

細胞内 DNA 及び蛋白合成に関する研究

II. 細胞内 DNA 量, 蛋白量に与える OX の作用

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〕

先に著者は *Euplotes woodruffi* 及び Ehrlich 腹水癌細胞の分裂 cycle と DNA 合成, 蛋白合成との関係を顕微分光測光法により求め, DNA 合成は interphase の一定時期に起り, 蛋白合成は分裂 cycle の各時期を通じて間断なく合成される事を明らかにした¹⁾. 一方著者は先に山本等と共に放射線照射家兎肝より抽出した不飽和脂肪酸の誘導体 (OX と仮称)²⁾ に就いて検討しこの物質がウニ卵の細胞分裂を停止せしめる事を報告した³⁾⁴⁾.

本論では種々の細胞に OX を作用させ DNA 合成或いは蛋白合成がどの様に変化するかを観察した結果を報告する.

材料及び方法

材料には *Euplotes woodruffi*, Ehrlich 腹水癌細胞, HeLa 細胞及びウニ卵及び精子を使用した. *Euplotes* の培養は第 1 編に用いた方法により, 又 Ehrlich ascites tumor cell は純系マウス Strong A に移植後 6 日目のものを用いた. HeLa cell は Subculture 後 3 日目のものを使用, 又ウニ卵及び精子はサンショウウニを使用した.

核酸 (DNA) 及び蛋白の定量は第 1 編¹⁾ に述べた方法に拠った. 観察の対象となる細胞は次の如く処理した. 即ち *Euplotes* 及び Ehrlich 腹水癌細胞はデッキグラス上に塗抹乾燥し, HeLa cell はデッキグラス上に培養した細胞を風乾した. これ等は 1 : 3 の醋酸アルコールで 5 分間固定された⁵⁾. ウニ卵は受精後 5 分おきに取り出し醋酸アルコールに直接入れて固定した. これ等の細胞は第 1 編に述べた方法で Feulgen 反応⁶⁾ を施し, 更に Naphthal yellow⁸⁾ で重染色を行った.

OX 物質を細胞に作用させる方法は次の如くである. 即ち *Euplotes* では培地内の OX 終末濃度が 0.025 % となる様に加え 24 時間作用させた後に観察, Ehrlich 腹水癌細胞の場合は 2.5% OX 物質 0.2 cc

を腹腔に注入, 24 時間後に採取された細胞に就いて観察, 亦 HeLa cell の場合は OX の終末濃度が 0.01% になる様に培養液に加え 6 時間後に観察測定した.

Mitotic phase の観察には Feulgen 反応を行つたものについて 2000 個の細胞を観察し Per 1000 Cells 表わした. 又ウニ卵の場合には受精 10 分後に OX 終末濃度が 0.01% になる様に海水に加えその後 70 分後迄 5 分おきに細胞を取り出して観察した.

著者は更に ³²P の DNA, RNA への incorporation に対する OX の影響をも観察した. この場合の材料は Ehrlich 腹水癌細胞移植後 6 日目のものである. 腹腔内に 2.5% OX 0.2 cc 及び ³²P 10 μ c を同時に注射し注射 3 時間後に腹水細胞を採取 DNA, RNA の放射能を測定した. 対照として OX の代わりに生理的食塩水を 0.2 cc 注射したものに就いて観察した. OX 或いは生理的食塩水注射 3 時間後腹水を集め細胞 (Packed Cell) 約 0.2 g をとり Schmidt, Thannhauser, Schneider 法⁹⁾ により DNA, RNA の分画を取り出した. これ等の材料に就いて Pi の定量は高橋氏法により ³²P の測定にはシンチレーションカウンターを用いた.

実験結果

OX の注射を受けた Ehrlich 癌腹水から分離された癌細胞の DNA 及び RNA への ³²P の incorporation rate を観察した結果は表 1 に示す如く DNA, RNA 何れの分画に於いても ³²P の incorporation は対照群のそれ等の約 1/3 の値を示しており DNA, RNA 合成が OX によつて阻害される事がわかる.

