

ジギトニン処理透過性細胞内における SV40クロマチン DNA 複製の解析

岡山大学医学部整形外科教室（指導：田辺剛造教授）

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部（指導：小田琢三教授）

花 川 志 郎

（昭和57年5月26日受稿）

Key words: ジギトニン, 透過性細胞,
SV40, クロマチン, DNA 複製

緒 言

Simian virus 40 (SV40) はサルを自然宿主とする最も代表的な小型 DNA 腫瘍ウイルスの一種であって、SV40 DNA 蛋白複合体 (SV40クロマチン) は細胞核クロマチンと同様なヒストン組成とヌクレオソーム構造を有する複製単位 (レプリコン) である。したがって、SV40クロマチンは真核細胞におけるクロマチンの構造と DNA の複製・転写、ならびに発癌の分子構造を調べる上に極めて有利な研究モデルである¹⁾。SV40ウイルスは許容細胞 (サルの腎臓細胞) に感染すると、その核内でSV40クロマチンとなって、その遺伝子機能の段階的発現が起る。すなわち、SV40初期遺伝子の転写翻訳によるT抗原とt抗原の合成、ウイルスDNAの複製、後期遺伝子の転写翻訳によるウイルス構造蛋白質V1, V2, V3の合成など。これらの諸過程はすべて宿主細胞の酵素系によって行なわれる¹⁻³⁾。

SV40クロマチンの *in vitro* DNA複製は、従来、SV40感染細胞の分離核やその抽出物などで研究されてきたが³⁾、私共は、真核細胞におけるクロマチンDNAの複製とその調節機構を研究するために、なるべく *in vivo* の状態に近く、しかも種々な基質や阻害剤および高分子蛋白質の影響を調べることでできる *in vitro* DNA複製系として、低濃度のジギトニン処理で基質

透過性とした細胞 (permeable cell) 内におけるSV40クロマチンのDNAの複製系を開発した⁴⁾。ジギトニンはステロイド・グリコシドの一種で、コレステロールに特異的に結合し⁵⁾、細胞膜のコレステロール含量は他の膜系よりはるかに多く⁶⁾、低濃度では、細胞膜のみ選択的に透過性にし、他の内膜系は比較的無傷に保つことができる^{4),7)}。

本研究においては、ジギトニン処理したSV40感染細胞の超微構造、SV40クロマチンDNA複製系の諸条件の検討、基質要求性と阻害剤の影響などを調べた。その結果、DNA複製の至適条件を確立し、本実験系がクロマチンDNAの *in vitro* 複製のみならずDNA合成阻害制癌剤などの作用を調べる上に極めて有用な実験系であることを明らかにした。

材 料 と 方 法

1. 細胞培養とSV40ウイルス感染

アフリカミドリザルの腎臓由来株細胞 (CV-1) を10%仔ウシ血清 (Gibco Co.) 添加 MEM (Dulbecco の Eagle minimum essential medium) で、プラスチック製ペトリ皿 (LAX製、直径90mm) を使い、CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95% 空気) 中で37°Cで培養した。CV-1細胞が confluent に達してから24時間後、ブラック精製した高感染価 (10⁸~10⁹ PFU/ml) の小ブラック型 simian virus 40 (SV40) 777

株を高 MOI (50~100 MOI) で感染さし、ウイルス吸着約90分間後、3%仔ウシ血清を含む MEM を加えて、37°C、CO₂ インキュベーターで培養した⁸⁾。

2. SV40感染細胞の採集と透過性細胞の調製

SV40感染後38時間から46時間後に、メジウムを除き、37°Cの0.05%トリブシン-0.02% EDTA-PBS (-) で一度洗い、再びそれを加えて、37°C保温し、細胞が丸くなってからメジウムを除き、4°Cに冷した10%仔ウシ血清添加 MEM をディッシュ当たり 5 ml づつ加えてトリブシンの作用を停止させた。駒込ピペットを用いて細胞をディッシュから剝離し、遠心管に集めた。以下の操作はすべて 4°C で行った。遠心管に集めた細胞を静置して凝集塊をとり除き、2,000 rpm, 5分間遠心して上清をとり除いた後、沈渣を Buffer A (0.15M sucrose, 50mM Tris-HCl, pH7.4, 80mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT)) で洗い、再度2000 rpm, 5分間遠心し、上清をとり除いて沈渣を Buffer A 1 ml 当り1000万個の細胞になるように懸濁した。この細胞懸濁液 1 ml 当り 100~150 μg のジギトニン (1%ジギトニン・アルコール溶液0.01~0.015ml) を加えて、25°C, 5分間保温することによって、ジギトニン処理透過性細胞を調製した。

