



Title	発癌プロモーターをヒト肝癌培養細胞に作用させた時に誘導される分子量46,000の分泌蛋白について
Author(s)	米田, 悅啓
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34643
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	米	田	悦	啓
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6833	号	
学位授与の日付	昭和	60年	3月	25日
学位授与の要件	医学研究科	生理系専攻		
	学位規則	第5条第1項該当		
学位論文題目	発癌プロモーターをヒト肝癌培養細胞に作用させた時に誘導される分子量46,000の分泌蛋白について			
論文審査委員	(主査) 教 授 岡田 善雄			
	(副査) 教 授 内田 駿 教 授 谷口 維紹			

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

正常細胞が癌細胞へと変化する過程は複雑であって、多くのステップを必要とするものであると考えられている。これまで、マウスの皮膚を用いた実験系で、発癌過程が少なくとも2つの段階に区分できることが示され、発癌二段階説が提唱された。このうち二段階目を発癌プロモーションと呼び、この段階に作用する物質を発癌プロモーターと呼ぶ。発癌プロモーターにはそれ自身単独では発癌作用がないため、これを細胞に作用させた時に誘導されてくる変化は、発癌プロモーションの段階に限られたものと考えられ、複雑な発癌過程のある一段階だけを取り出して実験系に組みこむことが可能である。そこで、著者は、ヒト肝癌培養細胞の分泌する蛋白に注目し、発癌プロモーターのヒト細胞に及ぼす影響を検索する目的で本研究を行なった。

(方法ならびに成績)

- ヒト肝癌培養細胞に及ぼすTPAの効果：細胞はヒト肝癌培養細胞株であるHuH-6 Cl-5を用いた。SubconfluentのHuH-6 Cl-5細胞に対して、[³⁵S]methionineの存在下で、10ng/ml～10μg/mlの濃度になるようにTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)を培地に加えた。37°Cで6時間処理後、培地を集め、SDS電気泳動を行ない、分泌蛋白の解析を行なった。その結果、TPAで処理していないコントロールの細胞と比較して、TPAで処理した細胞から分泌されてくる蛋白の総量が増加するばかりでなく、分子量46,000の蛋白が新たに誘導してきた。この蛋白をp46と名づけ、以下の実験は、このp46に注目して行なった。
- TPA以外の発癌プロモーターの効果：p46が発癌プロモーターに特異的なものであるか否かを

調べるため、TPA以外の発癌プロモーターを作用させた。1)と同様な処理をし、電気泳動パターンを検索してみると、現在発癌プロモーター活性を持つと考えられている teleocidin, aplysiatoxin, debromoaplysiatoxin はすべて TPA と同様に p 46 の分泌を誘導した。一方、TPA の類似体であるが、発癌プロモーター活性を持たない phorbol や phorbol-13-acetate によっては全く誘導されなかった。つまり、p 46 は発癌プロモーターに特異的な分泌蛋白であると考えられる。

3) p 46 の性質の検討：1)と同様に、 $[^{35}\text{S}]$ methionine 存在下で TPA 処理を行なう時に、同時にアクチノマイシンDを加えて、mRNAが転写されるのを block しながら分泌蛋白をラベルした。その結果、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアクチノマイシンDが存在すれば、TPAによるp 46 の分泌は抑制された。TPAはある遺伝子の転写を促進することによって p 46 の分泌を誘導したことがわかる。次に、HuH-6 Cl-5 細胞株は、肝実質細胞由来であり、多くの血清蛋白を分泌していることが知られているので、p 46 が正常血清蛋白の 1 つである可能性を検討した。つまり、TPA 存在下でラベルされた分泌蛋白と、ウサギで作製した抗ヒト正常血清蛋白抗血清とを反応させ、免疫沈降してくる蛋白を SDS 電気泳動により解析した。2種類の異なる抗血清を用いて検索したが、p 46 はいずれの抗血清とも反応しなかった。このことから、p 46 は正常ヒト血清中には存在しない蛋白である可能性が示唆される。

4) Pulse-chase 実験：アクチノマイシンDを用いた実験から、p 46 は TPA によって degradation が誘引された結果生じてくる反応産物でないことが示されたが、これを更に確認するために、pulse-chase 実験を行なった。HuH-6 Cl-5 細胞に TPA を加えてから 4 時間後に $[^{35}\text{S}]$ methionine を加えて 2 時間 pulse ラベルを行なった。その後、培地を除去し、TPA 存在下で 4 時間及び 6 時間 chase した。コントロールの細胞は、TPA 非存在下で 2 時間 pulse ラベルした後、TPA 存在下で 4 時間及び 6 時間 chase した。p 46 はウサギの抗ヒト血清蛋白抗血清と反応しないことを利用し、結果をわかりやすくするため、この抗血清で免疫沈降してこない反応上清のみを SDS 電気泳動にかけた。その結果、TPA 存在下で chase したにもかかわらず、コントロールの細胞から p 46 の分泌はみられなかった。つまり、p 46 は TPA によって誘導された degradation 産物ではないことが確認できた。

(総括)

- 1) ヒト肝癌培養細胞株 HuH-6 Cl-5 に発癌プロモーターを作用させると、分子量 46,000 の蛋白が新しく誘導されてくることがわかった。
- 2) この蛋白の誘導は遺伝子転写のレベルでおこり、ヒト正常血清蛋白ではない可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、発癌プロモーターによるヒト体細胞の遺伝子発現の調節に及ぼす影響を調べる目的で、ヒト肝癌培養細胞株 HuH-6 Cl-5 を用い、分泌蛋白に注目して追求したものである。その結果、これまで発癌プロモーター活性をもつといわれている物質によって特異的に、分子量 46,000 の蛋白の分泌が誘導されることが明らかにされた。また、この蛋白は、ヒト正常血清蛋白ではない可能性が示唆された

ことは興味深いことで、この実験系を用いれば、未知の発癌プロモーターを容易に知ることができると考えられ、応用面でも価値あるものである。

よって、本論文は、学位論文に値すると認められる。