



Title	Tetrahymenaの増殖とアドレナリン作動性機構
Author(s)	仮家, 公夫
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30921
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	仮 ^{かり} 家 ^や 公 ^{きみ} 夫 ^お
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 2901 号
学位授与の日付	昭和 48 年 8 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Tetrahymena の増殖とアドレナリン作動性機構
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 上原喜八郎 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

緒 論

古くから細胞周期は大きく静止期と分裂期に分けられていたが、1950年代に入ってから DNA 合成が静止期の一部で行なわれていることから、その時期を S 期、そして分裂期との間にできた間隙は各 G_1 および G_2 期に分けられるようになった。また自然界の細胞には増殖性・非増殖性のものがあり、これらの細胞が細胞周期のいかなる時期に、いかなる因子により制御を受けているのかということを解明することは生物学上重要な問題である。

細胞増殖とアドレナリン (Ad) 作動性機構の関係については、Ad が正常細胞の分裂を抑制することから諸家の注目を浴びていた。そして種々の研究がなされてきたが未だその役割については解明されていない。

一方、原生動物 *Tetrahymena pyriformis* W. (T.p) は Ad および noradrenaline (Norad) を含有し哺乳動物と同様に活性アミンの生合成過程を有している数少い微生物の一つであることが知られている。またこの原生動物は温度刺激により同調培養が可能な系である。したがって上記の細胞増殖における Ad 作動性機構の役割を細胞レベルで解明するための有用な場をこれに求めることができる。

このようなことから著者は T.p に存在する Ad 作動性機構と増殖との関係について検討すべく以下一連の実験に着手した。

第 1 章 *Tetrahymena* の増殖にたいするアドレナリン作動性機構に作用する薬物の影響

T.p に活性アミンが存在していることから、哺乳動物において Ad 作動性機構に作用する種々の薬物を用い、T.p の増殖にたいする影響について検討した。

この原生動物を72時間各種薬物を含む培地で培養すると、その増殖は dibenamine, ergotamine 添加により促進された。しかし DCI, propranolol, chlorpromazine, nardil, catron, reserpine などでは抑制された。さらに Coulter size distribution plotter を用いた実験においても同様の結果を得た。

このような結果は Ad 作動性機構が複雑に T.p の増殖に関与していることを示唆するものである。

第Ⅱ章 Tetrahymena の catecholamine 含量ならびに adrenaline, noradrenaline に対する感受性について

培養細胞は exponential growth phase (対数増殖期) と stationary growth phase (定常増殖期) に大別される。そしてこれらの各増殖期における細胞内物質代謝はかなり異なっており、代謝物質含量および薬物にたいする感受性も各増殖期において違っていると推定されるので、catecholamine (CA) 含量および Ad ならびに Norad にたいする感受性について T.p の増殖を指標にして検討した。

T.p 中の CA 含量は対数増殖初期の細胞では $0.39\mu\text{g}/10^8\text{cells}$ であったが、定常増殖期のものでは $0.02\mu\text{g}/10^8\text{cells}$ に減少していた。また対数増殖期の T.p を $10^{-3}\sim 10^{-5}\text{M}$ の Ad あるいは Norad を含む培地で培養するとその増殖はやや促進されたが、同様に定常増殖期のものでは $10^{-3}\sim 10^{-7}\text{M}$ の濃度で抑制された。この作用は Norad よりも Ad の方が強くあらわれた。

これらの事実から CA がその増殖と密接な関係を有しているものと考えられる。

第Ⅲ章 Tetrahymena における酸化的脱アミノ系について

T.p においては哺乳動物におけると同様に Ad, Norad の前駆体である phenylalanine, tyrosine が CA に取り込まれていくことが見い出されている。また哺乳動物においては酸化的脱アミノ過程を経てこれら活性アミンが不活性化されることから、原生動物における酸化的脱アミノ系について検討した。

酸化的脱アミノ系に存在する酵素系のその反応における至適 PH は Norad を基質にした場合 7.4 で、基質特異性は Norad, normetanephrine, tyramine, Ad, 5-hydroxytryptamine そして benzylamine の順に強かった。一方 histamine を分解する diamine oxidase (DAO) 活性をも有することをみとめた。また阻害剤による影響ではモノアミンを基質にした時には monoamine oxidase (MAO) 阻害剤により、ジアミンを基質にした時は DAO 阻害剤のみによりそれらの分解活性は抑制された。

すなわち、T.p に存在する酸化的脱アミノ過程には哺乳動物と同様に MAO 型および DAO 型の 2 つが存在していることが明らかになった。さらに一般的に微生物において見い出されている MAO は培地にモノアミンを添加した時にみられる適応酵素であるが、この原生動物の培地にはとくにモノアミンを添加していないのでその存在意義を全く異にするものと考えられる。

第Ⅳ章 Tetrahymena の増殖と monoamine oxidase 活性について

T.p の Ad 作動性機構がその増殖と密接に関係しているならば、この機構に関与する MAO の活性は、その増殖期あるいは細胞周期の間において変動すると考えられる。そこで増殖培養あるいは同調培養下における MAO 活性の変動について検討した。

増殖培養下における MAO 活性は対数増殖期において減少し、定常増殖期の細胞では上昇した。他

の微生物に存在する MAO 活性は対数増殖期には上昇し、定常増殖期には減少することからも T.p の MAO は全く異った役割をしていることは明らかである。

また同調培養下においてはこの酵素の活性はM期およびS期において減少していた。さらにこの同調培養細胞に同調化終了直後に Ad を添加した場合 MAO 活性は添加直後より上昇した。

このようなことから、T.p の Ad 作動性機構がその増殖において何らかの役割をしていることが考えられる。そこで細胞周期と Ad 作動性機構との関係について知るべく以下の実験を行なった。

