

養殖アマノリの疾病に関する研究V

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	加藤, 盛 渡辺, 凝
巻/号	38巻7号
掲載ページ	p. 693-697
発行年月	1972年7月

養殖アマノリの疾病に関する研究—V.

癌腫病罹病ノリの DNA について

加藤 盛・渡辺 競

(1972年2月21日受理)

Studies on the Diseases of Cultured *Porphyra*—V.On the DNA of Cancered *Porphyra* Cells

Sakari KATO* and Tuyoshi WATANABE**

The abnormal cell division in cancered *Porphyra* tissue was studied in respect to its DNA. The results obtained are as follows:

1) Base composition of DNA in *Porphyra* cells was characterized by a high content of guanine and cytosine, thus representing the DNA of G-C type.

2) Base composition, melting temperature and buoyant density of cancered and healthy cell DNA were not significantly different. These results suggest that the abnormal cell division in cancered *Porphyra* may not be caused by structural changes of DNA.

3) When the DNA content in the tissue was expressed on a dry weight basis, it was greater in the cancered tissue than the healthy tissue. On the other hand, microspectrophotometric analysis of cancered single cells revealed that the ultra-violet extinction at 260 m μ did not differ from that of healthy cells. Probably, the increase of DNA content in the cancered tissue might be due to increase in the number of cells per dry weight.

ノリの癌腫病は細胞の無秩序な分裂によつて起る病害である。発生要因としては前報¹⁾で報告した通り、呼吸系の不可逆的な損傷が重要である。

一方、細胞分裂を中心として本病を考える場合、最も重要な反応は DNA に関するものである。したがつて細胞の異常増殖面からは、本病の発生機構として第一に DNA の構造的な変化、またはその合成の制御面²⁾での変化を考える必要がある。細胞 DNA の構造変化は、発現する遺伝情報に質的、量的な変化を与え、また制御面での変化は無秩序な細胞増殖を可能とするものである。

癌腫病罹病葉での DNA 量の変化については、すでに藤山²⁾、片山・藤山ら³⁾の詳細な報告がみられ、発癌初期には組織または細胞当りで DNA 量が増大することが報告されている。またこの DNA の過剰生産が増殖組織形成の起源となることも報告されているが、DNA の構造的な面については全く言及されていない。

本報告では前報¹⁾に引き続き、ノリ癌腫病の発生機構の解明を目的とした実験の中、DNA の質的な面を中心に行なつた実験の結果を報告する。

実験材料および方法

材料: 1971年1月に宮城県塩釜湾の養殖ノリ (*Porphyra tenera*) に発生した癌腫病罹病葉を材料とした。対照葉としては癌腫病発生ノリヒビおよびその周辺のノリヒビ内の健全葉を用いた。罹病葉の病徴は前報¹⁾通りである。葉面積の80%以上に亘つて病徴を呈するもののみを選び出し、以下の実験材料とした。

* 東北大学農学部 (Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

** 宮城県水産試験場 (Miyagi Fisheries Experiment Station, Ishinomaki, Japan)

DNA の抽出: DNA の抽出, 精製は MARMUR 法⁴⁾を若干改変した方法によつた。すなわち saline-EDTA (0.15 M NaCl-0.1 M EDTA, pH 8.0) で充分洗滌した材料を細断, saline-EDTA に懸濁し, ガラスホモジナイザーで磨砕した。次いで磨砕液 25 ml 当り 2 ml の 25% SDS を加え, 60°C で 10 分間保温, 室温まで冷却後 5 M NaClO₄ を最終濃度 1 M になるように加えた。さらに等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1, v/v) を加え, 30 分間振盪した。振盪後 7,000×g, 5 分間遠心分離し, 3 層に分れたその上層のみをとり, 以下 MARMUR 法にしたがって操作し, 最後に RNase で処理して DNA を精製した。

DNA の塩基組成: DNA の塩基組成の分析は MARSHAK・VOGEL らの方法⁵⁾により, DNA を 70% HClO₄ で加水分解し, 炭化残留物を除いた上清を試料として, ペーパークロマトグラフィーによつて行なつた。ペーパークロマトグラフィーの方法は次の通りである。

