

遺伝分析技術の進歩と人類遺伝学

荻 田 善 一

(富山医科薬科大学和漢薬研究所・病態生化学部門)

Zen-ichi OGITA

*Institute for Oriental Medicines, Toyama Medical and
Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan*

遺伝現象を、交配実験を基盤にしたメンデル式遺伝分析法で解明するにはその解析範囲に限界があり、またヒトの場合にはその適用にあたってさまざまな制限がある。

交配実験を基盤としたヒトの遺伝分析にとって不都合な条件のなかには、生まれる子供の数が他の実験動物に比較して極端に少ないこともあるが、さらに問題なのは、観察者と被観察者が同じ寿命をもつ同一動物種に属しているヒトであることだ。これは親から子供に伝えられる形質の伝達形式を、各世代にわたって観察しなければならない遺伝学の実験系としては致命的な欠陥である。このような理由から、人類遺伝学を実験遺伝学の一つとして発展させるためには、どうしても交配実験によらないで遺伝現象を解明することのできる分析技術が開発されなければならない。

もちろん遺伝現象解明のための研究方法も初期には交配実験を主としていたが、遺伝子と染色体との関係が明らかになるにつれ、細胞学的方法が取り入れられた。さらに遺伝子の化学的本体に関する研究や遺伝情報発現過程の生化学的研究など、分子レベルでの研究が進み、物理化学的手段による分析法も大いに進歩した。またこのような遺伝現象の分子レベルでの理解が進むなかで、一方では生物集団における遺伝現象を理解し、進化の機構を明らかにしようとする分析技術も発展した。この方面では、統計数学や電子計算機が遺伝分析技術として重要な役割を果たしてきた。

1972年の組み換え DNA の実験に端を発した遺伝子操作法、細胞融合法の確立によって体系化されてきた体細胞遺伝学的技術によるヒト染色体地図の作成など、いずれも 20 年前までは想像すらできなかったことである。

さらに、1962年に発表されたキメラ動物作製法に始まった発生工学的研究技術は、ヒト遺伝子を実験動物の初期胚に移入する方向に発展しつつある。このことは、ヒトの疾患遺伝子の発症過程を実験動物の初期胚における発生過程を通じて解析できる研究法の開発を可能とした。もしこの方法が確立されるならば、ヒトの疾患遺伝子の発症機序を実験動物の特定臓器あるいは器官で解明することができるだろう。そして、遺伝性疾患の発症を防止するという最も穏やかな方法による遺伝性疾患の治療法を開発できる可能性がある。

このようにヒトの遺伝学は、遺伝子工学、細胞工学あるいは発生工学における研究技術を組み合わせることによって、患者から得られた細胞を用いて、ヒトの尊厳を傷つけることなく疾患遺伝子の発症条件を解析できる画期的な研究に展開されつつあり、新しい時代を迎えようとしている。このときにあたり、ヒトの遺伝学の最終目標が、人類の福祉に役立たせることにあることを再確認するとともに、新しい研究技術をさらに発展させ遺伝性疾患の発症を防止することに基づく治療法を確立したいと考えている。

S1 インターフェロン遺伝子の構造と発現

谷口維紹・大野茂男・高岡千佳子・西 達也

(癌研究会癌研究所・生化学部)

インターフェロン (IFN) は抗ウイルス作用を持つ液性因子であり、ヒトにおいては少なくとも 3 種類のタイプの異なる IFN (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) の存在が知られている。組み換え DNA 技術の発達により、これらの IFN ならびにその遺伝子に関する研究は大きな進展を遂げつつある。われわれはすでに、ヒト IFN- β cDNA とその染色体遺伝子をクローンし、その構造解析を行った。IFN- β 遺伝子の構造を他の IFN 遺伝子のそれと比較した結果、ともにウイルスなどによって遺伝子の発現が誘発されることが知られている IFN- α , β 両遺伝子が類似性を示し、両者が共通の先祖 (ancestral sequence) から分散 (diverge) し、進化したものであることが明らかとなった。一方、IFN- γ 遺伝子は他の IFN 遺伝子と類似性を示さないことも最近明らかとなっている。さらに染色体遺伝子の解析によって IFN- α , β 両遺伝子の転写開始上流部位に IFN 遺伝子にユニークな配列が保存 (conserve) されていることがわかり、このような配列が遺伝子発現の制御 (ウイルスなどによる誘発) に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。われわれはさらに、この遺伝子の制御機構を明らかにする目的で、1,800 塩基対よりなるヒト IFN- β 遺伝子を含む DNA 断片を培養マウス細胞に導入しその遺伝子が制御されて発現する (ウイルスなどによって誘発される) ことを見いだした。ひきつづき、種々の欠失を持つ IFN- β 遺伝子も *in vitro* で作成し、それらの発現を調べることによって IFN 遺伝子の制御に関与している DNA 塩基配列を同定中である。

われわれはまた、抗ウイルス作用のみならず抗腫瘍作用など多面的生理活性を持つことが報告され、その臨床応用が期待されている IFN タンパクの大量生産を目的とし、大腸菌によってヒト IFN- β を生産させることができるいくつかの発現プラスミドを構築した (一部、協和醸酵東京研究所との共同研究による)。

最近、川出ら (京大ウイルス研) と共同でマウス IFN- β に対応する cDNA クローンを同定し、ヒト IFN- β 遺伝子とさまざまな角度から比較を行っている。

S2 真核生物の遺伝子発現調節機構

帯 刀 益 夫

(東京大学・薬学部)

近年、遺伝子操作技術の進歩により、真核生物の遺伝子のクローニングが容易になり、多数の遺伝子が単離され、その構造が、詳しく調べられている。これら遺伝子の構造解析から、真核生物遺伝子中の介在配列の存在、遺伝子構造と進化の関係、遺伝病と遺伝子構造の対応関係など、いくつかの興味ある知見が集積されつつある。

