

## 動物細胞抽出液のDNA合成酵素の測定について

大村 浩久  
九州大学農学部食糧化学教室

Keir H. M.  
Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/22946>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 21 (4), pp.383-399, 1965-05. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

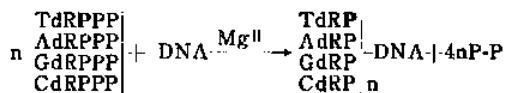
## 動物細胞抽出液のDNA合成酵素の測定について

大村 浩久・H. M. Keir

## On the estimation of DNA synthesizing enzyme of animal cell extracts

H. Omura and H. M. Keir

Kornberg 等による大腸菌からの DNA 合成酵素 (DNA polymerase; DNA nucleotidyltransferase; EC. 2.7.7.7) の発見およびその詳細な研究は核酸類の代謝, 合成機構について多くの新しい知見を提供している。<sup>1,2,22~24</sup> この反応は DNA に含まれている 4 種類の deoxyribonucleoside-5'-triphosphates (TTP, dATP, dGTP, dCTP) が primer DNA と Mg<sup>++</sup> イオンの存在下に酵素的に重合して primer と似た構成成分の polynucleotide を生ずるものである。このような反応系は種々の動物組織にも含まれていることが Canellakis 等<sup>10,11,27,28</sup> や Bollum 等<sup>3-8</sup> によつても認められ特に活性の強い胸腺の酵素について詳細な研究が続けられている。Davidson 等は動物の核酸代謝について細胞レベルでの研究を広く行なつておりその一部として DNA 合成酵素も詳細に検討されている。<sup>22~21,31-35</sup> 彼等は主として甘鼠の Landschutz 腹水癌細胞や HeLa 細胞について研究し特に最近ではウイルスの増殖や癌との関連に注目している。これ等の酵素系も Kornberg 等が発見した大腸菌のもの全く類似の機構によるものであつてその反応は一般に次の式で表わされる。



この酵素活性の測定法としては生成した Polynucleotide を分離しその紫外外部吸収の値を測定し primer DNA に由来する値を差引いて DNA の増加量を求めることによつて酵素活性を表わすことも出来るが、この場合比較的少量の DNA が生成されなければならないのでこれにともなつて基質として高価な nucleoside-5'-triphosphates も少量に用いなければならない。しかも測定には活性の高い酵素液が必要である。いいかえると酵素活性が弱い場合はこの方法で測

定することはむづかしい。そのため一般には基質 triphosphates の DNA へのとり込みで測定される。通常 4 種の基質のうちの 1 つを P<sup>32</sup> 又は C<sup>14</sup> で標識したものをを用い生成した polynucleotide に含まれた放射能の強さを測る方法がよく用いられている。標識基質としては DNA に特異的な TTP の α 位の P を P<sup>32</sup> で標識したものが測定上からも最も望ましい。我々は通常無機 P<sup>32</sup> と cyanoethanol とから cyanoethyl phosphate, TMP を経て合成したものを使用した。

DNA 合成酵素はその反応にあたり種々の条件で極めて鋭敏に影響されやすい。例えば Mg<sup>++</sup> が反応に必要なことは周知の通りであるが腹水癌細胞酵素の場合後述する測定条件では 1 μmole の Mg<sup>++</sup> イオンで最高の活性が得られるがその添加量の有効な範囲は極めて狭い。また Na<sup>+</sup> イオンは活性を阻害するので使用を避けなければならないが低濃度の K<sup>+</sup> イオンは反応を促進し 10 μmoles で最高に達し約 2 倍となる。しかし添加量をさらに増加すると却て阻害し 50 μmoles では殆ど完全に反応を停止する。EDTA の効果はさらに鋭敏であつて 0.08 μmole の低濃度では約 10 倍もの活性化をもたらすが 0.6 μmole では完全に失活する。従つて酵素活性の測定に当つてはその条件は極めて厳格に保たなければならないだけでなく酵素液の調製にも考慮しなければならない。

Bollum 等<sup>4</sup>) によつて鼠について認められたように DNA 合成酵素は種々の組織について検出されたがその活性の差は著しい。Smellie<sup>21</sup>) も兔の組織の酵素活性の分布が鼠のものと同く似ていることを示した。これらの結果によると腎臓, 胸腺, 再生肝等が比較的強くそれに反して腎臓, 肝臓, 膵臓等は著しく弱い。一方我々が主として取扱つてきた腹水癌細胞はその活潑な増殖能とともに DNA 合成酵素の活性も高い。何れにしても我々は細胞レベルでの研究のため一般に単