第V章 Tetrahymena の核酸および蛋白質の含量ならびにそれらの合成にたいする adrenaline の影響について

前章までに明らかにした結果から、この章では同調培養細胞を用い、Ad 作動性機構が細胞周期のいかなる時期に関与しうのかを知る目的で、Ad を用いて核酸および蛋白質含量への影響について検討した。ついで核酸および蛋白質の放射活性前駆体の細胞への取り込みにたいする Ad の影響を、catron および DL-dihydroxyphenylalanine を対照に用いて実験を行なった。

T.p の同調培養系において、同調化終了直後(S末期)に Ad を添加すると、細胞分裂後の DNA 含量の増加はみられなかった。また添加後から RNA、蛋白質含量は細胞分裂を行なうまでの間の時期において減少していた。さらに顕微鏡による観察では Ad 添加により細胞の分裂の抑制がみられた。一方核酸および蛋白質の放射活性前駆体を用いた実験から、Ad 作動性機構に作用する薬物はG₁後期およびG₂期の RNA および蛋白質合成を阻害することが明らかになった。

このような結果は T.p の増殖はその細胞周期において Ad 作動性機構により1つはS期への導入に関与するG₁期における RNA および蛋白質合成が、そしてもう1つはG₂期における分裂装置に関連する RNA および蛋白質合成が制御されていることを示唆している。

第VI章 Tetrahymena の cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 系とその増殖

Cyclic adenocine 3', 5'-monophosphate (cAMP) は多くのホルモン作用の mediator として考えられており、細胞増殖との関係についても多くの報告がある。一方 T.p における cAMP 系については cAMP phosphodiesterase および adenylylase 活性が存在しているが cAMP それ自身の存在は確認されていない。また前章までにのべてきたようにこの原生動物の Ad 作動性機構がその増殖を抑制していることが明らかになったので、このものの cAMP の確認およびその含量について、さらに増殖における cAMP 系の役割について検討した。

T.p の cAMP を薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認した。その含量は対数増殖期に約50 p mols/10⁶ cells であったが、定常増殖期にはほぼ $\frac{1}{3}$ 程度に減少していた。また、対数あるいは定常増殖期にある T.p を dibutyryl-cAMP (Bt₂-cAMP) を含む培地で培養するとその増殖は10⁻⁴M以上の濃度で阻害された。しかし cAMP では著明な変化はみられなかった。また対照に用いた methyl-xanthines ではいずれの細胞の増殖をも10⁻³以上の濃度で抑制した。一方同調培養下における核酸および蛋白質の放射活性前駆体の取り込みに対する Bt₂-cAMP の影響を検討したところ、Bt₂-cAMP によりG₁期の蛋白質および RNA 合成を阻止した。

このような結果は fibroblast 細胞を用いて検討された結果と同様に cAMP 系が細胞増殖においてG₁期からS期への導入に重要な役割をはたしていることを示したものと考えられる。

結 論

細胞増殖における Ad 作動性機構の役割について、CA を有する原生動物 T.p を用いて哺乳動物において Ad 作動性機構に作用する薬物の増殖への影響について検討したところ、dibenzamine および ergotamine はその増殖を促進するが、chlorpromazine, DCI, Nardil および reserpine により抑制されることが明らかになった。また T.p の CA 含量は、対数増殖期の初期において高く、増殖が進むにつれて減少した。これに関連して exogenous CA にたいする T.p の感受性について、その増殖を指標に検討したところ、対数増殖期の T.p を Ad あるいは Norad を含む培地で培養するとその増殖はやや促進された。しかし定常増殖期の細胞では抑制を受けた。

この原生動物には CA の生合成過程が存在することが知られているが、著者はこの細胞に CA の酸化的脱アミノ分解過程が存在することを明らかにした。そして酸化的脱アミノ系には哺乳動物に存在するものと同じような MAO および DAO を含むことを認めた。また MAO 活性は増殖培養下において、対数増殖期の細胞では減少し、定常増殖期のものでは上昇すること、さらに他の微生物において認められている MAO は適応酵素であるが T.p のものはそのような酵素ではないことを認めた。また同調培養下においては、この酵素活性が M 期および S 期において減少することを明らかにした。

このようなことから T.p における Ad 作動性機構がその増殖と密接に関係していることが明らかになったので、同調培養系を用い、この機構が細胞周期のいかなる時期に作用するか検討したところ、G₁ 期および G₂ 期において関与しうることが判明した。

また、哺乳動物で多くのホルモンの第 2 の伝達物質と考えられている cAMP が T.p にも存在することを TLC を用いて確認した。また cAMP の含量が対数増殖期に高く、増殖が進むにつれて減少していくことが判明した。Bt₂-cAMP あるいは cAMP を含む培地で対数あるいは定常増殖期の細胞を培養すると、いずれの細胞においても Bt₂-cAMP は増殖を抑制した。しかし cAMP では何ら影響はみられなかった。また同調培養系において検討した結果から、この cAMP 系は G₁ 期においてのみ作用していることがみられた。

以上ここで得られた結果は、T.p の増殖が Ad 作動性機構により G₁ 期の S 期への導入に関与する因子を、さらに G₂ 期における分裂装置系を介してその増殖を制御している可能性を示したものである。

論文の審査結果の要旨

本論文はアドレナリン等の活性アミン代謝系を有している数少ない微生物のひとつである原生動物 Tetrahymena の増殖が、アドレナリン作動性機構により G₁ 期における S 期への導入に関与する因子と、G₂ 期における分裂装置系を介して制御されている可能性を示したもので、薬学博士の学位を授与する価値のあるものである。