

癌細胞核・酸性蛋白質の免疫学的解析

Ehrlich ascites tumor 細胞を用いて.

金沢大学医学部病理学第2講座(主任: 石川 太刀雄教授)

河 野 尚 子

多くの研究者は癌組織に於ける, 正常組織にない特殊な物質や分子レベルで変化した現象を知り, 正常組織とは異なった代謝調節機構などを把握しようとし, 癌細胞の本質的な微少な変化をつかもうとして来た. これらの一連の研究の1つとして, 癌特異蛋白質の究明がある.

癌細胞の蛋白合成が正常細胞の場合に比べて著しく異なっていることは古くから知られていた. Hempel¹⁾は radioactive precursor を用いて細胞内への取り込みを検討し, 癌細胞核での蛋白合成が異常な高まりを示すことを報告し, 又, これは Seed²⁾の実験によっても確かめられた. Busch³⁾も Walker 腫瘍の histone 分画に ¹⁴C-lysine を特異的に取り込む分画を認め, Zbarsky⁴⁾, Irvin⁵⁾も核・酸性蛋白質について, 腫瘍組織での増量を報告した. 最近では癌組織中の特異蛋白質の究明に対する努力は種々の方法で盛んに行なわれ, 特に細胞核蛋白質に, その重要性が目ざされた. Zilber^{6) 7)}は人の腫瘍核蛋白質の抗原性を報告し, Miller⁸⁾はラットのリンパ腫及び肉腫に特異抗原を観察した. 更に平井^{9) 10)}も腫瘍特異抗原の存在を証明した. 又, 我々の教室に於いても, ここ数年来より系統的に細胞下レベルでの免疫学的解析を行ない, 癌特異抗原の存在を証明して来た^{11) ~13)}. 特に細胞核内に於いては佐原¹⁴⁾, 島¹⁵⁾が核上清分画に, 佐伯¹⁶⁾, 吉光¹⁷⁾が histone 分画にその特異性を見だし, 癌研究に於ける新分野を展開している.

しかし, 実際に遺伝伝達行為が行なわれている細胞核の機能的な面での核蛋白質については, 今までほとんど明らかにされていなかった. 従って蛋白質の分類も, 基本的には核の構造と存在場所, それにその溶解性に基づいて行なわれて来ている. Douglas¹⁸⁾は核蛋白質について次のように分類している. 即ち,

中性の塩類溶液 (0.14 M NaCl など) で抽出される核上清蛋白質, 高濃度の塩類溶液 (1~2 M NaCl) で抽出される繊維状の chromosomal 蛋白質, この分画には histone と酸性及び残余 chromosomal 蛋白質が含まれている. 次に希アルカリ溶液で取り出される核やリボ蛋白質の破片物及び粒子など, 更に残存する膜やラメラ構造をもった物質などである.

そこで著者は癌細胞に於ける, 上記の核蛋白質の1つについて免疫学的手法を用い, 癌特異抗原の検索を行なった. その結果, 癌細胞として用いた Ehrlich ascites tumor 細胞核蛋白質である chromatin 酸性蛋白質に癌特異的な性質を見出した. Histone や DNA と結合している chromatin 酸性蛋白質は glutamic acid や aspartic acid などの酸性アミノ酸を多量に含み, わずかながら phosphorus も含有しているといわれて来たが, 他の核蛋白質と同様に, 長い間不溶性のため, アミノ酸分析や細胞内局性などの追求のみに終っていた. しかし, 最近では分画法も改良され, 研究が急速に進展し, この chromatin 酸性蛋白質が gene expression の controller として, 又細胞分裂等の stimuli として核中で機能を果しているのではないかとさえいわれ, 生物学的重要性が認められて来ている. 著者がこの蛋白質に癌特異的な性質を見出したのでここに報告する.

実験材料および実験方法

I. 実験材料

1. Ehrlich ascites tumor細胞 (以後EA細胞と略記する)

マウス ddN (体重平均 25g) に EA 細胞を移植し, 8~9 日目後に腹水 EA 細胞を集め用いた. 得られた EA 細胞は血球部分を除去し, 冷 sucrose 溶液 (0.25 M sucrose, 0.01~0.02M Tris-HCl, 0.1mM E-

Immunological Analysis of Tumor Cells—The Chromatin Acidic Proteins of Ehrlich Ascites Tumor—Naoko Kono, Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

DTA, pH7.2) 又は冷生理食塩水で洗浄後使用した。

2. 正常マウス肝臓

正常マウス ddN より肝臓を別出し、十分細切後冷 sucrose 溶液又は生理食塩水で洗浄し、血清を除去後、蛋白質の分画抽出に用いた。

II. 実験方法

1. 細胞核の分離

Hogeboom-Schneider¹⁹⁾ 法に主として従い、一部改良して行なった²⁰⁾。まず flench presser (大岳製作所、型式 F5615) および teflone homogenizer で細胞を破壊し、gentiana violet 醋酸溶液で染色。検鏡を行ないながら、核と細胞質成分との分離を試みた。更に Chauveau²¹⁾の方法に従って、40,000 × g, 60分の遠心操作を加え、核の精製をおこなった。

2. Chromatin酸性蛋白質の抽出 (EAN-APと略記する)

EAN-APの抽出は主として Wang^{22) 23)} に従った。EA細胞核から Tris-HCl 溶液 (0.05M Tris-HCl, 0.005M MgCl₂, pH7.6) で核上清蛋白質を十分除去後、約50倍量の 1M NaCl (pH7.2) を加え glass homogenizer で懸濁したのち、1時間静かに攪拌した。次いで、25,000 × g, 30分の遠心後、上清を集め、沈渣には再びNaClによる抽出、遠心操作を行ない上清を採集した。集めた上清は6倍の蒸留水で18時間透析して塩濃度を0.14Mに調整した。上清部分に chromatin 酸性蛋白質が存在し、再構成したDNAとHistoneの結合体は沈澱するので遠心操作で分離した。得られた上清分画を攪拌しながら、固体硫酸を0.7飽和になるように添加するとEAN-APが沈澱した。これを集め0.05M Tris 溶液 (pH8.5) に溶解し、同一液で充分透析後、subfraction に分離した。

前記0.05M Tris 溶液 (pH8.5) で透析して得た蛋白質液を105,000 × g, 60分の遠心を行ない、得られた pellet を glass homogenizer を用いて、0.05M Tris 溶液中で攪拌した。約2/3の pellet が溶液として得られたので、20,000 × g, 30分遠心し、不溶物を除去後、溶液部分をR-RNP分画とした。105,000 × g, 60分の遠心で得られた上清部分に、1M酢酸を加えpH5.7とし、30分静置後遠心して沈澱物を得た (pH6.0分画とした)。次いでpH5.7に調整した溶液の上清部分に再び1M酢酸を添加し、pH4.8にした溶液からpH6.0分画の場合と同様に沈澱物を集めた (pH5.0分画とした)。更にpH4.8溶液の上清部分に固体硫酸を加え0.7飽和にすると再び沈澱物が得られた (硫酸沈澱分画-A.S分画とした)。

操作方法を図1に示した。

それぞれR-RNP分画, pH6.0分画, pH5.0分画およびA.S分画を0.05M Tris 溶液 (pH8.5) で透析後、実験に用いた。

正常マウス肝臓の chromatin 蛋白質 (MLN-APと略記する) も同様に細胞核から抽出した。

Chromatin酸性蛋白質抽出の各操作は出来る限り4°C以下で行なった。各分画は白色の粉末として抽出され、水溶液は無色透明であった。用いた超遠心機は40p日立分離用超遠心機である。

3. 抗原

EA細胞核から抽出した105,000 × g遠心直前のEAN-APを免疫抗原とした。蛋白質量は8 mg/mlとし、蛋白質の定量はLowry²⁴⁾の方法を用いた。又EAN-AP及びその subfraction (R-RNP, pH6.0, pH5.0, A.S分画), 更にMLN-APを試験抗原とし、各分画の蛋白質量を10 mg/mlに調整した。その他、EA細胞を移植された ddN, C3H, C57BLマウスの血清、正常マウスの諸臓器及び血清、⁸⁵Sr-発現骨肉腫細胞²⁵⁾ (Sr細胞と略記する)の核上清蛋白質と chromatin 酸性蛋白質 (Sr N-AP と略記する), および Sr細胞をもった ddNマウスの血清も試験抗原として用いた。

4. 抗血清の調整

1) 免疫方法

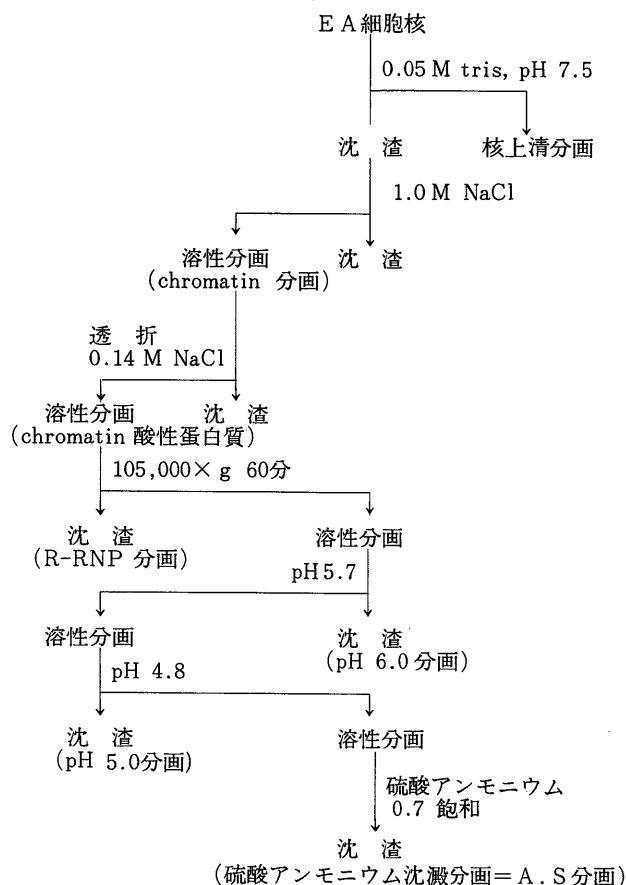
Freundの complete adjuvant²⁶⁾ 法に従い、蛋白質量8 mg/mlの抗原溶液2 mlを当量の adjuvant 液 (BCG死菌85 mg, 流動パラフィン85 ml, アラセルA油15 ml) と混合して乳剤を調製し、家兎 (体重約2 kg) の肩甲骨下腔に1週間間隔で4回注射し、最終免疫注射後3週目に追加免疫を行なった。それ以後耳静脈より部分採血を行なって抗体価を調べ、抗体価が高まったところで採血を行ない、抗体の産生が低い場合には更に追加免疫を行なった後1~2週間目に採血した。分離した血清は分注し、-20°Cに保存した。

