

| | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title | REGULATION OF DNA SYNTHESIS IN THE LIVER OF TUMOR-BEARING RAT |
| Author(s) | Harada, Nobuyuki |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | ETD |
| URL | http://hdl.handle.net/11094/24439 |
| DOI | |
| rights | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

| | |
|---------|--------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 原 田 登 之 |
| 学位の種類 | 理 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 5 1 8 9 号 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 56 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科 生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | 担癌ラット肝におけるDNA合成の制御 |
| 論文審査委員 | (主査) 教 授 藤井 節郎 (副査) 教 授 堀尾 武一 教 授 中川 八郎 |

論 文 内 容 の 要 旨

当研究室において従来担癌動物におけるDNA合成系酵素活性の変動について検討され、担癌動物の肝臓においてDNA合成系酵素(チミジンキナーゼ, dTMPキナーゼ, DNAポリメラーゼ)活性の上昇が認められ報告されている。この担癌肝におけるこれらの酵素活性の上昇は癌由来の物質によって引き起こされる現象であることが予想され、この物質の癌細胞(吉田肉腫)より部分精製を試みた。すなわち吉田肉腫の粗抽出液を硫酸分画, DEAEセルロース及びセファデックスG-200のゲル濾過により部分精製した本因子を正常マウスの腹腔に投与することによりマウスの肝臓のチミジンキナーゼ活性を上昇させる。また, チミジンキナーゼだけでなく, dTMPシンターゼ, dCMPデアミナーゼ, rNDPリダクターゼ, CTPシンセターゼ及びDNAポリメラーゼの活性も上昇させることが認められた。この酵素活性の上昇はアクチノマイシンD投与により抑えられることより, 本因子はマウスの肝臓においてDNA合成系酵素の生合成を促進していると考えられる。また, ラット肝再生時に本因子を腹腔に投与すると, チミジンキナーゼ活性が対照に比べ2~3倍上昇し, さらに酵素活性が最大になる時間が本因子により早められることが明らかになった。これらの結果より本因子がDNA合成を促進していると考えられる。また, 本因子の性質としては熱に不安定で高分子の物質であることがわかった。次に本因子のアッセイ系として, 従来マウスの腹腔に投与するというin vivoでのアッセイ系であったが, 本因子が種々のDNA合成系酵素を上昇させていることから, 培養細胞を用いたアッセイ系について検討を行った。細胞株はBHK-21/クローン13細胞(シリアンハムスター仔腎由来細胞), HEL細胞(人胎児肺由来線維芽細胞), スイスマウス3T3細胞(マウス線維芽細胞)の3種を用い, また, 本因子の精製は癌細胞を破碎し超遠心後の上清を0~60%の硫酸沈澱させ, DEAE

Eセルロースカラムにかけ段階的溶出法で調製した。癌細胞として吉田肉腫及び AH-130腫瘍細胞を用いて比較検討した。まず BHK細胞において吉田肉腫及び AH-130腫瘍細胞より得られる DEAEセルロースカラムより 0.2MNaClで溶出される分画 (DE-F₂) に細胞数を増加させる活性が認められた。HEL細胞及び 3T3細胞を用いたアッセイ系においても BHK細胞のアッセイ系で得られた結果と同様であった。この3種のアッセイ系において、吉田肉腫より得られた分画よりも AH-130腫瘍細胞より得られた分画に高い活性が認められ、3T3細胞でのアッセイ系が最も感受性が高く感度が優れていることが判明した。そこでこの3T3細胞を用いたアッセイ系により本因子の精製を検討した。まず硫酸沈澱を DEAEセルロースカラムにかけ濃度勾配法により溶出させると、0.19MNaClに相当する分画に細胞数を増加させる活性が溶出され、さらにセファローズ 4Bによるゲル濾過では分子量約90万のところに活性が溶出された。また本因子は熱処理 (100℃, 1分) で失活する。以上の成績より本因子は従来報告されている成長因子とは性質が異なる物質であり、熱に不安定な高分子物質であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

癌と宿主の関係を明らかにすることは癌の実体を知る上で極めて重要なことである。担癌動物の肝臓において DNA合成系酵素の活性が上昇してくることはすでに報告されており、この現象は癌由来の物質により引き起こされていることは、トキソホルモンという概念から種々説明されてきている。

原田君は吉田肉腫担癌ラットを用い、この担癌動物の肝臓で DNA合成系酵素の活性を上昇させる機構を明らかにし、更にその癌細胞の粗抽出液を正常マウスに投与すると肝の DNA合成が上昇し担癌状態と同様の現象が認められたので本因子の精製を行った。本因子のアッセイ法として正常マウスの腹腔に精製段階の各分画を投与した後その肝臓で DNA合成系酵素の一つであるチミジンキナーゼの活性を測定するという *in vivo* のアッセイ法を用いて、吉田肉腫細胞より粗抽出液、0-60%硫酸沈澱、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー及び Sephadex G-200によるゲル濾過により、精製を行い、本因子が高分子量のタンパク質様物質であることを明らかにした。更に本因子は細胞分裂に先がけて上昇してくるピリミジンヌクレオチド合成系酵素の活性をも上昇させる作用を有しているので、細胞増殖に対する促進効果の検討を行った。3種類の株化された細胞種 (BHK: Baby hamster kidney cells, HEL: Human embryonic lung cell, 3T3: Swiss albino 3T3 cells) を用い、癌細胞として吉田肉腫と AH-130細胞を用いて検討した。吉田肉腫及び AH-130癌細胞より得られる DEAEセルロースカラム分画において *in vivo* のアッセイ系で効果の見られた分画と同じ分画に3種の細胞いずれに対しても増殖促進効果があることが明らかになり、また AH-130細胞より得られる分画には吉田肉腫のそれより細胞増殖促進効果が顕著であり、用いた3種類の培養細胞では3T3細胞を用いたアッセイ系が最も感度のよいことが判明した。それ故3T3細胞の系を用い、AH-130細胞の因子の性質を調べてみると、分子量約90万、熱に不安定なタンパク質様物質であるこ

とが明らかになった。本因子の性質は従来報告されている癌細胞由来の細胞増殖因子と異なり、新しい種類の増殖因子の可能性が考えられる。

以上のように原田君の研究は、担癌動物の肝臓におけるDNA合成促進という現象を解析し、また細胞増殖の制御という点まで研究を進めたもので今後のこの分野における研究発展に寄与するところ大である。よって同君の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと判定する。