ウニ卵に上記の方法で OX を作用させると分裂は 100% 阻害される. 即ちその細胞は分裂に入るが進行は metaphase で停止し, 形態学的に mitotic apparatus の形成阻害が認められる. OX を海水中に入れたものでは DNA の合成は一時的に促進される傾向

	RNA			DNA		
	COUNT MIN.	Pi	S.A.	COUNT MIN.	Pi	S.A.
CONTROL	490	36.7	13.5	86.0	41.6	2.09
OX	183	42.9	4.2	25.5	36.2	0.71
OX-EST.	319	33.6	9.5	62.0	34.5	1.79
			31%			34%

Table 1. Incorporation of ³²P into DNA and RNA of Ehrlich ascites tumor cell, observed 3 hours after introductions of ³²P, 10 μ c, into peritoneal cavity at 6 th day of tumor cell transplantation.

Control : injected 0.2cc of 0.85% NaCl solution with ³²P intraperitoneally

OX : injected 0.2cc of 2.5% unsaturated fatty acid emulsion from irradiated rabbit.

OX-Est. : treated with esterified OX, 0.2cc of 2.5% emulsion.

S. A : Specific activity

を示したが後には低下する。受精卵の中には雄核と雌核との融合の起らないものも認められた。然しこの様な場合にもそれぞれに於いて DNA の増加が認められた (図 1)。

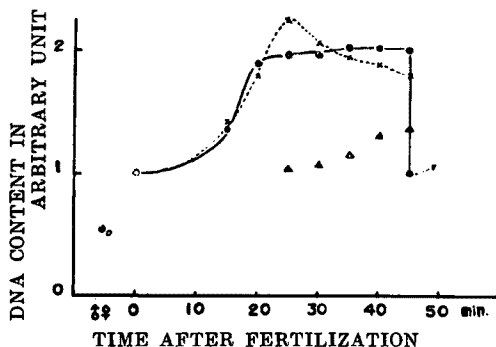


Fig. 1 DNA Synthesis in the fertilized sea urchin eggs

- - - : in those cultured in sea water only
- ...x... : in those cultured in sea water added OX
- ...▲... : in those cultured in sea water added OX (unfused nuclei)

次に OX を含む培地に入れられた HeLa Cell の DNA 量を測定した結果では顕著な変化は認められなかったが DNA 量の極度に少ない細胞の出現頻度が増している (図 2), 形態的には細胞の萎縮が認められた。

Ehrlich 腹水癌細胞移植 6 日目に OX を注射 (P³²を与えず) 24 時間後に細胞を形態学的に観察すると

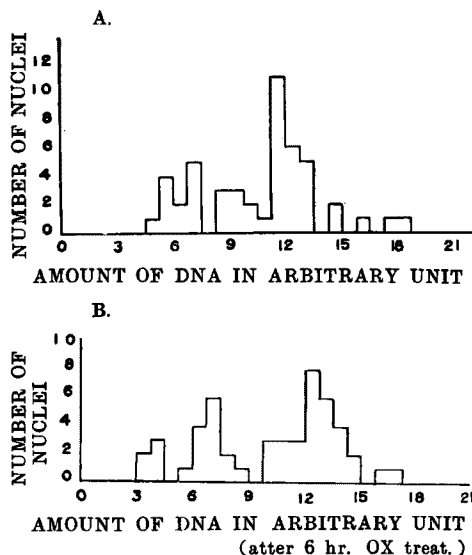


Fig. 2 Relative amount of DNA in individual nuclei of HeLa cell

- A : Control
- B : treated 6 hours with 0.01% OX at final concentration

写真 1 の如く正常なものに比して核も細胞もその形が小形になっている (写真 1)。又 mitotic phase のある時期、即ち prometaphase, metaphase, anaphase, terophase の各 stage にある細胞の数が対照に比し何れも多くなっている (表 2)。これ等の標本で休

	INTER.	PROMETA.	META.	ANA.	TELO.
CONTROL	971	14	9	2	4
AFTER OX (2.5% 0.2cc) INJECT.	926	22	18	14	20

Table 2. Number of various mitotic phases of Ehrlich ascites tumor cell, observed 6 days after transplantation.

Control : injected 0.2cc of 0.85% NaCl solution
After OX : after 24 hours injection of 0.2cc of 2.5% unsaturated fatty acid emulsion from irradiated rabbit.