2) 吸収抗血清の調製

抗血清の吸収には試験管内吸収法と寒天内吸収法とを用いた。試験管内吸収法は予備実験で調べた最適吸収抗原量を3回~4回に分けた。まづ抗原の適量を抗血清に加え、37°C 1時間振盪反応させ、4°C氷室に1時間放置後、1,000 × g, 10分遠心で沈澱物を除き、その上清部分について同様な操作を2~3回繰り返えし、最終吸収操作後4°Cに1夜放置し遠心して、その上清を吸収抗血清とした。

寒天内吸収法は Björklund²⁷⁾ による specific inhibition 法を用いた。吸収すべき抗原をあらかじめ抗体孔に入れ、24時間4°Cに放置後抗体孔を洗浄

図1 EAN-AP の抽出法



し、抗血清を入れて抗原との反応を行なった。

5. 免疫学的検査法

1) 寒天内二重拡散法

Ouchterlony²⁸⁾法に従った。抗原抗体孔は直径0.5 cm, 0.7cm, 間隔0.5cmのものを主として用いた。厚さ0.2cmの寒天板上で、20°C湿室に於いて反応させ2~4日間観察し、写真撮影後0.14M食塩水及び蒸留水で洗浄、乾燥後保存した。溶媒は0.05Mリン酸溶液(0.005% EDTA, 0.14M NaCl, 0.1% NaN₃を含む、pH7.6)を用いた。

乾燥した寒天板は必要に応じ、蛋白染色は thiazine red-酢酸²⁹⁾で、脂肪染色は Sudan black B-アルコール³⁰⁾で、又糖染色はPAS染色³¹⁾でそれぞれ染色を行なった。

2) 免疫電気泳動法

Graberら³²⁾の方法を用いた。抗原孔は0.7×0.2cmとし、抗原孔と抗体溝の距離を0.5cmとした。抗原を14mA, 60V, 120分泳動後、直ちに抗体溝を掘り抗血

清を入れ、以後寒天内二重拡散法と同様に処理した。溶媒は0.05Mペロナル溶液(0.1%NaN₃を含む、pH 8.2)を用いた。

6. 抗原の諸性質

1) DNA, RNA, および蛋白質の定量

蛋白質の定量は Lowry 法³⁴⁾を用いて行ない、DNAおよびRNAの検出にはそれぞれ diphenylamine 反応³³⁾, orcinol 反応³⁴⁾を用いて検出した。

2) アミノ酸分析

得られた蛋白質1mgを硬質ガラス管に入れ、6.0N HClを加えて減圧下で密封し、110°C 22時間加熱して加水分解したのち、開管し、NaOH上で蒸発乾固した。得られた資料を acetate 緩衝液に溶解後、日立アミノ酸自動分析計KLA-3B型(本学小児科)で分析定量した。

3) 紫外外部吸収の測定

蛋白濃度をOD_{280mμ}^{1cm}=1.0に調整し、紫外部(220mμ

~320 μ)に於ける吸収測定をおこなった。分光光度計は Hitachi Perkin-Elmer 139UV-Vis spectrometer を用いた。

4) 超遠心分析

およそ50mg/mlに蛋白質濃度を調整後、分析用超遠心機 Spinco E (本学ガン研) を使用して遠心し、 $S_{20,w}$ 値の計算をおこなった。film の読みとりは Beckman Analytrol film densitometer を使用した。

5) DEAE-cellulose column による精製

通常の方法²⁵⁾に従って樹脂を活性化し、Tris 溶液 (0.02M Tris-HCl, 0.005M MgCl₂, pH8.5) による調整を行なった後、蛋白質を100mg流した。樹脂交換した蛋白質はNaCl (Tris 溶液, pH8.5) による、0Mから1.0Mまでの段階的流出法で回収した。column は直径1.7cm, 長さ10cmのものを用いた。樹脂は0.4meq/g, 流量は2.5ml/10minとし、得られた蛋白質は280 μ および260 μ の紫外部吸収測定により定量した。

6) Subfraction への³H-4,5-lysine の取り込みおよび EA細胞 histone との反応

EA細胞を移植後7日目のddNマウス腹中に1 μ C/g体重の³H-4,5-lysine (The Radiochemical Center Amersham 510mC/mM) を接種し、一定時間後マウスからEA細胞を集めた。次いで前述したように chromatin 酸性蛋白質の抽出をおこない、³H-4,5-lysine の取り込みを観察した。

次いで、Johns³⁶⁾に従って抽出した histone (f_1 , f_2 , f_3) を isotope でラベルしたEAN-APと試験管内で反応させ、不溶性蛋白質を形成させた後、沈殿したEAN-AP量を測定した。反応溶媒は0.05M Tris 溶液 (pH7.5) を用いた。

³H-4,5-lysine 量は Beckman LS-200B Liquid Scintillation Counter (本学ガン研) で測定し、シンチレーターは dioxane scintillator (PPO 10g, POPOP 250mg, ナフタリン 100g/dioxane 1 liter) を用いた。

7 組織学的検索

組織学的検索には10%ホルマリン固定をし、パラフィン包埋後、hematoxylin-eosin 染色を行なった。

8. 蛍光抗体法

EAN-APの抗血清を34%飽和硫酸で γ -globulin 化し、Marshall 法を変型した川村³⁷⁾による改良法に従い、fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベルした後、Sephadex G-25 および DEAE-cellulose column に通して遊離色素を除去し、純化

した。更にMLN-APの充分量と37°C 1時間反応させ、ついで氷室内で一夜放置後遠心し上清を使用した。正常マウス組織の場合は別出後直ちに-70°Cドライアイス-アセトンで凍結し、cryostat で薄切片を製作した。EA細胞の場合は塗沫標本を用いた。標本は蛍光抗体液で室温、湿室内で、30分~60分間染色(直接法)し、staining 緩衝液で洗浄、検鏡した。使用蛍光顕微鏡は Reichert Binolux Zetopan microscope (本学医動物) で行なった。

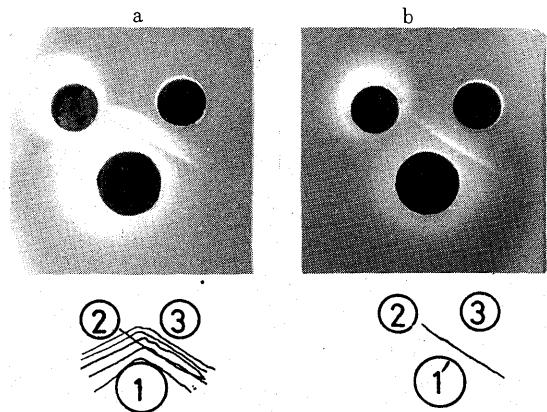
実験結果

I. 抗EAN-APおよび抗MLN-APについて

EAN-APおよびMLN-APとの抗原組成の差異を抗EAN-APを用いて寒天内免疫二重拡散法で調べた結果、注目される点は、癌(EA細胞)抗原には正常には観察されない抗原組成が存在していることである。抗EAN-APに対してEAN-APおよびMLN-APを反応させると、5本の共通沈降線が観察される他に、EAN-APに1本の非癌物質でない沈降線が得られ(図2a)、共通成分を吸収により除去するとEAN-APのみに1本の非癌材料でない沈降線が残った(図2b)。この沈降線は正常マウス血清との間には形成されない(図3)。次にEAN-APを subfraction したそれぞれの分画との反応について検討したところ、R-RNP分画およびpH6.0

図2 抗 EAN-AP 及び吸収抗 EAN-AP に対する EAN-AP と MLN-AP との比較

1. 抗 EAN-AP
- 1' 吸収抗 EAN-AP
2. MLN-AP
3. EAN-AP



分画には全く沈降線が認められず、pH5.0分画およびA.S分画に1本の共通線が存在することが認められた。しかもこの沈降線はEAN-APと共通であった(図4)。一方抗MLN-APを用いてMLN-APおよびEAN-APとを反応させると5本の共通した沈降線が観察されたが、MLN-APに特徴的な沈降線は得られず(図5)、共通成分をEAN-APで吸収すると沈降線はすべて消滅し、癌化に伴う正常組織抗原の消失は認められなかった。

II. EAN-APの抗原分析

1. 寒天内免疫二重拡散法

抗EAN-APおよび吸収抗EAN-APを用いて、EAN-APとMLN-APとの相互の抗原分析をした結果、癌に特異的な抗原が存在し、更にEAN-APの subfractionであるpH5.0分画およびA.S分画に存在することが認められたので、抗原分析をさらに進めることにした。

EAN-AP抗原は抗EAN-APに対して32倍希釈(0.31 mg/ml)まで、吸収抗EAN-APに対しては16倍希釈(0.63mg/ml)まで沈降線をつくった。又EA細胞の他の分画と対比してみると、細胞上清および mitochondria 分画, microsome 分画にも沈降線の認められた抗体は吸収抗血清にすると、沈降線のほとんどが消失してしまった。又、(DNA+histone)分画にも全く沈降線は認められなかった。たゞ細胞上清分画と核の1M NaCl抽出後に残る residual 蛋白質分画、更に核上清分画にも弱い沈降線が観察され、それらはEAN-APとの沈降線とも共通であった(図6)。正常マウス諸臓器と吸収抗EAN-APとの反応では全く沈