しかし、ヒトをはじめとする高等生物での発生や分化、がん化など複雑な現象を理解するためには、さらに、遺伝子の発現調節機構を明らかにすることが重要であろう。

最近、クローン化された遺伝子を用い、*in vitro*での転写調節機構を解析するのみならず、遺伝子を、再度、細胞に導入し、その発現を追跡する、あるいは、胚へ導入し、個体レベルでの発現を解析するといった方向の研究が始められている。また、クローン化された遺伝子を、*in vitro*で望み通りに変異させた後、細胞へ導入することにより、従来、バクテリアで行われたと同様の遺伝生化学的アプローチが可能になったといえる。

本シンポジウムでは、このような技術を紹介しつつ、真核生物の遺伝子発現調節機構について討論したいと考えている。

S3 再構成細胞を用いた遺伝子発現の細胞質制御の研究

関 口 豊 三

(国立がんセンター研究所・放射線生物)

Pleiotropic Cytoplasmic Control of Gene Expression in Mammalian Reconstituted Cells (Nuclear Transplanted Cells)

TOYOZO SEKIGUCHI

National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

Summary Chloramphenicol-resistant (CAP^r) reconstituted cells and cybrids were isolated by fusion of karyoplasts (or intact cells) of mouse amelanotic melanoma B₁₆ cells with cytoplasts of HGPRT-deficient, CAP^r rat myoblastic cells, L₆TG·CAP^r. Reconstituted cells or cybrids exhibited unique cellular arrangement, and about one third of the isolated clones expressed high tyrosinase activity and marked melanin synthesis, although the parental mouse cells expressed low tyrosinase activity and the parental rat cells did not express tyrosinase activity. These phenotypic changes have been stable for more than a year. The phenotypic reversion of these clonal cells were induced by treatment with a tumor promoter. There were changes in the morphology of the treated cells to that of the mouse B₁₆ cells and extinction of tyrosinase activity and melanin synthesis in pigmented clonal cells. These phenotypic changes and reversions induced by a tumor promoter were repeatedly reversible. Extramitochondrial small circular DNAs were analysed by Yamagishi method to elucidate possible molecular mechanism of cytoplasmic factors of gene regulation.

1. 体細胞遺伝子発現の制御, 分化の制御

われわれ個体は, それを形成するもろもろの臓器, 組織がそれぞれの特異的機能を発現し, そのバランスと調和の上に成立している。例えば, アルブミンは肝細胞のみで作られ, インシュリンは膵でのみ作られている。すなわち tissue-specific function が発現しているが, これは遺伝子のレベルでは tissue-specific gene(s) が発現していることである。一方, Gurdon らの核移植の研究の成果によって, どの体細胞も, 腸上皮も皮膚もまた肝の核には個体形成に必要なすべての遺伝子を有し, 遺伝子レベルではどの体細胞も等値であろうことが考えられる。したがって分化した体細胞にあっては, ある特定遺伝子のみが発現するように, 存在する他の多くの遺伝子は発現しないように, 抑制され制御されている。この遺伝子発現の制御の細胞機構を知ることは, 生命現象の解明の基礎の一つをなすであろう。

Gurdon らの実験系では, 紫外線照射を受けた受精卵に移植されたどの体細胞核も個体形成に必要な

なすべての遺伝子が存在し、かつ個体（カエル）を形成した。しからば体細胞の細胞質内には遺伝子発現を制約し、抑制する因子が存在するのであろうか。このことを証明する最も直接的な研究方法は、体細胞核を取り出し、別の体細胞の核なし細胞質に移植すればよい。しかし、Gurdon らの用いた毛細管を用いる物理的方法では、哺乳類細胞はもとより、カエルでも技術的に困難であった。

2. 哺乳動物体細胞間の核移植、再構成細胞

哺乳動物体細胞間の核移植は、全く別の面から技術的に開発されてきた。1967年、Carter¹⁾はサイトカラシン B (CB) が哺乳動物細胞の脱核作用を有することを初めて見いだした。彼は、種々の培養動物細胞を CB を含む培地で培養することによって、細胞核の脱核されることを見いだした。これは自然脱核 spontaneous enucleation と呼ばれているが、当時、その脱核度も低く、最高 30% ぐらいであり、また長時間処理 (8~24 時間) が必要であり、一般化されなかった。

1972年、Prescott ら²⁾はサイトカラシン脱核法の改良を行った。すなわち細胞を CB と孵置するのみでなく、同時に遠心力という物理作用を加えることによって、短時間 (15~30 分遠心) で種々の培養細胞について高い脱核度、ある株細胞では 99% 以上の脱核度が得られるようになり、この改良法、間接脱核法が急速に実用化されるにいたった。この方法により短時間に、数百万個の分離核 (核体, karyoplasts) を得ることができ、また数百万個の核なし細胞質 (細胞質体, cytoplasts) を得ることが可能となった。前者は遠心管底部に沈澱し、後者は脱核 disc に付着している。この両者を融合する細胞工学手法が発展してきた。

図 1 に示すごとく、第一の方法は分離核体を同種あるいは異種の細胞質と融合して新たな細胞を作る方法で、細胞再構成法と呼ばれ、作られた細胞は再構成細胞 reconstituted cells と呼ばれる。これは核移植細胞に相当する。第二の方法は、ある細胞と、同種あるいは異種の細胞質体とを融合する方法で、細胞質雑種形成法と呼ばれ、作られた細胞は細胞質雑種 cytoplasmic hybrids (サイブリッド) と呼ばれる。この細胞は自己の核および細胞質のほかに、新たに融合した細胞質を保有する。融合には通常 HVJ (Sendai virus) が用いられる。また遠心条件は細胞によって微細に異なるが、10,000~

