

---

## 環境汚染物質の遺伝物質に及ぼす影響の鋭敏な検出方法の開発

Development of sensitive methods to detect environmental pollutants which have effects on genetic material

代表研究者 東京大学応用微生物研究所教授 大石 道夫  
Prof., Inst. of Appl. Microbiol., Univ. of Tokyo Michio OISHI

協同研究者 東京大学応用微生物研究所助教授 長田 嘉穂  
Assist. Prof., Inst. of Appl. Microbiol., Univ. of Tokyo Yoshiho NAGATA

Our research projects supported by Nissan Science Foundation have dealt with development of new methods to detect environmental pollutants which affect genetic material (DNA) and studies on the molecular mechanism of action of such pollutants on DNA. The results obtained in the last three years can be summarized as follows.

(1) Detection of carcinogens and other substances which damage DNA structure by SV40 induction

Simian virus 40 (SV40)-transformed Syrian hamster kidney cells produce infectious SV40 virus particles after treatments which damage DNA, such as UV irradiation or mitomycin C treatment. We have found that the induction of SV40 by DNA-damaging agents is greatly stimulated when a typical tumor promoter, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), is present in the medium. Phorbol, which has a molecular structure similar to TPA but does not have any tumor promoting activity, showed no such stimulatory effect on SV40 induction. This effect of DNA-damaging agents and tumor promoter (TPA) was more pronounced when a tumor initiator, benzo( $\alpha$ )pyrene or 2-acetamidofluorene, was combined with TPA. The effect of TPA on UV-triggered SV40 induction was greatly influenced by the timing of TPA addition to the culture medium, which was most efficient when addition of TPA was 5 to 20 h before UV irradiation. The effect of TPA, however, was not observed in SV40 rescue from hamster cells by cell fusion with permissive monkey (C7) cells. These results indicate that intracellular reactions triggered by these agents (a tumor initiator and a promoter) act synergistically in inducing SV40. This finding can be used for a new efficient method to detect environmental pollutants including tumor promoters and initiators.

(2) A new method to detect environmental carcinogens by utilizing erythroid differentiation in mouse Friend cells

Mouse Friend cells differentiate into erythroid cell *in vitro* upon treatment of the cells by DNA damaging agents. Using this phenomenon, we undertook a series of experiments to develop a new method to detect environmental pollutants which damage or interact with DNA. For this purpose, we first applied enzyme linked immunosorbent assay for mouse hemoglobin.  $\beta$ -Galactosidase was conjugated with anti mouse hemoglobin IgG and the enzyme activities associated with (antibodies immobilized) solid surface by bridges of antigens (hemoglobin) (a sandwich procedure) were assayed by fluorometry. This procedure allowed us to detect a least  $10^6$  of hemoglobin molecules synthesized as a result of erythroid differentiation. Among model DNA damaging compounds tested, we were able to classify them into two groups. One group consists of aflatoxin B, Glu-Pl and AAF which induce erythroid differentiation by themselves. The other group consisting mitomycin C, UV, neocartinostatins induce the differentiation only in the presence of a low concentration of dimethyl sulfoxide. We have studied the biological significance of this phenomenon and have attempted to develop our findings into a new sensitive and reliable method to detect environmental pollutants which affect DNA molecules.

(3) The mechanism of erythroid differentiation induced by agents which affect on DNA

molecules

We employed *in vitro* terminal differentiation system of mouse Friend cells as a model system to study the basic molecular mechanism governing cellular differentiation induced by DNA damaging agents. By employing cell fusion between two genetically marked Friend cells and other non-erythroid cells, including BHK (baby hamster kidney) and FM3A (mouse mammary gland) cells, we were able to induce erythroid differentiation indirectly by fusing Friend cells that had been exposed briefly to dimethyl sulfoxide prior to fusion with non-erythroid cells that had been treated with ultraviolet light (or other DNA-damaging agents). The results suggest that two distinct reactions are involved in erythroid differentiation in Friend cells *in vitro*. One reaction, originating from the damaged DNA, exhibits an inducible nature, is non-specific to Friend cells, and is *trans*-acting. The other reaction is specific to Friend cells and most likely is *cis*-acting. We also present evidence from the cell fusion experiments that a typical tumor promoter, TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate), inhibits erythroid differentiation by affecting the later reaction. Furthermore, we attempted to isolate an intracellular factor which is produced following DNA damage by DNA damaging agents or tumor initiators. We were able to detect an activity in the crude extract from DNA damaged cells which triggers erythroid differentiation. The factor seems to be of a protein nature judging from its non-dializability and heat sensitivity. Preliminary experiments were also performed to apply these findings to establish a new detection method for environmental pollutants, especially those which affect on genetic material.