- INTER..... 間期
- PROMETA..... 前中期
- META..... 中期
- ANA..... 後期
- TELO..... 末期

止期にある細胞で DNA 量を測定した結果は図 3 に示す如く明らかに減少を示し、亦分布ピークが対応する対照群のものに比し低い値を示している。これ

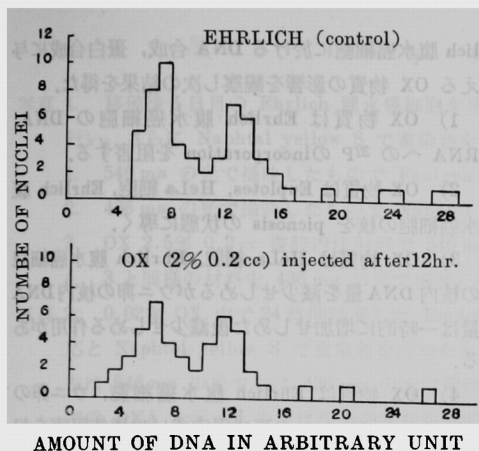


Fig. 3 Relative amount of DNA in individual nuclei of Ehrlich ascites tumor cell

A : Control

B : treated 12 hours with 0.2 cc of 2% OX

等の細胞に於いて Naphthol yellow S 染色を施し蛋白量を測定して見ると蛋白量にも著明な減少が認められる。更に第 1 編¹⁾に述べたと同様な方法で DNA 量と蛋白量に関するグラフを作れば図 4 の如くであ

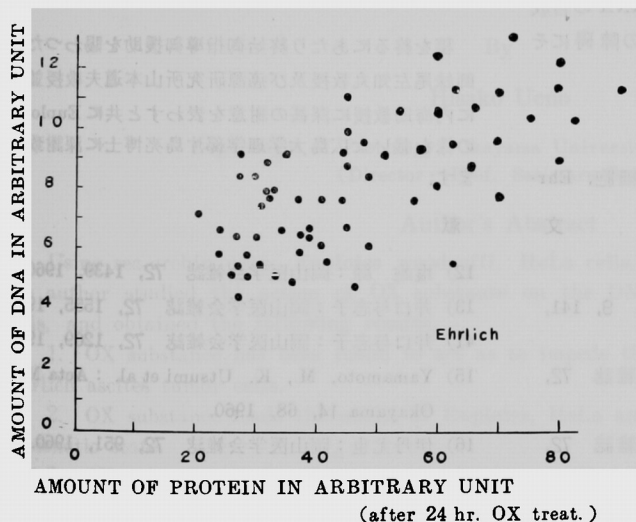


Fig. 4 Relation between DNA and Protein Contents in each cell of Ehrlich ascites tumor Cell, 24hr after injection of 0.2 cc of 2.5% unsaturated fatty acid emulsion from irradiated rabbit

る。即ちこの場合、分配域は正常細胞で示された様なシグモイド曲線として追跡する事が出来ない。

Euplates を OX を含む培地に移した後その形態を観察した所では核の形が変化し C 型の大核の各所に突起を生じ亦核そのものの萎縮が認められる (写真 2)

考 察

OX 物質は山本¹⁾等の放射線障病に関する一連の研究から被照射動物の臓器の不飽和脂肪酸分画に発見された抗腫瘍性物質であり、空中に放置すると多量の lipid peroxid を生成する¹⁰⁾。生物学的にはこの物質が細胞分裂阻害、DNA、RNA 合成阻害、吸呼酵素系の一時的な活性上昇とそれに続く低下等を起す事が各種の細胞で研究され明らかにされている⁹⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。この物質を注射すると腫瘍細胞の他に率丸の精細胞は極めて強い変性を起す²⁰⁾。然し他の組織にはそれ程大した影響を与えない。そして以上の実験結果に於いても OX は Ehrlich 癌細胞の DNA、RNA への ³²P incorporation を阻害する様に働きこの物質は明らかに DNA、RNA の合成を阻害する作用がある事は疑問の余地がない³⁴⁾。ウニ卵に於ける実験に於いても OX は細胞の分裂を阻止する様に働く事が示された。然しこの場合には DNA 合成の形式が一時的に亢進する様な結果が得られた。この事は Marshak、杉野等¹⁷⁾²¹⁾により

示された如くこの細胞が細胞質内に多量の低分子 DNA を含み、特異な DNA 代謝を営んでいる事と関係しているのかも知れない。然しこの場合も終局的には DNA 量は低下し、分裂阻止によつて異常に DNA 量が増加すると云う様な現象は認められなかつた。この事は一見細胞分裂の阻害が DNA 合成阻害と密接に関係している事を示す様でもあるが細胞の分裂阻害と DNA 合成は全く別の過程である事は村上²³⁾の実験に示される如くである。