使用用紙: 東洋用紙 No. 51, 3×40 cm. 一次元法

展開溶媒: メタノール・HCl・水 (70:20:10, v/v)⁶⁾

展開後, 紫外線によつてスポットの位置を検出した。各スポットを切り抜き, 0.01 N HCl で 24 時間抽出したのものについて紫外部の吸光度を測定, 塩基組成を算出した。

DNA の融解温度の測定: 融解温度 (T_m) の測定は紫外部吸収法⁷⁾によつて行なつた。恒温槽内液としては, エチレングリコールを使用し, セルは 1 cm セルを用いた。DNA 濃度は 20 μg/ml SSC (0.15 M NaCl・0.015 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) である。各温度における吸光度は水の体積膨脹に対して補正し, それを基準として 260 mμ における relative absorption を計算した。

DNA の浮上密度の測定: 浮上密度 (Buoyant density) は CsCl による平衡密度勾配分析法⁸⁾によつて測定した。精製した CsCl を SSC に溶解 (55.9%・w/w) したものを 2 ml と, DNA 溶液に同濃度に CsCl を加えたものを 1.5 ml を同一遠心管にとり, 36,000 rpm で 48 時間, 超遠心分離機 (日立 55 P・RPS 40 rotor 使用) で遠心分離を行なつた。終了後, 遠心管の底に小さな穴をあけ, そこから内容液を分け取り, 各分画について 260 mμ の波長で吸光度を測定した。分画数は 50 分画である。

DNA の定量: DNA の抽出は OGUR・ROSEN⁹⁾の方法により, 定量は BURTON の変法¹⁰⁾にしたがい, ジフェニルアミン反応によつた。

顕微分光測光法による罹病細胞の検討: 罹病葉片を石英製スライドガラス上にとり, 滅菌した河過海水を滴下し, 顕微分光光度計 (オリンパス製-A IV) によつて, 50 個の細胞の紫外線吸収を測定した。対照として健全葉片についても同様に測定した。使用ピンホール直径は 10 μ である。測定は細胞全体を単位として行なつた。

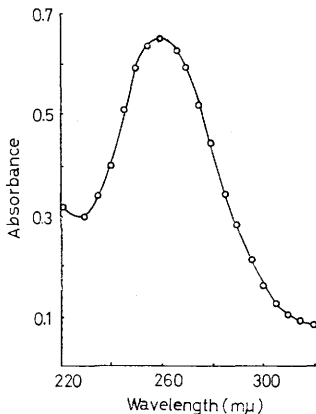


Fig. 1. Absorption curve of DNA isolated from *Porphyra* tissue.

結 果

DNA の紫外部吸収および塩基組成: ノリ細胞 DNA の紫外部吸収は典型的な核酸の吸収曲線となり, 260 mμ 付近で吸収の極大を, 230 mμ 付近に極小点をもつたスペクトルを与える (Fig. 1)。

また, その塩基組成は極めて特徴的で, ノリ DNA はグアニンとシトシンの多い, いわゆる G-C 型の DNA に属している。罹病葉からの DNA も同様であり, その塩基組成では健全葉の DNA とほとんど相違がみられなかつた (Table 1)。

DNA の融解温度: DNA 間の 2 次構造の相違は種々の方法で検知することができる。加熱による紫外部吸光度の増加の測定もその一つである。この

Table 1. Base composition of DNA isolated from healthy and cancered *Porphpra* tissues.

Isolated DNA	Molar ratios calculated to a total of 100				
	Adenine	Guanine	Cytosine	Thymine	A+T/G+C
DNA from healthy tissue	19.4	29.7	30.8	20.1	0.65
DNA from cancered tissue	19.7	29.5	30.8	20.0	0.66

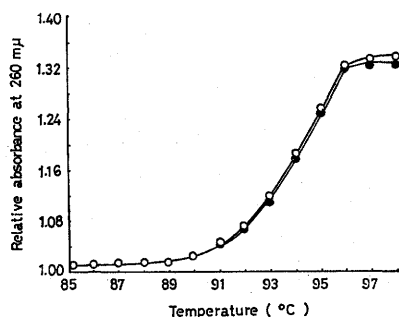


Fig. 2. Variation in absorbance (260 $m\mu$) as a function of the temperature of DNA solution.

The solvent was 0.15 M sodium chloride plus 0.015 M sodium citrate.

○—○: DNA isolated from healthy tissues.

●—●: DNA isolated from cancered tissues.