3. DNA 合成反応条件と測定法

DNA 合成の標準的測定条件においては、1 ml 中に1000万個の細胞を含むジギトニン処理透過性細胞懸濁液0.1ml (10⁶ 細胞, 約0.5mg蛋白質量) と反応基質液0.15ml を混じ、反応液総量0.25ml で反応を行った。反応液は最終濃度において、それぞれ0.1mM dATP, dCTP, dGTP, 0.01mM [³H] dTTP (0.5Ci/m mole), 2 mM ~ 5 mM ATP, pH 7.4, それぞれ0.1mM CTP, GTP, UTP を Buffer A 中に含み、反応温度は 37°C, 反応時間は15分であった。反応停止は冷 7% trichloroacetic acid (TCA) -40mM ピロリン酸ソーダ (Na-PPi) 3 ml を加えることによって行ない、沈殿をガラスフィルター (GF/C, Whatman) に乗せ、同液で充分洗浄後、酸不溶性分画にとりこまれた放射活性をトルエン-³PFO-POPOP システムで液体シンチレーシ

ョンカウンターを用いて測定した。

4. 電子顕微鏡的観察法

ジギトニン処理透過性細胞を 37°C, 15分間 DNA 合成反応を行った後に、2.5% グルタルアルデヒド-0.1M カコシル酸ソーダ緩衝液で固定、1%四酸化オスミウムで後固定、エタノール系列で脱水、エポン樹脂包埋、超薄切片、酢酸ウラニウムと塩化鉛で二重染色し、日立電子顕微鏡 HU-11D で観察、写真撮影した。

5. 蛋白質定量その他

蛋白質の定量は Biuret の方法、及び Lowry らの方法によった⁸⁾。DNA は紫外線吸収 (OD 260 nm/mg=20) によって測定した⁸⁾。

結 果

1. DNA 合成に及ぼすジギトニン処理濃度の影響
透過性細胞を調整するためのジギトニン処理濃度と、DNA 合成量との関係は図1に示すごとく、標

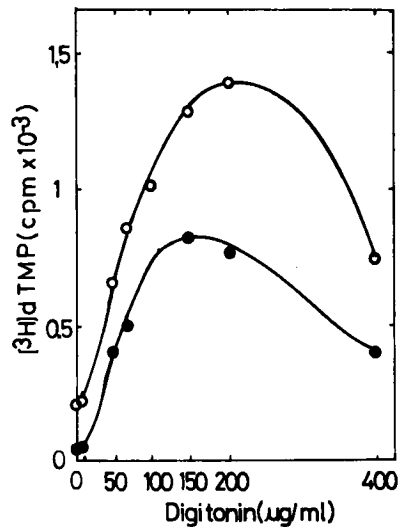


図1. ジギトニン処理濃度の DNA 合成におよぼす影響。

○—○, 標準反応系; ●—●, 標準反応系に 1 mM ホスフォエノールピルビン酸カリウム, 5 mM リン酸緩衝液, 0.1mM CaCl₂ を添加。

標準反応系 (完全系, 白丸) では150~200 μg ジギトニン/10⁷ 細胞/ml で最大であった。分離核の反応系で ATP 再生のためおよび核構造保護のためによく使用される 1 mM ホスフォエノールピルビン酸カリウム (PEP), 5 mM リン酸緩衝

液 (Pi), および 0.1mM CaCl_2 をさらに添加した反応系 (黒丸) ではかえって DNA 合成量が低下した。ジギトニン処理透過性細胞では細胞膜は透過性になっても, ミトコンドリアその他の内膜系は比較的無傷に保たれ, ATP合成系が含まれるので⁹⁾, PEP-Pi などの添加を必要としない。ジギトニンは溶解度に限界があるので, 以後の実験では透過性細胞の調整に $100\sim 150\ \mu\text{g}$ ジギトニン/ 10^7 細胞/ml を至適濃度として用いた。ジギトニン $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度において, DNA 合成は細胞数 10^6 個まで細胞数にほぼ平行した。至適ジギトニン濃度は細胞数の増加によってある程度まで上昇した。

2. ジギトニン処理透過性細胞の電子顕微鏡的 微細構造

ジギトニン処理しない SV40感染 CV-1 細胞 (対照) および $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のジギトニンで処理した SV40 感染透過性細胞を DNA 合成の標準反応液で, 37°C , 15分間反応した後の電子顕微鏡像をそれぞれ図2a, b に示す。ジギトニン処理透過性細胞は, 電顕像において細胞膜がかなり破壊されているが, ミトコンドリアその他の内膜系は比較的良好に保たれている。核は幾分腫大しているが, 破壊されておらず, クロマチンの構造もかなりよく保たれている。

