HeLaS3細胞におけるDNA複製順序性についての研究

金沢大学十全医学会雑誌　第87巻　第3号　440—452（1978）

HeLaS3 細胞における DNA 複製順序性についての研究

金沢大学がん研究所生物物理部（主任：吉川　寛教授）
青　山　重　靖

（昭和53年5月25日受付）

動物細胞のゲノムは数本から数十本の染色体から成る．その複製は細胞周期のS期（DNA 合成期）に行なわれ[1]，染色体 DNA 分子の多数の部位から開始される[2)~4)]．

細菌細胞の場合と類比して考えると，S期の長さは，S期内で働きうる複製開始点の総数（複製単位の大きさに関係する．）及び複製単位の複製開始頻度（時間的順序の調節），そして複製点での DNA 合成速度などのパラメターにより決まると考えられる．これまでの研究により，とくに複製単位の大きさの調節[5)~7)]及び複製単位の複製開始頻度の調節[7)]（時間的順序の調節）が重要な役割を果していることが示唆された．さらに，DNA 線維オートラジオグラフ法を用いた実験は[3)7)~10)]，いわゆる複製単位が群単位としても時間的順序の調節を受けている可能性を示している．

全S期にわたって，このような DNA 複製の時間的順序の調節は存在するのだろうか．今までの研究は DNA 複製順序性が部分的には存在することを明らかにした．すなわち，複製 DNA の塩基組成はS期を通じて一定の変化を示す[11)~14)]とか，S期初期または後期に標識した DNA[15)~18)]，特殊な性質を示す DNA[13)14)19)~22)]，あるいは特定の遺伝子[23)~27)]などの複製時期は他の世代でも再現性があるとかを示した．

しかし，S期のあらゆる時期において DNA 複製が一定の順序で行なわれているかについてはなお実証が不充分である．さらに，方法的にもいくつかの問題がある．たとえば，同調細胞を用いている多くの研究では，同調化に用いた DNA 合成阻害剤の影響や同調化に伴う2次的効果についてあまり配慮されていない．従って，従来の方法の問題点を充分考慮した上でS期全体にわたり DNA 複製が一定の順序で行なわれているか否かをしらべることが必要である．

対数増殖期にある培養細胞を短時間標識したのちM期に達した細胞を順次集めると，S期全体にわたってS期の各時期で標識された細胞を集めることが可能である[13)16)]（以下，この方法を Retroactive Synchronization 法[23)]と呼ぶ）．この方法は DNA 合成阻害剤を用いることも，また GI 期での細胞の乱れの問題も避けるばかりではなく，細胞を同調化しないでS期全体にわたり特定の時期にある細胞を標識できる利点をもつ．

本研究では，HeLaS3 細胞を用いて，この Retroactive Synchronization 法による場合とM期細胞採集法[28)]により同調化した細胞を用いる場合の2種の解析法の結果を比較することにより，全S期にわたる DNA 複製の順序性の有無をしらべた．さらに Hydroxyurea (HU) 同調法のS期への影響も検討した．

その結果，S期のあらゆる時期において DNA は一定の順序で複製することがわかった．また，HU 同調法はS期初期の DNA 複製順序には変化を与えず，しかも単位時間当りの複製点の数の増加もS期の長さの短縮も起こさなかった．さらに，この研究過程で生理的なものに加えて，標識に用いたトリチウムの放射能効果が細胞進行を著しく乱すことがわかった．

実験材料および方法

I. 細胞培養

細胞は HeLa 細胞 S3 株を用いた（金沢大学薬学部堀川正克博士より供与された．）．

培養液は浮遊細胞培養用イーグル MEM 培地「ニッスイ」（日水製薬）を 1l の2回蒸留水に溶かし，L-グルタミン 0.292g を加え，10％炭酸水素ナトリウム水溶液で pH を約 7.0 に調整した．さらに最終濃度 10％になるように仔牛血清（Flow 社）を加えた．

培養瓶に生育した細胞を，0.25％トリプシン溶液で分散し，培養液で稀釈した．その内の約 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 細胞を 15 ml の上記培養液の入った中角瓶（池本理化）に加え，37℃密閉系で単層培養した．この条件下では細胞の世代時間は約 24～25 時間であり，5日間毎に継代を行なった．

Study on the temporally ordered replication of DNA in HeLa S3 cells. **Shigeyasu Aoyama**, Department of Biophysics (Director : Prof. H. Yoshikawa), Cancer Reserch Institute, Kanazawa University.

II．試薬

1．〔methyl-^{3}H〕Thymidine（^{3}H-TdR），5Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham.

2．〔2-^{14}C〕Thymidine（^{14}C-TdR），53-62mci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham.

3．Deoxy〔5-^{3}H〕Cytidine（^{3}H-CdR），2Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham.

4．5-Bromo-2′-deoxyuridine（5-BUdR），Sigma.

5．Hydroxyurea（HU），Sigma.

6．プロナーゼE．（科研化学）

III．緩衝液

1．P.B.S.；1l 中に，NaCl　8.0g，KCl　0.2g，Na_2HPO_4 1.15g，KH_2PO_4 0.2g を含む．

2．1×SSC；0.15M NaCl, 0.015M Na_3-citrate

3．lysis buffer；0.2M NaCl, 10mM EDTA, 0.2％Sarcosyl, pH9.0.

IV．実験方法

1．M期細胞採集法および同調培養

出来るだけ生理的に同調化を行なう方法としてM期細胞採集法[28]を用いた．これはM期細胞のガラス面吸着力が特に弱いことを利用しているが，通常のイーグルMEM培地よりも更に吸着力を弱める低カルシウム培地を用いて，より多くのM期細胞を得るのに好成績を収めた．

まず，30 ml 培養液の入ったルー瓶（池本理化）3～9本に対数増殖期にある細胞を各々5×10^5個を加え2～4日間培養した．細胞のDNAを一様に標識するときは，1日後に^{14}C-TdR又は^{3}H-TdRを各々最終濃度を0.1μc/2μgTdR/ml又は0.5μc/2μgTdR/mlになるように加え4日間培養した．また，細胞を短時間標識するときは，4日間培養後，まず古い培養液を除き直ちに細胞を10 mlの新鮮培養液で2回洗い，その後^{3}H-TdR（2μc/ml）あるいは^{14}C-TdR（0.3μc/ml）で1時間標識した．TdR（50μg/ml）を含む培養液で置き換えることにより標識前駆体の取込みを抑え，さらに培養液で数回洗った後，もとの連続標識用培養液で一定時間培養し続けた．

M期細胞の採集を開始する前に古い無標識の培養液あるいは連続標識用培養液を捨て去り，新鮮培養液で1回細胞面を洗った後10 ml培養液を加え，ルー瓶を手動で水平に100回ほど強く振盪し，水力学的力により球形または亜鈴形となり壁面に弱く結合しているM期細胞を剥しとった（1回の振盪操作過程）．

すでに浮遊している細胞，ゆるく壁面に結合している死細胞あるいは剥れやすいM期以外の細胞を除くために，初めの2回の振盪操作過程で剥された細胞浮遊液を捨て去った後，10 ml培養液で2回洗浄し，さらに10 ml培養液を加えた．30分後にルー瓶を水平振盪しM期細胞をとり去り，新たな10 ml培養液を加え同様の操作過程を繰り返した．2時間にわたる合計4回の操作過程により集めた細胞を氷冷して保存した．以上の操作はすべて37℃恒温室内で行なった．

M期細胞採集法は機械的刺激を除けば非常に生理的な同調法であるが，5～8×10^6個の対数増殖期細胞が生育しているルー瓶1本から，1回の振盪操作過程の収率はわずか1～2％である．

分裂期で集めたHeLa細胞は，0℃で2～3時間保存しても37℃に戻すと細胞代謝及び同調に何ら影響なく細胞周期を進行することが知られている[29][30]．そこで，2時間にわたる，4回の操作過程で集めた細胞浮遊液を氷中で保存することにより収率の増加を計った．毎回集めたM期細胞の分裂指数はほぼ85～90％以上であり，氷冷中も変化しなかった．