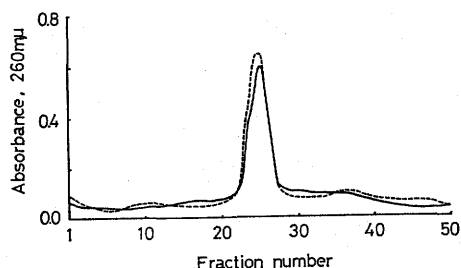


Fig. 3. Density gradient centrifugation in CsCl of DNA isolated from *Porphpra* tissues.

Centrifugation was run for 48 hr at 36,000 rpm in the RPS 40 rotor of Hitachi Model 55 P centrifuge at 25°C. The absorbance at 260 $m\mu$ was measured after the collection of fractions throughout the gradient. Density increase toward the left.

—: DNA isolated from healthy tissues.

-----: DNA isolated from cancered tissues.

増加は DNA の水素結合ないしは 2 次構造の変化によるものと考えられている。ノリ DNA の加熱による吸収増加を測定した結果が Fig. 2 である。吸光度は 90°C 付近から急激に増大し、96°C 付近に至り停止し、再び一定の吸光度を示すようになる。この吸収曲線からノリ DNA の融解温度は、およそ 94°C と計算できる。また、この値は罹病葉からの DNA でも全く同様であつた。

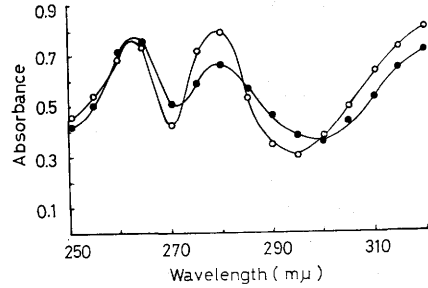
DNA の浮上密度: CsCl 濃厚溶液中での浮上密度の測定もまた DNA の 2 次構造の相違を知るための有力な方法である。健・病両組織からの DNA について浮上密度を測定した結果が Fig. 3 である。両組織からの DNA 共に同一パターンを示し、パターンの上からは両者の差異は認められなかつた。浮上密度は共に 1.72 g/ml である。

DNA 含量の変化: 組織の乾燥重当りで DNA 含量を比較した場合は、罹病組織で DNA 含量が増加するという結果が得られる。しかし、生体当りでの比較では、逆に不変、または減少の傾向として得られる (Table 2)。これは両組織の水分含量の相違や、一定重量当りの細胞数の相違によるものであろう。

このように比較のための基準のとり方で結果が異なるから、正確にその実体を把握するためには、細胞当りで比較するのが最良と考えられる。ここではそのような考えのもとに、技術的には種々の欠陥はあるが、

Table 2. DNA content in the healthy and cancered *Porphyra* tissues.

	Healthy tissue		Cancered tissue	
DNA content	2.4*	372**	3.1*	351**

* μg per mg dry weight** μg per g fresh weight**Fig. 4.** Microspectrophotometric measurements on healthy and cancered *Porphyra* cell.

Each curve represents an average of the data obtained from 50 cells.

○—○: healthy cell

●—●: cancered cell

Table 3. Molar relationship in bases of DNA.

Isolated DNA	A/T	G/C	A + G/T + C	A + C/G + T
DNA from healthy tissue	0.97	0.96	0.96	1.0
DNA from cancered tissue	0.98	0.96	0.97	1.0

A: Adenine, G: Guanine, C: Cytosine, T: Thymine

顕微分光測光法により個々の細胞について紫外部の吸収を測定した。結果は Fig. 4 に示す通りである。健・病両細胞共に波長 $260\text{ m}\mu$ と $280\text{ m}\mu$ に吸収の peak があり、 $260\text{ m}\mu$ 付近の吸収では両者の間に差はみられない。しかし $280\text{ m}\mu$ では病細胞で低下の傾向がみられた。 $260\text{ m}\mu$ での吸収の大部分は恐らく核酸によるものと思われ、この結果からみると、病組織での DNA の増加は個々の細胞での DNA の増加によるものではなく、組織重量当りの細胞数の増加によることが推定できる。

考 察

癌腫組織の示す無制御的と思われる細胞の増殖は、生化学的には旺盛な蛋白合成と核酸合成を示している。核酸の合成は細胞の増殖に最も重要な反応であるから、発癌の原因としては先ずこの DNA が問題とされるべきであろう。