3. DNA 合成反応の時間的経過

標準反応条件下における透過性細胞の DNA 合成反応の時間的経過は図3 (白丸印) に示すごとくである。反応は5分まではほぼ直線的に進み, 以後漸次減速するが, 15分まではかなり速い速度で進行し, それ以後著しく減退する。SV40感染細胞の *in vivo* における SV40 DNA 合成1サイクルに要する時間はおよそ15分とみなされている³⁾。したがって, 標準反応においては, 反応時間を15分とした。反応細胞を Hirt¹⁰⁾ の上清と沈渣に分けて, Hirt 上清の酸不溶性分画への $[^3\text{H}]\text{dTTP}$ のとりこみは, 細胞全体のその80%以上を占めるので (図3 黒丸印), この透過性細胞における DNA 合成の大部分は SV40 DNA の合成によるものとみなされる。

4. DNA 合成におけるその他の基礎条件

1) 塩濃度: 標準反応液の KCl 濃度を $32\sim 300\text{mM}$ の間で調べた結果, DNA 合成は $32\sim 100$

mM まであまり変化なく, 150mM 以上ではかなり阻害されたので, 標準では 80mM を至適と定めた。

2) 蔗糖濃度: $60\sim 150\text{mM}$ ではあまり変化がなく, それ以上では阻害されたので, 150mM を至適と定めた。

3) Mg^{2+} 濃度: $5\sim 7\text{mM}$ で DNA 合成が最高であったので, 5mM を至適と定めた。

4) 反応温度: 4°C ではジギトニン処理しない細胞と同様に DNA 合成が極めて低く, 25°C でジギトニン処理し, 37°C で反応したものの約10%程度であった。反応の至適温度は $30\sim 37^\circ\text{C}$ であった。

5) DTT: 0.5mM DTT を含む標準 Buffer A と DTT を除いた Buffer A とでジギトニン処理した透過性細胞について DNA 合成を比較した結果, 後者では著しく DNA 合成が低下したので, 透過性細胞の調製には DTT の添加が必要である。DNA 合成反応には終末 0.2mM DTT で充分である。 1mM 以上の高濃度の DTT では DNA 合成がかなり強く阻害される。

6) pH: DNA 合成反応時の pH を $6\sim 10$ の間で調べた結果, pH7.0 以下では DNA 合成が極めて低く, pH7.4 で最高となり, pH8.0 \sim 8.5 では低下し, pH9.0 では著しく低い (図4)。

7) CV-1 細胞の SV40 感染後の使用時期: SV40感染後36から48時間までは DNA 合成量があまり変化しないが, 早い時期の細胞を使用する場合には宿主細胞核の DNA 合成の関与を多く考慮しなければならない。それは DNA 合成反応後, 全細胞の放射活性と Hirt 上清に回収される放射活性を測定して比較すれば判別できる。

5. DNA 合成の基質要求性

この系における効率のよい DNA 合成は基質として4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (4 dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) の他, ATP と Mg^{2+} の添加を必要とする (表1)。他の3種のリボヌクレオシド三リン酸 (3 NTP: CTP, GTP, UTP) をさらに添加すると僅かに DNA 合成量が増加する。DNA 合成には ATP 依存性が強く, ATP の添加を省くと, DNA 合成量が著しく減少する。 Mg^{2+} を添加せ