図3 EAN-AP と正常マウス血清との比較

- 2 吸収抗 EAN-AP
- 3 MLN-AP
- 4 EAN-AP
- 5 正常マウス血清

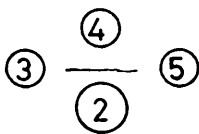
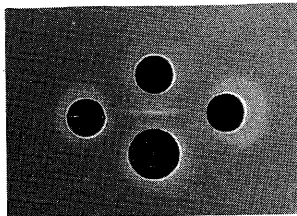


図4 EAN-AP とその subfraction の抗原性

- 1 EAN-AP
- 2 MLN-AP
- 3 R-RNP 分画
- 4 pH6.0 分画
- 5 pH5.0 分画
- 6 A. S 分画
- 7 抗 EAN-AP
- 8 吸収抗 EAN-AP

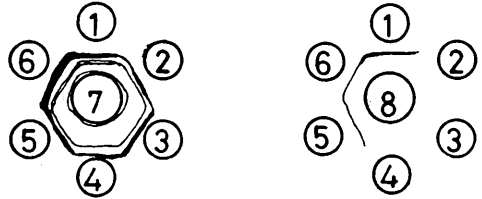
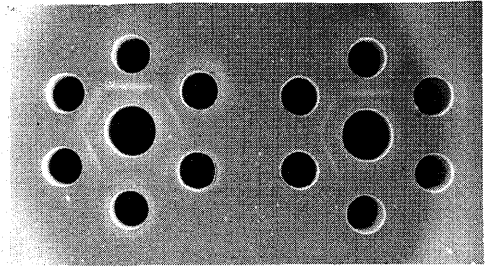
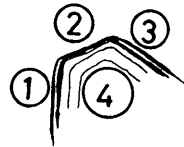
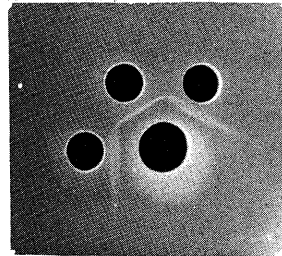


図5 EAN-APと抗 MLN-AP との反応性

- 1 EAN-AP
- 2 MLN-AP
- 3 SrN-AP
- 4 抗 MLN-AP



降線が得られなかった。しかし、胎児の均一物質には弱く反応した(図7)。

EAN-AP抗原の熱安定性については、70°C10分の加熱で抗原性を失い、沈降線を示さなくなってしまう。又、trypsin (37°C, 2時間作用)で消化するとやはり沈降線が認められなくなり、抗原性が得られなかった。又、吸収抗EAN-APとによって形成された特異沈降線は thiazine red による蛋白染色には陽性であるが、糖染色および脂肪染色には共に陰性であった。又抗EAN-APおよび吸収抗血清の濾紙電気泳動を行ない、densitometer からの測定より成分組成も検討した。

次にC3H, ddN, C57BLマウスにEA細胞を移植後、14日目にそれぞれのマウスから血清を取り出し抗EAN-APとの反応を観察した。正常マウス血清とは沈降線を形成しないのに、これらの血清とは抗EAN-APは2本の特異沈降線を形成し、しかも、形成された沈降線の内1本はEAN-APとの反応で形成された線と共通であった。次いでEA細胞移植後ddNマウスから腹水を採集し、遠心により完全にEA細胞を除いた後、蛋白質濃度を調整後、抗EAN-APと反応させると、吸収

抗血清の場合にはやはり、同様に癌特異沈降線と共通する線が得られた(図8)。又ddNマウス血清について、EA細胞移植後いつ頃からEAN-APと反応する抗原が出現してくるかという点を、寒天板上で認められる沈降線について検討した。EA細胞移植後、経時的にddNマウス血清を採集し、吸収抗EAN-APとの反応を追跡した(図9)。その結果、8日目にはすでに沈降線の確認が可能であった。次にEA細胞とは発生を異にする⁸⁵Sr発現骨肉腫(Sr細胞)からEAN-APに相当するSrN-APおよび核上清分画を抽出し、吸収抗EAN-APとの反応性を確かめると、両方とも抗EAN-APとは全く反応しない(図10, 11)。又Sr細胞をもつ

図6 EAN-AP と EA 細胞の他分画との比較

- 1 EAN-AP
- 2 1M-NaCl 抽出後の残留物
- 3 核上清分画
- 4 microsome 分画
- 5 mitochondria 分画
- 6 Histone+DNA 分画
- 7 抗 EAN-AP
- 8 吸収抗 EAN-AP

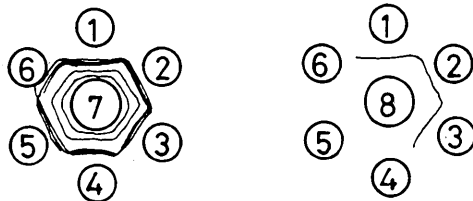
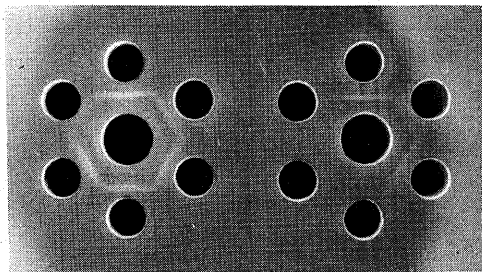


図7 EAN-AP と正常マウス諸臓器との比較

- 1 EAN-AP
- 2 MLN-AP
- 3 正常マウス肝臓
- 4 正常マウス脾臓
- 5 正常マウス腎臓
- 6 正常マウス肺臓
- 7 MLN-AP
- 8 正常マウス脳
- 9 正常マウス心臓
- 10 正常マウス腸管
- 11 正常マウス胎児
- 12 抗 EAN-AP
- 13 吸収抗 EAN-AP

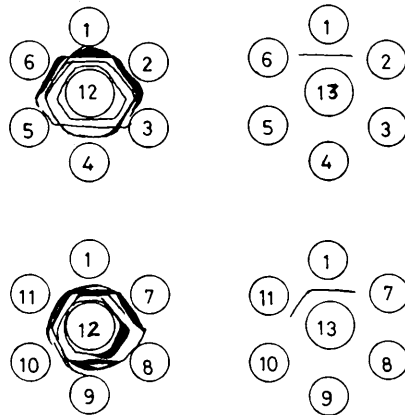
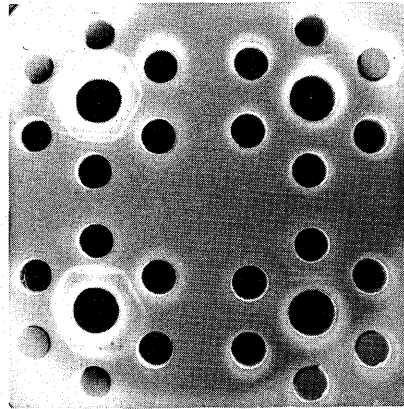


図8 EAN-AP と腹水との比較

- 1 EAN-AP
- 2 MLN-AP
- 3 正常マウス血清
- 4 腹水 (EA 細胞)
- 5 ddN マウス血清(EA 細胞)
- 6 pH 5.0 分画
- 7 抗 EA-AP
- 8 吸収抗 EAN-AP

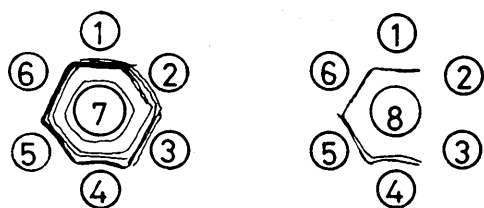
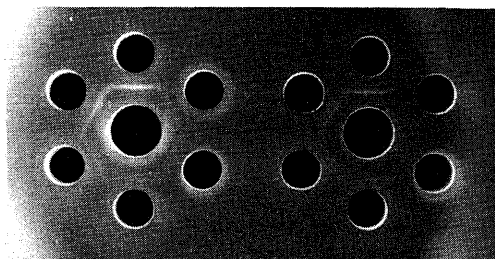


図9 EA 細胞を持つ ddN マウス血清 (移植後の時間変化)

- 1 EAN-AP
- 2 正常マウス血清
- 3 EA 細胞移植後 9日目
- 4 EA 細胞移植後 12日目
- 5 EA 細胞移植後 15日目
- 6 EA 細胞移植後 18日目
- 7 吸収抗 EAN-AP

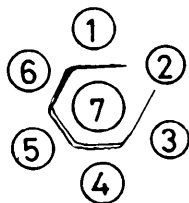
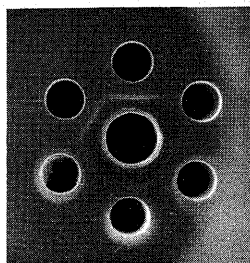


図10 EAN-AP と SrN-AP との比較

- 1 MLN-AP
- 2 EAN-AP
- 3 SrN-AP
- 4 吸収抗 EAN-AP

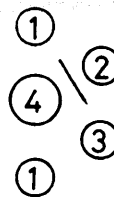
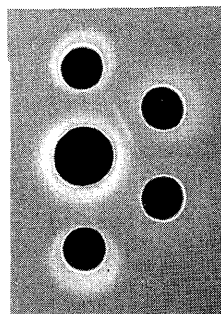
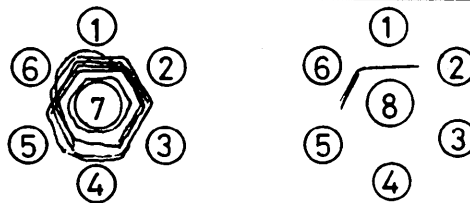
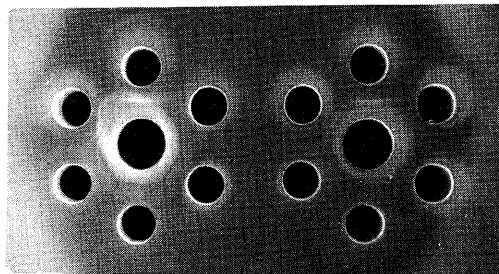


図11 EAN-AP と SrN-Sup 及び Sr 細胞をもつ ddN マウス血清との比較

- 1 EAN-AP
- 2 MLN-AP
- 3 SrN-Sup
- 4 正常マウス血清
- 5 ddN マウス血清 (Sr 細胞)
- 6 ddN マウス血清 (EA 細胞)
- 7 抗 EAN-AP
- 8 吸収抗 EAN-AP



ddNマウス血清とも沈降線が認められなかった(図11).