同調培養を始めるには，まず氷冷したM期細胞浮遊液を一旦遠心して，新鮮培養液に置き換えてから37℃恒温槽中で急速に温めて平衡化した．恒温室（37℃）内で35m/mペトリディッシュ（Falcon）に細胞浮遊液を2 mlづつ分注した後5％炭酸ガス培養器内で培養した．

2．^{3}H-TdRの取込みによるDNA合成量の測定法

35m/mペトリディッシュ中で対数増殖期にある細胞あるいはM期細胞採集法で同調した細胞を^{3}H-TdR（2μc/mlあるいは10μc/ml）を含む培養液で一定時間標識した．標識用培養液を除去し，氷冷したP.B.S.（50μg/ml TdRを含む．）で数回ディッシュを洗い，0.25％トリプシン溶液で細胞分散させ，そこから適量をとり最終濃度1NになるようにKOHを加えるか，あるいは直接ディッシュにKOH（最終1N KOH）を加え，37℃で1晩処理した後HClで中和した．これに氷冷した10％トリクロル酢酸(TCA)を加え，TCA沈澱をGlass fiber filter（Whatman製，GF/C）上に集め，トルエン・PPOシンチレーター(PPO 5g/lトルエン）を用いて，その放射能活性を測定した．

3．CsCl密度勾配遠心法

同調培養後，各試料採取時間に培養液（5μg/ml 5-BUdRを含む．）を除去し，細胞をP.B.S.で3回洗ったのち，細胞が生育しているディッシュを－20℃冷凍庫に入れ保存する．

保存していた試料細胞をlysis bufferで溶かし，さらにプロナーゼEを最終濃度500μg/mlになるように加え37℃で数時間処理する．その後溶けた試料液を直径1.0m/mの注射針の中を数回通しDNAを切断す

る．この溶液に4.76gのCsClと適量の1×SSCを加えて最終密度を1.70，全容量を5.0 mlとした．Beckmann SW 50.1 ローターで20℃，35,000rpm，48時間遠心した．遠心後，遠心管の底から8滴づつ分画し，各分画のDNAの放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定した．この条件ではBUdRの置換率は約80％であった．

4．オートラジオグラフ法

M期で同調した細胞あるいはHU処理により同調した細胞を一定時間毎に^{3}H-TdR (2μc/ ml) で30分間短時間標識し，直ちに氷冷したP.B.S. (50μg/ ml TdRを含む.) で3回洗い，その後0.25％トリプシン溶液で細胞を分散させ，培養液で浮遊した後低速遠心で細胞を集める．細胞はメタノール・酢酸（3：1）で固定後スライドグラス上に拡げ，一日乾燥後2％過塩素酸溶液で2回洗うことにより酸可溶性標識化合物を取り去り，充分水洗する．スライドグラスに乳剤(サクラNR-M2）を塗布し暗箱内で3週間露光後現像した．標識細胞当り10個以下の銀粒子のものは，バックグラウンドとして標識細胞としなかった．

実験結果

I. Retroactive Synchronization 法による解析

1．S期の特定期で短時間標識した細胞の採集について

DNA複製の順序性を調べるためには，S期の各時期で標識した細胞を得る必要がある．このためには，S期の開始及びS期全体を通じて高度な同調性を保つ細胞集団を必要とする．M期及びGI期で同調化した細胞を用いる場合は，GI期での細胞進行の乱れの問題[31][32]を考慮しなくてはならない．従って，今までの研究の多くは，GI/S遷移点で同調化を行なうことを目的としてDNA合成阻害剤を用いてきた．しかしながら，これらの研究では，DNA合成阻害剤の複製順序性に対する影響についてほとんどしらべられていないばかりでなく，細胞集団の進行を同調化することによる2次的効果についても検討されていない．

対数増殖期にある培養細胞を短時間標識したのちM期に達した細胞を順次集めると，S期全体にわたって，S期の各時期で標識した細胞分画を順次集めることが可能である[13][16]（これをRetroactive Synchronization法[23]と呼ぶ）．この方法はDNA合成阻害剤を用いることも，またGI期での細胞の乱れの問題も避けるばかりでなく，細胞の同調化を行なわないでS期全体にわたって特定の時期に標識された細胞分画を集めうるという特徴をもつ．

まず，^{14}C-TdR (0.1μc/2μg TdR/ ml）で4日間標識した対数増殖期細胞に^{3}H-CdR (4μc/ ml)で1時間標識して，その後30分毎にM期細胞採集法により順次M期細胞を集め，各細胞のDNAへの^{3}H-CdRの取込み量の変化を測定した（図1）.

標識後，3時間から7ないし10時間までに集められた細胞の標識時のDNA合成活性は次第に増加しているが，それ以降に集められた細胞のDNA合成活性は次第に減少している．即ち，これは標識時にS期後期にあった細胞から，中期，初期にあった細胞へと順次に集めたことを示している．

以下の実験では，30分毎に採集したM期細胞を氷冷保存し，4回分を集め1細胞分画とした．図1の棒グラフの1単位が2時間の細胞分画に相当する．即ち，この方法ではS期細胞を，DNAの放射性デオキシシチジン（あるいはチミジン）による標識に関して8～9分画に分けることになる．はじめの2分画をS期後期，次の3分画をS期中期，最後の3～4分画をS期初期と呼ぶ．

2．^{14}C連続，^{3}H短時間標識DNAの第2S期における複製様式

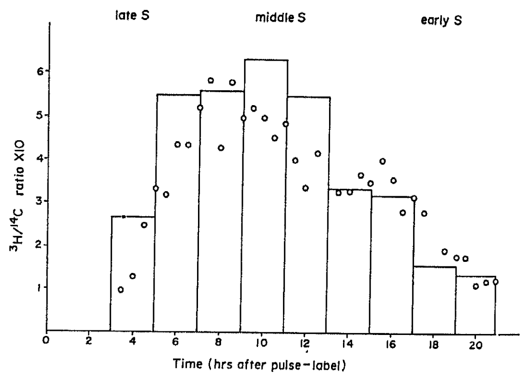

図1： 標識後，M期に至った細胞のDNA当りの^{3}H-CdR取込み量の変化．

^{14}C-TdR (0.1μc/2μg TdR/ ml）で4日間連続標識した対数増殖期細胞に^{3}H-CdR (4μc/ ml) で1時間標識し，37℃培養液（50μg/ ml CdRを含む.)で2回洗ったのちもとの連続標識用培養液で各時間培養した．M期細胞採集法で集めた細胞のDNAへの^{3}H-CdR取込み量は実験方法で述べたようにして測定した．^{3}H/^{14}C ratioでDNA当りの^{3}H-CdR取込み量を表示した．各棒印(□)は異なる瓶で各2時間(30分毎，4回)の振盪操作過程により集めた細胞分画のDNA当りの^{3}H-CdR取込み量を表わす．(○) はそれぞれの瓶で1回の振盪操作過程により集めたM期細胞のDNA当りの^{3}H-CdR取込み量を表わす．

1で述べたような方法でS期の特定の時期に複製されるDNAのみが標識されている細胞分画を集め，この標識DNAが次のS期においてどのような時期に複製するかを調べるのが目的である．このためには，対照として全体のDNAの複製様式を同時に測定する必要がある．そこで，全体のDNAと特定の時期のDNAを2種の異なる放射性同位元素で標識し，次のS期の複製は5-BUdRを取込ませ，複製し一方の鎖が重くなったDNA（HL分画）への標識の移行によって測定した．