花 川 志 郎 論 文 附 図

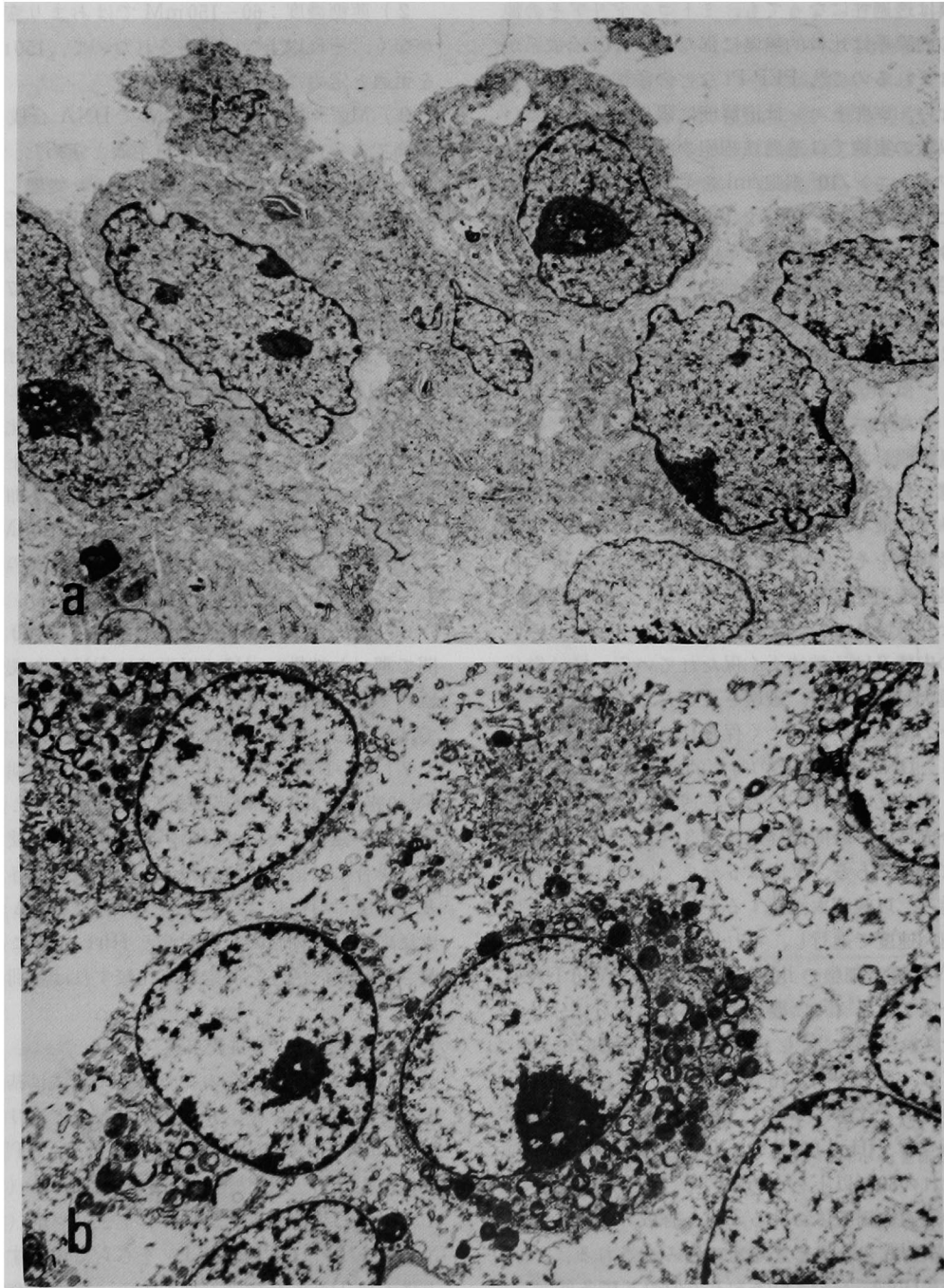


図 2. ジギトニン処理透過性細胞の電子顕微鏡像 ($\times 4,700$).
a, ジギトニン (0); b, ジギトニン $100 \mu\text{g/ml}$ 処理.

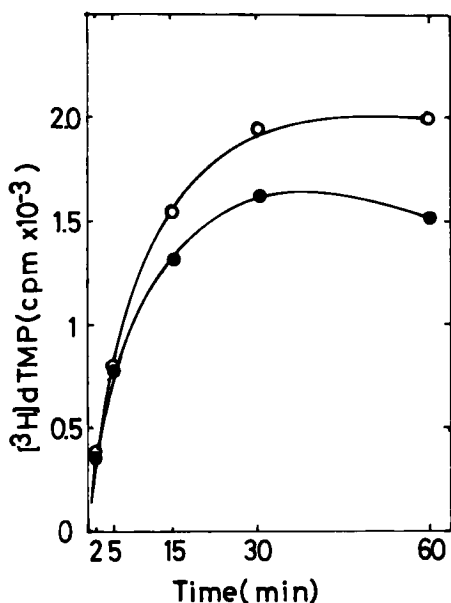


図3. ジギトニン処理透過性細胞における SV40クロマチン DNA 合成量の反応時間経過。
○—○, 細胞全体; ●—●, Hirt 上清, 共に³H]dTMPの酸不溶性分画

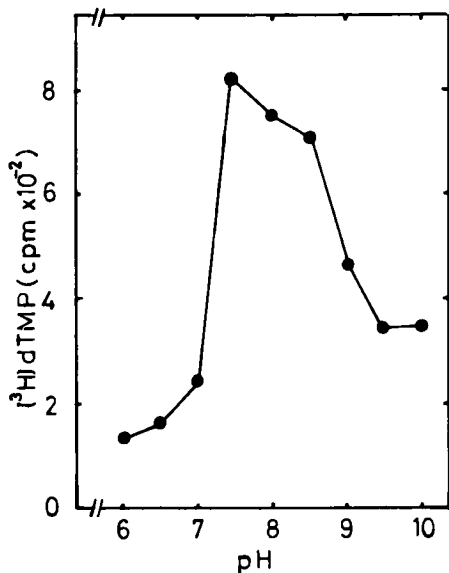


図4. DNA 合成におよぼす pH の影響.