更に抗SrN-APと抗EAN-APとを用いて, SrN-APとEAN-AP間の共通抗原性の有無を比較, 検討し図12の結果を得た. 故に吸収抗EAN-APで現われる1本の沈降線はEA細胞一癌一に特徴的な抗原であることが想像される.

2. 免疫電気泳動法

図12 吸収抗 EAN-AP と吸収抗 SrN-AP との比較

- 1 吸収抗 EAN-AP
- 2 SrN-AP
- 3 吸収抗 SrN-AP
- 4 EAN-AP

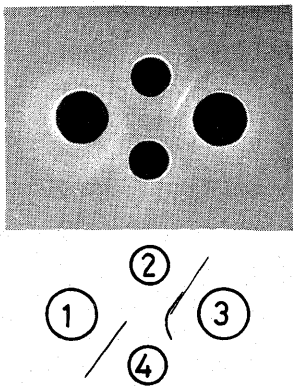
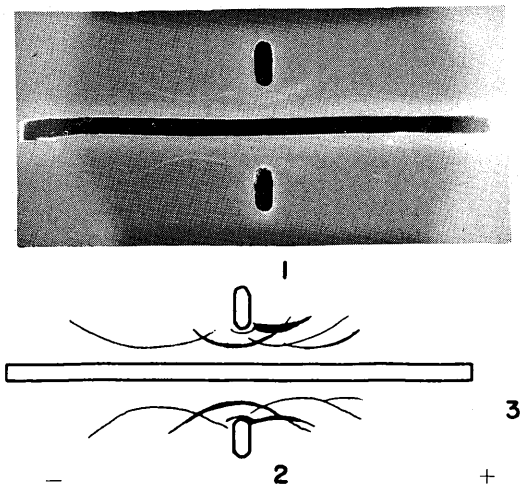


図13 EAN-AP の免疫電気泳動像

- 1 MLN-AP
- 2 EAN-AP
- 3 抗 EAN-AP



抗EAN-APとEAN-APおよびMLN-APとの免疫電気泳動をおこなった. 結果は抗原孔を中心にそれぞれ5~6本の沈降線が認められ(図13), 吸収抗EAN-APに対しては人血清の β -globulin 位に相当する泳動度をもった沈降線(1本)が得られ, 免疫電気泳動法と寒天内免疫二重拡散法とを併用してみると沈降線はEAN-APとの沈降線と一致した(図14).

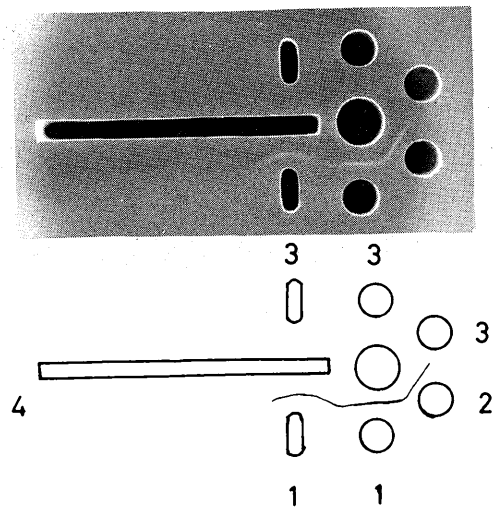
3. EAN-APのDNA, RNAおよびアミノ酸分析

EAN-APについて蛋白量, DNAおよびRNA量を測定し, 5回の平均値を表1に示した. Subfractionに含まれるそれぞれの蛋白量は95%前後であった. DNA量はいずれも1%以下, pH5.0分画およびA.S分画にはそれぞれ0.33%および0.71%であった. 又RNA量はA.S分画では微量であったが, 他の分画には大体3~4%前後の割合で存在し, これはMLN-APの場合もほぼ同様な結果が得られた. 次いでEAN-APに含まれている subfraction の量はA.S分画が最も多く, 次にpH5.0分画, pH6.0分画, R-RNP分画の順であった. 又 Wang^{22) 23)} らが指摘しているようにEA細胞の場合にも phosphorus を含んでいたもので, Allen²⁴⁾ の方法に従って分析した.

アミノ酸分析については加水分解後, 緩衝液に溶解し, 日立アミノ酸自動分析計KLA-3B型で分析定量した結果を表2に示した. いずれの分画にも酸性アミ

図14 免疫電気泳動法及び寒天内免疫二重拡散法を用いて検索した EAN-AP の抗原性

- 1 EAN-AP
- 2 pH5.0 分画
- 3 MLN-AP
- 4 吸収抗 EAN-AP



ノ酸 (glutamic acid, aspartic acid) が多く、酸性蛋白質であり、塩基性アミノ酸に対する酸性アミノ酸の割合はR-RNP分画が1.49, pH6.0分画では1.54, pH5.0分画では1.67, A.S分画では1.76であり、pH5.0分画およびA.S分画の方が酸性度が強かった。又、lysine 量はどの分画にもほぼ同量含まれていることになる。

4. 紫外部の吸収

Tris 溶液 (0.05M Tris-HCl, pH8.5) に溶解したEAN-APの吸光度の変化を、20°C 1 mg/mlで測定し、比較のためにMLN-APも同様に行なった。EAN-APのどの subfraction に於いても蛋白質特有の tyrosine, tryptophan 附近 (270mμ~280mμ) に吸収極大値を示し、その絶対値も類似していた。次項に示すように沈降係数の測定から、それぞれの分画が、まだ尚、2~3成分の複合体であるため、吸収帯からの解析は困難であった。

5. 沈降係数および電気泳動

Spinco E を使用してEAN-APの沈降係数を測定した。溶媒は0.05M Tris-HCl (pH8.5) を用いた。10°C, 59,780 r. p. m.での実験ではいづれの分画も単

一体ではなく、それぞれが2~3成分の複合体であることが解った。MLN-APの場合も同様であったが、 $S_{20,w}$ 値については必ずしも一致していなかった(表3)。又電気泳動像についても、同様にどの subfraction も heterogeneous な性質を示した。R-RNP分画は溶けにくい点から原点近くから広域に渡って存在し、pH6.0分画もR-RNP分画に類似していた。しかしその heterogeneous な性質はR-RNP分画に比べて少い。pH5.0分画は最も少い成分から構成され、泳動度もR-RNP分画やpH6.0分画よりも高かった。A.S分画はpH5.0分画に類似した結果が得られた。正常細胞核蛋白質の場合も同様な結果を示した。

6. DEAE-cellulose column による精製

EAN-APと抗EAN-APとによって得られた癌特異沈降線はEAN-APの subfraction であるpH5.0分画およびA.S分画に、1本の共通線として存在することが認められた(図4参照)が沈降係数の測定からpH5.0分画およびA.S分画共に2~3成分の複合体であることが判ったので、EAN-AP抗原の再精製を行なった。

通常の方法に従って活性化したDEAE-cellulose column

表1 EAN-AP の DNA, RNA および Protein 分析

Fraction	protein%	DNA %	RNA %	relative amount %	phos. g/100g
R-RNP	96.00	0.79	3.22	13.87	0.52
pH 6.0	94.60	0.95	4.45	19.26	0.051
pH 5.0	96.49	0.33	3.28	28.35	0.035
A.S	99.06	0.71	0.23	38.52	0.090
MLN-AP	97.38	0.29	2.34	—	1.17

表2 EAN-AP のアミノ酸組成

Fraction Amino acid	R-RNP	pH 6.0	pH 5.0	A.S
Lys	6.54	6.49	6.92	7.04
His	2.82	2.70	2.99	2.68
Arg	5.60	5.69	5.14	4.45
Asp	9.59	9.85	11.2	12.2
Glu	12.7	13.0	13.9	12.7
Glu+Asp/ Lys+Arg+His	1.49	1.54	1.67	1.76

moles/100 moles recovered

図15 EAN-AP (pH 5.0+A.S 分画) の DEAE-cellulose column クロマトグラフィー
 溶媒: 0.02M Tris-HCl, 0.005M MgCl₂, pH 8.5

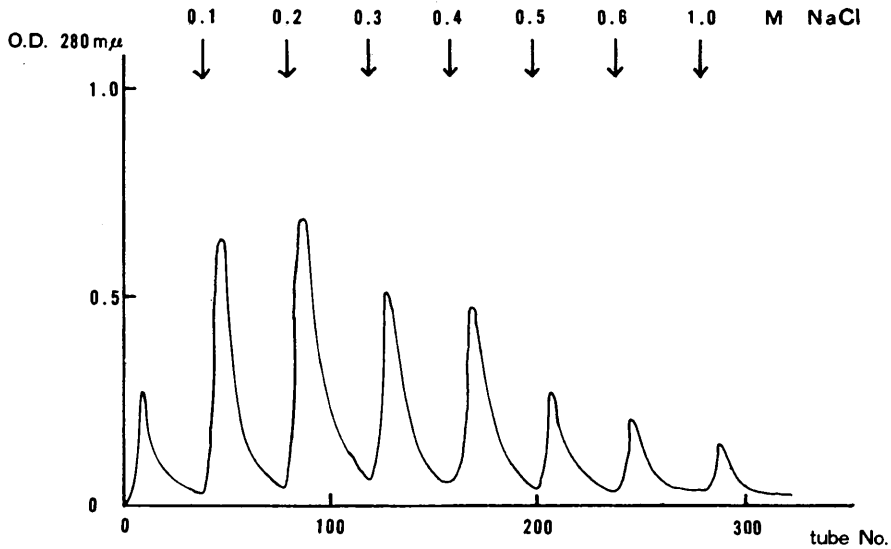


表3 EAN-AP の沈降係数

S _{20,w}	1	2	3	4	5
EAN-AP	3.17	—	—	—	17.0
R-RNP	3.17	—	—	—	17.0
pH 6.0	2.88	4.76	—	10.5	—
pH 5.0	—	3.92	6.34	10.2	—
A. S	—	4.47	6.79	—	—