なる細胞抽出液の程度で活性を迫及した。しかし酵素活性は上述のような測定条件だけでなく細胞の破壊、抽出、保存等の諸条件にもかなり影響を受け易く活性が低下するのでこれを無視することは出来ない。

他方 Wildy 一派<sup>37-44)</sup>は、DNA ウィルスである herpes simplex ウィルスの増殖等について組織培養した HeLa 細胞を用いて種々の観点から広汎な研究を進めており、我々も生化学の立場から特に DNA の代謝を中心にして共同研究に加わつたがその成果については既に報告した。<sup>39)</sup> HeLa 細胞の DNA 合成酵素活性は腹水癌細胞のものに比べて著しく弱い。しかも組織培養のために腹水癌細胞や細菌等のように簡単に大量の材料を得ることは出来ない、例えば細胞は数日培養して約 10 倍に増殖するに過ぎず後述するように  $10^8$  個程度の少量の細胞しか試験に使うことは出来なかつた。このような場合出来るだけ活性の高い細胞抽出液を調製することはなによりも先づ必要であつて抽出条件の詳細な検討は活性の測定法の検討とともに不可欠の要因であるので、研究に際しその都度検討したがここに取り纏めて報告する。

## 実 験 方 法

### 酵素液の調製

Landschutz 腹水癌細胞や HeLa 細胞からの抽出液の調製については既に Smellie や Keir 等<sup>16,17)</sup>によつて一応の方法は設定されている。その概略は次の通りである。

これらの細胞は低い浸透圧で破壊され易いので専らこの方法を利用した。細胞を 0.15 M NaCl あるいは 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+PO_4$  緩衝液で数回洗滌した後 15 ないし 20 倍容の冷却した蒸留水に懸濁する。これを Potter-Elvehjem 型の homogenizer で処理して細胞を破壊し、直ちに KCl および  $K^+PO_4$  緩衝液、pH 7.5 を加えてその濃度をそれぞれ 0.15 M および 0.01 M とする。これを Spinco L 型超遠心分離機、ローター No. 40 を用いて 105,000×g で 60 分間遠心分離して細胞抽出液を得る。これが我々の “standard soluble extract” あるいは “K<sup>+</sup>-soluble extract” である。場合によつては細胞を破壊した後遠心分離し、得られた上澄に KCl および  $K^+PO_4$  緩衝液を加え “H<sub>2</sub>O-soluble extract” とした。HeLa 細胞のように少量の材料から出発する場合遠心分離には普通のローターの代りに特殊ローター SW 39 を用いても差支えない。このような抽出液を調製した残りの沈澱につ

いても酵素活性を測定する場合がある。この場合は沈澱を適量の 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+PO_4$ , pH 7.5 に懸濁し前記 homogenizer で 1 分間烈しく攪拌し、さらに 20 KC 音波で処理して破壊する。これを 105,000×g 60分間遠心分離してその上澄液をとり “sediment extract” とする。

一方細胞分画法も利用される。上述のように浸透圧ショックで細胞を破壊し直ちに 1/3 容の 1 M 蔗糖溶液を加えて終濃度 0.25 M とする。軽く homogenize した後 700×g で 10 分間遠心分離する。上澄液をピペットで注意して取り除く。Crystal violet で染色しこの分画が細胞核および完全細胞を含まないことを顕微鏡で確かめる。沈澱は上として細胞核より成り他の violet 染色性物質も多少混つているが細胞の破壊は充分であつて完全細胞は殆ど含んでいない。上澄液を 105,000×g で 60 ないし 90 分間遠心分離して “soluble cell sap” と mitochondria および microsomes からなる “small particles” との両分画に分れる。これらの各分画をさらに次のように処理する。(a) 細胞核を 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+PO_4$ , pH 7.5 に懸濁し、“sediment extract” の調製に準じて音波処理後遠心分離する。(b) “soluble cell sap” に KCl および  $K^+PO_4$  を加える。(c) “small particles” も細胞核と同様に処理して抽出液を調製する。

専らこのような細胞抽出液について酵素活性を測定したが場合によつてはさらに 1 段程度精製した。即ち抽出液に 0.2 N 酢酸を滴加してその pH を 4.8 とした。約 5 分間放置した後生じた沈澱を 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して集め約 1/4 容の 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+PO_4$ , pH 7.5 にとかし “pH 4.8 沈澱” とした。酸沈澱は 0.15 M KCl の有無でかなり異なるのでこの点を留意しなければならない。沈澱溶液は保存中に再び多少の沈澱を生ずるので遠沈除去する。