本研究は環境中に存在する数多くの汚染物質、特に発癌物質（発癌イニシエーターと発癌プロモーター）の検出に関する有効な方法の確立とそれらの物質の細胞への作用のメカニズムの研究を中心に過去3年間にわたって東京大学応用微生物研究所においてなされたものである。本来、環境汚染物質、特にDNAに影響を与える発癌関連物質に関してはAmes法などバクテリアを使った検出法が中心であった。確かにバクテリアを使った方法はその迅速性、経済性などの長所を有しているが、本来、動物細胞が標的である発癌物質の検出をバクテリアという下等生物を使って行なう点でその正確度に近來疑問が提出され、また、発癌プロモーターのような高等動物細胞のみに効果のある物質の検出には当然難点があった。一方、これら発癌物質の細胞に対する作用機構の研究は当然、高等動物を用いることが必須であるので、我々は培養哺乳類動物細胞（マウス細胞）を用いて環境中に存在する発癌物質の検出のためのモデル系の確立と発癌物質、特にDNAに損傷を与える物質が細胞分化にどのように影響を与えるかを研究対象として以下の成果を得た。

(1) 癌ウィルス(SV40)の誘発を利用した発癌イニシエーターおよびプロモーターの検出法

SV40はマウス細胞に存在する時はDNAに影響を与える物質（例えば発癌イニシエーター）によって誘発されないが、ハムスター細胞(E株)に存在する時は紫外線、マイトマイシンCなどDNA傷害物質によって誘発される。我々はこの誘発現象を利用して環境中に存在する発癌物質の検出法の確立をめざした。まず、SV40でトランスフォームしたハムスター細胞(E株)を紫外線(UV)、2-acetoamidofluorene(AAF)、benzo( $\alpha$ )pyrene(BP)のようなDNA傷害物質であると同時に発癌イニシエーターで処理するとSV40の誘発(ウィルス粒子の産生)が見られたがこの誘発は、未処理の対照群に比してわずかな増加に留まっていた。しかしながら、これらの発癌イニシエーターと同時に発癌プロモーター(12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA)を共存させると著しくSV40の誘発は促進されることが分かった(表1)。このSV40の誘発はTPAとはその化学構造上類似しているが、プロモーター活性のないphorbolでは影響がなく、TPAの持っている発癌プロモーター活性によるものであることは間違いないと思われる。更にTPAのみではSV40の誘発は全くみられないことから発癌イニシエーターとプロモーターの両者が共役して

表 1. 発癌物質による SV40 の誘発に及ぼす TPA の影響

Addition ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Plaques		
		Control	TPA (100 ng/ml)	Phorbol (100 ng/ml)
None		<1.0	<1.0	<1.0
Benzo[a]pyrene	3.75	<1.0	7.6	2.3
	7.50	<1.0	18.9	3.6
	15.00	<1.0	9.9	1.2
2-Acetamidofluorene	0.5	1.1	6.7	3.3
	5.0	1.3	50.5	6.8
	50.0	1.3	15.5	5.8
UV (20 J/m <sup>2</sup> )		9.2	35.7	9.8

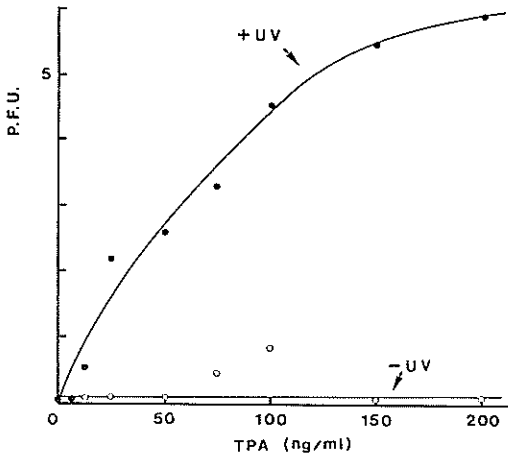


図 1. SV40 誘発に及ぼす TPA の濃度依存性

SV40 が染色体より切り出されてきてプラークを作ることを示唆している。TPA の SV40 誘発に対する至適濃度は 100 ng/ml であったが、これは TPA の癌化または細胞分化に及ぼす作用の至適濃度とほぼ一致する。図 1 に TPA の SV40 誘発に関する濃度依存性を示す。我々は更に TPA の SV40 誘発に対する促進作用を TPA 添加と発癌イニシエーター添加の時間的關係を調べることによって追求したが発癌イニシエーター(紫外線)処理の時間 (0 時) の前および後に TPA を加えて、SV40 誘発をみると、イニシエーター処理の 5 時間ないし 20 時間前に TPA を添加した場合が最も有効であり、イニシエーター処理後の TPA の添加ではその促進効果が減少していき、48 時間

以降ではほとんどその効果がみられなかった (図 2)。これらの実験結果は発癌プロモーターの作用によって引き起こされる反応とある時点において細胞内で共役的に働き、何らかの未知の細胞内反応によって SV40 の誘発をもたらすことを示唆している。なお、この TPA の SV40 誘発に及ぼす効果はハムスター細胞と permissive 細胞であるサルの細胞 (C7) との細胞融合による SV40 の誘発においては見られないので、DNA に与えられた発癌イニシエーターによる修飾、傷害と密接に関係していると推定される。したがって、この系は少なくとも見掛け上は発癌におけるイニシエーターとプロモーターの共役作用と類似しているので、将来この系を用いて、①プロモーターの存在する条件においてのみ作用を示す発癌物質の検出、および②イニシエーターの存在する時のみ作用を示すプロモーターの検出の系として有効と思われる。従来の培養動物細胞を利用した環境中に存在する発癌イニシエーターおよびプロモーターの検出法は、ほとんどの場合両者の中のどちらかのみしか検出できなかった。一方、実際の発癌に際してはこの両者の相互作用によると考えられるので、発癌物質の検出、又その発癌作用の解明において実際により近いモデル系の確立が望まれていたので、この点において上述した我々の見いだした現象 (発癌イニシエーターとプロモーターの synergetic な効果) による SV40 の誘発は環境汚染物質、特に発癌物質の検出およびその作用機