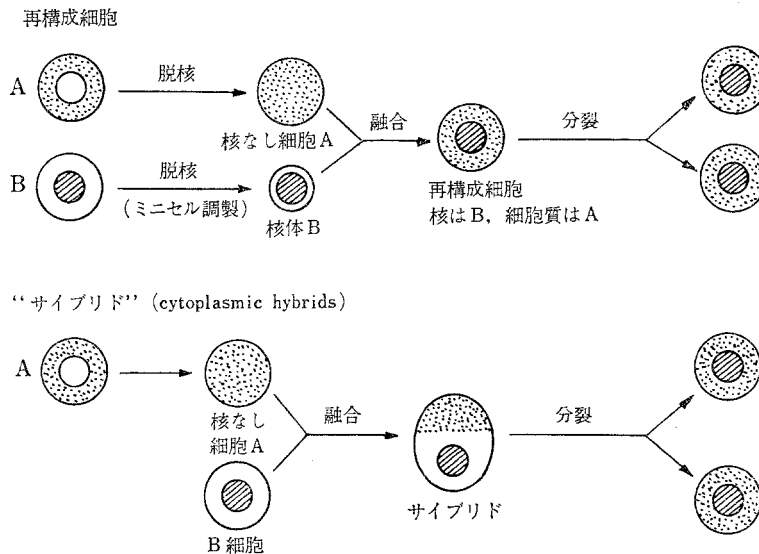


図 1 CB を用いた再構成細胞 (上), およびサイブリッド (下) の説明図

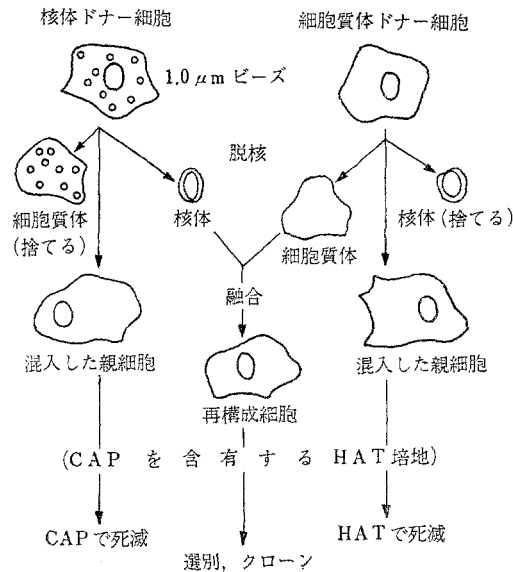


図 2 二重選別による再構成細胞のクローン分離法 (Shay, 1977⁴⁾)

15,000 回転, 15~30 分遠心である。分離核体サンプルは通常, intact 細胞などが混入するので, 1~3% ウンアルブミンの無菌的連続濃度勾配を用いて精製して用いる。再構成細胞, およびサイブリッドのクローン分離の目的には細胞, ことに細胞質ドナー細胞がある選別可能な遺伝的マーカーをもつことが必要である。

再構成細胞のクローン分離は, 1975 年, Ringertz ら³⁾によって行われた。彼らは, 核酸合成酵素の一つである HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase) 活性を欠く細胞から細胞質体を分離し, 一方, この活性を有する細胞から核体を分離し, 両者を融合後 HAT 培地で選別を行って再構成細胞をクローン分離した。HAT 培地は HGPRT 活性のある細胞が増殖できる培地である。しかしこの方法では, 核体ドナー細胞が混入すれば, HAT 培地で同様に増殖する。現在, 最も良い選別法は両親細胞, すなわち核体ドナー細胞および細胞質ドナー細胞の両者を死滅させ, 再構成細胞, あるいはサイブリッドのみを増殖させる選別培地である。これは図 2 に示すごとく, Shay⁴⁾によって考案された二重選別法である。まず細胞質ドナー細胞として, 核および細胞質遺伝マーカーをもつ二重変異細胞を用意する。核のマーカーとしては HGPRT, あるいは TK-細胞 (thymidine-kinase deficient) が用いられ, 細胞質マーカーとしてはミトコンドリア DNA 分子の変異であるクロラムフェニコール耐性 (CAP^r) が用いられる。この CAP 耐性の細胞質体と, HGPRT 活性を有する核体とを融合後, CAP を含む HAT 培地で二重選別することにより, 両親細胞は死滅し, HGPRT 活性を有しかつ CAP 耐性の細胞質から構成された再構成細胞, あるいはサイブリッドが増殖するのでクローン分離できる。

3. 核移植細胞等における遺伝子発現の細胞質制御の今までの知見

再構成細胞, あるいはサイブリッドを用いて現在, 細胞分化, 癌化, あるいは老化の細胞機構について研究が進められている。これらの知見をまとめると三つに分類される。第一は, 体細胞核の発現していたある機能が, 異なった細胞質に移植された後も, 同様に発現する例である (normally expressed)。このような例としては, Ringertz ら⁵⁾の報告で myotube 形成能を有するラット筋芽細胞

の核を、この能力を有しないマウス線維芽細胞の細胞質と融合して得られた核移植細胞クローンの大部分がこの myotube 形成能を示した例である。

第二は遺伝子発現の抑制である。発現していた機能が核移植後、抑制、消失されたもので、この報告例は多い。Gopalakrishnan ら⁶⁾は、マウス赤芽球細胞の DMSO によるヘモグロビン合成の誘導能が、この細胞とラット肝癌の細胞質とを融合して得られたサイブリッドでこの誘導能が消失することを報告した。また Halaban ら⁷⁾は、メラニン産生能を有するマウスメラノームの核体と、この産生能を有しないマウス細胞の細胞質とを融合した再構成細胞およびサイブリッドはメラニン産生能が抑制されることも報告した。また、特殊な形質発現として造腫瘍性 (tumorigenicity) をマーカーとした例がある。Ziegler⁸⁾は、造腫瘍性の高いマウス癌細胞を、造腫瘍性を示さないマウス細胞の細胞質と融合したサイブリッドは造腫瘍性を発現したが、これと反対の結果が、Sager ら⁹⁾によって報告されている。すなわち造腫瘍性の高い中国産ハムスター細胞と、この能力を欠くハムスター細胞の細胞質とを融合して得られたサイブリッドは著明に造腫瘍性の抑制されることを報告している。