形態的に観察した結果からすれば OX 物質の細胞分裂阻害作用は主として mitotic apparatus の形成阻害に基く事は明らかである。即ち Ehrlich 腹水癌細胞に見られた如く OX の作用を受けると prometaphase

から telophase 迄の細胞の数が増して来て分裂後期の進行が阻まれる事がわかるし、又ウニ卵では mitotic apparatus の形成阻害が形態学的にはつきり認められた。この際 chromosome の形成は正常に進行するので DNA 合成に対する OX の阻害作用は分裂阻止作用とは別の過程による DNA 合成過程の

攪乱によるものと考えられる。HeLa 細胞を OX で処理した場合にも DNA 量の減少が見られたが、これ等の細胞は形態学的に blister formation を示しているので DNA 合成阻害は細胞の変性による随伴現象と考えられる。

Euplotes の大核の場合にも OX はその形態に著明な変化を与えると共に核の萎縮を来す作用があり細胞の変性を起す作用のある事が理解される。山本²⁾によれば OX は核膜の崩壊を起す様に作用すると云うから或いはこの様な過程により核内の代謝が攪乱されるのかも知れない。

HeLa 細胞に認められた DNA 量の減少と共に起る蛋白量の減少も細胞の degeneration に起因すると考えられる。この様な変化は autolysis を起した細胞で Kasten²²⁾が観察した結果と一致する。

これ等の現象は OX は何等かの機序により細胞全体の degeneration を起す様に作用し、その結果として蛋白合成と DNA 合成の障害が起るとの推論を裏づけるものである。変性の原因が何であるかは今回の実験では明らかにし得なかつたが RNA の合成阻害、ATP その他のエネルギー産生系の障害にその一次的な原因があるかも知れない。

結 論

ウニ卵, Euplotes woodruffi, HeLa 細胞, Ehr-

lich 腹水癌細胞に於ける DNA 合成, 蛋白合成に与える OX 物質の影響を観察し次の結果を得た。

- 1) OX 物質は Ehrlich 腹水癌細胞の DNA, RNA への ³²P の incorporation を阻害する。
- 2) OX 物質は Euplotes, HeLa 細胞, Ehrlich 腹水癌細胞の核を picnosis の状態に導く。
- 3) OX 物質は HeLa 細胞, Ehrlich 腹水癌細胞の核内 DNA 量を減少せしめるがウニ卵の核内 DNA 量は一時的に増加せしめた後減少せしめる作用がある。
- 4) OX 物質は Ehrlich 腹水癌細胞, ウニ卵の mitotic apparatus の形成阻害或いは機能阻害を起す。
- 5) さらに又 Ehrlich 腹水癌細胞の蛋白合成も阻害する働きを有する。
- 6) 以上の観察結果から OX の作用は一次的に mitotic apparatus に作用してこれの形成を妨げると共に、細胞の変性を起して二次的に DNA, RNA 及び蛋白の合成阻害を起すものと考えた。

稿を終るにあたり終始御指導御援助を賜つた恩師妹尾左知丸教授及び癌源研究所山本道夫教授並びに内海助教授に深甚の謝意を表わすと共に Euplotes の株を載いた広島大学理学部片島亮博士に深謝致します。

献

- 1) 上乃寿子：岡山医学会雑誌投稿中
- 2) 山本道夫：細胞化学シンポジウム 9, 141, 1959.
- 3) 妹尾, 山本, 内海他：岡山医学会雑誌 72, 1197, 1660.
- 4) 妹尾, 山本, 内海他：岡山医学会雑誌 72, 1307, 1960.
- 5) Marrian, R. W. : J. Histochem. Cytochem. 6, 43, 1958.
- 6) Shibatani, A. and Naora, H. : Experientia 8, 263, 1952.
- 7) Deitch, A. D. : Laboratolical Invest. 4, 324, 1955.
- 8) Volkin, E., Cohn, W. E., "Method of Biochemical Analysis" vol. 1, 9287, 1954.
- 9) 山本道夫：岡山医学会雑誌抗稿中
- 10) 山本, 内海, 大原：未発表
- 11) 塩飽 緑：岡山医学会雑誌 72, 1203, 1960.
- 12) 塩飽 緑：岡山医学会雑誌 72, 1439, 1960.
- 13) 井口与志子：岡山医学会雑誌 72, 1555, 1960.
- 41) 井口与志子：岡山医学会雑誌 72, 1269, 1960.
- 15) Yamamoto, M., K. Utsumi et al. : Acta Med. Okayama 14, 68, 1960.
- 16) 伊丹尤也：岡山医学会雑誌 72, 951, 1960.
- 17) Marshak, A. and C. Marshak : Exptl. Cell Res. 5, 288, 1955.
- 18) Marshak, A. and C. Marshak : Exptl. Cell Res. 10, 246, 1955.
- 19) 杉野, 岡崎：蛋白質, 核酸, 酵素 2, 20, 1957
- 20) Sugino, Y. et al : Biochim. Biophys. Acta 26, 453, 1957.
- 21) Sugino, Y. : J. Am. Chem. Soc. 79, 5074, 1957.
- 22) Kasten, F. H. : Exptl. Cell Res. 19, 93, 1960.
- 23) 村上哲英：細胞化学シンポジウム 11 抗稿中