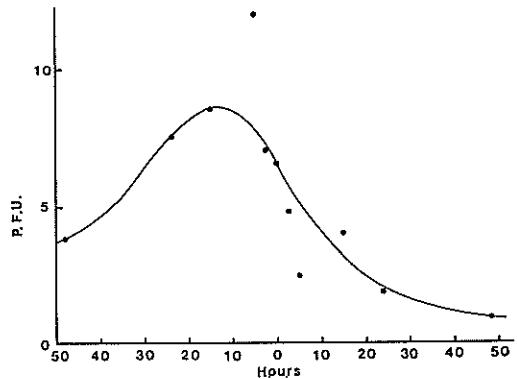


図 2. TPA 存在下の SV40 誘発における TPA 添加時の影響

構の解明のために新しい系を提供すると思われる。なお、この系の将来改良すべき点は SV40 の誘発をウィルス粒子のブラック測定で行なうため比較的長い時間 (2~3 週間) かかるので、SV40 構造タンパクに対する抗体を使って、ELISA 法など免疫化学的手法で SV40 誘発を定量化することであろう。そのための技術的問題の解決については目下実験中である。

## (2) フレンド細胞分化の系を用いた発癌物質の検出法の開発

上述した SV40 誘発を利用した発癌物質 (発癌イニシエーターおよびプロモーター) 検出法の確立と同時に、マウス・フレンド細胞 (mouse erythroleukemia cell) における細胞分化を指標とした環境中発癌物質の検出法の確立を試みた。フレンド細胞はフレンド・ウィルス感染によってマウスより株化した細胞であるが、dimethyl sulfoxide (DMSO), hexamethylenbisacetamide (HMBA), 酪酸のような物質又は DNA に損傷を与える物質によって *in vitro* で分化がみられ、ヘモグロビン生産など赤芽球状の細胞としての特性を示すようになる。またこの *in vitro* での分化は TPA などの発癌プロモーターによって特異的に阻害されるので分化と発癌との関係を追求するための材料としても有効であると思われた。我々はこのフレンド細胞における細胞分化、特に DNA 損傷物質による分化誘導を指標として新しい発癌物質の検出法の確立を試みた。まずフレンド細胞の分化を従来のヘモグロビンの細胞内蓄積をベンゼジンで染める細胞化学的方法をより感度の高く、かつ客観的に信頼性の高い生化学的方法で測定する方法の確立を行なった。そのために、Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA 法) をこの目的のために利用することを試みた。その結果、マウス・ヘモグロビン抗体に  $\beta$ -ガラクトンダーゼを結合させることによるサンドウィッチ ELISA 法によって  $10^0$  分子程度のヘモグロビンを定量的に測定できることが可能となった。この ELISA 法を用いて実際に各種の発癌イニシエーターおよび DNA 損傷物質によるマウス・フレンド細胞の分化に対する効果を調べた。比較的強い

表 2. 各種発癌イニシエーターによる細胞分化

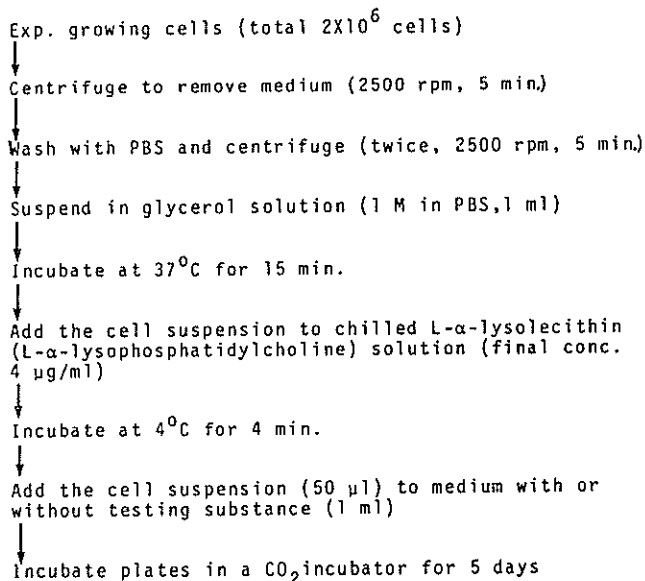
Cc:mpounds	Effective conc. ( $\mu$ g/ml)	$\beta$ -galactosidase (units)
None	—	0
Trp-P1	0.01 — 0.1	16
Trp-P2	0.01 — 0.1	32
Lys-P1	0.1 — 1.0	7
Glu-P1	0.1 — 1.0	71
Benzo( $\alpha$ )pyrene	1.0 — 10.0	(-5)
AAF	1.0 — 10.0	44
Aflatoxin B	0.1 — 1.0	82
MNNG	0.01 — 1.0	3
4NQO	0.005 — 0.05	0
Mitomycin C	0.05 — 0.50	2270
Bleomycin	0.05 — 0.50	700
Novobiocin	7.5 — 75	1250