図16 NaCl による段階的溶出により回収した蛋白質と EAN-AP との比較

- 1 吸収抗 EAN-AP
- 2 EAN-AP
- 3 buffer 分画
- 4 0.1 M NaCl 分画
- 5 0.2 M NaCl 分画
- 6 0.3 M NaCl 分画
- 7 0.4 M NaCl 分画

を作り緩衝液を通した後, EAN-AP (EAN-APからR-RNP分画およびpH6.0分画を除いた蛋白質, 即ちpH 5.0分画およびA. S分画を含む) を交換させた. NaCl による段階的の流出をおこない, 得られた流出 pattern を図15に示した. 回収された蛋白質は特に0.1M, 0.2M分画に多く含まれていて, 低分子であることが推定される. 又, わずかであるがKOH分画からも吸光度計にかゝる物質が存在していた.

そこでDEAE-cellulose column 法でのNaCl分画 (0M~1.0M) で得られた蛋白質を生理的条件に戻し, 濃度を調整後, 寒天内免疫二重拡散法で抗EAN-APと反応させると図16のように0.2M NaCl分画とのみ反応し, 特異沈降線を形成した. この0.2M NaCl分画を用いて DEAE-cellulose column による再クロマトグラフィーを行ない精製した. 溶媒は0.02M Tris-HCl, 0.005M MgCl₂, pH7.2である. pHを8.5から7.2に変化させてNaClにより溶出した結果を図17

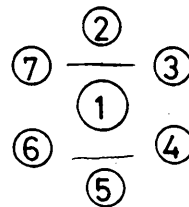
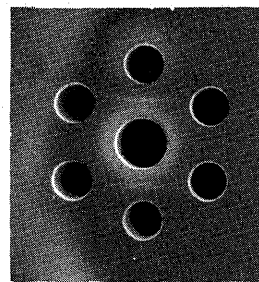


図17 DEAE-cellulose column による再クロマトグラフィー

溶媒：0.02M Tris-HCl, 0.005M MgCl₂, pH 7.2

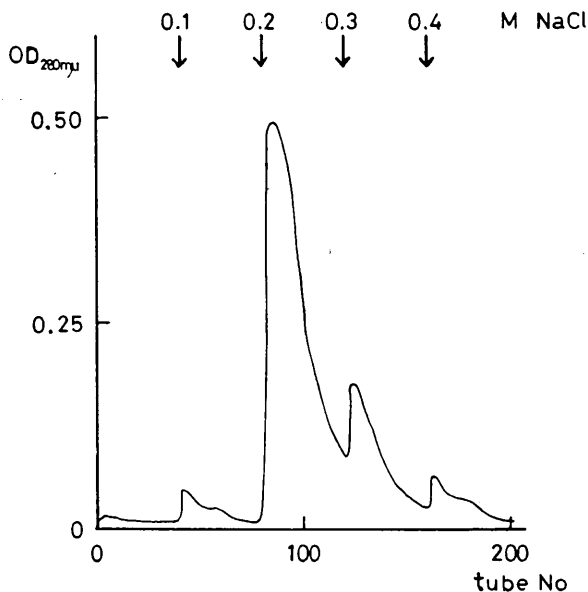


図18 EAN-AP と DEAE-cellulose column クロマトグラフィーにより回収された蛋白質との比較

- 1 吸収抗 EAN-AP
- 2 EAN-AP
- 3 pH 5.0分画
- 4 A. S分画
- 5 0.2M NaCl分画
- 6 再クロマトグラフィーでの 0.2M NaCl分画 (E-P)
- 7 MLN-AP

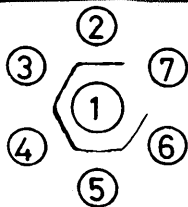
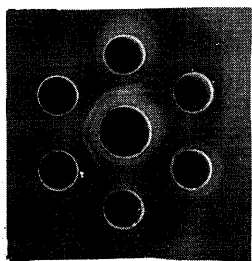


表4 E-Pのアミノ酸分析

Amino acid	E-P
Lys	7.10
His	2.96
Arg	5.06
Asp	11.0
Thr	6.18
Ser	6.60
Glu	13.8
Pro	4.92
Gly	7.27
Ala	7.40
Half-cystine	0.83
Val	6.53
Met	2.05
Ile	4.71
Leu	7.89
Tyr	2.52
Glu+Asp/Lys +His+Arg	1.64

moles/100 moles recovereol

に示した。0.1Mおよび0.3M NaClにわずかに分離されてくるが、大部分の蛋白質は0.2M NaClによる溶出で回収されて来た。そこで0.2M NaCl分画(pH7.2)の蛋白質(E-Pと略記する)を用いて抗EAN-APとの反応を寒天内免疫二重拡散法で調べると、EAN-APと共通な1本の沈降線を形成することが観察された(図18)。

特異沈降線は蛋白染色に陽性、糖染色および脂肪染色には共に陰性であったので、E-Pについて他の性質を検討した。

写真1はE-Pの沈降像である。単一peakを示し、濃度依存性(3.9~11.7mg/ml)はあまり大きくなく、 $S_{20,w}=4.3s$ であった。0.14M NaClに溶解したE-Pの紫外外部吸収変化像は278m μ に最大吸収値を示し、又E-Pのアミノ酸組成はsubfractionの項で述べたように、aspartic acidやglutamic acidが多量に含まれ、塩基性アミノ酸に対する酸性アミノ酸の比は1.64であった(表4)。DNAやRNAはそれぞれの検出法で陰性であり、phosphorusの存在も認められず、単純蛋白質であることが示された。

7. Histone との反応性

アミノ酸分析結果からEAN-APが酸性蛋白質であることが判り、又、その存在がchromatin中であるため、DNAやhistoneと何らかの関連性を持って細胞核で挙動していることが想像される。そこでまづhistoneとの反応性を知るために、EA細胞移植後7日目のddNマウス腹腔に 3H -lysineを注射し、その直後から経時的にchromatin酸性蛋白質を抽出しそのとりこまれた放射エネルギーを調べた。その結果注射後6時間後には十分なcount数をもった蛋白質が得られることがわかったので、 3H -lysine注射後6時間後にEA細胞を採集、 3H -lysineでラベルされたEAN-APを調製した。EAN-APに於ける 3H -lysineのとり込みは表5に示したようにpH6.0分画に最も多く、次いでR-RNP分画、A.S分画、pH5.0分画の順であった。前述したアミノ酸分析の結果から、どの分画にも大体同量に近いlysineを含有していることを

表5 EAN-AP 中へとりこまれた 3H -lysine量(投与後6時間目)

Fraction	cpm/mg. pro.	Relative amount %
R-RNP	22675	29.54
pH 6.0	23508	30.63
pH 5.0	10538	13.79
A. S	19975	26.02

考えれば、各分画での生合成は異なっていることになる。

次いで、EAN-APの各分画、特に抗EAN-APと特異沈降線を形成したpH5.0分画およびA.S分画が、EA細胞から抽出したhistoneとどのように反応するかは興味深い。EAN-APはhistoneと混合すると直ちに不溶性複合体¹⁰⁾を形成した。反応を十分行なわせた後、少量の溶媒で洗浄し、放射エネルギーからhistoneとの結合量を計算した。histoneはJohnsの方法に従って抽出したものであり、アミノ酸分析より塩基性アミノ酸及び酸性アミノ酸含量については検討を行なっている。複合体形成は加えたEAN-AP量に比例するがその絶対量は4分画間で異っていた。histoneの各分画1mg中に加えたEAN-AP量に対し、沈殿した量を 3H -lysine-EAN-APより算出し図19に示した。又表6にhistone1mgに対し1mgのEAN-APの各分画を加えた時に生じた沈殿量を示した。その値はhistone側から考えれば、lysine richな f_1 との反応が最も強く、次いで f_{2b} 、 $f_1 \approx f_{2a}$ の順に弱くなってゆく。しかしEAN-AP側からみると、必ずしも単純に説明できない。酸性度はA.S分画が最も高くpH5.0分画、pH6.0分画、R-RNP分画の順である。しかしその反応の強さはR-RNP分画 \approx pH6.0分画、pH5.0分画そしてA.S分画の順に弱くなり、特にpH5.0分画およびA.S分画はそのaffinityが弱かった。癌特異抗原がpH5.0分画、A.S分画に見出されることから、その相関性について検討してゆきたい。