第三のものは新たな形質発現の誘導である。Lipsich ら¹⁰⁾は、肝特異酵素である tyrosine amino-transferase (TAT) 活性を発現するラット肝癌の細胞質と、この活性を発現しないマウス線維芽細胞の核体とを融合した核移植細胞で、この TAT 活性が新たに誘導されること、かつこの酵素はマウス型であることを示した。また、Gopalakrishnan ら¹¹⁾は、phenylalanin hydroxylase 活性を有するラット肝癌の細胞質と、この活性を発現しないマウス赤芽球細胞とを融合したサイブリッドが、この活性を発現し、かつマウス型酵素であることを示した。以上の 2 例が、細胞質因子による遺伝子の活性化として報告されている。以上の抑制や活性のいずれの例をみても、形質発現の変化の起こったマーカーは 1 種類であり、またこの変化も比較的短時間で消失するもので、最も安定な例である Lipsich らの TAT の誘導も数か月間持続するのみであった。

4. 安定な細胞質制御の知見

筆者は、マウス癌細胞核を分離し、非癌細胞の細胞質と融合した再構成細胞およびサイブリッドを分離し、その形質発現の変化を分析した¹²⁾。形質発現のマーカーとして造腫瘍性発現をみることは、メラニン産生能の誘導の有無を知るべく、メラノーム由来のマウス培養細胞 B₁₆ を核ドナーとして用いた。この細胞はメラノーム由来であるが、培養系ではほとんどメラニン合成を示さない。しかし、同系マウスに移植するとメラニン産生を示す腫瘍を作る能力がある。

また種々の酵素活性の変化をアイソザイムの面から分析する目的で、細胞質ドナー細胞は異種のラット由来の二重変異細胞、HGPRT 欠損し、かつ細胞質遺伝マーカーである CAP 耐性を有する非癌細胞 (近二倍体、筋芽細胞 L₆TG·CAP⁺) を用いた。このラット筋芽細胞は図 3a, b に示すごとく、脱核度の高い細胞で、通常 99% 以上の脱核が得られる。またマウス癌細胞より核体を分離し、連続濃度勾配法により精製し (図 3c, d)、このマウス核とラット細胞質 (d, b) を HVJ 融合を行って、HAT+CAP の二重選別を行い、再構成細胞をクローン分離した (図 3e)。またマウス細胞そのものと、ラット細胞質 (図 3, c+b) を融合後、同様の方法でサイブリッドをクローン分離した。両者は形態的に著しく異なり、再構成細胞の個々の細胞は両親細胞 (図 3a, c) より小型で、かつ細胞が一定方向に配列する極性 polarity を示す。この性状はいずれの両親細胞にもみられない新たな特性である。一方、サイブリッドは個々の細胞が大型で、かつ配列に極性を示さない。

これらクローン細胞はいずれも CAP を含む HAT 培地でよく増殖する。また、その染色体分析の結果は、いずれもマウス B₁₆ そのもので、ラット染色体は 1 本も含まれていない。このクローン細胞でみられた新たな形質発現の誘導は、第一は著明なメラニン産生能の誘導である。すなわち、今までに再構成細胞 50 クローン、サイブリッドクローン 25 クローンをクローン分離したが、その約

表 1. 両親細胞および再構成細胞のチロジナーゼ活性値

Cell line	Tyrosinase activity nmol/mg prot./hr, S.E.M.
B ₁₆ (nuclear donor)	7.2*±0.5
L ₆ TG·CAP ^r (cytoplast D)	0.6 ±0.2
RC. 6-7-8-5	1.9 ±0.4
RC. 14-4-1	1.4 ±0.3
RC. 14-4-4	75.5 ±6.1
RC. 14-4-6	143.2 ±1.8

* Mean of 4 determinations. 測定：及川法による（及川教授測定）。

1/3 クローンが著明なメラニン合成を示した。酵素的にはメラニン合成の key enzyme であるチロジナーゼ活性が表 1 に示すごとく、マウス親細胞 B₁₆ の約 10~20 倍の高い活性を示すクローンが出現した。

一方、他の 2/3 のクローンは非色素性であり、活性もこの B₁₆ よりさらに低下している。これらメラニン産生を示すクローン細胞は、融合数日後より肉眼的に認められ、それぞれ融合 3 週間後にクローン分離されたものである。

両親細胞およびメラニン産生を示すクローン細胞を電顕的に調べると、いっそう明瞭となった。すなわち図 4a, b に示すごとく、マウス親細胞にはメラノソームはほとんど認められず、また見いだされたものは未熟なメラノソーム (stage I, II) のものであった。一方、細胞質ドナー細胞であるラット筋芽細胞は、チロジナーゼ活性を全く欠き、かつメラノソームはどの stage のものも全く存在しない (図 4c, d)。また、電顕的に見いだされた重要な事実は、マウス、ラット親細胞の細胞表面の微細構造が著しく異なる点である。すなわち、マウス親細胞のそれは大小不規則な陥入を示すのに反し、ラット筋細胞のそれは細長い多数の微絨毛 microvilli を有することである。