これらの調製操作は特記しない限りすべて氷冷しながら 0°~2°C で行ない溶液もあらかじめ氷冷したものをを用いる。又調製した細胞抽出液も氷で冷しながら冷蔵庫に保存したが凍結すれば酵素の活性が低下するので注意しなければならない。

個々の調製試験の詳細については後に述べる。

### DNA 合成酵素活性の測定

酵素活性は primer DNA, Mg<sup>2+</sup> イオン および dATP, dGTP, dCTP の共存下に [<sup>32</sup>P]TTP から酸不溶性分画にとり込まれる [<sup>32</sup>P]TMP の量を測定して求めた。反応液の組成は常に次の通りであつて上述

のように反応条件を厳格に保つことに特に留意した。即ち反応液の全量は 0.25 ml とし 10  $\mu$ moles Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5, 0.5  $\mu$ mole  $K^+$ - $PO_4$  緩衝液, pH 7.5, 1  $\mu$ mole  $MgCl_2$ , 9  $\mu$ moles KCl, 0.08  $\mu$ mole EDTA, 50  $\mu$ g primer DNA, 50  $m\mu$ moles 宛の dATP, dGTP, dCTP および [ $P^{32}$ ]TTP ならびに 0.05 ml 細胞抽出液を含むようにした。そのため例えば終濃度 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+$ - $PO_4$  の細胞抽出液について活性を測定する場合には 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.75 ml, 0.5 M  $MgCl_2$  0.06 ml, 0.02 M EDTA 0.12 ml, 1.0 M KCl 0.045 ml, nucleotides 混液 0.60 ml (10  $\mu$ M/ml, 0.15 ml 宛), DNA 溶液(0.3 mg/ml) 1.15 ml,  $H_2O$  0.275 ml から全量 3 ml の特別混合液をあらかじめ調製しその 0.1 ml を酵素液 0.05 ml および  $H_2O$  0.1 ml と混合して反応液を調製した。実験の都合上終濃度 0.05 M KCl-0.01 M  $K^+$ - $PO_4$  の酵素液 0.05 ml について活性を測定することもあつたがこの場合には 1.0 M KCl 0.125 ml, 酵素液 0.10 ml を測定に用いる場合には KCl 0.09 ml を添加して上記特別混合液 3 ml を調製しこの 0.1 ml を用いれば反応液の  $K^+$ イオンを 10  $\mu$ moles にすることが出来る。Primer DNA は 1 本鎖 DNA の効果が高いので特別混合液の調製には直前に 100°C で 10 分間加熱後水で急冷した熱変性 DNA を用いた。

反応液は 37°C の温浴中で振盪作用させる。通常 30 分, 60 分, 120 分および 180 分間反応させた後ドライアイスで反応液を凍らせて作用を止める。反応が全部終了後に試験管を砕氷に移し 0°C で反応液をとかず、これに吸着助剤として 0.2% 牛血清アルブミン溶液 0.05 ml を加えよく混合した後、これから 0.05 ml 宛をとり出し直径 2 cm の円形濾紙に均等に吸着させ直ちに氷冷した 5% トリクロール酢酸溶液の中に投入する。この場合 1 試験管について 2 枚調製し、又トリクロール酢酸は濾紙 1 枚について 15 ml 宛使用する。トリクロール酢酸をゆるく攪拌して吸着濾紙を洗い未反応の nucleotides のような酸可溶性区分を除き酸不溶性の polynucleotides だけを濾紙に保持させる。烈しい攪拌は polynucleotides も濾紙から除かれるおそれがあるので避けなければならない。そのため洗滌はゆるく行ない傾瀉してトリクロール酢酸を除き再び新しい洗滌液を加える。このような洗滌を 3 回繰り返して未反応の nucleotides 特に [ $P^{32}$ ]TTP を完全に除いた後エタノールついでエーテルで濾紙を洗つて脱水し最後に正控空気を吹きつけて乾燥

する。この濾紙に吸着保持されている DNA にとり込まれた放射能の強さを Nuclear Chicago gas-flow counter で測定する。1 試料について 2 回計測してその平均を求める。対照区として酵素液の代りに同じ濃度の KCl- $K^+$ - $PO_4$  溶液を用いた反応液を調製し試験区と平行に操作して得た濾紙について放射能を測定しこれを試験区の値から差引いて DNA に含まれている放射能の強さを求める。この値から反応によって DNA にとり込まれた全カウント数を求め、さらに酵素の測定に用いた [ $P^{32}$ ]TTP の  $m\mu$ mole あたりのカウント数から DNA にとり込まれた [ $P^{32}$ ]TMP の  $m\mu$ mole 数が得られる。別に酵素液の蛋白含量を測定し DNA 合成酵素の活性として反応液中の蛋白 mg あたり DNA にとり込まれた TMP の  $m\mu$ mole 数で表わす。