8. 蛍光抗体法

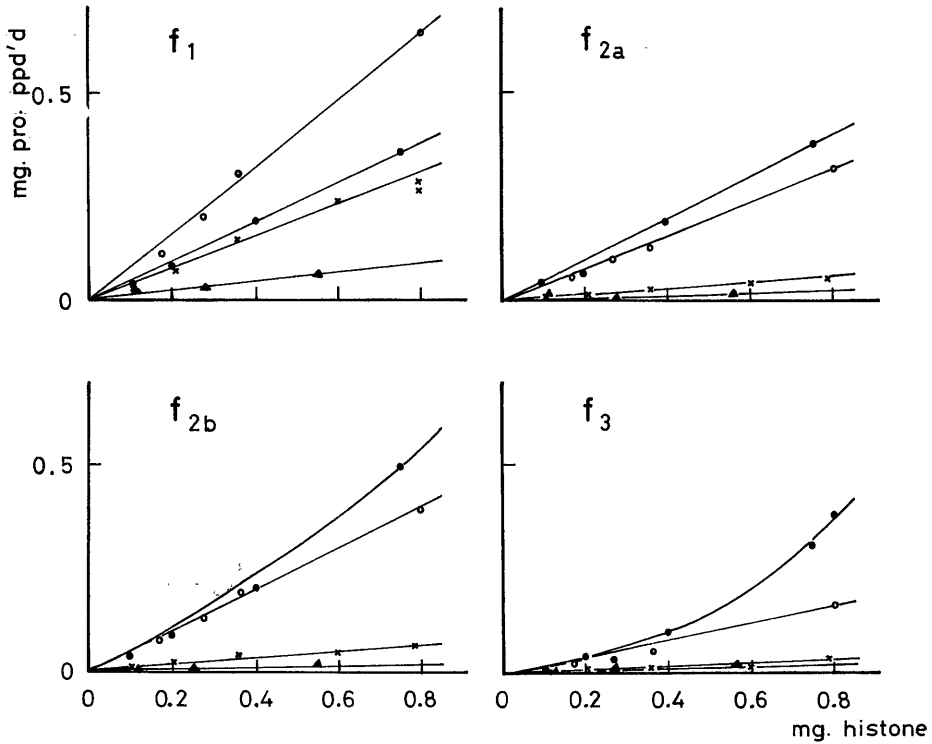
FITCをconjugationした吸収抗EAN-APでEA細胞およびマウス肝細胞について蛍光染色を行なった。蛍光抗体のF/Pのモル比は $OD_{495m\mu}$ および $OD_{280m\mu}$ の吸光度から計算し、1.38₂のものを用いた。EA細胞を蛍光標識抗EAN-APで染色すると写真2のように核に非常に強く染色され、細胞質は若干の蛍光を発したのみであった。しかしEA細胞を無蛍光の抗EAN-AP

表6 1mg histone 中に EAN-AP 1mg を添加したとき histone と反応し沈殿をおこした EAN-AP の mg 数

Fraction	f_1	f_{2b}	f_3	f_{2a}
R-RNP	0.80	0.55	0.30	0.41
pH6.0	0.47	0.66	0.23	0.50
pH5.0	0.41	0.09	0.07	0.07
A. S	0.12	0.04	0.04	0.03

図19 EAN-AP と EA-cells histone との反応性

—○— R-RNP 分画 —●— pH 0.6 分画
—×— pH 5.0 分画 —▲— A.S 分画



でブロックし、蛍光標識抗体で染色すると核は全く染色されず(写真3)、細胞質が若干の蛍光を発生するが、その程度は弱く、一方正常マウス肝細胞は核、細胞質とも蛍光を示さなかった。

次いで、EA細胞核より抽出したDNAで処理して、当教室で癌化したL細胞¹³⁾を、蛍光標識抗EAN-APを用いて、EA細胞実験と同様に染色すると核が強く反応した(写真4)。この抗体によって井上ら¹³⁾の実験である cytolysis の結果に加えて、EA細胞DNAで transformation させたL細胞から、EA細胞の特長を証明することが出来た。

考 察

癌細胞の核・酸性蛋白質について免疫学的手法を用いた報告は少ないが、核上清蛋白質については2~3の報告が見られた。平井^{9) 10)}はAH49腹水肝癌で、pH4.8可溶性蛋白質中に癌特異抗原を証明し、DEAE-cellulose column による精製の結果、単純蛋白質で分子量が数万であると報告した。当教室の佐原¹⁴⁾、島¹⁵⁾

も同様に核上清蛋白質分画に癌特異抗原を認め、約4sのものであると報告している。

そこで著者は最近可溶化され、分析可能になってきた核 chromatin 蛋白質、特に DNA および histone と結合している酸性蛋白質について、EA細胞での特異抗原の検索をおこなった。佐原¹⁴⁾はAH127細胞核から Patel ら⁴⁰⁾の方法で抽出した核上清分画に癌特異抗原を見出しているが、著者は Wang^{22) 23)}の方法に従ってEA細胞核からEAN-APを抽出精製し、抗EAN-AP家兔血清を用いて、免疫学的に比較検討した結果、EA細胞核中に癌特異性を見出すことが出来た。MLN-APを対照とし寒天内二重拡散法で沈降線の確認をおこなうと、MLN-APに対し5本の沈降線が得られたが、これは癌抗原との共通成分であり、癌抗原で吸収するとすべて消失してしまう。EAN-APに対してはMLN-APによる吸収で1本の沈降線が残り、癌特異蛋白質であることが判明した。対照としてMLN-APを選んだことはEA細胞の起原を考慮すれば不均一な系を含んでいることになるかもしれないが、得られた1本

の癌抗原が正常マウス諸臓器(腎, 脾, 心, 肝, 肺, 脳)および血清には認められないことから, 最も多量に得やすいMLN-APを対照として選んだ。ところで, 吸収抗EAN-AP血清はマウス embryo とも1本の沈降線を形成し, EAN-AP癌抗原とつながり, 共通抗原であることを示した。癌細胞が胎児細胞のような性質を再現する現象は α -fetoprotein¹¹⁾ 12) や他の2, 3の酵素で観察されている。例えばアルドラーゼ¹³⁾, ヘキソキナーゼ¹⁴⁾ 15), ビルビン酸キナーゼ¹⁶⁾などのアイソザイムには成熟型である肝型と胎児型である筋肉型があるが, 成熟肝細胞が癌化するとそれらのアイソザイムパターンが胎児型を示すというものである。又, Thomsonら¹⁷⁾や石川¹⁸⁾のいう carcino-embryonic antigens (CEA)もその1つである。CEAは1種のグリコプロテインで, 胎児消化管組織に存在する抗原である。Thomsonらはこの蛋白質を血中で証明することにより, 胃癌, 腸癌, 食道癌などの診断が可能であると報告した。そこでこれらの胎児性抗原とEAN-AP抗原との関係を追究してゆくことが, 今後の問題点でもある。

EAN-AP抗原はEAN-APを subfraction するとpH 5.0分画およびA, S分画の両分画に含まれることから, この蛋白質の当電点はpH4.8よりも低いことが考えられる。又, 佐原¹¹⁾の方法で抽出したEA細胞上清分画, 更に細胞上清および1M NaCl抽出後に残存する蛋白質(residual蛋白質)にも弱い共通線が観察されたが, 前の二者は起原を同じくする蛋白質であるのかもしれない。Basergaら¹⁹⁾の仮説, 即ち核・酸性蛋白質が細胞質で作られ, 核内へ移行するとすれば, 核中のDNA附近以外の場所にも酸性蛋白質が存在することになり, 細胞上清, 核上清分画にも沈降線が認められることになる。

電気泳動法を用いた実験から, Wang²²⁾ 23), Petelら⁵⁰⁾, Benjaminら⁵¹⁾, Steinら⁵²⁾やSheltonら⁵³⁾によって, 核・酸性蛋白質がいくつかの成分の複合体⁵⁴⁾であると報告された。それは著者の系に於いても同様で, 沈降係数の測定結果や電気泳動実験での結果からEAN-APが heterogeneous な性質を示すことが判った。そこで著者は更に抗原の精製を行ない純化した。抗原が蛋白質である場合, ゲル濾過法, 電気泳動法などが用いられ, 最近では Nishiら⁴²⁾が特異抗血清を用いた抗原-抗体複合物からpHの調整とゲル濾過法を使用して純化している。著者は一般によく用いられている DEAE-cellulose column による抗原の精製を試みた。

活性化した樹脂上でEAN-APをイオン交換させNaCl

による段階的流出をおこなったのであるが, EAN-APは0M~0.4M NaCl分画に約80%近くまで回収され, 低分子物質の複合体であることは明らかであった。更に回収された蛋白質を抗EAN-APと寒天内免疫二重拡散法で反応させると, 0.2M NaCl分画の蛋白質のみに特異沈降線が形成され癌抗原の存在が確かめられた。又, 0.2M NaCl分画における蛋白質は超遠心分析結果から, $S_{20}, w=4.3s$ であり, アミノ酸分析結果から酸性蛋白質であることが判った。染色の様子や紫外部吸収曲線からも精製単純蛋白質であることが確かめられた。Baileyら⁵⁵⁾はDAB肝癌で2sおよび4s成分が増加し, 中でも4s成分が癌特異成分であると報告した。又平井⁹⁾ 10)はAH49腹水肝癌に於ける核上清分画で4sのpH4.8可溶蛋白質に癌特異性を認め, その精製を行なっている。更に佐原¹⁴⁾も4sと18s成分をもった核上清分画で癌特異物質は4sであると報告している。いずれも低分子でA・S附近の蛋白質に癌特異性を認めている点では著者の場合と一致している。

ところで細胞核・酸性蛋白質は1944年, Stedmanら⁵⁶⁾によって "chromosomin" と名づけられ, chromosomal matrix に存在し, 遺伝子の機能に関与⁵⁷⁾ 58) していることが示唆され, その後の研究から aspartic acid や glutamic acid に富んだ蛋白質⁵⁹⁾ 60) であることが報告されていたが, 不溶性のため十分な追求がなされていなかった。しかし最近になって種々の実験手段が開発され, 核・酸性蛋白質(核上清, chromatin 酸性および residual 蛋白を含む)に対する研究は急速に進んで来た。核・酸性蛋白質, 特に chromatin 酸性蛋白質の機能について, 最近では gene activity の regulation として, 又細胞分裂等の stimuli としての役割を演じていると報告されている。Steinら⁶¹⁾はこの蛋白質が細胞質で合成されているという。又 Farberら⁶²⁾はDNAにこの蛋白質の大部分が結合していると報告した。それは活性な組織⁶³⁾ 64) や chromatin⁶⁵⁾ ~67) の方が不活性な所より多量に含まれ, 更に異常増殖している組織や癌組織⁶⁸⁾ 69) に多量に存在しているという。(著者の得た蛋白質が正常と癌に於ける量的な差ではなく, 正常では認められないことに意味があろう)。又, それらの蛋白質は種特異的⁷⁰⁾であり, origin の組織に特異的⁷¹⁾ 72) であると報告している(この点でもDNAや histone との相互作用を検討すること, 更に癌特異性との関連を考えることは重要であらう)。Howkら⁷³⁾ 74)はこの蛋白質の一部から DNA-polymerase を分離し, Marushigeら⁷⁵⁾, Wang⁷⁶⁾ 77), Kamiyamaら⁷⁸⁾, Paulら⁷⁹⁾はRNA合成に関連する実験報告をしてい

