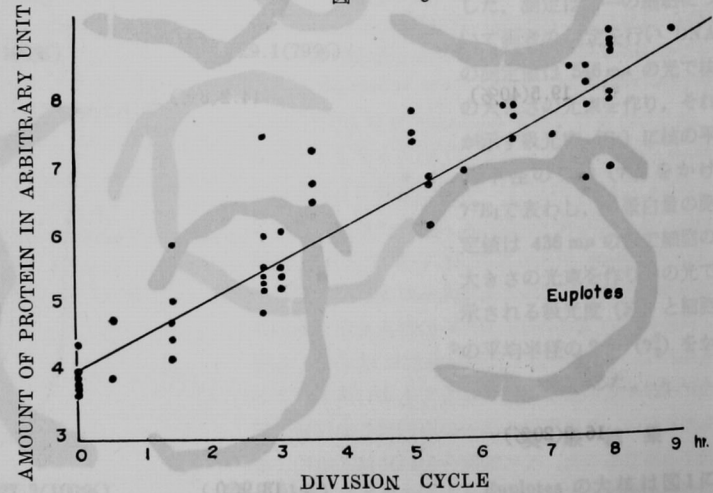
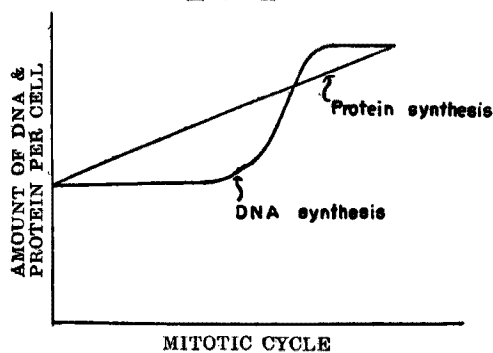
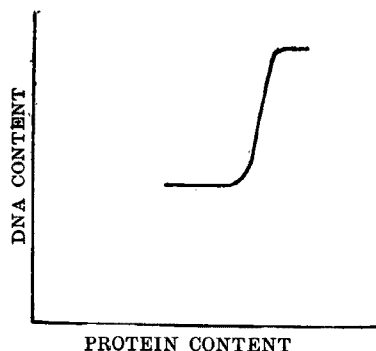


図 7 A



B



相関関係を示す曲線を求めると図7Bの如くである。asynchronous culture に於ける Euplates の DNA 量と蛋白量の関係を多数の細胞について求めると図8に示す如く synchronous culture の場合に求めたと同じ曲線が成立する。この事は一つの mitotic cycle の間に蛋白合成が直線的に進行するとした場合に DNA 合成の過程を逆に追跡し得る可能性を示している。

今、Ehrlich 腹水癌細胞について（移植後6日目のもので最も盛な増殖をまち）個々の細胞の DNA 量と蛋白量の分布曲線を求めると図9、図10の如くである。即ち細胞の DNA 量の分布は明らかに4倍体の分布ピークと8倍体あたりの分布ピーク

