The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	癌細胞の核小体DNA中に存在する反復配列DNAに関する研究
Author(s)	敷地, 宏一
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31954
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

【24】

氏名・(本籍)	敷地宏一（しきち こういち）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4152 号
学位授与の日付	昭和53年2月22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	**癌細胞の核小体ＤＮＡ中に存在する反復配列ＤＮＡに関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 天野 恒久　教授 大久保舜三

論文内容の要旨

〔目　的〕

高等生物のＤＮＡの中には，ゲノム当り１個の遺伝子から，数百個におよぶものまである。最近，このようなＲＮＡとして転写される遺伝子以外に，非常に単純な塩基配列が何万回となく反復しているＤＮＡの存在が注目されて来たが，その生理的意義に関しては不明である。マウスの細胞核のDNAにも，反復配列ＤＮＡが約10%存在し，その浮遊密度は1.691 g/cm^{3}であって，他の大部分のDNAの1.700g/cm^{3}よりは軽く，比較的容易に検出することが出来る。核小体ＤＮＡの場合，この反復配列ＤＮＡの含量は更に高く，マウス肝では，30%以上にも達する。我々は核小体ＤＮＡ上のリボソーム遺伝子の研究中に，癌細胞と正常肝の核小体では，この反復配列ＤＮＡの含量に差のあることに気附いたので，種々の腫瘍細胞で共通してみられる傾向であるのかを調べ，次に核小体ＤＮＡ上でこの反復配列ＤＮＡの分布の仕方に若干の検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

ddY系のマウス，およびC3H/He系のマウスの雄，５－７週令のものを用いた。エールリッヒ腹水癌細胞（hyperdiploid株とhypotetraploid株），肉腫180，Ａ－４腹水腫瘍はddYマウスの腹腔内で，マウス肝癌由来のMH—134はC3H/Heの腹腔内で，夫々継代移植を行い，移植後７－８日目の腫瘍細胞を用ちいた。これらの細胞より単離した核を超音波処理で破砕し，核小体を分離した。核小体をプロテアーゼ処理後，SDS-フエノール法でDNAを抽出し，更にRNase，次いで，再びプロテアーゼで精製後エタノール沈澱，0.1×SSCで透析したDNA標品をCsCl平衡密度勾配遠心法により分析し，反復配列のDNAの百分率を求めた。

核小体DNAを二本鎖のままCsCl法で分析すると反復配列DNAの分離が完全でないので若干の工夫を加えた。すなわち，一旦，DNAを熱処理し，1本鎖とした後，反復配列DNAは一定条件下では非常に速く二本鎖に再構成され易い特性を利用し，非反復DNAとの分離を良くした。通常は日立製，固定角40Rローターで33,000rpm（25℃），40時間遠心後，分画化したが，同じ試料をベックマン分析用超遠心機（UVスキャンニング装置附）でも解析し，我々の方法が，充分に，定量性のあることを確認した。

①核小体DNA中の反復配列DNAの百分率はマウス肝（ddY）…37.2%，エールリッヒ癌細胞の2N株……20.4%，4N株……18.2%，A—4腹水腫瘍細胞……10.6%，マウス肉腫—180……24.8%，であり更にC3H/Heのマウス肝……31.4%，肝癌由来のMH—134……15.6%であった。我々が調べた腫瘍細胞の核小体DNAでは，共通して反復配列DNAの含有率は，正常肝より低く約½の値を示した。

②次に上記の差異が人為的なものか，どうかを調べる為に次の諸点を検討した。

a）エールリッヒ腹水癌細胞より核小体DNAを得る場合，移植後の日数を変えて，増殖率の反腹配列DNA含有率への影響。

b）核および核小体を分離する時の二価陽イオンの影響（$CaCl_2$と$MgCl_2$の比較）。

c）核の精製法として低張液処理，および界面活性剤を用いた方法と，従来のChaveau法（高濃度の蔗糖を用ちいる）との比較。

d）異なった分子量のDNAでの比較。

e）核小体にも存在するCa^{++}およびMg^{++}イオン依存性のDNaseの影響。

これらの要因により，癌細胞と正常細胞の核小体の間にみられた反復配列DNAの含有率の差が現われたのではないことが分った。

③次に核小体DNA上で反復配列DNAとリボソーム遺伝子がどのように分布しているかを

a）CsCl法による浮遊密度の差による分面法。

b）核小体DNAを1本鎖にした後，2本鎖DNAに再構成される反応速度の差により，ハイドロキシアパタイトのカラムでDNAを分画化する。

この二つの方法で検討した結果，反復配列DNAは集団をなして存在し，その中にリボソーム遺伝子が含まれるということはないが，リボソーム遺伝子に近接した部分に反復配列DNAが存在することが分った。従って反復配列のDNAの含有率の差異がリボソーム遺伝子の転写に何らかの影響を及ぼす可能性も考えられる。

〔総　括〕

① 単純な塩基配列が高度に反復しているDNAの核小体DNAにおける含有率は，マウス肝と比べ，癌細胞（5種類）では全て低く，約½しか存在しなかった。

② 癌細胞移植後の時期，核小体の調整法，DNAの分子量，DNaseなどの要因を検討した結果この含有率の差は，人為的なものとは考えられない。

③ 核小体DNA上で，少なくとも反復配列DNAの一部は，リボソーム遺伝子に近接して存在してい

ることが分った。

論文の審査結果の要旨

本論文は数種のマウス癌細胞で共通して反復配列DNAが少ないこと，及び，このDNAがリボソーム遺伝子に近接して存在することの二つのオリジナルな知見を示し，これまでその生理的意義の全く分らなかった反復配列ＤＮＡの役割を知る手がかりを与えた点は細胞生物学的にも高く評価されるものである。