る。又、prokaryotic系での represser である lac operon⁸⁰⁾ や λ phage represser⁸¹⁾ からこの酸性蛋白質の分離が可能であり、eukaryotic系に於いては酵素誘起^{82)~85)}を行なうという報告が出されているなど、他の多くの文献^{86)~89)}がこの蛋白質の役割の重要性を指摘している。

Basergaら⁴⁹⁾の仮説では、mammalian細胞核・酸性蛋白質が gene expression の controller として、又DNA合成や細胞分裂の stimuli としての機能を果していると述べている。それは酸性蛋白質が遺伝子に作用し、情報高分子の transcription を誘起したり、変化させるような特別な機構に関与していることが期待されるであろう。それらは癌細胞に於いても同様で、生体の homeostasis を無視した無限の分裂と増殖を続ける癌細胞で、核蛋白質に異常が存在したことは、発癌の原因と密接な関係があるのではないか、chromatin 酸性蛋白質の癌抗原としての役割について、一層検討しなければならないと考える。

多くの研究で報告されているように、核・酸性蛋白質の重要性から考えて、そこに癌特異性を見出したことは今後の発癌機構の解析に新しい"approach"を提供したことになろう。癌細胞核・酸性蛋白質-chromatin 酸性蛋白質についてその特異性と用いる実験手段の感度を充分検討しながら、その構造と機能について、更に追求することが今後の課題である。

結 論

EA細胞核から最近 gene regulator として、又細胞分裂の stimuli として注目されて来ている chromatin 酸性蛋白質について、寒天内免疫二重拡散法、免疫電気泳動法、蛍光抗体法などにより抗原分析を行なった結果、癌抗原の存在を見いだした。

1. EA細胞核 chromatin 酸性蛋白質 (EAN-AP と略記する) は DNA および histone との結合体として抽出されるが、それは塩濃度の調整により EAN-AP として精製され、更に pH と硫酸により subfraction することが出来た (R-RNP 分画, pH6.0 分画, pH5.0 分画および A.S 分画)。抗 EAN-AP 家兔血清は寒天内免疫二重拡散法と免疫電気泳動法により、EAN-AP と特異的な沈降線を形成することが認められた。この癌抗原は pH5.0 分画および A.S 分画に含まれることが判明した。

2. EAN-AP 抗原は正常マウス諸臓器及び正常マウス血清には認められない。しかしマウス胎児組織に少量含まれていた。

3. EA細胞を移植したマウス (ddN, C3H, C57BL, dd) 血清に抗 EAN-AP 家兔血清と反応する物質が認められた。しかし⁸⁹Sr 発現骨肉腫をもつ ddN マウス血清には全く認められなかった。

4. ⁸⁹Sr 発現骨肉腫の chromatin 酸性蛋白質 (Sr N-AP) について、抗 EAN-AP 家兔血清と反応させると、特異的な沈降線は得られず、又、Sr 細胞核上清蛋白質に於いても同様であった。

5. EAN-AP 抗原は蛋白染色に陽性。脂肪および糖染色には陰性であった。その抗原性は 70°C, 10 分の加熱で消失し、又 trypsin 消化でも認められなかった。

6. EAN-AP の subfraction はいづれも 95% 前後の蛋白質を含み、DNA, RNA 含量はそれぞれ 1% 以下、4% 前後であった。アミノ酸分析結果は癌抗原をもつ pH5.0 および A.S 分画が最も酸性度が高かった。

7. DEAE-cellulose column クロマトグラフィーによる EAN-AP 抗原の精製を行ない、NaCl による段階的溶出法で分画した。EAN-AP 抗原は 0.2M NaCl 分画に含まれ、再クロマト法により再精製をおこなったのち、沈降像を調べると 1 ピークを示し、沈降係数は 4.3s であった。又 278m μ に吸収極大値を持ち、核酸や糖およびリンを含まない単純蛋白質で、塩基性アミノ酸に対する酸性アミノ酸の比が 1.64 であることが判った。

8. ³H-4,5-lysine を用いて、EA細胞から ³H-lysine-EAN-AP を抽出した。

9. EA細胞より抽出した histone と EAN-AP を反応させると、直ちに複合体が形成された。³H-lysine EAN-AP による測定結果から、その affinity は R-RNP 分画が最も強く、pH5.0 分画および A.S 分画は酸性度が高いにもかかわらず、その affinity は弱く癌抗原と関連して機能的な面を考えることは興味深い。

10. EA細胞核は FITC 標識 EAN-AP 抗体により、強く染色された。

11. EAN-AP 抗原について、その特異性と測定に用いる手段の感度とを、より充分に検討しながら、その構造と機能について、更に追求することが今後の課題である。

謝 辞

稿を終えるに当り、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師石川太刀雄教授に深く感謝いたします。又、井上和子博士、福田鎮雄博士、さらに高沢ますみ氏はじめ教室の皆様御援助に謝意を表します。

文 献

- 1) Hhmpel, K., Lennartz, K. J. & Mauer, W. : Beitr. Path. Anat. 126, 381 (1962).
- 2) Seed, J. : Proc. Roy. Soc. B., 156, 41 (1962).
- 3) Steele, W. J. & Busch, H. : Cancer Res., 23, 1153 (1963).
- 4) Zbarsky, I. B. & Pereroschiva, K. A. : Biochimiya, 22, 295 (1957).
- 5) Irvin, J. L., Holbrook, D. J., Evans, J. H., Allister, H. C. Mc. & Stiles, E. P. : Exp. Cell Res. Suppl., 9, 359 (1963).
- 6) Zilber, L. A. : Advanc. Cancer Res. 5, 291 (1958).
- 7) Zilber, L. A. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 101, 264 (1962).
- 8) Miller, E. : Growth, 25, 67 (1961).
- 9) 平井秀松 : 癌の臨, 8, 588 (1962).
- 10) 平井秀松 : 最新医学, 19, 495 (1964).
- 11) 法幸多良雄 : 十全医会誌, 74(1), 30 (1966).
- 12) 福田鎮雄 : 十全医会誌, 76(2), 342 (1968).
- 13) 井上和子・河野尚子・小西二三男・石川太刀雄 : Symposia Cell Biol., 21, 321 (1970).
- 14) 佐原吉博 : 十全医会誌, 79(3), 55 (1970).
- 15) 島 巖 : 日整外会誌, 46(8), 575 (1972).
- 16) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 74(1), 51 (1966).
- 17) 吉光外宏 : 十全医会誌, 75(1), 3 (1967).
- 18) Douglas, M. & Fambrough, Jr. : Handbook of Molecular Cytology (ed. by Lima-de-Faria, A.) 15, P. 438, London, North-Holland Publishing company, 1969.
- 19) Hogeboom, G. H. & Schneider, W. C. : The nucleic acid, 2, P. 105, N. Y., Acad. Press, 1955.
- 20) Kono, N. : (in preparation).
- 21) Chauveau, J., Moulé, Y. & Rouiller, C. : Exp. Cell Res., 11, 317 (1956).
- 22) Wang, T. Y. : J. Biol. Chem., 241, 2913 (1966).
- 23) Wang, T. Y. : J. Biol. Chem., 242, 1220 (1967).
- 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 25) 高瀬武平・真鍋昌平 : 整外科, 15, 1 (1964).
- 26) Freund, J. & Bonato, M. W. : J. Immunol., 48, 325 (1944).
- 27) Björklund, B. : J. Immunol., 79, 319 (1952).
- 28) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953).
- 29) Crowle, A. J. : J. Lab. Clin. Med., 52, 784 (1958).
- 30) Uriel, J. : Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 277 (1958).
- 31) 小林忠義・影山圭三 : 病理組織標本の作り方, 第3版, p.118, 東京, 医学書院, 1968
- 32) Graber, P. & Williams, C. A. : Biochem. Biophys. Acad., 17, 69 (1955).
- 33) Schneider, W. C. : Methods in Enzymol., 3, 680 (1957).
- 34) Zamenhof, S. : Methods in Enzymol., 3, 696 (1957).
- 35) Ootaka, E., Oosawa, S., Oota, Y., Ishihama, A. & Mitsui, H. : Biochem. Biophys. Acta, 55, 310 (1962).
- 36) Johns, E. W. : Biochem. J., 92, 55 (1964).
- 37) 川村明義 : 蛋, 核, 酵, 11, 1621 (1966).
- 38) Allen, R. J. L. : Biochem. J., 34, 858 (1940).
- 39) Wang, T. Y. & Johns, E. W. : Arch. Biochem. Biophys., 124, 176 (1968).
- 40) Patel, G. & Wang, T. Y. : Exp. Cell Res., 34, 120 (1971).
- 41) Gitlin, D. & Boesman, M. : Comp. Biochem. Physiol., 21, 327 (1967).
- 42) Nishi, S. : Cancer Res., 30, 2507 (1970).
- 43) Rensing, von U., Schmid, A. & Leuthardt, F. : Z. Physiol. Chem., 348, 921 (1967).
- 44) Sato, S., Matsushima, T. & Sugimura, T. : Cancer Res., 29, 1437 (1969).
- 45) Shatton, J. B., Morris, H. P. & Weinhouse, S. : Cancer Res., 29, 1161 (1969).
- 46) Farina, F. A., Adelman, R. C., Lo, C.-H., Morris, H. P. & Weinhouse, S. : Cancer Res., 28, 1897 (1968).
- 47) Thomson, D. M. P., Krupey, J., Freeman, S. O. & Gold, P. : Proc. Natl. Acad. Sci., 64, 161 (1969).
- 48) 石川太刀雄 : Medical Postgraduates (医学書院), 9, 430 (1971).