一方、メラニン産生を示す再構成細胞クローンは、いずれも (図 4e~h) 成熟した多数のメラノソーム (stage III および IV) が存在する。さらにその細胞表面の微細構造は、多数の細長い絨毛様構造を示した。この細胞表面の微細構造の変化が第二の形質発現の変化である。このメラニン産生能は安定であり、2 年以上継代培養を行っているが、安定に発現している。ここで問題が生じた。このような安定なメラニン合成能の誘導がはたして融合したラットの細胞質因子にもとづくものか、あるいは融合によってマウス核遺伝子のなんらかの突然変異 gene mutation が起こり、その結果、形質発現が変化したかを知る必要である。この最も直接的な方法は再構成細胞よりマウス核を分離し、再びもとのマウス細胞質に移植することであろう。もし、再構成細胞に認められた種々の形質発現の誘導が、マウス核の遺伝子変異によるものでなく、核のおかれた細胞質環境の変化によって起こるものであれば、再びもとのマウス細胞質にもどすことによってこれらの誘導された形質発現は消去されるであろうことが考えられる。この方法はしかし困難であった。すなわち、再構成細胞は前記のごとく細胞配列および細胞表面の微細構造の変化が起こり、disc への附着性が著しく減弱し、脱核して核を分離することがきわめて困難となった。

それで第二の方法として再構成細胞を突然変異誘発作用、あるいは発癌作用のないことが知られている薬剤で処理することによって、誘導された種々の形質発現が消去されるか否かを試みた。もし、これらの薬剤処理によってこのような変化が起こるならば、これらの薬剤は mutagenic ではないの

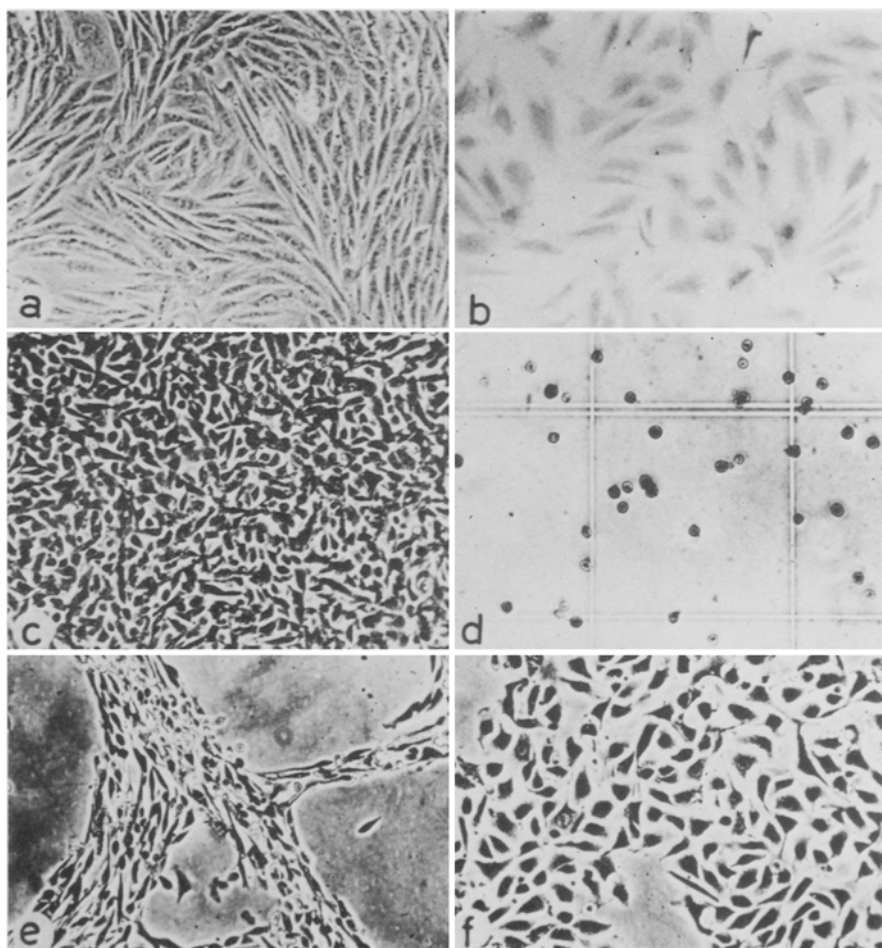


図 3 マウス, ラット両親細胞およびその核体, 細胞質体, および再構成細胞とサイブリッドの形態 (位相差写真 $\times 150$)

- a. ラット筋芽細胞 $L_6TG \cdot CAP^+$, 脱核前.
- b. 同上の細胞質体 (脱核後).
- c. マウス B_{16} 細胞.
- d. 同上の細胞より分離, 精製された核体.
- e. マウス核体とラット細胞質体 (d と b) とを融合し, 二重選別培養によって分離された再構成細胞クローン.
- f. マウス細胞とラット細胞質体 (c と b) とを融合し, 二重選別培養によって分離されたサイブリッドクローン.

で, マウス核の遺伝子変異によらないで, 形質発現が再び変化しうることを意味する. このような薬剤として tumor promoter と呼ばれる TPA (12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), またはテレオンジンで再構成細胞処理を行った. 条件は TPA (またはテレオンジン) 50~100 ng/ml であった. この tumor promoter 処理によって劇的な変化が認められた. まず処理 18 時間後には, 処理したい