図 8

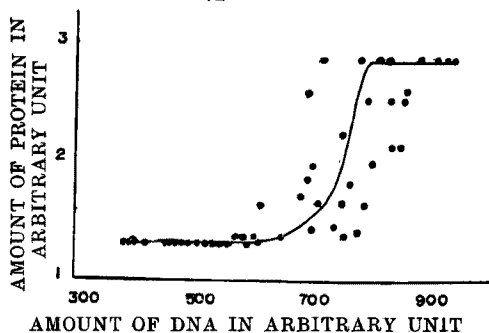


図 9

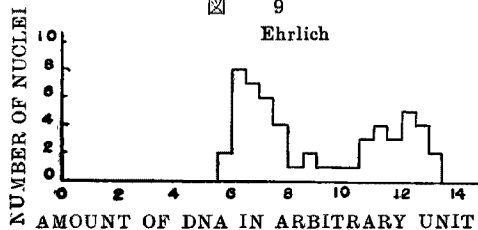


図 10

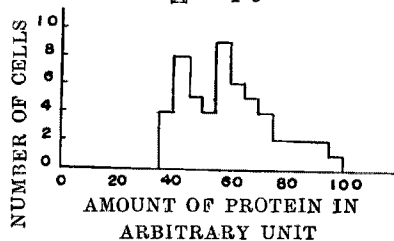
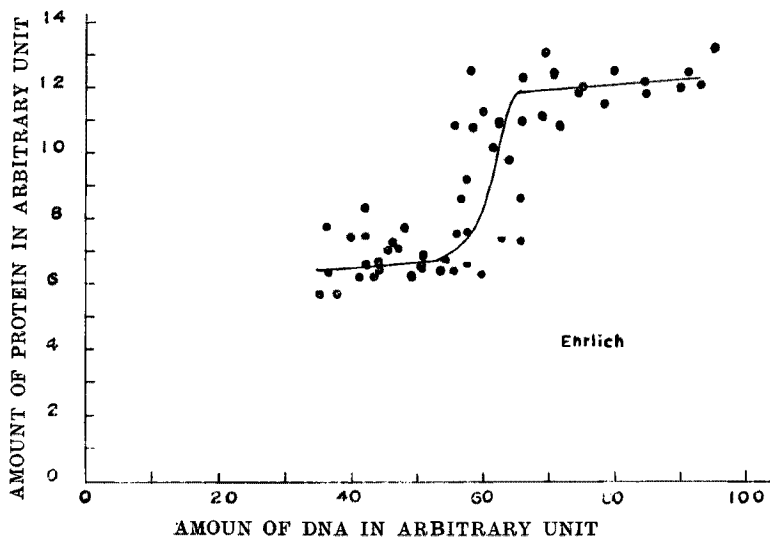


図 11



が示される。これに対し蛋白量はほぼ1つの標準曲線が示される。

今これ等の2つを各細胞について同時に蛋白量、DNA量を測定しDNA量と蛋白量の関係を示せば図11の如く明らかにEuplotesで求められた曲線(図8)と類似し蛋白合成が直線的に進行すると仮定するとDNA合成がシグモイド曲線的に合成されている事になる。

考 按

顕微分光測定法によるDNA量の測定は今迄に可成多く色々な細胞で観察され、増殖の盛んな細胞では個々の細胞のDNA量の分布ピークが2つにわかれている事が内海、妹尾²⁴⁾その他によつて示されている²⁵⁾。これ等の関係は著者の場合にも明らかに認められ1つのピークは細胞の固有DNA量に相当し他のピークは細胞分裂を行なうためにduplicateされたDNAに相当する事は議論の余地のない所である。然しこの様に分裂の盛んな細胞群のDNA量の分布曲線が2つに分れる事は合成速度が直線的でなくintephaseのある時期に非常に速やかにDNA合成の行なわれる時期があり、その前後に於いてDNA合成の比較的緩慢な時期のある事は明らかである。そして多くのこれまでの実験はDNA合成の促進がinterphaseの終期に起ることを示している。本実験に於いてもEuplotesに示されたDNA合成の実験ではEuplotesの場合reorganization bandの通過後にDNAが倍加しその合成の進行が形態学的にも観察出来、DNA合成の上述の様な過程はこの材料で最もはつきり正確に把握し得た。然しDNA合成が倍量に迄進行してもそれは必ずしも細胞の分裂を誘起しない事は年とつたネズミの肝細胞のDNA量が4倍体に相当するものが多いにも拘らず分裂像が殆んどない点からみても明らかである²⁶⁾。然し蛋白合成と分裂との間には一定の関係があるかも知れない。

Morton²⁷⁾によればDPN合成酵素は核内に限局し生じたDPNは細胞質に与えられるが細胞質が増大すると細胞質内DPN量が比較的稀薄状態となり、ある一定程度以上にDPNが稀薄になるとATP合成が低下し核と細胞質の代謝にunbalanceが生じDPNとATPの間にfeed backが生じ細胞質内DPNの減少を核内DPNが補いきれなくなると核膜の崩壊が起ると云う。彼はこの現象が細胞分裂を誘導すると説明しているが、もしそうであれば細胞

質の増大、即ち蛋白合成の亢進は分裂と密接に関係していると云える。現在迄に蛋白合成と細胞分裂の関係を顕微測光法により求めたdataはないが、著者の実験結果ではEuplotesの分裂cycleに於ける蛋白合成の進行は殆んど直線的に進行する。この変化からみると細胞質のDPNの要求も亦直線的である可能性がある。