- 49) **Baserga, R. & Stein, G.** : Fed. Proc., **30**, 1752 (1971).
- 50) **Patel, G. & Patel, V., Wang, T. & Zorbel, C.** : Arch. Biochem. Biophys., **128**, 654 (1968).
- 51) **Benjamin, W. & Gellhorn, A.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **59**, 262 (1968).
- 52) **Stein, G. S., Pegoraro, L., Borun, T. W. & Baserga, R.** : J. Cell Biol., **47**, 202a (1970).
- 53) **Shelton, K. & Allfrey, V. G.** : Nature, **228**, 132 (1970).
- 54) **Teng, C., Teng, C. & Allfrey, V. G.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 690 (1970).
- 55) **Bakey, B. & Sorof, S.** : Cancer Res., **24**, 1814 (1964).
- 56) **Stedman, E. & Stedman, E.** : Exp. Cell Res., **34**, 120 (1940).
- 57) **Stedman, E.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **12**, 244 (1947).
- 58) **Stedman, E. & Stedman, E.** : Symp. Soc. Exptl. Biol., **1**, 232 (1951).
- 59) **Steel, W. J. & Busch, H.** : Exp. Cell Res., **33**, 68 (1964).
- 60) **Dounce, A. L. & Hilgartner, C. A.** : Exp. Cell Res., **36**, 228 (1964).
- 61) **Stein, G. S., Borun, T. W., Pegoraro, L. & Baserga, R.** : Federation Proc., **30**, 457 (1971).
- 62) **Farber, J., Baserga, R. & Gabbay, E.** : Biochem. Biophys. Res. Comm., **43**, 675 (1971).
- 63) **Dingman, C. & Sporn, M.** : J. Biol. Chem., **239**, 3483 (1964).
- 64) **Stein, G. & Baserga, R.** : Biochem. Biophys. Res. Comm., **41**, 715 (1970).
- 65) **Frenster, J. H.** : Nature, **206**, 680 (1965).
- 66) **Frenster, J. H., Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **50**, 1026 (1963).
- 67) **Littau, V. C., Allfrey, V. G., Frenster, J. H. & Mirsky, A. E.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **52**, 93 (1964).
- 68) **Grunicke, H., Potter, V. & Morris, H.** : Cancer Res., **30**, 776 (1970).
- 69) **Sporn, M. & Dingman, C.** : Cancer Res., **26**, 2488 (1966).
- 70) **Spelsberg, T. & Hnilica, L.** : Biochem. J., **120**, 435 (1970).
- 71) **MaGillivray, A. J., Carroll, D. & Paul, J.** : Federation European Biochem. Soc. Letters, **13**, 204 (1971).
- 72) **Klensmith, L. J., Heidema, J. & Carroll, A.** : Nature, **226**, 5250 (1970).
- 73) **Howk, R. & Wang, T. Y.** : Arch. Biochem. Biophys., **133**, 238 (1969).
- 74) **Howk, R. & Wang, T. Y.** : Arch. Biochem. Biophys., **136**, 422 (1970).
- 75) **Marushige, M. & Ozaki, H.** : Developmental Biol., **16**, 474 (1967).
- 76) **Wang, T. Y.** : Exp. Cell Res., **53**, 288 (1968).
- 77) **Wang, T. Y.** : Exp. Cell Res., **61**, 455 (1970).
- 78) **Kamiyama, M. & Wang, T. Y.** : Biochim. Biophys. Acta, **228**, 563 (1971).
- 79) **Paul, J. & Gilmour, R. S.** : J. Mol. Biol., **34**, 305 (1968).
- 80) **Gilbert, W. & Mueller-Hill, B.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **56**, 1891 (1966).
- 81) **Ptashne, M.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **57**, 306 (1967).
- 82) **Ruddn, R. W. & Rainey, C. H.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **40**, 152 (1970).
- 83) **Shelton, K. & Allfrey, V. G.** : Nature, **228**, 132 (1970).
- 84) **Bick, M. O. & Sohauder, P.** : Biochim. Biophys. Acta, **224**, 644 (1970).
- 85) **Swaneck, G. E., Chu, L. & Edelman, I.** : J. Biol. Chem., **245**, 5382 (1970).
- 86) **Kleinsmith, L. J. & Allfrey, V. G.** : Biochem. Biophys. Acta, **175**, 123 (1969).
- 87) **Gershay, E. L. & Kleinsmith, L. J.** : Biochem. Biophys. Acta, **194**, 519 (1969).
- 88) **Kraemer, R. J. & Coffey, D. S.** : Biochem. Biophys. Acta, **224**, 553 (1970).
- 89) **Spelsberg, T., Hnilica, L. & Ansevin, A. T.** : Biochem. Biophys. Acta, **228**, 550 (1971).

Abstract

The cancerous change of chromatin acidic proteins was analysed by immunological methods.

The chromatin acidic proteins were isolated from Ehrlich ascites tumor cells (EA-cells) by dissociation of the deoxyribonucleo-protein complex. These proteins contained about 95% protein, 4% RNA, and a trace of DNA and phosphorus.

They were separable into four main fractions (R-RNP, pH 6.0, pH 5.0 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate fractions) by pH-change and ammonium sulfate concentration.

The antisera against these proteins were made by complete adjuvant Freund's method with rabbits.

One specific antigen, characteristic of the chromatin acidic proteins (EAN-AP), was detected by the double immunodiffusion method and the immunoelectrophoretic method. EAN-AP antigen was present in the pH 5.0 fraction and the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate fraction. Moreover, a crossreacting antigen was found in the EA-tumor bearing mouse serum of dd, ddN, C3H and C57BL strains. This antigen was not found in the normal lungs, spleens, livers and serum of mice. EAN-AP antigen showed electrophoretic mobilities similar to those of serum β globulin.

The EAN-AP antigen was purified using DEAE-cellulose column and eluted with 0.01 M Tris buffer, pH 7.2, containing 0.2 M NaCl. This antigen showed a single peak by analytical centrifuge. This chromatin protein fractions was acidic protein, therefore could be seen by the predominance of acidic amino acids in the molecule. The ratio of acidic to basic amino acids was 1.64.

The pH 5.0 fraction and the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate fractions interacted strongly with EA tumor cell histones and formed a complex. However, these complexes forming activity were lower than other acidic proteins. The results suggested that complex formation might be specific and distinct from the other two fractions.

One specific antigen was found in the chromatin acidic proteins from ^{89}Sr induced osteosarcoma. EAN-AP antigen and ^{89}Sr induced osteosarcoma antigen proved to be different from each other by the double immunodiffusion method.

EA-cells were characteristically stained in the nuclei by the direct fluorescein antibody method.

The possible significance of these characteristics was discussed in this paper.

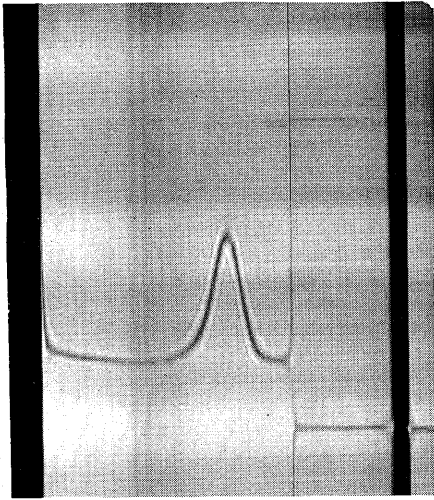


写真1. E-Pの沈降波形
 溶媒 0.14M NaCl 7.85mg/ml
 59,780 r.p.m. 2400秒後 (20°C)

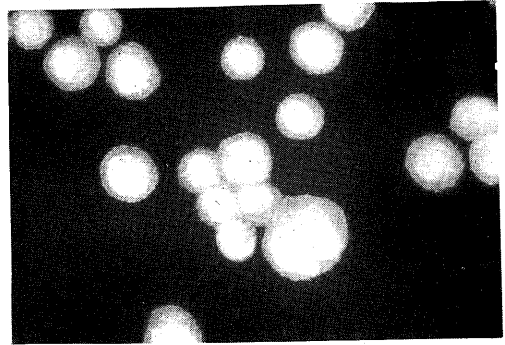


写真2. 抗EAN-APによるEA細胞の蛍光染色像 (強拡大).

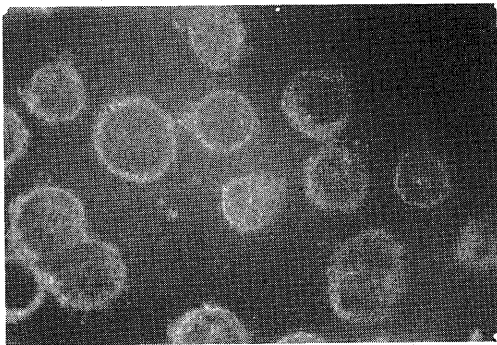


写真3. 抗EAN-APによりブロッキングを行なった後蛍光染色をしたEA細胞像 (強拡大).

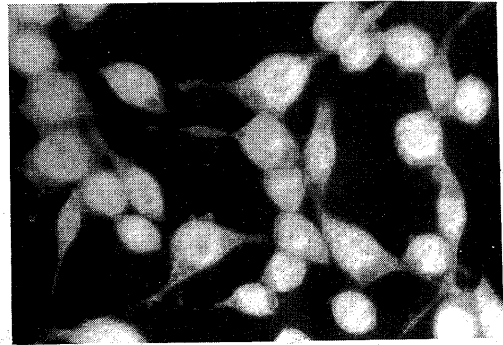


写真4. 抗EAN-APによるEA-DNA処理L細胞の蛍光染色像 (強拡大).