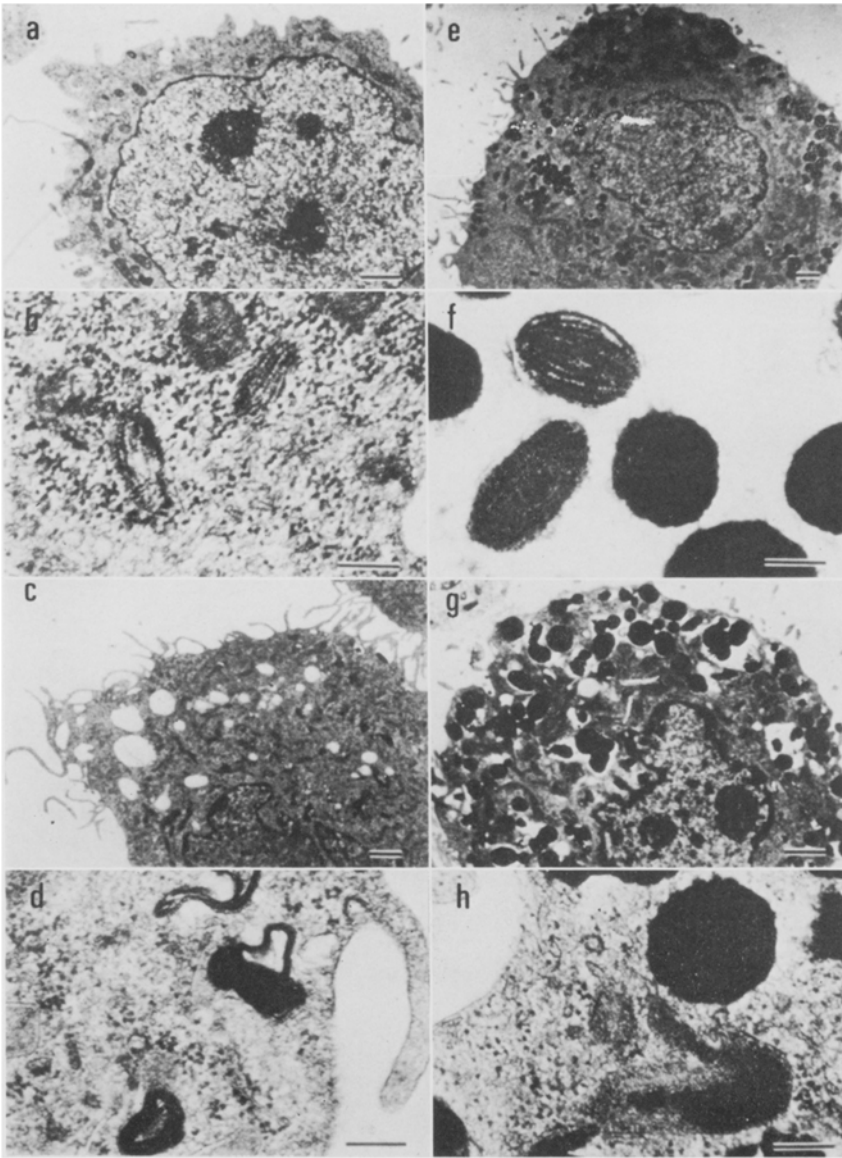


図 4 マウス親細胞, ラット親細胞およびメラニン産生再構成細胞の電子顕微鏡写真 (亀谷・関口原図)

- a. マウス B₁₆. ×7,800
 b. マウス B₁₆ プレメラノソーム (stage I, II) があるが成熟型はない. ×35,000
 c. ラット L₆TG·CAPr. ×7,800
 d. ラット L₆TG·CAPr. ×35,000. ミエリン様顆粒があるが, メラノソームは全くない.
 e. メラニン産生再構成細胞 CI 14-4-4, 多数のメラニン顆粒がある. ×7,800
 f. 多数の成熟したメラノソームが存在する (stage III, IV). ×35,000
 g. メラニン産生再構成細胞 CI 14-4-6. 多数の成熟したメラニンがある. ×7,800
 h. 同上. 多数の成熟したメラノソームが存在する. ×35,000

ずれの再構成細胞およびサイブリッドクローンの形態が元のマウス B₁₆ 細胞と区別できぬ形態を示した (図 5). さらに処理 5~7 日後にはすべてのメラニン産生能を有したクローン細胞はメラニン産生を行わず, 黒色の細胞がすべて無色となった. テレオシジン 100 ng/ml, 10 日間処理後のチロジナーゼ活性を表 2 に示す. マウス B₁₆ 細胞の弱いチロジナーゼ活性もゼロとなったが, 10~20 倍高いチロジナーゼ活性を示した再構成細胞の値もゼロとなった. さらに電顕的に調べると, 図 6(a, b) のご

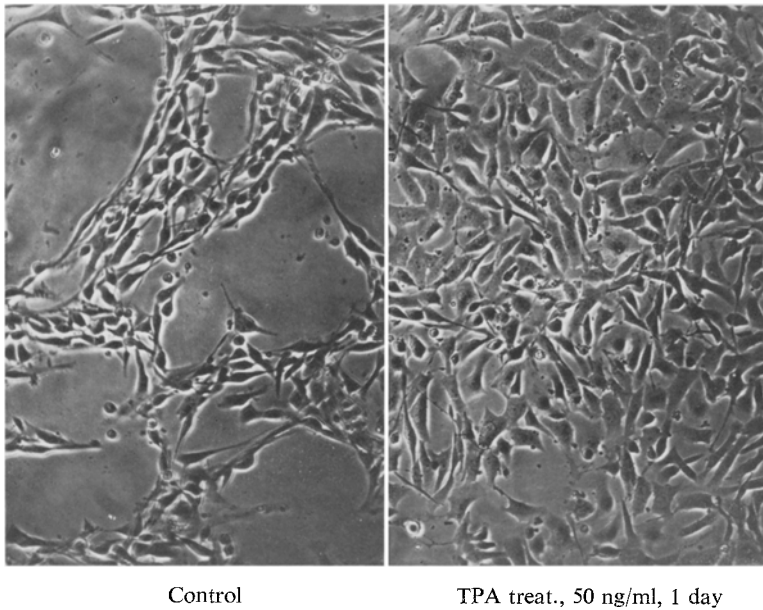


図 5 Tumor promoter, TPA 処理による再構成細胞の形態変化

表 2. 両親細胞および構成細胞のチロジナーゼ活性に及ぼすテレオシジンの作用

細胞名	テレオシジン処理	チロジナーゼ活性	
		nmol/mg prot.	/hr S.E.M.
B ₁₆	—	7.2	±0.5
	+	0.2	0.2
L ₆ TG·CAP ^r	—	0.6	±0.2
	+	0.3	0.6
RC* 14-4-1	—	1.4	±0.3
	+	2.6	0.6
RC* 14-4-4	—	75.5	±6.1
	+	1.1	0.3
RC* 14-4-6	—	143.2	±1.8
	+	0.8	0.3

* Values are means of determinations. 測定: 及川法による (及川教授測定). RC は再構成細胞の略.