活性が Glu-P1, aflatoxin B, AAF などについてみられたが benzo( $\alpha$ )pyrene, MNNG, 4NQO などについてはほとんど活性がみられなかった。また、novobiocin のような化合物はそれ自体でフレンド細胞の分化を引き起こす (表 2)。一方, mitomycin C, bleomycin, neocartinoastatin などではそれ自体ではフレンド細胞の分化をほとんど誘導しないが、低濃度 (0.2%) の dimethyl sulfoxide (DMSO) の存在下でその誘導効果がみられる。これらの事実はこの系がある種の発癌イニシエーターの検出に利用できることを示しているが、また、必ずしもすべてのイニシエーターを検出できないと思われるのでその原因の解明が必要であろう。また、このように同じような DNA の構造変化, DNA の複製阻害を引き起こす化合物中にもフレンド細胞の分化に対する影響を比べると、いろいろなグループに分かれることが判明した。このような ELISA 法による高感度な環境汚染物質、特に遺伝物質 (DNA) に影響を与える発癌物質の検出法の基礎的研究を更に現在進行中である。

## (3) 発癌物質検出のための高分子透過性細胞の確立

環境中に存在する DNA に損傷を与える物質のうち、培養細胞膜を必ずしも自由に透過させないものが多い。このような物質および DNA に損傷を与えてからの細胞内反応の機構を解明するために高分子物質透過性の細胞の調製が必要となっ

表 3. フレンド細胞より高分子物質透過性細胞の調製



た。従来、そのような目的にはマイクロインジェクション法、リポソーム法、細胞融合法などがあるが、いずれも手順が煩雑で多量の接点を扱う際に難点があった。そのため我々は新しい高分子物質の細胞内導入法の開発を試みた。その原理および詳しい条件は表 3 に示すが、まず目的細胞（この場合はマウス・フレンド細胞）を PBS バッファーで洗浄後、高張液（1 M glycerol 溶液）に入れ、浸透圧変化を起こさせた後に L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (4  $\mu$ g/ml) などリン脂質処理し、次に導入すべき物質の入った低張液中に移して、目的物質の細胞内導入を行なうものである。我々の見いだした至適条件下で約 10% の細胞が上記の処理後、2 時間以内に生き返り（図 3）、この方法によって高分子物質の細胞内導入後にその生物活性を測定できる可能性を示している。この方法で diphtheria toxin (A fragment) を細胞内に導入させ、その細胞死との関係を示した図 4 より、1 細胞当たりの導入された外液の容量を計算すると約  $3\sim 5 \times 10^{-15}$  l となり、他の方法とほぼ同じ容量の高分子物質をフレンド細胞内に導入できることを示している。なお、本法はフレンド細胞以外にマウス L 細胞、マウス FM3A 細胞、ヒト K562 細胞など

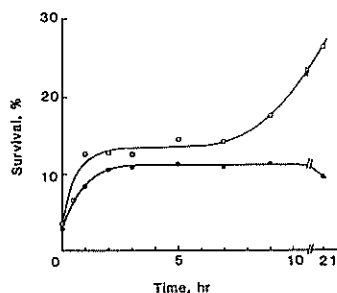


図 3. グリセロールおよび L- $\alpha$ -phosphatidylcholine 処理細胞の低張培養液中での生存率の回復 対照 (○), Colcemide 添加 (●)

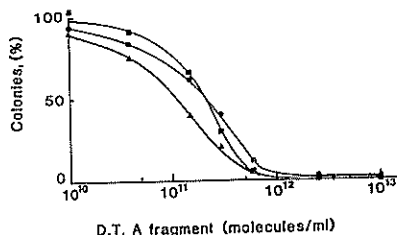


図 4. 透過性にしたフレンド細胞への diphtheria toxin (A fragment) の導入によるコロニー生成率の低下。横軸は導入時の培地中の diphtheria toxin A fragment の濃度を示す。3 回の実験