写 真 説 明

写真 1. 移殖後 6 日目の Ehrlich 腫瘍細胞を塗抹, 乾燥し, 酢酸アルコールにて固定, Feulgen 反応を行い, さらに Naphtol yellow S で重染色をした細胞.

1. 546 m μ の光で撮映したもので Feulgen 反応で示された核を示す.
2. 436 m μ の光で撮映したもので Naphtol yellow S で染色された細胞質を示す.
3. OX 2.5% 0.2 cc 腹腔内注射群で 546 m μ の光で撮映 DNA 量の減少を示す.
4. 3 と同様の材料を 436 m μ の光で撮映, 蛋白量の減少を示す.

写真 2. 0.02% OX 中で 24 時間培養した Euplotes を塗抹, 乾燥後酢酸アルコールで固定し, Feulgen 反応と Naphtol yellow S で重染色を行ったもの.

左は 546 m μ の光で右は 436 m μ の光で撮映したもの.

左の DNA を示すものでは核形の変化が顕明で核の萎縮が認められる.

右は蛋白量を示すものには大した変化を認めない.

Studies on the DNA and Protein Synthesis in the Cell

II. Effect of OX on the DNA and Protein Contents in the Cell

By

Hisako Ueno

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

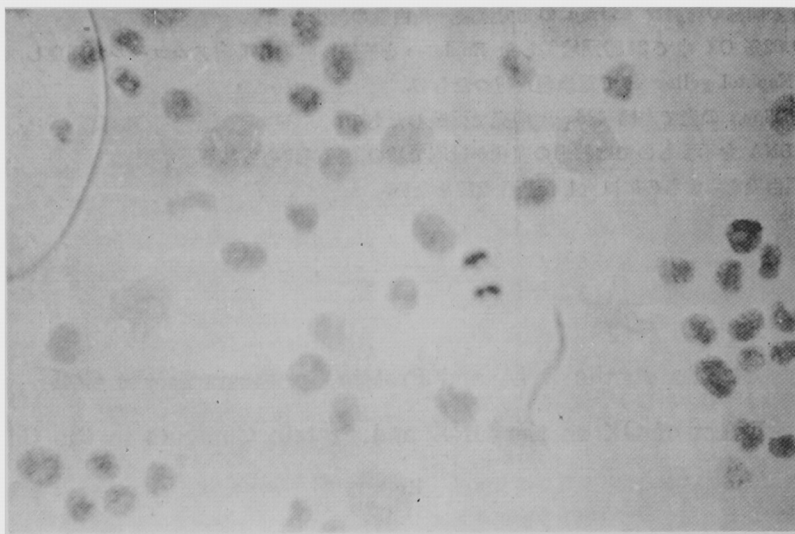
Author's Abstract

Using sea-urchin eggs, Euplotes woodruffi, HeLa cells, and Ehrlich ascites tumor cells, the author studied the action of OX substance on the DNA and protein synthesis of these cells, and obtained the following results.