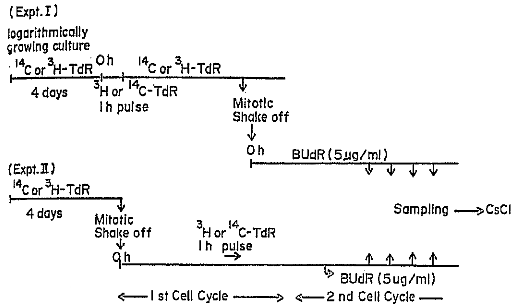

図2：実験プロトコール

S期の特定期で短時間標識した細胞の獲得と標識DNAの第2S期における複製様式の解析法．

Expt.I：^{14}C-TdR（0.1μc/2μg TdR/ml）又は^{3}H-TdR（0.5μc/2μg TdR/ml）で4日間連続標識してDNAを均一に標識した対数増殖期細胞に，^{3}H-TdR（2μc/ml）又は^{14}C-TdR（0.3μc/ml）で1時間標識する．もとの連続標識用培養液でさらに一定時間培養してのち，2時間にわたりM期細胞採集法によりS期の特定期で標識されたM期細胞分画を集める（Retroactive Synchronization法：但し各細胞分画は異なる母集団から集める.）．ディッシュで同調培養後0.5時間に新生DNAを重く標識するするために5-BUdR（最終濃度5μg/ml）を加え，第2S期の各時期に試料細胞を採取した．CsCl密度勾配遠心法を行ない，図3の説明文中の式により標識DNAの複製の割合を求めた．

Expt.II：^{14}C-TdR（0.1μc/2μg TdR/ml）又は^{3}H-TdR（0.5μc/2μg TdR/ml）で4日間連続標識した対数増殖期細胞から，M期細胞採集法により細胞を集めてディッシュで同調培養を始めた（0時間）．第1S期の各時期に^{3}H-TdR（2μc/ml）又は^{14}C-TdR（0.5μc/ml）で1時間標識し，培養液（50μg/ml TdRを含む）で細胞面を2回洗ったのちチェイス用培養液（2.5μg/ml TdRを含む）で培養をつづけた．30.5時間（ときには28.5時間あるいは34時間）に5-BUdR（5μg/ml）を含む培養液に置き換え，その後第2S期の各時間に試料細胞を採取した．標識DNAの第2S期での複製の割合は，Expt.Iと同様な方法で求めた．

そこで，第1の組合わせとして以下のように行なった（図2のExpt. I）．^{14}C-TdRで4日間連続標識した対数増殖している細胞に^{3}H-TdRで1時間標識し，一定時間後から2時間にわたりM期細胞採集法により集めた細胞分画は直ちに37°C新鮮培養液で同調培養を行なった．新生DNAを重く標識するために5-BUdR（最終濃度5μg/ml）を加え，その後経時的に試料細胞を採取してCsCl密度勾配遠心法にかけた．複製により片方の鎖に5-BUdRを含み重くなった標識DNA分画(HL)をまだ複製していない標識DNA分画(LL)から分離して均一に標識したDNA(^{14}C-DNA)お

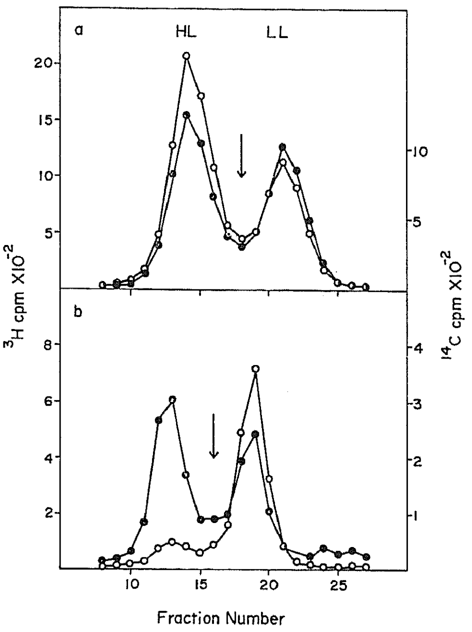

図3：標識DNAのCsCl密度勾配遠心分離パターン．

図2のExpt.Iで示す様に^{14}C-連続，^{3}H-短時間標識した対数増殖期細胞からRetroactive Synchronization法により標識後，(a) 15〜17時間，(b) 5〜7時間にM期に達した細胞分画を集め，5-BUdR存在下で同調培養を行なった．同調後(a) 18時間，(b) 19.5時間に試料細胞を採取し，CsCl密度勾配遠心法にかけ，各分画のDNAの放射能活性を測定した．

(○——○)：^{3}H-DNA，(●——●)：^{14}C-DNAをあらわす．(↓)のところで軽い分画(LL)と重い分画(HL)とを分け，次式により各標識の複製の割合を求めた．

$$\text{標識DNAの複製の割合} = \frac{HL}{HL+LL}$$

(a) ^{14}C：54.9％，^{3}H：64.0％，
(b) ^{14}C：58.1％，^{3}H：14.2％

よび短時間標識 DNA（^{3}H-DNA）の複製の割合（percent replication）を求めた（図3）.

図4は各細胞分画の標識 DNA の第2S期における複製様式を示している．短時間標識後，より遅くM期に達する細胞分画（即ち，よりS期初期に近い分画）の^{3}H-DNA（短時間標識）ほど第2S期ではより先行して複製が進む．これは，DNA の複製が全く無秩序に起るのではなく，一定の順序に従って起っていることを示す．

しかし，第1S期の中期ないしは後期標識細胞分画の^{3}H-DNA は，全 DNA（^{14}C-DNA）の複製様式と比較すると，第2S期でも明らかに中期ないしは後期に複製していることがわかる．これに対して，標識後15～17時間ないしは13～15時間にM期に達したS期初期標識細胞分画（以下，R.S（15～17h），R.S（13～15h）のように表示する.）の^{3}H-DNA の第2S期での複製は，S期初期にとどまらずS期全体にわたり全 DNA に近い複製経過を示す．これは，第1S期初期で標識した DNA が第2S期では無秩序に近い複製を行なうことを示しているのか，あるいはS期初期に標識したとしている細胞分画に，標識時S期中期ないし後期にあった細胞で細胞進行速度の遅いものが混じってくるために，見かけ上この細胞分画の^{3}H-DNA の複製が無秩序に近くみえるのか，この実験では区別できない．

3．^{3}H 連続，^{14}C 短時間標識 DNA の第2S期における複製様式

前述の系では，標識時S期中期ないしは後期にあった細胞で進行速度の遅いものがS期初期標識細胞分画に混入する可能性を指摘した．これには生理的に生ずる細胞進行の乱れの他に比活性の高い^{3}H による短時間標識に伴う放射能効果[33]が関与していることが考えられる．

そこで，^{3}H-TdR の放射比活性を低くし，かつS期の各時間毎の^{3}H 放射能効果の感受性の差を考慮しないですむように核種の交換を行なった．すなわち，細胞を弱く^{3}H-TdR で4日間連続標識し定常状態とした後，^{14}C-TdR で1時間の短時間標識を行なった（図2の Expt. I).

図5はS期初期の細胞分画 R.S（15～17h）とS期後期の細胞分画 R.S（5～7h）の標識 DNA の複製経過を示している．

R.S（5～7h）の^{14}C-DNA（短時間標識）は第2S期でもS期後期で複製している．一方，R.S（15～17h）の^{14}C-DNA の第2S期での複製は，^{3}H-DNA（全 DNA）の複製経過と明らかに異なり，むしろ R.S（5～7h）のものと非常によく似た複製経過を示す．しかも，この^{14}C-DNA の多くは第2S期初期で複製している．

これは，第1S期の初期で標識した DNA が第2S期で無秩序に近い複製を行なうことはなく，S期後期で標識した DNA と同様にS期初期の一定の時期に複製していることを示す．

従って，前述の系でS期初期細胞分画の短時間標識 DNA が全 DNA に近い複製経過を示したのは，標識時S期の中期ないし後期にあった細胞進行速度の遅い細胞がこの分画に混入したためと考えられる．この著しい混入には，比活性の高い^{3}H による短時間標識に伴う放射能効果が関係している．

これら2種類の実験結果から，HeLa 細胞では2世代にわたりS期全体の DNA 複製順序が一定であると解釈できる．しかも，標識細胞の同調化による2次的効果は少くともこの実験精度では見られない．

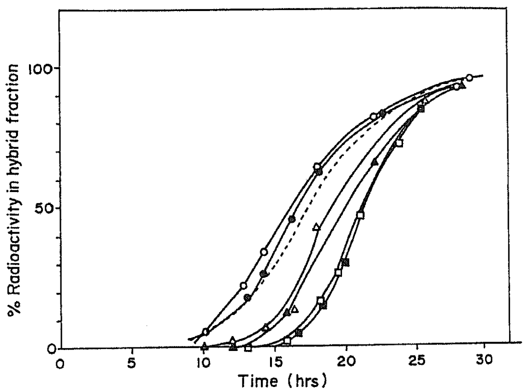

図4：^{14}C 連続，^{3}H 短時間標識 DNA の第2S期における複製様式.