尚測定に用いる酵素液の蛋白含量は 50 ないし 100  $\mu$ g が最も適当であることが経験されたので通常酵素液は 0.05 ml あたりこの程度になるように調節して測定に用いることが望ましい。

DNA の合成反応にはこのほかに 1 種類だけの deoxyribonucleoside-5'-triphosphate の関与するいわゆる“限定反応”も知られており、我々<sup>18)</sup>も横胸腺から調製した酵素による TMP のとり込みを測定したが本報では 4 種類の nucleotides を要求するものに限定した。

#### Deoxyribonuclease I の測定

Kornberg 等<sup>24)</sup>は大腸菌の DNA 合成酵素をストレプトマイシン処理、硫酸分画、DEAE cellulose 処理、phospho cellulose 処理等によつて 2,000 ないし 4,000 倍に精製したにも拘らず夾雑する DNase を取り除くことは出来なかつた。我々は研究の性格上細胞抽出液あるいは単に 1 段階精製を進めた pH 4.8 沈澱について酵素の活性を測定しているために酵素液に共存する DNase の活性も常に考慮しなければならない。即ち酵素的に重合した生成物も反応中に再び DNase で低分子のものに分解されるために得られた酵素活性は厳密には酵素的に DNA にとり込まれた TMP の量からさらに DNase のために再び酸可溶化した量を差引いたもので表わされている。従つて DNA 合成酵素の測定に際しては夾雑する DNase の活性を常に求めなければならない。しかもこの DNase 活性は DNA 合成酵素の測定に用いたものと同じ条件で測定されなければならないことは当然である。しかし反応中の DNase 作用は primer DNA

にも働くので合成酵素によつてとり込まれた TMP のうちの程度が再分解されるかは厳密には求められず DNase 活性は定性的参考の域にとどまることを考慮しなければならない。

我々は DNase(BC. 3.1.4.5)の測定には基質 DNA から酵素の作用によつて酸可溶性となつた量を紫外部吸収から求める方法を採用したので吸収の測定上通常合成酵素の測定条件の 10 倍スケールで行なつたが 4 種の triphosphates は反応系から除いた。従つて反応液の全量を 2.5 ml とし 100  $\mu$ moles Tris-HCl, pH 7.5, 5  $\mu$ moles  $K^+$ - $PO_4$ , pH 7.5, 10  $\mu$ moles  $MgCl_2$ , 0.8  $\mu$ mole EDTA, 90  $\mu$ moles KCl, 500  $\mu$ g 熱変性 DNA を含む酵素液は 0.5 ml を使用する。37°C に 180 分間振盪作用させた後碎氷中に冷却して反応を停止、直ちに精胸腺 DNA 0.2 多溶液および牛血清アルブミン 0.2 多溶液それぞれ 0.25 ml を加えてよく混合しさらに 2.1 N  $HClO_4$ , 2 ml を加える。0°C に 10 分間放置してよく沈殿させた後に遠心分離しその上澄液について 260  $m\mu$  の吸光値を測定する。場合によつては浮游沈澱を残すこともあるがこれは 2 回遠心分離または濾過によつて除かれる。盲験として DNA あるいは酵素液を省略した反応液を調製し同様に操作してその吸光値を求める。これらの値から酵素によつて分解され酸可溶性となつた DNA の量を計算によつて求め酵素液中の蛋白含量から mg 当りの DNA 量で活性を示した。計算にあつては酸可溶性 DNA 分解物の酸性における 260  $m\mu$  での分子吸光係数は 10200 と仮定した。この値は dAMP, dGMP, dCMP および TMP の 260  $m\mu$  での分子吸光係数の平均であつて (Burton<sup>25</sup>), oligonucleotides は pH 2 あるいはそれ以下で吸光値を測定しても hyperchromic effect を示さないことが Staehelin<sup>26</sup>) によつて報告されているので酸可溶性 DNA 分解物の真の値と近似していると考えられる。従つて計算は例えば次のように行う。

260  $m\mu$  での吸光値が試験区 1.390, DNA除去区 0.162, 酵素除去区 0.383 である場合

$$A_{E_{260}} = 1.390 - 0.162 - 0.383 = 0.845$$

従つて全溶液 5 ml の optical density unit は O.D.U. = 0.845  $\times$  5 = 4.225

1  $\mu$ mole/ml の deoxyribonucleotides  $E_{260}$  = 10.2

1  $\mu$ mole  $\div$  327  $\mu$ g deoxyribonucleotides

$$\div 327 \mu\text{gDNA}$$

従つて酸可溶化された DNA の量は

$$327 \mu\text{g} \times 4.225 / 10.2 = 135.4 \mu\text{g}$$

#### 蛋白質含量の測定

広く常用されている Lowry 等<sup>25</sup>)の鋭敏な方法で発色させ、その強さを Unicam 分光光度計 750  $m\mu$  または 500  $m\mu$  で測定、牛血清アルブミンで調製した標準曲線から蛋白含量を求めた。