Ehrlich腹水癌細胞に於いてみられた蛋白合成とDNA合成の進行状態もEuplotesの場合と略々同様に進行しているであろう事を示唆している。この事はsynchronous cultureされた細胞での¹⁵Nのincorporationから蛋白合成が直線的に行なわれる事を明らかにしている報告結果³⁾とよく一致する。

勿論ここに示された値から見ても蛋白量の変動はDNA量のそれに比較してdeviationが大きく、これは同時にDNAが遺伝子の担体でありそれが大きい変化を示さない事は1つのDNA constancyを物語るものと考えられる。

結 論

1) Euplotes woodruffi, Ehrlich ascites tumor cellを使用し顕微分光測光法により個々の細胞のDNA量、蛋白質量をFeulgen反応及びNaphthol yellow S染色により求め、その量と分裂cycleとの関係を求めた。

2) Euplotesの大核DNA量は、その両端が増加し、増加した部分とそうでない部分とはreorganization bandの進行によつてへだてられている。

3) EuplotesのDNA合成はintephaseの後期で最も盛んであり分裂前に完全なDNAの倍加が完成している。

4) Euplotesの蛋白合成は分裂cycleのすべての時期で行なわれ、分裂cycleと蛋白量の間には直線関係が存在する。

5) Euplotesの分裂cycleの間DNA合成と蛋白合成の関係から個々の細胞のDNA量と蛋白量の間にはシグモイド曲線が示され、Ehrlich腹水癌細胞に於いても同様な曲線が示される事からEhrlich腹水癌細胞に於いても蛋白合成はmitotic cycleのすべてを通じて行なわれ直線的合成カーブが考えられた。

6) 蛋白合成と細胞分裂の関係に就いて論じた。

稿を終るに臨み終始御指導、御援助を賜つた恩

師妹尾左知丸教授に及び癌研究内海助教授に深甚の謝意を表わすと共に *Euplotes* 株を載いた広島大学

理学部片島亮博士に深謝致します。

文 献

- 1) Taylor, J. H. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 445, 1960.
- 2) Gall, J. G. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 295, 1959.
- 3) Prescott, D. M. : *Exptl. Cell Res.* 19, 228, 1960.
- 4) Block, D. P. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 353, 1959.
- 5) Rasch, E., H. Swift et al. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 11, 1959.
- 6) Neuton, A. A. : *Exptl. Cell Res.* 16, 624, 1959.
- 7) Kimball, R. F., T. O. Caspersson, G. Svensson and L. Carlson : *Exptl. Cell Res.* 17, 160, 1959.
- 8) Kimball, R. F. and T. Barka : *Exptl. Cell Res.* 17, 173, 1959.
- 9) Walker, P. M. B. and J. M. Mitchson : *Exptl. Cell Res.* 13, 167, 1957.
- 10) Rohn, O. : *Cold spring Harbor Symposia on Quant. Biol.* 2, 63, 1934.
- 11) Scherbum, O. : *Exptl. Cell Res.* 13, 24, 1957.
- 12) Mitsky, A. and H. Ris : *Nature* 163, 666, 1949.
- 13) Swift, H. : *International Rev. Cytol.* 2, 1, 1953.
- 14) Pollister, A. W. : *Exptl. Cell Res.* 2, Suppl. 59, 1956.
- 15) Naora, H. : *Biochem. et Biophys. Acta.* 9, 582, 1952.
- 16) Davidson, J. N. et al. : *Biochem. J.* XI, 46, 1950.
- 17) Leuchtenberger, C. and H. Leuchtenberger and M. Davis : *Am. J. Pathol.* 30, 65, 1954.
- 18) Utsumi, K. : *Acta Med. Okayama* 14, 1, 1960.
- 19) Watson, J. D. and F. H. C. Crick : *Nature* 171, 737 and 964, 1953.
- 20) Walker, P. M. B. : *J. Heredity* 6, 275, 1953.
- 21) Deeley, E. M. et al. : *Exptl. Cell Res.* 6, 569, 1954.
- 22) Shibatani, A. and H. Naora : *Biochem. Biophys. Acta* 12, 515, 1953.
- 23) Deich, A. D. : *Laboratorial Inves.* 4, 324, 1955.
- 24) 内海, 妹尾 : *細胞化学シンポジウム* 10, 30, 1960.
- 25) Richards, B. M. : *Nature.* 175, 259, 1955.
- 26) 木本, 内海, 松岡, 妹尾 : *印刷中 (Acta Med. Okayama)*
- 27) Morton, R. K. : *Nature* 181, 540, 1958.