図1の Expt.I で示したように^{14}C 連続，^{3}H 短時間標識した対数増殖期細胞から Retroactive Synchronization 法により，標識後5～7時間（■──■），7～9時間（□──□），9～11時間（▲──▲），11～13時間（△──△），13～15時間（●──●），15～17時間（○──○）にM期に達した細胞分画（略して R.S (15～17h)のようにかく.）を集め，各細胞分画の均一に標識した^{14}C-DNA（……）及び^{3}H-DNA（──）の第2S期の種々の時間における複製の割合を図3のようにして求め，時間に対してプロットした．

各細胞分画はそれぞれ異なる母集団から集められ，しかも別々に同調培養を行なっている．従って，それぞれの^{14}C-DNA の複製経過には多少ばらつきがある．そこで，すべての^{14}C-DNA の複製が一致するように補正するために，各細胞分画の第2S期の各時間で得られる^{3}H-DNA の複製の割合を，その時間の^{14}C-DNA の複製の割合と同じ値を示す R.S (15～17h) の時間にプロットした．

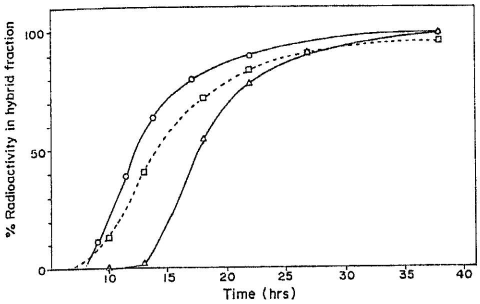

図5：^{3}H 連続，^{14}C 短時間標識 DNA の第 2S 期における複製様式．

図1の Expt.I に従って行なった．^{14}C と^{3}H の核種の使用法を逆にした以外は，図4と同じ方法で^{14}C-DNA（短時間標識）の複製様式を求めた．

S 期初期細胞分画 R.S（15 ～ 17h）：○──○；

S 期後期細胞分画 R.S（5 ～ 7h）：△──△；均一に標識した^{3}H-DNA（□……□）の複製様式は R.S（5 ～ 7h）のものであり，R.S（15 ～ 17h）の^{14}C-DNA の複製は図4と同様に補正してプロットした．

Ⅱ．従来の方法の検討

前述の，対数増殖期細胞を標識したのちS期の特定期で標識した細胞分画を集める Retroactive Synchronization 法の解析により，S期全体の DNA 複製順序が2世代にわたり一定であることを示した．

しかしながら，この研究で用いた Retroactive Synchronization 法による場合は，かなりの再現性があるとはいえ，S期の特定期で標識した各細胞分画を異なる実験の母集団から集め，別々に同調培養を行なった．さらに，S期初期で標識した各細胞分画はM期に到達するまでにS期後期のものに比べより時間を要し，生理的にも生ずる細胞進行の乱れの影響を受けやすい．

これに対して，細胞を同調化してのち標識する従来の方法（M期[11)24)]及び GI 期同調法[19)20)23)]，DNA 合成阻害剤による方法[11)14)15)22)23)25)~27)]）では，同じ実験の母集団から由来した細胞をS期の各時期で標識しうる．その上，これらの方法はS期後期よりもS期初期で標識するときの方が細胞集団の同調度が高い．

そこで，これらの利点をもつ従来の方法のうち，阻害剤を用いず比較的生理的なM期細胞採集法による場合にも，2世代にわたる DNA 複製順序の一定性が観察できるかを検討した．

一方，DNA 合成阻害剤による同調法はS期の開始時期を任意に遅らせることができ，かつS期全体を通じて高度な同調を維持させうる可能性をもつ，現在のところ唯一の方法である．しかしながら，DNA 複製過程に及ぼす影響についてはわずかな報告[34)~38)]があるにすぎない．そこで最もよく使われる HU 同調法の DNA 合成活性及び DNA 複製順序性に対する影響も検討した．

1．M期同調法による解析

M期細胞採集法によるM期同調法は，機械的刺激を除けば非常に生理的な方法である．しかし，細胞種によっては，GI 期が長くかつ細胞進行の乱れが著しいために第 1S 期ですでに同調度が悪くなり，この種の解析には不適当な場合がある．

M期細胞採集法により同調化した HeLaS3 細胞の同調度をしらべるため，第 1S 期の各時間の^{3}H-TdR の取込み量及びオートラジオグラフ法による標識細胞の割合の変化をしらべた（図10）．

同調細胞集団の DNA 合成活性のパターンは1相の比較的鋭いピークをもつが，DNA 合成開始から終了するまでには 15 時間以上要する．しかも，DNA 合成が開始されてから5～6時間以上かかって，ようやく 80％以上の細胞が標識される．さらに，大部分の細胞が標識されなくなるのに4～5時間以上かかる．これは，GI 期で同調が乱れたことを示す．

この同調法による解析は，図2の Expt. Ⅱのプロトコールに従って行なった．すなわち，^{3}H-TdR（又は^{14}C-TdR）で DNAを均一に標識した対数増殖期細胞からM期細胞採集法により細胞を集め同調培養を始め

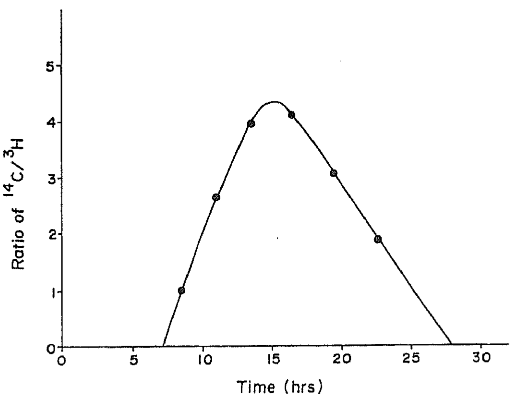

図6：M期同調細胞の第 1S 期における DNA 合成活性の変化．

図2の Expt. Ⅱで示すように，^{3}H-TdR で DNA を均一に標識した対数増殖期細胞からM期細胞採集法により細胞を集めて同調培養を始め（0時間），第 1S 期の6個所で^{14}C-TdR（0.5μc/mℓ）の1時間標識を行ない，DNA への取込み量を測定した．^{14}C/^{3}H ratio で DNA 当りの^{14}C-TdR 取込み量（●）を表示した．

て（0時間），第1S期の6個所で1時間の^{14}C-TdR（又は^{3}H-TdR）標識を行なった（図6）．標識した各細胞集団が第2S期に入る前と思われる時期に5-BUdR（最終濃度5$\mu g/ml$）を投与し，その後経時的に試料細胞を採取してCsCl密度勾配遠心法にかけた．第2S期の各時期で示す標識DNAの複製の割合は図3と同様にして求めた．

第1S期の各時間で^{3}H-TdR短時間標識した各細胞集団では，対照となる全体のDNA（^{14}C-DNA）の第2S期での複製経過が非常にばらつき一致しない（図7）．これは，5-BUdR投与（34時間）したときすでに，^{3}H標識した各細胞集団間に細胞進行の速さや乱れ方の，著しい相違があることを示している．従って，この系で短時間標識したDNA（^{3}H-DNA）の複製様式を解析することは非常にむずかしい．

