

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31954">https://hdl.handle.net/11094/31954</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

[24]

氏名・(本籍)	敷 地 宏 一
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 1 5 2 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  $1.691 \text{ g/cm}^3$  であって、他の大部分の DNA の  $1.700 \text{ g/cm}^3$  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付いたので、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いた。これらの細胞より単離した核を超音波処理で破碎し、核小体を分離した。核小体をプロテアーゼ処理後、SDS-フェノール法で 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、 $0.1 \times \text{SSC}$  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。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、十分に、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 $\frac{1}{2}$ 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、増殖率の反復配列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<sub>2</sub>とMgCl<sub>2</sub>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<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>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画法。
- 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 $\frac{1}{2}$ 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。