ず, ethlenediamine-tetraacetic acid (EDTA) を添加すると, 反応は完全に阻害されるので, Mg^{2+} の存在が必須である. N-ethylmaleimide (NEM) を添加すると, 反応はほとんど完全に

表1. ジギトニン処理透過性細胞の DNA 合成における基質要求性と阻害剤*

反応条件	DNA 合成活性 (対照に対する百分率)
完全系	100
-ATP	32
-CTP, GTP, UTP	96
-ATP, CTP, GTP, UTP	24
-CTP, GTP, UTP, dATP	25
-CTP, GTP, UTP, dCTP	21
-CTP, GTP, UTP, dGTP	21
-CTP, GTP, UTP, dATP, dCTP, dGTP	17
-ATP, CTP, GTP, UTP, dATP	6
-ATP, CTP, GTP, UTP, dCTP	9
-ATP, CTP, GTP, UTP, dGTP	5
-ATP, CTP, GTP, UTP, dATP, dCTP, dGTP	1
- Mg^{2+} , +EDTA (10mM)	0
-Dithiothreitol, +N-ethylmaleimide (10mM)	7
+araCTP (0.6mM)	15
+Aphidicolin (10ug/ml)	9
+ddTTP (50μM)	97

*DNA 合成の完全系は標準反応液で DNA への³H]dTTP の取り込み量により測定を行った。すべての反応は完全組成の DNA 合成量を 100 として表わした。

阻止されるので, SH 基が活性に関与している。

基質要求性の解析において, 市販 (Boehringer Co., PL Co. など) の ATP (5 mM) を使用した場合, dATP を除いても DNA 合成量の低下が認められず, むしろ僅かに増加することがあったが, それは ATP にかかりの dATP が混在しているためであって, 精製した ATP あるいは山佐社の ATP を使用した結果, dATP を添加しないときは DNA 合成量が最大となることがわかった (図5)。

6. DNA 合成阻害剤の影響

1) アフィディコリン (aphidicolin): アフィディコリンは DNA ポリメラーゼ α に特異的に結合し, DNA の複製を阻害する¹¹⁾。この系の DNA 合成はアフィディコリンの濃度の増大に伴って漸減し, 20 μ g では 5% になり, 強く (95%) 阻害された (表1, 2)。このことは SV40 DNA の複製が DNA ポリメラーゼ α によって行なわれること²⁾ と一致している。

2) 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate (ddTTP): ddTTP は DNA の複製をほとんど阻害しない濃度において, DNA の修復を強く阻害することが知られている¹³⁾。この系の DNA 合成はかなり高濃度の ddTTP (50 μ M) でもほとんど阻害されない (表1)。このことは SV40 DNA の複製に DNA ポリメラーゼ β の関与がほとんどないものと考えられる。

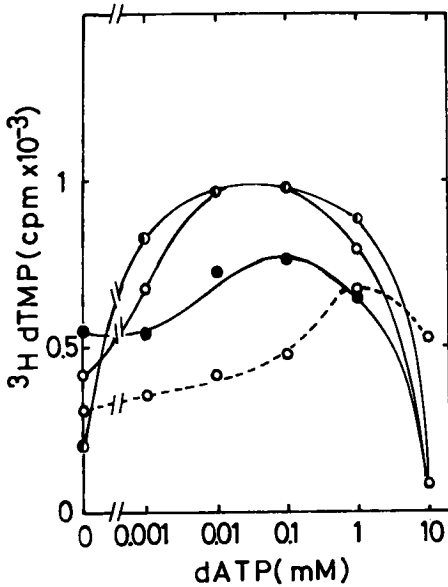


図5. ジギトニン処理透過性細胞のDNA合成における添加したdATPとATP濃度との関係。
 ○—○, ATP, 5 mM ; ●—●, 1 mM ; ●—●, 100 μM ; ○—○, 0.

表2. ジギトニン処理透過性細胞のDNA合成に及ぼすアフィディコリンの濃度変化の影響

アフィディコリン(μg/ml)	DNA合成活性(%)
0	100
0.1	95
0.2	84
0.5	60
1	44
5	32
10	9
20	5

3) Arabinosyl-cytidine triphosphate(ara CTP) : ara CTP は一般に DNA 合成の阻害剤であるが, この系の DNA 合成は ara CTP (0.6mM) によって高度に (85%) 阻害される (表1).