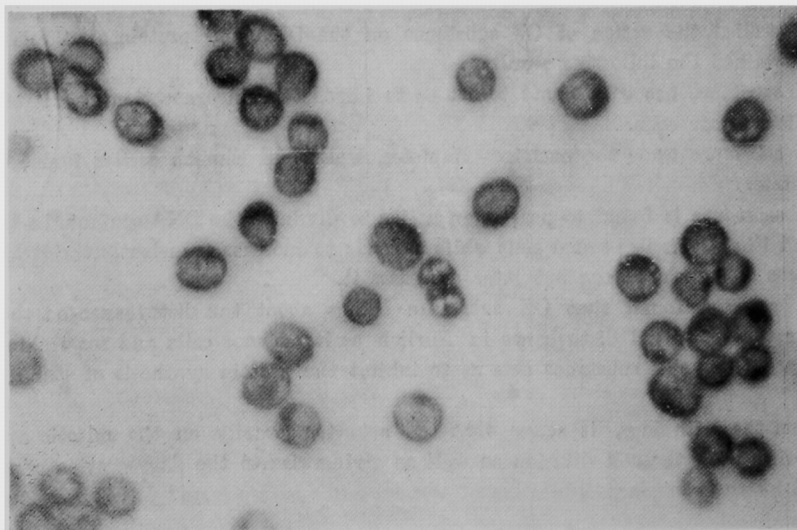
1. OX substance has been found to act as to impede the incorporation of ^{32}P to DNA in Ehrlich ascites tumor cells.
 2. OX substance leads the nuclei of Euplotes, HeLa and Ehrlich ascites tumor cells into a picnotic state.
 3. OX substance is found to possess an action to diminish the DNA contents in the nuclei of HeLa and Ehrlich ascites tumor cells while it tends to increase transiently the DNA content in the nucleus of sea-urchin egg but later decreases it.
 4. It has been found that OX substance brings about the disturbance on the mitotic apparatus or the functional disturbance in Ehrlich ascites tumor cells and sea-urchin eggs.
 5. In addition, this substance acts as to inhibit the protein synthesis of Ehrlich ascites tumor cells.
 6. From these findings, it seems that OX acts temporarily on the mitotic apparatus, thus interfering with the cell division as well as giving rise to the degeneration of the cells, accompanied by the secondary inhibition of the synthesis of DNA and RNA in the cells.
-

上 乃 論 文 附 図 (写真1)

1

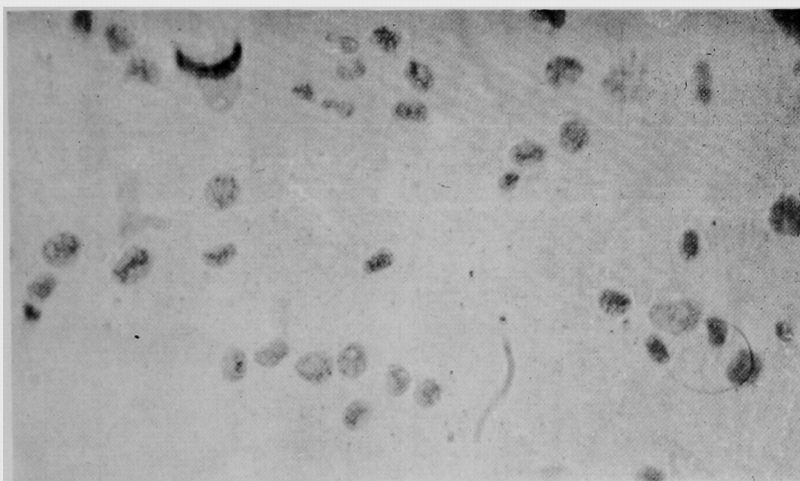


2

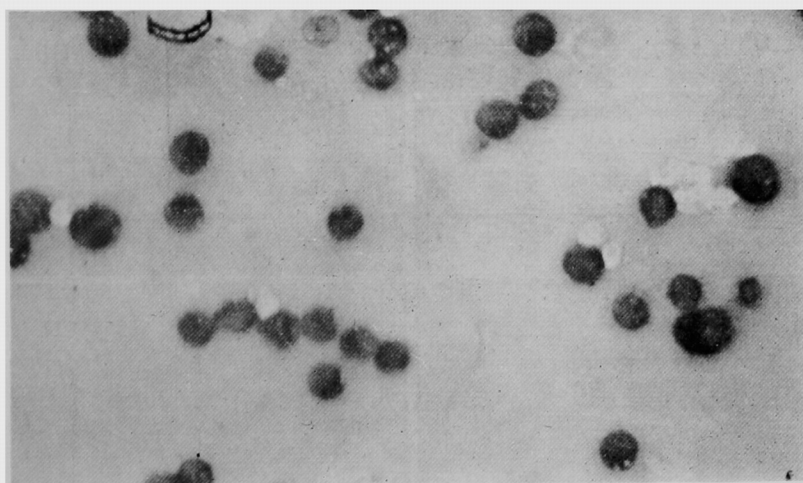


上乃論文附図(写真1)