にも条件を変えることによって応用可能であることが分かった。

(4) DNA に損傷を与える物質によって誘導される細胞内反応

遺伝物質 (DNA) に影響を与える環境汚染物質の検出方法と平行してこれらの物質の DNA に対する作用機構の研究が行なわれた。特に DNA に損傷を与える物質によって誘導される細胞内反応、細胞分化および脱癌化の誘導に関する研究に主体がおかれ、いくつかの新しい知見が得られた。マウス・フレンド細胞は分化誘導物質によってヘモグロビンの合成など赤芽球のもつ種々なる生化学的、形態学的特徴を示すようになり、いわゆる細胞の末端分化 (terminal differentiation) を引き起こすことが知られている。一方、このような分化を引き起こす物質としては DMSO (dimethyl sulfoxide), HMBA (hexamethylenebisacetamide) などが知られているが、DNA に損傷を与える物質によっても分化が低頻度ながら誘導される。我々はこの系を利用することによって、環境中の遺伝物質 (DNA) に影響を与える物質の検出およびその作用機構の解明が可能になると考え、フレンド細胞における分化誘導の基本的条件の解析を行なった。まず、いろいろな既知の分化誘導物質による *in vitro* での細胞分化の機構の大概を明らかにする目的で、分化を引き起こす複雑な初期反応を異なった遺伝マーカーで標識した 2 種のフレンド細胞で個々に誘導させ、後に細胞を融合させて、これらの初期反応が融合したハイブリッド細胞でどのように発現するか検討した。その結果、従来考えられていたような単一の過程で分化が誘導されるのではなく、少なくとも二つの質的に相異なったプロセスによって分化の誘導が行なわれることが明らかになった。更にこのような細胞融合の系によって各々の初期反応の解析が容易になり、分化誘導に関する細胞内因子の特性化およびその分子の実体はかなり明らかになったと言えよう。したがって、このような分化誘導の系を環境中に存在する DNA に損傷を与える物質の検出系として利用する際の系の基本的特質が明らかになるにつれ、汚染物質、特に発癌イニシ

エーターおよびプロモーターの作用機構の解明にも資するところが多いと思われる。

(a) 単一細胞による実験 フレンド細胞を DMSO (1.8 v/v%) と我々の培養条件下で 30~35 時間程度インキュベートするとフレンド細胞赤芽球状細胞へ細胞分化する能力を獲得し、これ以後 DMSO の存在がなくても分化が誘導される。この現象は細胞の分化への決定 (commitment) と呼ばれる。この DMSO の処理時間を短縮する (15-25 時間) と 2-3% の細胞しか commitment しないが、我々は同時に 20 J/m<sup>2</sup> 程度の UV を照射すると 20% 以上の細胞が分化することを見いだした。この線量の UV 照射による細胞分化は 0.5-4% であるから、明らかに 2 種の処理によって細胞内に引き起こされた反応が共役的に働いてフレンド細胞を分化に導いたと考えられる。UV 照射は、mitomycin C 処理、bleomycin 処理によって置き換わる。このことは二つの反応のうち一つは DNA 損傷による複製の阻害の結果引き起こされる。バクテリアの SOS 反応に類似の何らかの反応が関与していることが想定された。一方、DMSO 処理は短時間の HMBA、酪酸、N-methylacetamide 処理によって置き換わり得る。第 1 のグループ内同士の組合せでは共役的な作用はみられない。また、UV 照射細胞は、UV 照射後少なくとも 10 時間インキュベートしてから DMSO 処理した細胞と融合しないとその活性はみられないことはこの反応が誘導性であることを示唆している。

表 4. 細胞融合によるフレンド細胞の分化

Treatment		Benzidine positive cells (%)
DS19(Tk <sup>-</sup> )	DS19(Hprt <sup>-</sup> )	
—	—	0.1
—	UV	3.8
UV	—	4.0
UV	UV	4.5
—	DMSO	1.7
DMSO	—	1.5
DMSO	DMSO	2.6
UV	DMSO	33.7
DMSO	UV	35.8

(b) 細胞融合による実験 上述の実験は単一細胞でなされたために系の解析に限度があるため、細胞融合による細胞分化研究の系の開発を行なった。まず、フレンド細胞より hypoxanthine phosphoribosyl transferase 欠損株 (Hprt<sup>-</sup>) を単離し、これを thymidine kinase 欠損株 (Tk<sup>-</sup>) と細胞融合を行なった。ハイブリッド細胞のみ HAT 培地で生育可能である。この結果細胞融合前の各種の誘導処理がどのようにして分化に影響を与えるか解析可能となったわけである。表 4 に典型的な例を示す。ここにおいては DS19 (Tk<sup>-</sup>) を UV (20 J/m<sup>2</sup>, 後 24 時間培養) 又は DMSO (1.8 v/v% 16 時間) 処理した後、細胞融合を行ない、HAT 培地で生き残ったハイブリッド細胞の分化 (細胞中に蓄積したヘモグロビンを benzidine で染色) を比べたものである。この表より明らかなように、UV 照射した細胞と DMSO 処理した細胞の細胞融合のみ、高頻度 (30-35%) の細胞が分化を誘導していることが分かり、単一細胞で得られた結果と明白に一致している。このことは、フレンド細胞における細胞分化が DNA の損傷もしくはその結果起こる DNA 複製の阻害に由来する反応と、おそらくは細胞膜を介する DMSO 処理に由来する反応の二つが合致した結果引き起こされることを示している。

(c) DNA 由来反応の性質 UV 照射などによって引き起こされる DNA 由来の反応は誘導性のものであり、バクテリアの SOS 反応ときわめて類似している。更にこの反応は種又は器官特異性をもたない反応であることが明らかになった。まず、図 5 に示すように UV 照射したハムスター細胞と (BHK, Tk<sup>+</sup>Oua<sup>s</sup>), DMSO 処理したフレンド細胞 (Tk<sup>-</sup>Oua<sup>R</sup>) の細胞融合では分化がハイブリッド細胞で誘導されるに比して、その逆では分化は誘導されない。同じような結果は、マウス乳癌由来細胞 (FM3A, Tk<sup>+</sup>Oua<sup>s</sup>) とフレンド細胞 (Tk<sup>-</sup>Oua<sup>R</sup>) の細胞融合においてもみられた (図 6)。これらの結果は、UV 照射によって誘導される反応 (DNA 由来反応) は *trans* に働き得て、種、器官特異性をもたない反応であることを示唆している。一方、DMSO 処理で誘導される反応はフレンド細胞に特異的で、恐らくは *cis* に働くものであろう。また、上記の実験はヘモグロビンの生成というフレンド細胞特有の分化が非フレンド細胞との細胞融合によって間接的に引き起こされたわけで、分化の間接的誘導の初めての例である。