写 真 説 明

Euplotes woodruffi の reorganization band の進行状態を示した。

それぞれ上は Feulgen 反応を行ない 546 m μ の光で撮影したもの, 下は同一の細胞を Naphthol yellow S で染色し 436 m μ の光で撮影したものである。

Studies on the DNA and Protein Synthesis in the Cell

I Cell Division and its Relation to Desoxyribonucleic Acid (DNA) Synthesis and Protein Synthesis

By

Hisako Ueno

Department of Pathology Okayama University Medical School
(Director: Prof. Satimaru Seno)

Author's Abstract

1. By means of microspectrophotometry the author carried out quantitative analyses of DNA and protein in an individual cell, using *Euplotes woodruffi* and Ehrlich ascites tumor cells as the materials through Feulgen reaction and Naphthol yellow S stain and studied the relation between the quantities of these substances and the mitotic cycle. The results are as follows.

2. The DNA content in the macronucleus of *Euplotes* is increased at two ends of the nucleus, and the part where DNA is increased and that which shows no DNA increase are demarcated by the formation of a reorganization band.

3. The DNA synthesis of *Euplotes* is most active in the latter stage of interphase, and the DNA content is completely doubled just before the cell division.

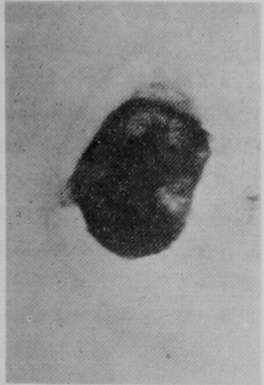
4. The protein synthesis of *Euplotes* cells is taking place at all phases of the mitotic cycle and there is a linear relation between the mitotic cycle and the protein contents of the cell.

5. Judging from the relationship between the DNA synthesis and the protein synthesis during the mitotic cycle of *Euplotes* cells, the DNA content and the protein content in an individual cell show a sigmoid curve between the two and also the similar curve can be observed in the case of Ehrlich ascites tumor cell. Therefore, it is assumed the protein synthesis is being likewise carried on all through the mitotic cycle of Ehrlich ascites tumor cells.

6. The author discussed about the relationship between the protein synthesis and the cell division.

上乃論文附区

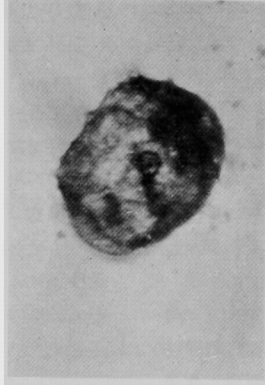
1



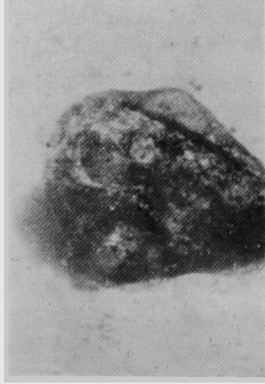
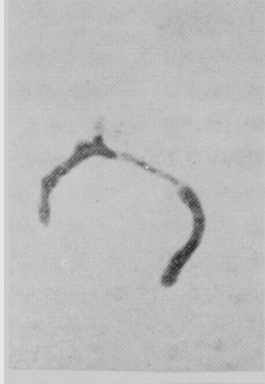
4



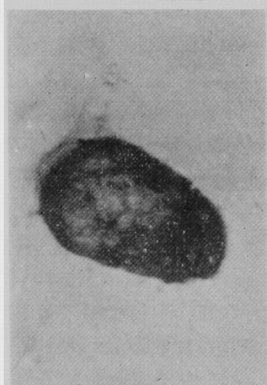
2



5



3



6