#### HeLa 細胞

BHK21, clone 13 Macpherson and Stoker<sup>26</sup>)を用いた。組織培養細胞は Glasgow 大学ウイルス研究室から提供された。

### 結果および考察

#### 細胞抽出液の調製

**K<sup>+</sup> イオンの影響:** 上述のように DNA 合成酵素は高濃度の K<sup>+</sup> イオンでは阻害されるが低い濃度では却て活性化され 10  $\mu$ moles で最高を示す。しかもその活性化の領域は 10  $\mu$ moles を中心とする狭い範囲にあるので酵素の活性を測定するにあつては反応液中の K<sup>+</sup> イオンの量は 10  $\mu$ moles に厳密に保持しなければならない。一方透過性ショックを利用して細胞を破壊しているので通常 H<sub>2</sub>O または低い塩濃度で酵素を抽出しているが、酵素活性を保持するためには多少の塩の存在が必要であり特別の場合を除いて KCl および K<sup>+</sup>- $PO_4$  緩衝液, pH 7.5 を加えてその終濃度をそれぞれ 0.15 M および 0.01 M とし 0°C で保存している。このように K<sup>+</sup> イオンは酵素の活性測定だけでなく酵素の保存に際しても影響するので細胞抽出液の調製にあつても K<sup>+</sup> イオンの添加量については考慮されなければならない。

約  $5 \times 10^7$  の HeLa 細胞を 0.15 M KCl-0.01 M K<sup>+</sup>- $PO_4$ , pH 7.5 に懸濁し洗滌後遠心分離する。これを 3 回繰り返したのち同じ混合液に懸濁しこれを 2 等分する。2,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して細胞を沈降させる。上澄液を除きさらに遠沈管を清潔なやわらかい紙の上にさかさに立てて附着している洗滌液を十分に除く。一方の細胞を 1.5 ml 0.01 M K<sup>+</sup>- $PO_4$ , pH 7.5 に懸濁し Potter-Elvehjem 型の homogenizer で軸を 10 回上下に動かして細胞を破壊する。顕微鏡で細胞の破壊を確認のち Spinco L 型超遠心分離機 SW39 ローターを用いて 105,000  $\times$  g で 60 分間遠心分離する。透明な上澄液に 1.0 M KCl を添加してその濃度を 0.15 M とした。他の区の細胞は 0.05 M KCl-0.01 M K<sup>+</sup>- $PO_4$ , pH 7.5 に懸濁し同様に細胞を破壊し直ちに 1.0 M KCl を加えて終濃度 0.15 M としたのちに

遠心分離して抽出液を得た。この両抽出液は最終的には 0.15 M KCl-0.01 M K<sup>+</sup>-PO<sub>4</sub>, pH 7.5 溶液であつて蛋白含量にも殆ど差異はなかつたがその酵素活性は第

1 図に示すようになりに異なつていた。これは常法通り抽出液 0.05 ml について測定したものであつて得られた抽出液の全酵素活性は第 1 表に示す。

Table 1. Effect of K<sup>+</sup> on the total activities in the extracts of HeLa cells.

Extract	Total volume, ml	Total protein, mg	DNA polymerase, m $\mu$ moles TMP/3 hrs	DNase I, $\mu$ g DNA/3 hrs
0.01 M K <sup>+</sup> -PO <sub>4</sub>	1.52	1.429	1.600	174.19
0.05 M KCl-0.01 M K <sup>+</sup> -PO <sub>4</sub>	1.47	1.411	2.046	346.26