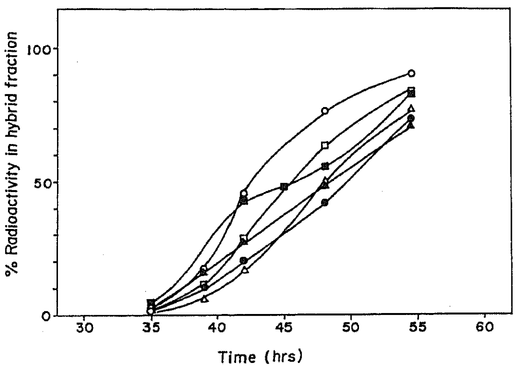

図7：M期同調後，第1S期の^{3}H-TdR短時間標識による第2S期の全DNAの複製様式に及ぼす影響．

図2のExpt. Ⅱに従って行なった．均一に標識した^{14}C-DNAをもつ同調細胞集団を，第1S期の8～9時間（○──○），10.5～11.5時間（□──□），13～14時間（△──△），16～17時間（●──●），19～20時間（▲──▲），22～23時間（■──■）で^{3}H-TdR短時間標識して，その後34時間に5-BUdR（5$\mu g/ml$）を含む培養液で置き換え，第2S期の各時間に試料細胞を採取して，全DNA（^{14}C-DNA）の複製の割合を求めた．

ところが，第1S期の各時間で^{14}C-TdR短時間標識した各細胞集団では，全体のDNA（^{3}H-DNA）が示す第2S期での複製経過が非常によく一致して1本の線上にのる（図8）．これは5-BUdR投与（30.5時間）以前も以降も，各細胞集団ごとの細胞進行の乱れ方が全く同じであることを示す．

そこで，以下の実験では，全体のDNAを^{3}H-TdRで均一に標識し，第1S期の短時間標識には^{14}C-TdRを

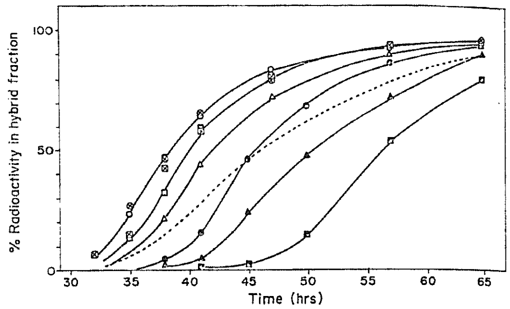

図8：M期同調後，第1S期で^{14}C-TdR短時間標識したDNAの第2S期における複製様式．

図2のExpt. Ⅱに従って行なった．均一に標識した^{3}H-DNAをもつ同調細胞集団を，図6で示したように，第1S期の8～9時間（○──○），10.5～11.5時間（□──□），13～14時間（△──△），16～17時間（●──●），19～20時間（▲──▲），22～23時間（■──■）で^{14}C-TdRの1時間標識を行ない，その後30.5時間に5-BUdR（5$\mu g/ml$）を含む培養液で置き換え，第2S期の各時間に試料細胞を採取して図2のExpt.Iと同様な方法で短時間標識DNAの複製の割合を求めた．

また第1S期の8～9時間（⊗──⊗），10.5～11.5時間（☒──☒）に標識してのち，28.5時間に5-BUdR（5$\mu g/ml$）を含む培養液に置き換えた場合も全く同様に行なった．

短時間標識したすべての細胞集団の^{3}H-DNA（均一に標識）の複製は第2S期のどの測定時間でもすべて破線（……）上に一致した．

用いて解析することにした（図8）．

この系では，5-BUdRの投与が28.5時間でも30.5時間でも複製様式は変らない．すなわち，第2S期の開始は30.5時間頃に起っていることを示している．

結果は以下のようである．まず第1に，第1S期での標識順序が早い^{14}C-DNA（短時間標識）ほど，第2S期では複製が早く開始し先行して進む．しかも，50％複製付近の複製速度はどの時期の^{14}C-DNAでもほぼ同じである．第2に，S期前半で標識したDNAの複製経過の時間差が第1S期での各標識時間の差に比べ短縮されているのに対して，S期後半で標識したDNAについてはむしろ延長される．第3に，S期初期に比べ後期で標識したDNAの方が80％複製に要する時間が長い．

第1の結果は，第1S期での複製順序と第2S期の複製順序が全く同じであることを示している．前節（図2のExpt.Iの系）の結果と考え合わせると，このことはS期のあらゆる時期のDNA複製が連続した3世代

を通じて一定の順序で行なわれていることを示している．

また，第2，3の結果は何によるのかはこの実験だけでは説明するのがむずかしい．しかし，第1S期初期や後期とS期中期で標識したDNAをもつ細胞群とでは，第2GI期での細胞進行の速度や乱れ方がちがうことを反映しているのかもしれない．

2．HU同調法による解析

過去の多くの研究はGI期での細胞進行の乱れの問題を避けるために，非生理的な種々のDNA合成阻害剤による同調法を用いてきた．

Hydroxyurea (HU) は，dGTP及びdATPの細胞内プールの欠乏を引起こすことによりDNA合成を阻害する[39][40]．このとき，RNAや蛋白質合成はほとんど阻害されない[37][41]．従って，HU同調法によりGI/S遷移点で細胞進行を止め多くの細胞のS期開始を遅らせることは，細胞内の高分子（DNA, RNA, 蛋白質）合成活性の間に非平衡的状態を作り出す．このことを考えると，HU同調法はDNA複製の過程に何らかの影響を与えていることも考えられる．

上述の解析で生理的条件下でHeLaS3細胞のDNA複製順序は3世代にわたって一定であることを示したが，HU同調法では，果してDNA複製順序が保存されうるものかどうかをしらべた．

1）HUによるDNA合成抑制とGI/S遷移点での同調法について

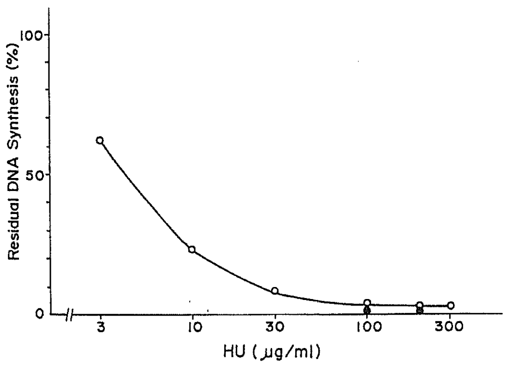

図9：各種濃度のHUによるDNA合成抑制

ペトリディッシュ中の対数増殖期細胞（1.2×10^5個）に各種濃度のHU存在したまま^{3}H-TdR（2μc/ml）で2時間標識したのち，ディッシュ当りの^{3}H-TdRの取込み量（○）を測定した．

HU（100μg/ml及び200μg/ml）の存在下で2時間前培養したのち，2時間の^{3}H-TdR標識した場合（●）も全く同様に行なった．

図はHU無添加の対照の取込み量を100として表示した．

筆者の使用した培養条件下でHUのDNA合成抑制の程度を調べるため，対数増殖期にあるHeLaS3細胞を各種濃度のHU存在のもとで2時間の^{3}H-TdR標識を行ない，DNAへの取込み量を測定した（図9）．

30μg/mlでほぼ90％以上の^{3}H-TdRの取込みは抑制されるが，100μg/ml以上の濃度でも3～4％程度の取込みが見られる．また100ないし200μg/mlで2時間の前培養した後，2時間標識すると対照の約1％まで取込み量は減った（図9）．少くともこの取込みの一部はミトコンドリアによるものかもしれない[42]．100ないし200μg/mlでは，10分以内で取込みの抑制が起