3

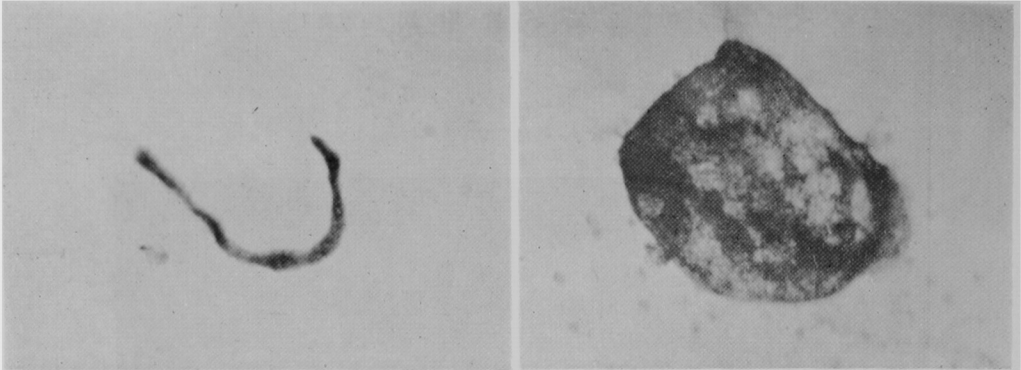


4

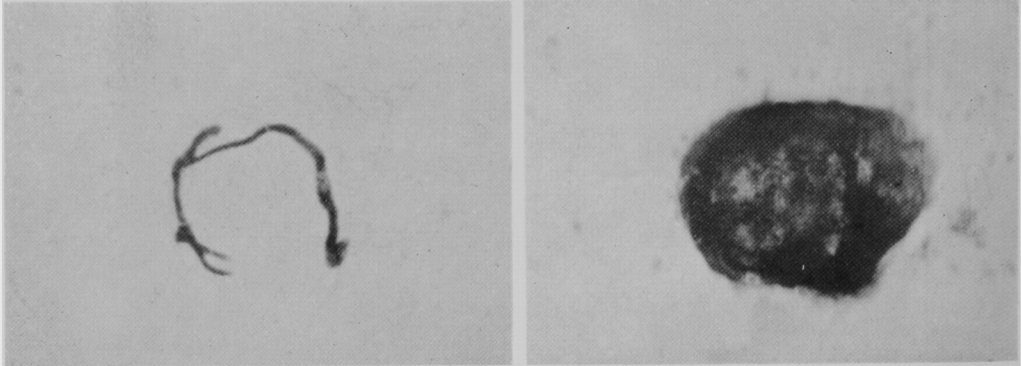


上 乃 論 文 附 圖 (写真2)

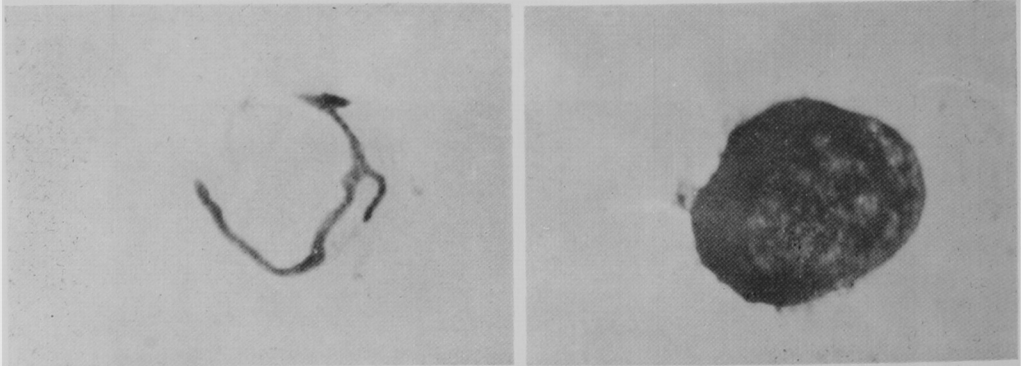
1



2



3



4