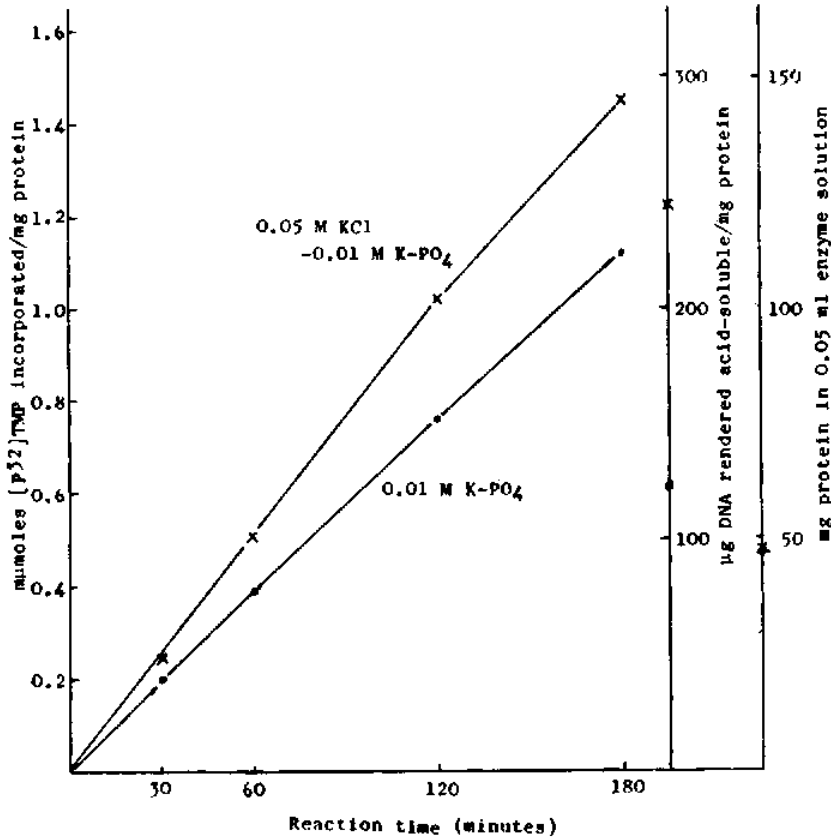


Fig. 1. Effect of K<sup>+</sup> on the specific activities of the extracts of HeLa cells.

実験の結果は HeLa 細胞では H<sub>2</sub>O の代りに低濃度の塩類溶液でも細胞の破壊が可能であることを示し、しかも蛋白質の抽出効果は 0.01 M K<sup>+</sup>-PO<sub>4</sub> でも 0.05 M KCl-0.01 M K<sup>+</sup>-PO<sub>4</sub> でも大差はない。しかし抽出にあつて KCl を若干加えた場合酵素活性の高い酵素液が得られた。KCl 添加区では無添加区のものよりも DNase 活性は 2 倍であるにも拘らず DNA 合成酵素の活性も高かつた。従つて実際の合成酵素力の比はさらに大きいものと思われる。両者は最終的には同

一の塩濃度であつて細胞の破壊、抽出から遠心分離にいたる約 2 時間の抽出操作中に一方は KCl を含んでいる点に差異があつた。従つて DNA 合成酵素および DNase I の活性は低い塩濃度で不安定であるが KCl が酵素の安定化に有効であることを示唆しこのような条件の相異は短時間でもかなり明白な活性の相異を惹き起すものと思われる。

音波処理: 細胞の種類によつては浸透圧ショックだけでは殆ど毀れないものも多い。このような場合音波

による破壊手段が屢々用いられていて通常 20 KC または 10 KC が採用されている。又細胞内粒子からの抽出の場合にもこの方法が有力な手段となつている。

$7.5 \times 10^8$  HeLa 細胞を 0.15 M NaCl で常法通り 3 回洗滌、再び NaCl に懸濁して 20 ml とし 2 等分した後遠心分離、上述のように遠沈管を紙の上に倒立して水分を除き約 0.6 ml の細胞沈澱を得た。

細胞を 3 ml の冷却蒸留水に懸濁し氷冷下に 20 KC の音波で 2 分間処理し、検鏡して細胞の破壊を確認したのち 1.5 ml の水の補助で遠心分離管に移す。105,000×g 60 分間遠心分離して 4.6 ml の上澄液を得た。この 1 ml に 1.0 M KCl 0.052 ml, 0.5 M  $K^+PO_4$ , pH

7.5 0.021 ml を加えて終濃度を常法通り 0.05 M KCl-0.01 M  $K^+PO_4$  とし活性の測定に用いた。別の細胞は比較のために滲透圧ショックで抽出液を調製した。即ち 2 ml の  $H_2O$  に懸濁し Potter-Elvehjem 型 homogenizer で破壊したのち 2.5 ml の水の補助で遠心分離管に移す。同様に 105,000×g 60 分間遠心分離して得た 4.4 ml の上澄液に 1.0 M KCl 0.23 ml, 0.5 M  $K^+PO_4$  0.094 ml を加えて規定の塩濃度とした。0.05 ml 宛で測定した酵素活性を第 2 図、全活性を第 2 表に示す。

抽出効果は抽出液の蛋白含量から明らかなように音波処理の場合滲透圧ショックよりもすぐれていて約 2

Table 2. Effect of sonic disruption on the total activities of the extracts of HeLa cells.