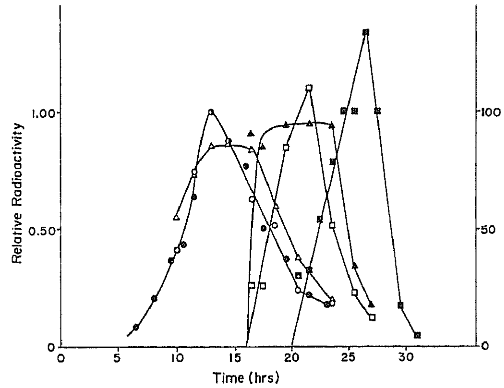

図10：M期同調法とさらにHU同調法を加えたときのS期の同調度の比較及びHUによるS期開始延期のDNA合成活性に対する影響

M期細胞採集法により同調化した細胞及びさらにHU（100μg/ml）により再同調化した細胞の第1S期での同調度を^{3}H-TdRの取込み量及びオートラジオグラフ法による標識細胞の割合の変化でしらべた．

第1S期の各時間で^{3}H-TdR短時間標識後，氷冷したP.B.S.（50μg/ml　TdRを含む）で3回細胞面を洗ったのち，0.25％トリプシン溶液で細胞分散させ，そのうちの1/4量は^{3}H-TdRの取込み量の測定に，残りの3/4量は標識細胞の割合を測定するために，実験方法で述べたように行なった．

M期細胞採集法：^{3}H-TdR取込み，2μc/ml 30分（○—○），10μc/ml 60分（●—●）；標識細胞の割合（△—△）．

HUによる同調法：（0.5～16時間処理）^{3}H-TdR取込み，2μc/ml 30分（□—□）；標識細胞の割合（▲—▲）．（0.5～20時間処理）^{3}H-TdR取込み，10μc/ml 60分（■—■）．

^{3}H-TdR取込み実験では，放射比活性濃度（2又は10μc/ml）や標識時間（30又は60分）に違いがあるので，比較のため13時間目での^{3}H-TdR取込み量を1.00としてその他の測定点は相対値で表示した．

こるが，新鮮な培養液で細胞を洗うことにより，その取込み能力は20分以内に回復する(データーは示していない.).

GI/S遷移点での同調は以下のように行なった．M期細胞採集法で同調培養を始めた後(0時間)，0.5時間から16時間までHU（100μg/ml）の存在下で培養し，再度GI/S遷移点で同調化した．その後直ちにHUを除去し，一定時間毎に^{3}H-TdR短時間標識して，^{3}H-TdRの取込み及びオートラジオグラフ法による標識細胞の割合をしらべた（図10）.

HU未処理の対照ではS期細胞が長時間に渡って存在するのに反し，分裂期後16時間でHUを除去した場合にはほぼ1時間以内に90%以上の細胞がS期に入り，大部分の細胞は7ないし9時間後にS期を終る．これに対応するように，DNA合成活性の変化のパターンは，対照に比べ1相のより鋭いピークをもち，かつS期の長さが短縮している．このようにM期同調後GI期で1度乱れた細胞を，HUによりGI/S遷移点で非常によく同調化しうる.

2）HUによるS期開始延期のS期に対する影響について

前述のHU同調法(0.5～16時間HU処理)よりもさらに長く20時間までHU処理して，その後のS期のDNA合成活性パターンをしらべた（図10；両者には放射比活性や標識時間の違いがあるので補正している.).

S期のほぼ半分に相当する4時間もS期開始を遅らせても，S期初期のDNA合成速度の増加やS期の長さの短縮は起きない．この事実はHamlinとPardeeの報告[37]とも一致する.

3）HU同調法のDNA複製の順序保存性に対する影響

^{3}H連続，^{14}C短時間標識した対数増殖期細胞からRetroactive Synchronization法によりS期初期標識細胞分画R.S(19～21h)とR.S(12～14h)を集めその各々を5-BUdR(5μg/ml)存在下で培養をつづけた未処理群と0.5時間から20時間まで5-BUdR(5μg/ml)及びHU(100μg/ml)存在下で，その後5-BUdR(5μg/ml)のみで培養しつづけたHU処理群とに分け，図2のExpt.Iと同様に標識DNAの第2S期における複製様式を解析した（図11）.

20時間目でHUを除去した同調細胞の均一に標識したDNA(^{3}H-DNA)及び2つの短時間標識DNA(^{14}C-DNA)の複製速度は，未処理群に比べて早くなっていることがわかる．しかしHU処理したR.S(19～21h)とR.S(12～14h)の標識DNA複製の時間差は，未

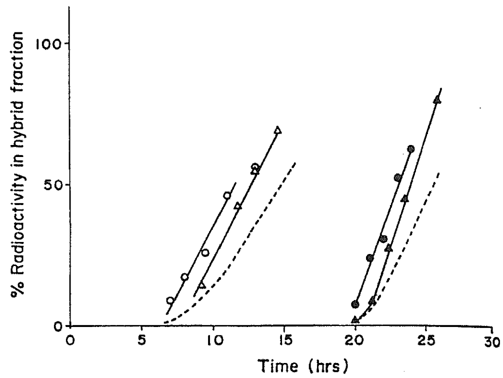

図11：HU同調法によるDNA複製順序性に対する影響

^{3}H連続，^{14}C短時間標識した対数増殖期細胞からRetroactive Synchronization法により集めたS期初期細胞分画R.S(19～21h)とR.S(12～14h)の^{14}C-DNAの第2S期における複製様式を，未処理とHU処理（100μg/ml，0.5～20時間)の場合について図5と同様に求め比較した.

R.S(19～21h)：未処理，○──○；HU処理●──●.

R.S.(12～14h)：未処理，△──△；HU処理▲──▲.

均一に標識した^{3}H-DNA(……)の複製様式はR.S(19～21h)のものであり，R.S(12～14h)の^{14}C-DNAの複製は図4と同様に補正してプロットした.

処理群の場合とほとんど同じで，短縮が起きていない．さらに標識DNA複製の時間的経過の関係は未処理群と非常によく似ている.

このことは，S期初期のDNA複製順序保存性はHU処理によって影響を受けないということを示している．また，HUのS期開始延期によってはS期初期のDNA合成速度の増加やS期の長さの短縮が起らないという前項の事実（図10）ともよく一致する.

考　　察

本研究により，HeLaS3細胞では，S期のあらゆる時期のDNA複製が連続した3世代を通じて一定の順序で行なわれていることを示した.

この結論は2種類の比較的生理的な方法による解析から得られ，さらにHU同調法を使用した方法によっても支持された.

これらの解析は，S期の特定期に複製するDNAのみを標識した細胞群を得て，この標識DNAが次のS期でどのような時期に複製するかを相互に比較することによって行なわれた.

第2S 期の複製様式は，第1に，S 期の各細胞分画の標識 DNA 複製様式のちがいを，第2に，目的とする細胞分画がどの程度S 期の特定期で標識した細胞から成立っているか（すなわち，細胞分画の均一性）を，第3に，標識後第 2S 期に至るまでの細胞進行の乱れを反映しうる．

対数増殖期細胞を短時間標識した系では細胞は M 期で同調したにもかかわらず主に GI 期で同調がくずれる（図4と図5の全 DNA の複製時間，及び図10）．しかし，この方法は短時間標識 DNA の複製様式の相互比較には本質的に影響を与えないばかりか，全 DNA の複製経過と比較することにより複製時期を大よそ決めることができる．

^{14}C 連続，^{3}H 短時間標識した対数増殖期細胞を用いた系（図4）及び^{3}H 連続，^{14}C 短時間標識した対数増殖期細胞を用いた系（図5）の実験でS 期のあらゆる時期の DNA 複製が2世代にわたり一定の順序で行なわれることを示した．

M 期同調細胞による解析法は，第 1GI 期での乱れのためにS 期の特定期にある細胞のみを標識することはできない．さらに，細胞は標識後第 2S 期に至るまで著しく乱れる（図5と図8はこの事実を示す．すなわち，全 DNA の 80 %複製に要する時間は第 1S 期で約14時間であり，第 2S 期では約 26 時間である.）.

これらの事実により，標識 DNA の第 2S 期での複製時期を正確に示すことは，この方法ではほとんど不可能である．しかしながら，一定の間隔でS 期全体にわたり細胞を標識して，その標識 DNA の第 2S 期での複製様式を相互に比較することにより，複製順序性の有無をしらべることは可能である．

結果は，全S 期にわたり DNA 複製は一定の順序で行なわれると仮定したときにのみ説明が可能な複製パターンを示した（図8）.