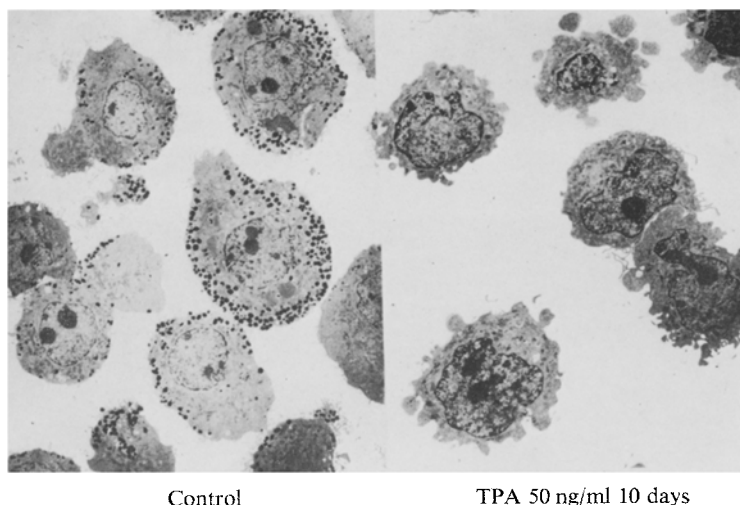


図 6 TPA 処理によるメラニン産生細胞のメラニン合成の消失および細胞表面微細構造の変化 (電顕 $\times 8,000$)

- a. 対照群には多数のメラニン顆粒があり, 細胞表面にはまた, 微絨毛様構造が認められる.
- b. TPA 処理射, メラニン顆粒なし.
細胞表面も大小, 不規則な突出構造を示す.

とく, 認められた多数の成熟メラノソームは消失し, 少数の未熟なメラノソームが見いだされるのみとなった. またラット細胞に近似した細胞表面に認められた微絨毛様突起も消失し, 元の B_{16} 細胞のごとき大小不同の陥入を示した (図 6a, b).

一方, マウス, ラット両親細胞は TPA 14 日間持続処理で, 形態的, 電顕的变化は全く認められなかった. さらに TPA の再構成細胞に対する効果は可逆的であり, TPA を含まぬ新鮮培地にもどすことによって, 一見, 元のマウス B_{16} 細胞と区別できぬ形態を示した再構成細胞は 24~48 時間内に再び特徴的な再構成細胞の形態, 配列を示し, さらにもどし培養 5~7 日後には再びメラニン産生を発現する. この色素産生再構成細胞を再び TPA 処理を行うと第 1 回処理時のごとく, 細胞形態および配列の変化を経て, メラニン非産生となる.

以上の結果から結論されることは, 第一は再構成細胞クローンに認められた種々の形質発現の誘導は, マウス核遺伝子の変異によるものでなく, その遺伝子発現の制御にもとづく形質発現の誘導であること, 第二はこの細胞質因子による遺伝子発現の調節, 制御を tumor promoter といわれる薬剤が可逆的に阻害低下させることである. 現在, その後の研究によって, さらに種々の形質発現の変化が認められ, すでに論文報告もある¹³⁾が, 表 3 に示すとどめ, ここでは一つだけ, 親細胞であるマウス癌細胞の示した高い造腫瘍性が, いずれの再構成細胞, およびサイブリッドクローンでヌードマウスを用いた移植実験によって造腫瘍性が著しく低下し, クローン分離 6 カ月以内の細胞ではいずれも全く腫瘍を作らぬことを述べる¹⁴⁾. しかし, 培養 9 カ月以上のあるクローンでは再び造腫瘍性を発現する. 一方, 前記のごとく, 再構成細胞に認められた形態的, および特異的細胞配列, メラニン産生は培養 2 年以上経過しても安定に発現している.

このように, 筆者の分離したマウス-ラット異種間の再構成細胞 (核移植細胞) の特徴は, 多種の

表 3. マウス核・ラット細胞質より構成された再構成細胞における新たな形質発現の誘導

-
1. CAP resistance
 2. Morphological changes
 - a. Unique cellular arrangement
(End-to-end joint)
 - b. Ultrastructural change on cell surface
(Microvillous structure)
 3. Induction of supermelanin synthesis and tyrosinase activity
 4. Epigenetic modulation of mouse HGPRT isozyme pattern
 5. Epigenetic modulation of expression of histone H1 genes
 6. Suppression of tumorigenicity
-

(多面的)な形質発現の誘導されること (pleiotrophic effect), およびその発現の安定性の高いことである。

5. 細胞質制御因子の分子の実態

ここでクローン分離された核移植細胞およびサイブリッドの特性は, すべての細胞は CAP 耐性を獲得していること, および前記のごとく, 種々の新たな形質発現の誘導のみられること, かつ, この形質発現の変化は gene mutation によるものではないことである. 細胞質内に存在する DNA 遺伝子は大きく分けてミトコンドリア DNA (mtDNA) と, extra-mitochondrial cytoplasmic DNA に区別される. そして CAP 耐性は以前より mtDNA の変異であろうことが推察されていた. 筆者らが, mtDNA を制限酵素分解し, その電気泳動パターンより動物種を鑑別する方法を用いて, クローン分離直後の再構成細胞およびサイブリッドについて分析を行ったところ, すべてマウス種であってラット種は検出されなかった¹⁵⁾.