Disruption	Total volume, ml	Total protein, mg	DNA polymerase, mmoles TMP/3 hrs	DNase I, $\mu$ g DNA/3 hrs
Sonication	4.94	22.46	28.46	3478.03
Osmotic shock	4.72	12.75	21.42	914.18

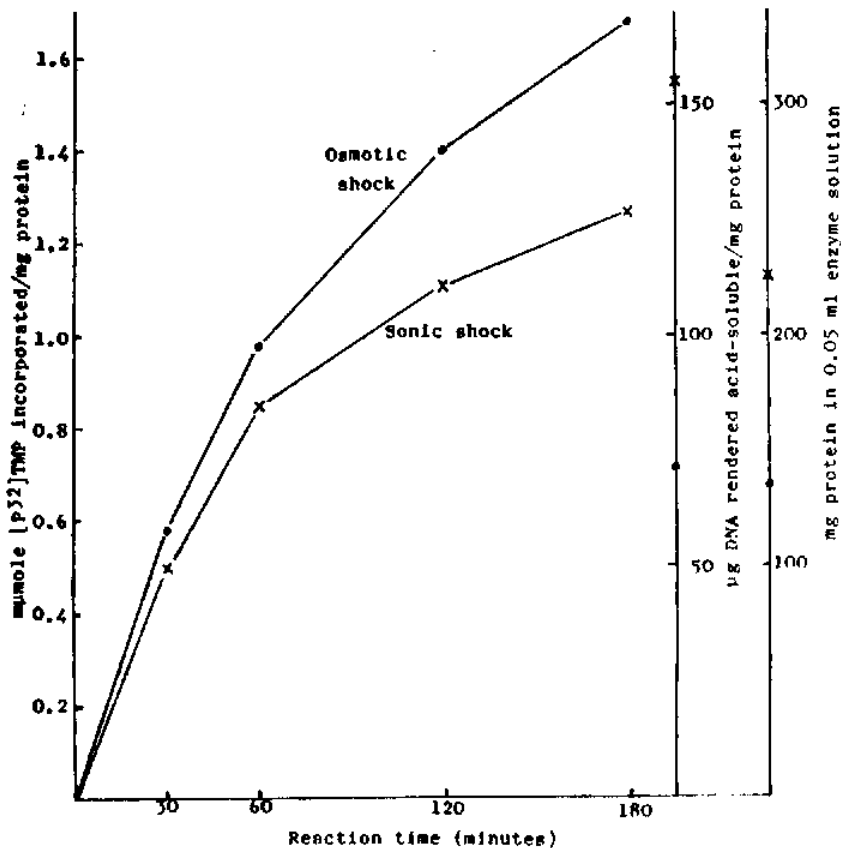


Fig. 2. Effect of sonic disruption on the specific activities of the extracts of HeLa cells.

倍の蛋白含量が認められた。それにともなつて DNA 合成酵素の全活性も 1.3 倍、DNase にいたつては 3.8 倍を示した。しかし得られた抽出液の比活性の点からはむしろ透過法による方が望ましく全活性とは逆に DNA 合成酵素の比活性は高く DNase のものは低い酵素液が得られた。従つて酵素液の調製に際しては目的に応じて適宜取捨することが望ましい。これとともに DNA 合成酵素の音波に対する抵抗性は DNase のものより低いことが推定された。

**Landschutz 腹水癌細胞:** このような抽出効果は単に HeLa 細胞だけについて認められるものではない。腹水癌細胞はその活潑な増殖力と取扱いの容易なことから我々の研究に最も適した材料の一つであつて DNA 合成酵素だけでなく種々の生化学的研究に利

用されている。

Landschutz 腹水癌を移植した日田鼠 5 頭から約 2 週間後に多量の増殖した癌細胞を含む腹水を採取しほぼ等容の 0.15 M NaCl に添加混合する。2,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して癌細胞を集め、さらに 2 回 0.15 M NaCl で洗滌遠沈を繰り返した後 HeLa 細胞の場合と同様に附着 NaCl 溶液を出来るだけ除き約 8 ml の細胞沈澱が得られた。

この細胞を冷却蒸留水に懸濁し全量を 15 倍容 120 ml にする。さらに homogenizer で軸を 4 回軽く上下させて均一の懸濁液とし約 10 分後にその 1/4 容を採り試料 A とする。残りをさらに homogenizer で 20 回上下させて細胞を破壊し検鏡する。この操作によつて癌細胞は破壊されたが多くの細胞核は毀れずに残つてい