従って，対数増殖期細胞に標識する系(Retroactive Synchronization 法）と M 期同調法による系の結果を合せて考えると，S 期のあらゆる時期の DNA 複製は連続した少なくとも3世代を通じて一定の順序で行なわれていることを示す．

Retroactive Synchronization 法による解析系で，S 期初期分画の^{3}H 短時間標識した DNA の複製様式が核種の交換により変化した．これは，この分画にS 期初期以外にあった細胞が混入したことを示している．

これは CsCl 密度勾配遠心分離パターンの変化によっても裏付けられる．すなわち，^{3}H-TdR 短時間標識したS 期初期細胞分画の^{3}H-DNA は全 DNA と同じ比重を示している（図3,a)が，^{14}C-TdR 短時間標識で行なったときには，^{14}C-DNA は明らかに全 DNA よりも重い比重を示した（データーは示していない）.これは，動物細胞のS 期初期で複製する DNA は全 DNA よりも重い比重を示すという事実[11]~[14]とよく合う．

この細胞の混入は，比活性の高い^{3}H 短時間標識によってとくにS 期後半で標識された細胞の正常な進行（S，G2 期）が著しく障害されたことを示す．

このようなトリチウムの放射能効果は他の実験でも観察された．M 期同調後第 1S 期の各時間で^{14}C-TdR 短時間標識した細胞集団では，対照となる全体の DNA の第 2S 期での複製経過が非常によく一致した（図8）．これに対して，第 1S 期の各時間で^{3}H-TdR 短時間標識した細胞集団では，各々の全 DNA が複雑なばらつきのある複製経過を示した（図7）．これも第 1S 期で^{3}H-TdR 標識した細胞集団の中にS 期後半で標識された細胞が含まれており，その細胞が^{3}H 放射能効果により細胞進行を障害されたとすることで説明がつく．

一方，比較的放射比活性の低い^{3}H-TdR で連続標識した場合には，細胞進行の乱れはあまり顕著でない(図5，図8）．図5の実験では，^{3}H-TdR 連続，^{14}C-TdR 短時間標識した対数増殖期細胞からS 期後期及び初期細胞分画を集めるに際して，8ないし 10 時間の差がある．ところが同調培養後のS 期で，この両分画の短時間標識 DNA の複製経過の時間差は約5時間であった．この差は実験誤差にしては大きい．すなわち，これは両S 期の長さに差があることを示唆している．

そこで，^{3}H 連続標識時における HeLaS3 細胞の集団サイズ倍化時間及び flow microfluorometry (FMF)を用いて細胞周期の分布をしらべた．

集団サイズ倍化時間は，未標識細胞集団では 25 時間であるのに対して，^{3}H 連続標識細胞集団では 31 時間を示し，明らかに延長していた．一方，未標識細胞集団及び^{3}H 連続標識細胞集団の細胞周期の分布は，(GI 期＋S 期初期)で 56.5 %と 40.5 %，S 期で 33 %と 38.5 %，(S 期後期＋G2 期＋M 期）で 10.5 %と 21 %であった．^{3}H- 連続標識細胞集団は未標識細胞集団に比べ明らかに S, G2 期細胞の増加(すなわち，S, G2 期の持続時間の延長）を示している．また，それらと一致してサイズの大きい細胞が増えていることがわかった（未発表）．すなわち，かなり非平衡的な生長条件にあることを示す．これは，比較的比活性の低い（$0.5\mu c/2\mu g$ TdR/ ml）^{3}H-TdR の連続標識に際してもトリチウムの放射能効果による細胞進行（S，G2 期）の障害があることを示している．

比活性の高い（$2\mu c/ml$）^{3}H 短時間標識による障害はEhmann ら[33]が指摘したように，多分G2 遅滞の形であらわれている．しかし，比活性の低いトリチウムの連続標識では，G2 遅滞以外にS期での細胞進行の遅延を示唆している．

また，HU を用いた実験はDNA 複製順序性の機構について多少の知見を与えた．

図 11 の実験は，20 時間目のHU 除去時にS期初期分画 R.S（19～21h）の短時間標識DNA の約7%，そして均一に標識したDNA の約1.5%がすでに複製していることを示している．これは，分裂期後0.5時間から20 時間までHU 処理し，終りの5時間に^{3}H-TdR を共存させたオートラジオグラフ法の実験で約90%の細胞核がバックグラウンドより有意の数の銀粒子を有している事実（データーは示していない．）ともよく一致する．これらの結果は，分裂期後20 時間までHU 処理している間に大部分の細胞はS期のごく初期に入っていて，DNA 複製を非常に遅い速度で行なっていることを示している．

しかも，このとき全体のRNA 合成[37]や蛋白質合成[37][41]は活発に行なわれているので，基質以外の大部分の複製開始や促進に要する因子は蓄積しているはずである．それにもかかわらず，HU 除去後には，S期初期のDNA 合成速度の増加やS期の短縮はみられず（図 10），さらにDNA 複製順序性（未処理の場合に比しての複製経過の相対的関係）の変化も観察されなかった（図 11）．

生理的な条件のみならず，^{3}H- 連続標識したとき（S期の延長）やHU 処理したときのように非平衡的生長条件でもS期での複製順序は変化しなかった．この事実は，S期細胞内ではDNA 複製を開始ないし促進する物質が本来蓄積しえない機構になっていることを示唆する．すなわち，細胞はGI 期にS期の開始とごく初期の少量のDNA 合成に必要とする物質のみを作り，それ以降の複製に必要とする物質はその初期の少量のDNA 合成が起きなければ作られないというモデル[37]で説明できる．あるいは，各複製単位（群）の複製開始には非常に代謝回転の早い物質が関与していることでも説明できる．このような問題の解決にこのRetroactive Synchronization 法による解析系は投立つであろう．

すでに指摘したように，HU 処理期間中に大部分の細胞はS期に入っていて，非常に遅い速度ではあるがDNA 複製を行なっている．このことは，S期のごく初期の事象をしらべるのにHU 同調法は不適当であることを示す．HU 同調法を用いてS期のごく初期のDNA 複製順序性をしらべたいくつかの研究は[17][18]，この点で問題を残し，今後の研究に慎重を期さなければならないだろう．

要　旨

HeLaS3 細胞を用いて，全S期にわたるDNA 複製の順序性の有無を検討した．

この解析は，S期の特定期に複製するDNA のみを標識した細胞群を得て，この標識DNA が次のS期でどのような時期に複製するかを相互に比較することによって行なわれた．そこで，全体のDNA と特定の時期のDNA を2種の異なる放射性同位元素で標識し，次のS期の複製は5-BUdR を取込ませ，複製し一方の鎖が重くなったDNA（HL 分画）への標識の移行によって測定した．

1．短時間標識した対数増殖期細胞からS期の特定期で標識した細胞分画を集め同調培養後，第2S 期での標識DNA の複製様式を解析した．その結果，S期全体のDNA 複製順序が2世代にわたり一定であることを示した．

2．M期細胞を採集して同調化した後，第1S 期の各時期で標識し，さらに第2S 期での標識DNA の複製様式を相互に比較検討した．この方法による結果は，1の結論を支持した．

1，2の結果を合せて考えると，S期のあらゆる時期のDNA 複製は連続した少なくとも3世代を通じて一定の順序で行なわれていることを示す．

3．この実験で，^{3}H-TdR 標識による放射能効果が観察された．高い比活性の^{3}H-TdR（$2\mu c/ml$）で標識した細胞の短時間標識DNA は次のS期で無秩序に近く複製する．しかし，^{14}C-TdR で標識した場合には，このようなことは見られない．しかも，このような影響は標識後M期細胞を採集するまでの時間が長くかかる分画（すなわちS期初期分画）により強くあらわれる．細胞を比較的低い比活性の^{3}H-TdR で連続標識したときにも，S期とG2 期の持続時間の延長が見られた．しかし，複製の順序性には何ら影響を及ぼさなかった．