最近, Craig ら¹⁶⁾によって CAP 耐性は mtDNA の 16s ribosomal gene (1,226 base pair) のただ 1 個所の point mutation であることが明らかにされた. また, われわれはあるマウス・ラット雑種細胞に recombinant mtDNA 分子の存在することを見いだした¹⁷⁾. したがって, もしラットの CAP 耐性に関与するラット mtDNA のごく一部がマウス mtDNA と recombinant mtDNA を作れば, 制限酵素分解法では検出されぬが, CAP 耐性を発現しうる可能性はある. しかし, 種々の新たな形質発現の理由を検出しえぬラット mtDNA に帰することは不可能である.

従来より, extra mtDNA として細胞質内に mtDNA の約 1/10 の分子サイズの小環状 DNA がヒトをはじめ, 哺乳動物細胞に存在することが知られていたが^{18,19)}, その分析には 10^9 程度の大量の細胞が必要であり, 分析困難であった. 最近, 京大理学部, 山岸秀夫博士はこの染色体外の, かつ extra mtDNA と考えられる DNA 分子をマイカ板上で展開し, 電顕分析を行うことにより, 10^9 レベルの細胞の小環状 DNA の検出法に成功した²⁰⁾. 同博士の分析によると, 培養株細胞には $0.5 \mu\text{m}$ 以下の小環状 DNA が共通に存在するが, 分化した細胞では染色体 DNA の切り出しが行われてよりサイズの大きな $1.0 \mu\text{m}$ 以上の環状 DNA が出現するとの知見を得ている²¹⁾. 同博士が筆著の両親細胞およびクローン細胞を分析したところ, いずれの親細胞にも $1.0 \mu\text{m}$ 以下の小環状 DNA が存在するが, ことにラット細胞では $0.3 \sim 0.5 \mu\text{m}$ (1,200 B.P.) にピークを示すほぼ均一な DNA が存在する²²⁾. 再構成細胞クローンではこのラットのピーク DNA に近似する小環状 DNA が存在するほかに, 数 μm に及ぶ大環状 DNA が検出されたが, これは分化細胞に特徴的に見いだされる

分子である。現在、再構成細胞に見いだされるピーク DNA がラット親細胞のそれと同一か否かについてクリーニングを行いつつある。また、染色体 DNA より分化に伴って切り出された中～大環状 DNA の一部が、再び染色体 DNA に integrate するか否か、すなわち transposone としての働きがあるか否かは今後の課題である。

目下、tumor promoter 処理を行った細胞での小環状 DNA について分析中であり、これらの結果とあわせて染色体外の小環状 DNA の遺伝的機能が明らかにされるであろう。いずれにしても再構成細胞において、遺伝子発現の細胞質による制御、誘導がみられること、そしてその分子の実態は次第に染色体外の小環状 DNA の動きと密接に関連するものと考ええる。

REFERENCES

- 1) Carter, S.B. 1967. *Nature* **213**: 261-264.
- 2) Prescott, D.M., Myerson, D., and Wallace, J. 1972. *Exp. Cell Res.* **71**: 480-485.
- 3) Ege, T., and Ringertz, N.R. 1975. *Exp. Cell Res.* **94**: 469-473.
- 4) Shay, J.W. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 2461-2464.
- 5) Ringertz, N.R., Krondahle, U., and Coleman, J.F. 1978. *Exp. Cell Res.* **113**: 233-246.
- 6) Gopalakrishnan, T.V., Thompson, E.B., and Anderson, W.F. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 1642-1646.
- 7) Halaban, R., Moellman, G., Godavska, E., and Eisenstadt, J.M. 1980. *Exp. Cell Res.* **130**: 427-435.
- 8) Ziegler, M.L. 1979. *Somatic Cell Genet.* **5**: 129-134.
- 9) Howell, A.N., and Sager, R. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 2358-2362.
- 10) Lipsich, L.A., Kates, J.R., and Lucas, J.J. 1979. *Nature* **281**: 74-76.
- 11) Gopalakrishnan, T.V., and Anderson, W.F. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 3932-3936.
- 12) Sekiguchi, T., Tosu, M., Yoshida, M.C., Oikawa, A., Ishihara, K., Fujiki, H., Tumuraya, M., and Kameya, T. 1982. *Somatic Cell Genet.* **8**: 605-622.
- 13) Isobe, M., Ogita, Z., Yoshida, M.C., Tosu, M., and Sekiguchi, T. 1982. *FEBS Lett.* **144**: 293-298.
- 14) Koura, M., Isaka, H., Yoshida, M.C., Tosu, M., and Sekiguchi, T. 1982. *Gann* **73**: 574-580.
- 15) Hayashi, J., Gotoh, O., Tagashira, Y., Tosu, M., and Sekiguchi, T. 1980. *FEBS Lett.* **117**: 59-62.
- 16) Kearsy, S.E., and Craig, I.W. 1981. *Nature* **290**: 607-609.
- 17) Hayashi, J., Gotoh, O., Tagashira, Y., Tosu, M., and Sekiguchi, T. 1981. *Exp. Cell Res.* **131**: 458-462.
- 18) Smith, C.A., and Vinograd, J. 1972. *J. Mol. Biol.* **69**: 163-184.
- 19) DeLap, R.J., Rush, M.G., Zouzia, D., and Khan, S. 1978. *Plasmid* **1**: 508-518.
- 20) Kunisada, T., and Yamagishi, H. 1983. *Plasmid* **9**: 8-16.
- 21) Yamagishi, H., Kunisada, T., and Tsuda, T. 1982. *Plasmid* **8**: 299-306.
- 22) 山岸秀夫, 国貞隆弘, 戸須真理子, 関口豊三, 第 41 回日本癌学会総会報告.