4) アドリアマイシン (adriamycin) : アドリアマイシンは世界で最も広く使用されている制癌剤の一種である. この系の DNA 合成はア

ドリアマイシンの添加で強く阻害される (図6a). 10 μg/ml で強く(80%) 阻害され, 100 μg/ml

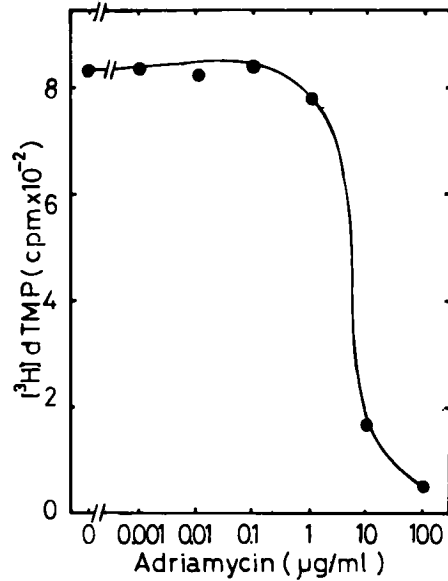


図6a. 制癌剤アドリアマイシン濃度変化によるジギトニン処理透過性細胞のDNA合成阻害.

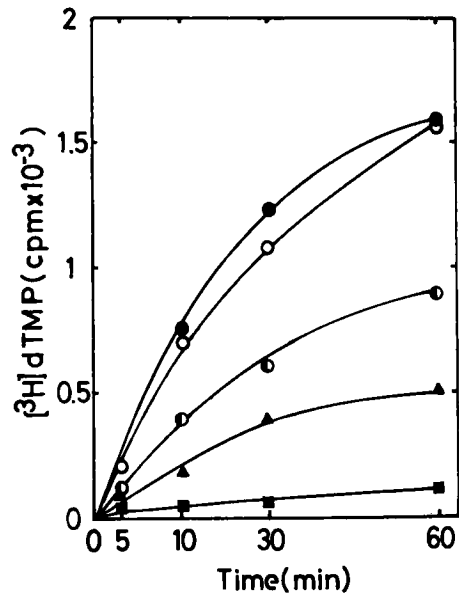


図6b. DNA合成におけるアドリアマイシンの種々の濃度と反応時間.

○—○, アドリアマイシン (0);
 ●—●, 1 μg/ml ; ●—●, 5 μg;
 △—△ 10 μg ; ■—■, 50 μg

でほとんど完全に (96%) 阻害された。図 6 b はアドリアマイシンの種々な濃度 (それぞれ, 0, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) における DNA 合成量の時間的経過を示す。

1 $\mu\text{g/ml}$ ではほとんど阻害が認められないが 5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ では濃度に応じて強い阻害が認められ, 50 $\mu\text{g/ml}$ ではほとんど完全に阻害される。アドリアマイシンは反応のはじめに加えておいても, また反応の進行途中に添加しても直ちに阻害がかかる。(図 6 c)。したがってこの系は

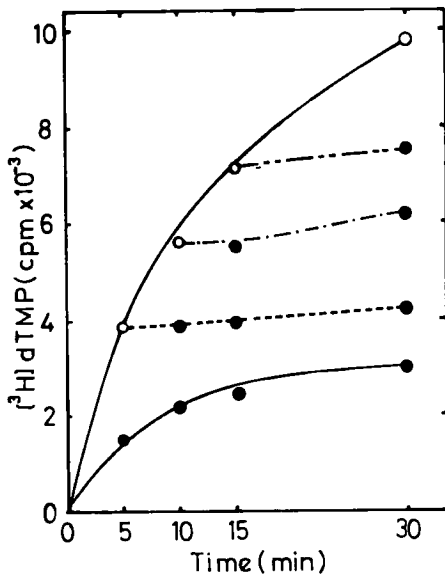


図6c DNA 合成反応進行過程におけるアドリアマイシン添加の影響
○—○, アドリアマイシン, 0;
●—●, アドリアマイシン10 $\mu\text{g/ml}$ 反応開始時添加; ●---●, 5分間反応後添加; ●···●, 10分間反応後添加; ●—●, 15分間反応後添加

アドリアマイシンなどの抗癌剤による DNA 合成阻害作用を *in vitro* で調べる上に有用である。

考 察

生細胞では DNA 合成の直接の基質であるデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) やその前駆体のヌクレオチドは細胞膜を通過し得ないので, 一般にリン酸の結合していない前駆体デオキシリボヌクレオシド (dN) の一種の標