(d) 発癌促進因子 (tumor promoter) の作用部位 フレンド細胞の分化を初め多くの細胞分化系は TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-

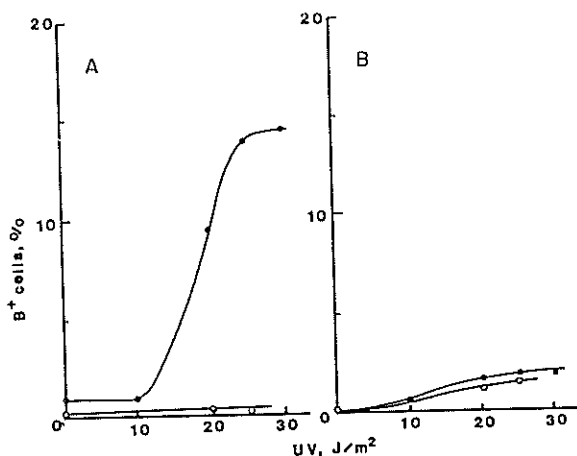


図 5. BHK21 細胞とフレンド細胞の細胞融合による分化の誘導  
 (A) 異なる UV 量を照射した BHK 細胞と DMSO 処理 (●) または未処理 (○) フレンド細胞との細胞融合。(B) 異なる UV 量を照射したフレンド細胞と DMSO 処理 (●) または未処理 (○) BHK 細胞との細胞融合

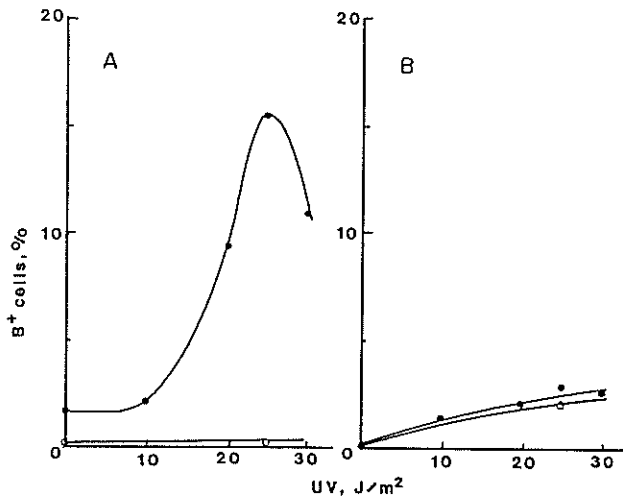


図 6. FM3A 細胞とフレンド細胞の細胞融合による分化の誘導  
 (A) 異なった UV 量を照射した FM3A 細胞と DMSO 処理 (●) または未処理 (○) フレンド細胞との細胞融合。(B) 異なった UV 量を照射したフレンド細胞と DMSO 処理 (●) または未処理 (○) フレンド細胞との細胞融合

表 5. TPA の細胞分化に及ぼす影響

Treatment	DS19(Tk <sup>-</sup> )		DS19(Hprt <sup>-</sup> )		Benzidine positive cells (%)
	TPA (ng/ml)	Treatment	TPA (ng/ml)	Treatment	
DMSO	0	UV	0	UV	31.5
DMSO	10	UV	0	UV	4.1
DMSO	50	UV	0	UV	3.7
DMSO	0	UV	10	UV	28.8
DMSO	0	UV	50	UV	30.9
UV	0	DMSO	0	DMSO	28.8
UV	10	DMSO	0	DMSO	23.6
UV	50	DMSO	0	DMSO	29.1
UV	0	DMSO	10	DMSO	4.4
UV	0	DMSO	50	DMSO	2.9

acetate) などの tumor promoter によって阻害されるが、その作用部位又は作用機能については全く不明である。細胞融合の系を用いて、TPA などの細胞分化過程の作用部位についての実験を行なった。表 5 は 2 種のフレンド細胞を DMSO もしくは UV 照射し細胞融合したその分化誘導の活性を測定したものであるが、DMSO 処理又は UV 照射時における TPA の存在の影響を調べたものである。この表より明らかなように TPA は DMSO 処理した細胞と共存することによってそ

の阻害効果がみられるのが、UV 照射した細胞とインキュベートしても阻害はみられない。このことは TPA のフレンド細胞分化における作用部位が DNA 由来の反応ではなくて、DMSO の作用する細胞膜に関連した反応であることを示唆している。この TPA のような tumor promoter の作用部位については後述する。

(e) DMSO 由来反応の性質 細胞融合の手法を用いることによって、DMSO 由来の反応の解析が可能になった。フレンド細胞を DMSO (1.8 v/v%) で短時間 (2 時間) インキュベート