ノリ細胞の DNA は、塩基組成からみて G-C 型の DNA に属している。高等動植物の DNA では、このような G-C 型の DNA は知られていない。G-C 型 DNA はバクテリア、ウイルス、カビ、藻類などのあるもので、その例が報告¹¹⁾されているに過ぎない。

塩基組成をもとにした CHARGOFF¹²⁾ の計算式から、ノリの DNA はいわゆる WATSON-CRICK の示した 2 重らせん構造をとつていることが推定できる (Table 3)。このことは病組織からの DNA についても全く同様である。また DNA の 2 次構造の変化の指標として行なつた融解温度や浮上密度の測定でも、健・病両組織からの DNA 間で差はみられず、発癌は DNA の構造面での変化に基因するものとは考え難い。

DNA の量的な面では、細胞の分裂速度から、病組織での DNA 合成は極めて速やかに行なわれていることが推定できる。藤山²⁾、片山・藤山ら³⁾は癌腫組織の DNA を定量的に、また組織化学的に検討し、発癌初期の多核細胞形成期には細胞当たりまたは組織当たりで DNA 量が著しく増加し、病状の進展に伴つて減少傾向を示すことを報告している。本実験では細胞当たりでの核酸量すなわち $260\text{ m}\mu$ の吸光度では増加の傾向は

みられない。これは用いた材料によるものであろう。本実験では病状がはなはだしく進行し、細胞が重なり合い、革状の完全な縮み症状を呈しているもの、すなわち最早異常な細胞分裂が終息したような時期の材料を使用している。そのため、核酸の有意な増加が認め得なかつたものと思われる。発癌初期または盛期にはもちろん正常、異常を問わず細胞分裂に伴う DNA の増大のあることは当然であろう。

以上の DNA に関する諸結果を要約すると、ノリ癌腫病の発生原因としては、DNA の構造面の変化、すなわち突然変異的なものを想定するより、むしろ DNA の合成制御面での変化によることが推定される。

要 約

癌腫病罹病ノリ組織における細胞の異常分裂を、DNA の面から検討した。

- 1) ノリ細胞の DNA はグアニン、シトシン含量が高く、いわゆる G-C 型の DNA に属している。
- 2) 健・病両組織から分離した DNA の間で、塩基組成、融解温度および浮上密度など DNA の 1 次、2 次構造に相違がみられない。したがって癌腫病罹病組織でみられる無秩序な細胞増殖は、DNA の構造面の変化によつて引き起されたものとは考え難い。
- 3) 健・病両組織の DNA 含量を乾燥重当りで比較した場合、罹病組織で含量の増大が認められる。しかし、顕微分光測光法で測定した個々の細胞についての $260\text{ m}\mu$ の吸光度では、健・病両細胞間で差異がみられない。 $260\text{ m}\mu$ 付近の吸収の大部分は核酸によると思われ、したがって罹病組織でみられた DNA 含量の増大は、主として単位重量当りの細胞数の増加によるものと思われる。

文 献

- 1) 宮城水試：昭和 45 年度都道府県水産試験特別調査事業報告書，9-14 (1971).
- 2) 藤山虎也：水産学集成，829-840 (1957).
- 3) 片山輝久・藤山虎也：本誌，23，249-254 (1957).
- 4) J. MARMUR: *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961).
- 5) A. MARSHAK and H. J. VOGEL: *J. Biol. Chem.*, 189, 597 (1951).
- 6) K. S. KIRBY: *Biochem. Biophys. Acta*, 18, 575 (1955).
- 7) 松尾君子・坪井正道：生化学研究法 II (安藤・寺山・西沢・山川編) 713-715, 朝倉書店, 東京 (1967).
- 8) 大塚治城・寺山 宏：同上, 692 (1967).
- 9) M. OGUR and G. ROSEN: *Arch. Biochem.*, 25, 262 (1950).
- 10) K. BURTON: *Biochem. J.*, 62, 315 (1956).
- 11) 大沢省三・高木康敬・竹村彰祐・磯 晃二郎・関口睦夫：核酸，81, 広川書店, 東京 (1963).
- 12) E. CHARGOFF: *The Nucleic Acid*, 1, 307, Academic Press, New York (1955).