識化合物 [^3H] チミジンを前駆体基質として添加し, その酸 (TCA) 不溶性分画へのとりこみ, すなわち DNA へのとりこみを測定して, *in vivo* の DNA 合成が調べられている。しかし, 生細胞では DNA 合成の反応過程の解析が難しい。SV40 クロマチン DNA の *in vitro* 合成は一般に分離核やその抽出物で行われているが, 効率のよい DNA 合成には細胞質抽出物の添加が必要である³⁾。最近, 生細胞の *in vivo* 合成を反映し, しかも DNA 合成の直接の基質であるデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) を基質として真核細胞の *in vitro* DNA 合成を研究するために, 種々な方法で細胞を処理して, 細胞膜を基質 (ヌクレオチド) 透過性にした permeable cell 系が利用されている^{4,14-17)}。透過性細胞の調製法として, 2-メルカプトエタノールでの低温処理, 種々なデターゼント, 低張, 高張, ジエチルアミノエチル・デキストラン, およびリゾレチンなどによる処理が行なわれている^{4,14-17)}。しかし, これらの処理の中, 温和なものは基質は透過しても高分子は透過し得なかったり, デターゼント処理では, 細胞膜のみならず細胞内膜系が障害され, 細胞や核の著しい腫大を来し, ミトコンドリアの酸化的リン酸化も障害されて, ATP再生系の添加が必要となる。私共は低濃度のジギトニン処理透過性細胞が真核細胞のクロマチン DNA の *in vitro* 複製やミトコンドリアの酸化的リン酸化の研究に極めて有用であることを見出した^{4,9)}。ジギトニンはステロイド・グリコシドの一種で, コレステロールその他の β -ヒドロキシ・ステロイドに特異的に結合する⁵⁾。細胞膜のコレステロール対リン脂質の分子比は他の内膜系よりはるかに高いので⁶⁾, 低濃度のジギトニン処理によって, 細胞膜を選択的に透過性にし, 他の内膜系を比較的無傷に保つことができる。そのことは本研究における電子顕微鏡的超微構造の観察によって裏付けられた。そして本実験系では細胞質抽出物や ATP 再生系を添加しなくても効率のよい DNA 合成が行なわれることを示した。さらに本実験系では外から添加したフェリチンのような生体高分子が細胞質内のみならず, 核内にも侵入することが電子顕微鏡的に証明され

るので(未発表), 種々な DNA 合成基質, 前駆体のみならず, 抗原や抗体その他の蛋白質の添加によって, クロマチン DNA の *in vitro* 合成制御を解析することができる。

SV40 感染細胞の Hirt 上清分画の DNA が大部分 SV40 DNA であることは一般的常識であり¹⁰⁾, 本実験系における SV40 感染透過性細胞の DNA 合成の80~90%が Hirt 上清に回収されることは, 本実験系における DNA 合成の大部分が SV40 DNA 合成によるものであることを示している。Hirt 上清より精製した DNA を1.4%アガロースゲル電気泳動し, エチジウムブロマイド染色すると, SV40 DNA-I 型, II 型および複製中間体が観察される⁴⁾。また [α -³²P] d CTP を基質として合成された DNA のアガロースゲル電気泳動のオートラジオグラフィーの時間的経過の観察によって, SV40 DNA 複製中間体, II 型, および I 型 DNA の生成が証明されている⁴⁾。したがって, このジギトニン処理透過性細胞は真核細胞におけるクロマチン DNA の *in vitro* 複製の研究に極めて有用な実験系として役立つものと考えられる。

要 約

真核細胞におけるクロマチン DNA の複製とその調節機構を研究するために, SV40 感染細胞を低濃度のジギトニン処理し, 基質透過性とした細胞 (permeable cell) の超微構造と同細胞内における SV40 クロマチン DNA 複製系の諸条件を検討し, 基質要求性と阻害剤や制癌剤の影響を解析した。その結果, ①至適なジギトニン濃度 (100~150 μ g/ml), 処理温度 (25°C), 塩濃度 (50~100 μ M KCl), 蔗糖濃度 (0.1 ~

0.15M), Mg^{2+} 濃度 (5~7 mM), 反応温度 (30~37°C) などの基礎的諸条件を決定した。

②このジギトニン処理透過性細胞は超微構造的に細胞膜は障害されているが, 他の内膜系や核クロマチンは比較的よく保たれている。③この透過性細胞系では, 細胞質抽出液を加えなくても, 基質としての4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸(d ATP, d CTP, d GTP, 各0.1mM, d TTP, 0.01mM) の他, ATP (2~5 mM) と Mg^{2+} (5 mM) の添加で効率のよい DNA 合成が行なわれる。④EDTA, NEM, アフィディコリン, ara CTP で DNA 合成がほとんど完全に阻害され, dd TTP では全く阻害されない。この系の DNA 合成は複製的 DNA 合成である。⑤アドリアマイシンなどの制癌剤で SV40 DNA の複製が直ちに強く阻害されることを見出した。