4．Hydroxyurea (HU) は細胞内の高分子合成活性の間に非平衡的な状態を作り出す．そこで，HU 同調法のS期への影響を検討した．S期開始を遅らせてもS期初期のDNA 合成速度，S期の長さ及びDNA 複製順序は何ら変化しなかった．これは，DNA 複製開始ないし促進に関与する物質が本来細胞内に蓄積しえない機構になっていることを示唆する．また，HU 処理期間中に大部分の細胞はすでにS期に入り，非常に遅

い速度で DNA 複製をしている．これはS期のごく初期の事象の研究には，HU 同調法は不適当であることを示す．

本研究を遂行するにあたり，御指導，御校閲を賜わりました吉川寛教授に深く感謝致します．また，適切な御助言をいただいた山口大学高橋学教授，そして村上清史博士を始めとする教室員各位，そして図表の作成に助力をいただいた寺田和代さんに対して謝意を表します．

文　献

1) **Howard, A. & Pelc, S. R.** : Nature, **167**, 599 (1953).
2) **Cairns, J.** : J. Mol. Biol., **15**, 372 (1966).
3) **Huberman, J. A. & Riggs, A. D.** : J. Mol. Biol., **32**, 327 (1968).
4) **Painter, R. B., Jermany, D. A. & Rasmussen, R. E.** : J. Mol. Biol., **17**, 47 (1966).
5) **Callan, H. G.** : Proc. R. Soc. London Ser. B, **181**, 19 (1972).
6) **Callan, H. G.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 195 (1973).
7) **Blumenthal, A. B., Kriegstein, H. J. & Hogness, D. S.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 205 (1973).
8) **Hand, R.** : J. Cell Biol., **64**, 89 (1975).
9) **Hori, T. & Lark, K. G.** : J. Mol. Biol., **77**, 391 (1973).
10) **Housman, D. & Huberman, J. A.** : J. Mol. Biol., **94**, 173 (1975).
11) **Tobia, A. M., Schildkraut, C. L. & Maio, J. J.** : J. Mol. Biol., **54**, 499 (1970).
12) **Bostock, C. J. & Prescott, D. M.** : J. Mol. Biol, **60**, 151 (1971).
13) **Bostock, C. J. & Prescott, D. M.** : Exp. Cell Res., **64**, 267 (1971).
14) **Flamm, W. G., Bernheim, N. J. & Brubaker, P. E.** : Exp. Cell Res., **64**, 97 (1971).
15) **Mueller, G. C. & Kajiwara, K.** : Biochim. Biophys. Acta, **114**, 108 (1966).
16) **Taylor, J. H., Myers, T. L. & Cunningham, H. L.** : In Vitro, **6**, 309 (1971).
17) **Amaldi, F., Buongiorno-Nardelli, M., Carnevali, F., Leoni, L., Mariotti, D. & Pomponi, M.** : Exp. Cell Res., **80**, 79 (1973).
18) **Adegoke, J. A. & Taylor, J. H.** : Exp. Cell Res., **104**, 47 (1977).
19) **Tapiero, J., Shaool, D., Monier, M. N. & Harel, J.** : Exp. Cell Res., **89**, 39 (1974).
20) **Parker, R. J., Tobia, A. M., Baum, S. G. & Schildkraut, C. L.** : Virology, **66**, 82 (1975).
21) **Bostock, C. J., Christie, S., Lauder, I. J., Hatch, F. T. & Mazrimas, J. A.** : J. Mol. Biol., **108**, 417 (1976).
22) **Dooley, D. C. & Ozer, H. L.** : J. Cell. Physiol., **90**, 337 (1977).
23) **Balazs, I., Brown, E. H. & Schildkraut, C. L.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 239 (1973).
24) **Stambrook, P. J.** : J. Mol. Biol., **82**, 303 (1974).
25) **Suzuki, N. & Okada, S.** : Mutation Research, **30**, 111 (1975).
26) **Aebersold P. M. & Burki, H. J.** : Mutation Research, **40**, 63 (1976).
27) **Balazs, I. & Schildkraut, C. L.** : Exp. Cell Res., **101**, 307 (1976).
28) **Terasima, T. & Tolmach, L. J.** : Exp. Cell Res., **30**, 344 (1963).
29) **Tobey, R. A., Anderson, E. C. & Petersen, D. F.** : J. Cell. Physiol., **70**, 63 (1967).
30) **Lesser, B. & Brent, T. P.** : Exp. Cell Res., **62**, 470 (1970).
31) **Prescott, D. M.** : Cancer Res., **28**, 1815 (1968).
32) **Smith, J. A. & Martin, L.** : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 1263 (1973).
33) **Ehmann, U. K., Williams, J. R., Nagle, W. A., Brown, J. A., Belli, J. A. & Lett, J. T.** : Nature, **258**, 633 (1975).
34) **Painter, R. B. & Schaeffer, A. W.** : J. Mol. Biol., **58**, 289 (1971).
35) **Studzinski, G. P. & Lambert, W. C.** : J. Cell. Physiol., **73**, 109 (1969).
36) **Bostock, C. J., Prescott, D. M. & Kirkpatrick, J. B.** : Exp. Cell Res., **68**, 163 (1971).
37) **Hamlin, J. L. & Pardee, A. B.** : Exp. Cell Res., **100**, 265 (1976).
38) **Ramseier, H. P., Burkhalter, M. & Gautschi, J. R.** : Exp. Cell Res., **105**, 445 (1977).
39) **Skoog, L. & Nordenskjöld, B.** : Eur. J. Biochem., **19**, 81 (1971).

40) **Plagemann, P. G. W. & Erbe, J.** : J. Cell. Physiol., 83, 321 (1974).
41) **Hershey, H., Stieber, J. & Mueller, G. C.** : Biochim. Biophys. Acta, 312, 509 (1973).
42) **Vesco, C. & Penman, S.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 249 (1969).

Abstract

Temporal regulation of DNA replication during S phase of the cell cycle has been studied in HeLa S3 cells.

Cells pulse-labeled with radioactive TdR were given a density label by providing 5-bromodeoxyuridine during the subsequent S phase. By the use of CsCl density gradients, the shift of the initial label to the hybrid density was detected and used to estimate the degree of replication of labeled DNA during the subsequent S phase. The results are summarized as follows.

1. Uniform subpopulations of cells labeled at defined intervals covering the whole S phase were obtained by a mitotic shake-off method after the cultures in asynchronous log phase were labeled for 60 min with radioactive TdR. The replication pattern of the labeled DNA during 2nd S phase of synchronous growth of each subpopulation was analysed. The results showed that DNA replication occurred in temporal order over two generations.

2. Syrchronous cultures were initiated by the mitotic shake-off method and then pulse-labeled for 60 min with radioactive TdR at various times during 1st S phase followed by analyzing the replication pattern of labeled DNA during 2nd S phase. The results supported the conclusion described above.

Considering the results of 1 and 2 combined, one can say that the temporally ordered replication during S phase is conserved at least over three generations in HeLa S3 cells.

3. Radiation effect of ^{3}H-TdR was observed. When cells were pulse-labeled with ^{3}H-TdR of high specific activity, 2 μC/ml, the pattern of the replication of the labeled DNA in the susequent cycle was randomized more than that when pulse was made with ^{14}C-TdR. The longer the time elapsed between the labeling and the harvest by mitotic shake-off, the more effect was observed. When cells were uniformly labeled with ^{3}H-TdR of lower specific activity, the duration of both S and G2 phases was elongated, although no effect was observed on the replication order.

4. Effect of synchronization with hydroxyurea on S phase was examined. Delaying entry into S phase with hydroxyurea did not significantly change the initial rate or duration of DNA replication and the temporal programming of DNA replication upon removal of hydroxyurea. This result suggested that the substances responsible for initiation or stimulation of DNA replication did not accumulate in the cell. The data also indicated that the majority of synchronized population could initiate and continue DNA replication at very slow rate during the treatment. This meant that cells synchronized with hydroxyurea were not suitable to the study of the earliest events in S phase.