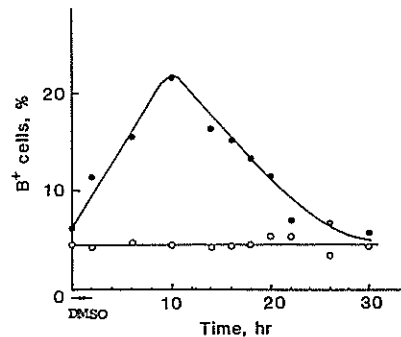


図 7. DMSO パルスによる分化誘導活性の発現と  
 その変化  
 UV 照射細胞 (●) および非照射細胞 (○) との細胞融合の後の細胞分化 (B<sup>+</sup>)



し、その後、経時的に UV 照射細胞と細胞融合して、5 日後に分化誘導の活性を測定した。図 7 に示すように DMSO 2 時間パルスした細胞はその後、DMSO のない状態でも UV 照射した細胞と細胞融合することによって分化誘導活性が誘導されることが明らかになった。この活性はしかし、一過性でパルス後 10 時間で最高値に達した後には減少して、元のレベルに戻る。この活性（ポテンシャル）は図から明らかなように UV 照射した細胞と細胞融合することによってのみ検出可能で、非照射細胞と細胞との融合では検出できない。また、このような活性の誘導は DMSO のみならず、HMBA および酪酸も同様に誘導される。また、この活性の誘導は少なくとも二つの段階があることが容易に推定される。すなわち、細胞が DMSO パルスによって何らかの変化を受けた時期（最初の 2 時間）とこの変化が細胞内で分化誘導活性を誘導する時期（次の約 8 時間）である。これらの段階における反応の性質について一連の実験を行なった。まず、先の実験（表 5）で DMSO 由来の反応を阻害すると分かった TPA などの tumor promoter の作用部位を更に細かく検討した。図 8 に示すように TPA が初めの 2 時間 DMSO と共存した場合は細胞分化を阻害する。しかし、この後 8 時間、活性（ポテンシャル）の増加時に存在してもほとんど影響を及ぼさない。なお、TPA のアナログで活性のない phorbol ではこのような阻害効果はいずれの段階でもみられ

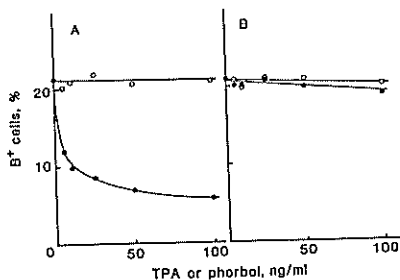


図 8. TPA の DMSO パルスによって誘導される活性への影響 (A) DMSO と同時に TPA (●) または phorbol (○) を 2 時間インキュベートした場合。(B) DMSO 処理 TPA (●) または phorbol (○) と 8 時間インキュベートした場合

ず、他の tumor promoter (PDD) でも TPA と全く同じ影響がみられた。このことより、分化ポテンシャルの DMSO による誘導反応は、TPA などの tumor promoter に感受性の初期段階とこれに引き続く tumor promoter に非感受性の二つの段階より成り立っていることが分かり、tumor promoter は *in vitro* での細胞分化を膜に由来する反応のそのきわめて初期の反応を阻害することによって阻害効果を示すことも明らかになった。一方、ポテンシャルの増加がみられる 8 時間の反応は、tumor promoter には非感受性であるがタンパク合成阻害剤である cycloheximide によって阻害される。また、初めの 2 時間の反応は対照的に cycloheximide の存在によっても阻害効果は見られない。このように DMSO パルスに由来する恐らくは細胞膜由来の反応は定性的に相異なる二つの反応によって、結果的には分化ポテンシャルの誘導を引き起こし、このポテンシャルが DNA 由来の反応と合致した時フレンド細胞は分化決定 (commitment) すると推定される。なお、この DMSO パルスによって引き起こされる一過性のポテンシャルの誘導は、その活性が低下してから (30-40 時間ぐらい) また、細胞を DMSO 処理することによって再び誘導できる。以上の実験結果より、フレンド細胞分化の DMSO パルスによる初期反応について、細胞膜の変化による誘導物質の生成、その誘導物質による分化決定に関する特異的タンパク質の誘導合成というモデルが考えられる。現在のところ、この誘導物質および特異的タンパク質の実体については想像の域を出ない。しかしながら、タンパク質合成を伴う分化ポテンシャルが一過性である事実は、誘導物質の寿命も含めて正常な生理的条件下では代謝回転 (turnover) していると考えられる。この turnover の性質を調べ、仮定の誘導物質と特異タンパク質誘導との間の関係を見いだすために、DMSO パルス後に cycloheximide を加えて DMSO によって生ずる仮定の誘導物質の安定性を検討した図 9 に示すように、このような条件下では当然ポテンシャル (特異タンパク質) の誘導はみられないが、cycloheximide を除くとポテン