したがって, 本実験系は真核細胞におけるクロマチン DNA の *in vitro* 複製の研究のみならず, アドリアマイシンなどの DNA 合成阻害制癌剤の作用を調べる上に極めて有用な実験系として役立つものと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み, 御懇篤な御指導と御校閲を賜わった恩師田辺剛造教授ならびに小田琢三教授に深甚の謝意を表します。また, 本実験の遂行にあたり, 終始親切な御援助をいただいた癌研生化学部渡辺断子助手および御協力をいただいた研究室の諸氏に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は, 昭和56年10月第40回日本癌学会総会において発表した。

文 献

1. 小田琢三: SV40 クロマチンの構造と機能, 生物物理 20, 163—173, 1980.
2. 小田琢三: SV40 クロマチンの構造と複製および転写, 生化学 53, 585, 1981.
3. De Pamphilis, M.L. and Wasserman, P.M.: Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 627—666, 1980.
4. Oda, T., Watanabe, S., Hanakawa, S. and Nakamura, T.: Complete *in vitro* DNA replication of SV40 chromatin in digitonin-treated permeable cells. *Acta Med. Okayama* 34, 409—413, 1980.
5. Scallen, T.J. and Dietert, S.E.: The quantitative retention of cholesterol in mouse liver prepared for

- electron microscopy by fixation in a digitonin-containing aldehyde solution. *J. Cell Biol.* **40**, 802—813, 1969.
6. Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignais, P.A.: Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 462—492, 1971.
 7. Fiskum, G., Craig, S.W., Decher, G.L. and Lehninger, A.L.: The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3430—3434, 1980.
 8. 渡辺晰子: SV40クロマチンの分子形態とその機能的変化, 岡山医学会雑誌 **92**, 923—941, 1980.
 9. 茂原嗣也, 渡辺晰子, 小田琢三: ジギトニン処理 permeable 腹水肉腫細胞におけるミトコンドリアの酸化的リン酸化, 生化学 **53**, 750, 1981.
 10. Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture. *J. Mol. Biol.* **26**, 365—369, 1967.
 11. Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y.: Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* **275**, 475—460, 1978.
 12. Edenberg, H.J., Anderson, S. and De Pamphilis, M.L.: Involvement of DNA polymerase α in simian virus 40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* **253**, 3273—3280, 1978.
 13. Waqar, M.A., Evans, M.J. and Huberman, J.A.: Effect of 2', 3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate on HeLa cell in vitro DNA synthesis— Evidence that DNA polymerase-alpha is only polymerase required for cellular DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **5**, 1933—1946, 1978.
 14. Berger, N.A. and Johnson, E.S.: DNA synthesis in permeablized mouse L cells. *Biochim. Biophys. Acta* **425**, 1—17, 1976.
 15. Seki, S. and Oda, T.: DNA synthesis in permeable mouse ascites sarcoma cells. *Cancer Res.* **37**, 137—144, 1977.
 16. Seki, S. and Oda, T.: DNA synthesis in detergent-treated mouse ascites sarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **476**, 24—31, 1977.
 17. Miller, M.R., Castellot, J.J. Jr. and Pardee, A.B.: A permeable animal cell preparation for studying macromolecular synthesis. DNA synthesis and the role of deoxyribonucleotides in S phase initiation. *Biochemistry* **17**, 1073—1080, 1978.

**Analysis of DNA replication of SV40 chromatin in
digitonin-treated permeable cells**

Shiro HANAKAWA

Department of Orthopedic surgery (Director: Prof. G. Tanabe)

and Department of Biochemistry, Cancer Institute (Director: Prof. T. Oda),

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

The ultrastructure of digitonin-treated permeable cells and various conditions for DNA replication of SV40 chromatin as well as the requirements for and inhibitors of DNA synthesis were analyzed. Electron microscopy of the permeable cells revealed that the plasma membrane was injured but inner membranes and nuclear chromatin remained relatively intact. Efficient DNA replication of SV40 chromatin in the present system requires the addition of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ATP and Mg^{2+} . Complete replication of SV40 chromatin DNA occurs without addition of cytosol. The DNA synthesis is almost completely inhibited by ethylenediamin-tetraacetic acid, N-ethylmaleimide, aphidicolin, and arabinosyl-cytidine triphosphate but not by 2', 3'-dideoxythymidine -5'-triphosphate, showing that the DNA synthesis is replicative. Adriamycin strongly inhibits the DNA replication, and the addition of adriamycin in the process of reaction immediately stops the DNA replication. Thus, the digitonin-treated permeable cell system serves as a useful system for studying *in vitro* replication of chromatin DNA in eukaryotic cells as well as for studying the *in vitro* action of adriamycin and other antitumor drugs which inhibit DNA replication.