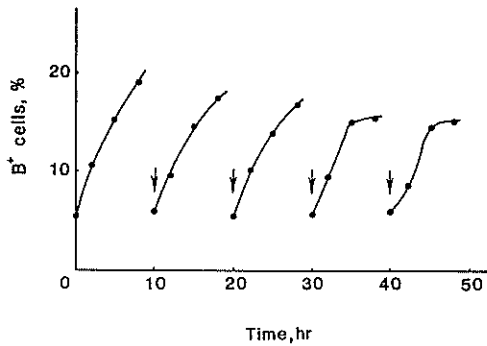


図 9. DMSO パルス後, Cycloheximide 存在による分化誘導能の保存。  
DMSO パルス後, 0 時で Cycloheximide を加え, 矢印のところで Cycloheximide を除き, UV 照射細胞と細胞融合してその分化誘導能を測定

シャルの誘導が起こり, しかも 40 時間もの長時間後も誘導はみられる。この事実は DMSO によって生じた誘導物質が, 正常の生理的条件下ではポテンシャルの誘導とともに turnover するが, cycloheximide のようなタンパク合成阻害剤でポテンシャルの誘導阻害すると, 少なくとも 40 時間の長時間にわたって細胞内に安定に存在することを示唆している。

(f) 細胞抽出液中より分化誘導因子の単離の

試み 前述の高分子物質細胞内導入系を用いて, 細胞分化に関して *in vitro* の実験より予測された細胞内における分化誘導因子の探索を行なった。まず, DMSO でパルスした細胞をグリセロールおよび L- $\alpha$ -phosphatidylcholine 処理によって透過性にして, UV (又は mitomycin C) 処理した細胞よりの抽出液とインキュベートして 5 日後にこれらの抽出液が細胞分化を引き起こすか測定した。図 10 に示すように, UV 照射した細胞よりの抽出液には低頻度ながら分化を誘導する活性がみられたが, 同様な活性は対照 (非照射) 細胞抽出液又は DMSO 処理抽出液ではほとんど検出できなかった。同様な活性は UV 照射した FM3A 細胞抽出液中にもみられるので, *in vivo* の実験より推定された DNA 由来活性の種, 器官非特異性とも合致する。この活性は UV 照射後, 一定の lag period を経てから現れ, cycloheximide の存在で阻害される。活性は UV 照射後約 10 時間の lag period を経て 20-30 時間で最高値に達し, その後しだいに活性は低下する。なお, 本活性は非透析性であり, 熱感受性であることからタンパク質と推定される。目下, 各種クロマトグラフィーなどを用いて本活性のある区分を精製中である。

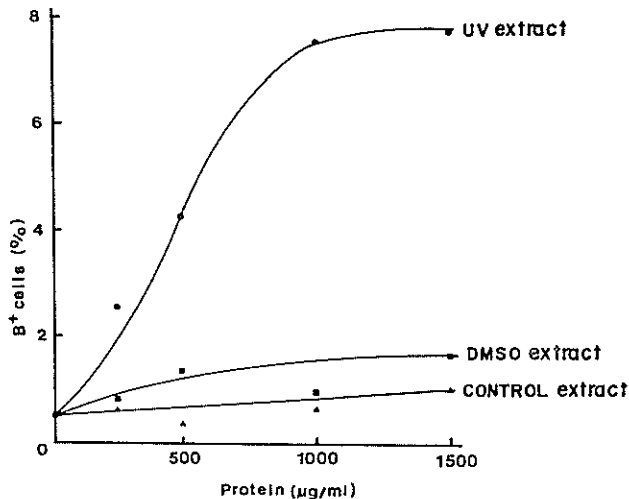


図 10. UV 照射, DMSO 処理および対照細胞よりの抽出液によるフレンド細胞の分化誘導

## 文 献

- 1) M. Oishi, R. M. Irbe and L. M. E. Morin: Molecular mechanism for the induction of "SOS" functions. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **26**, 281-301 (1981).
- 2) M. Oishi: On SOS functions with special emphasis on the early events leading to the induction of the functions. *Protein, Nucleic Acids and Enzymes* **26**, 1522-1535 (1981).
- 3) R. M. Irbe, L. M. E. Morin and M. Oishi: Prophage ( $\phi$ 80) induction in *Escherichia coli* K12 by specific deoxyoligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 138-142 (1981).
- 4) S. Nomura and M. Oishi: An intracellular factor which affects erythroid differentiation in mouse Friend cells. Symposium on "Inducible Responses to DNA Damage" Toulouse, France (*Biochimie*) **64**, 763-767 (1982).
- 5) S. Nomura and M. Oishi: Indirect induction of erythroid differentiation in mouse Friend cells: Evidence for two intracellular reactions involved in the differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 210-214 (1983).
- 6) S. Nomura, N. Shobu and M. Oishi: Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulates simian virus 40 induction by DNA-damaging agents and tumor initiators. *Molecular and Cellular Biology* **3**, 757-760 (1983).
- 7) M. Oishi: Recombination mediated functions in response to DNA damage. In "Recombination of Genetic Material" Academic Press. K. B. Low Ed. (1983) in press.
- 8) 野村慎太郎, 金児知子, 大石道夫: ガン細胞の分化誘導の機構—マウス・Friend 細胞を中心に—*化学と生物* **21**, 775-782 (1983).