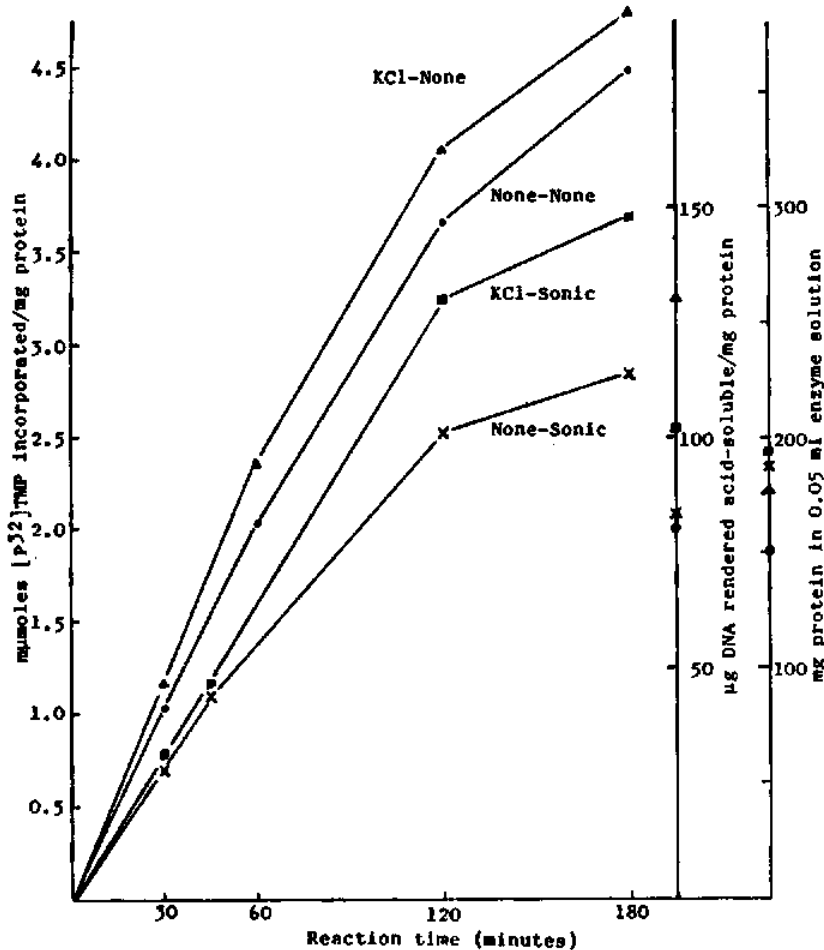


Fig. 3. Effect of  $K^+$  and sonic disruption on the specific activities of the extracts of Landschutz ascites tumor cells.



ることが認められた。これを 30 ml 宛に 3 等分し試料 B, C および D とした。試料 B および C をさらに 4 分間音波処理を行い細胞核も大部分は破壊され少しの核だけがそのまま残ることを観察した。次に試料 C および D に KCl 結晶 0.373 g 宛を溶解し終濃度を 0.15 M とする。全試料を同時に 105,000×g で 60 分間遠心分離した後、試料 A および B に KCl を加えて 0.15

M とする。こうしてそれぞれ約 22 ml 宛の抽出液が得られたが遠心分離に先立つて KCl を加えた抽出液 C および D は黄赤色であつたが遠沈後に KCl を加えた A および B は黄色を呈した。最後に 0.5 M  $K^+-PO_4$ , pH 7.5 を 0.45 ml 宛加えて終濃度 0.01 M とした。このようにして得た 22.45 ml 宛の 4 種の酵素液について測定した酵素活性を第 3 図、全活性を第 3 表に示

Table 3. Effect of  $K^+$  and sonic disruption on the total activities of extracts from ascites tumor cells.

Extract	Total protein, mg	DNA polymerase, mmoles TMP/3 hrs	DNase I, $\mu$ g DNA/3 hrs
A (none-none)	67.35	299.71	5444.62
B (none-sonic)	84.41	240.57	6980.71
C (KCl-sonic)	87.11	321.44	8920.06
D (KCl-none)	79.47	381.55	10378.78

した。

腹水癌細胞が低浸透圧で比較的破壊され易いことは試料 A の酵素活性および蛋白質含量から推定出来る。この場合細胞が低い浸透圧にさらされた時間は遠心分離時間を合せて 2 時間に達しない。さらに酵素活性が HeLa 細胞のものよりも高いことは明白である。また  $K^+$  イオンの添加ならびに音波処理の影響は HeLa 細胞で認められたものと類似している。即ち音波処理によつて蛋白質の抽出量も増加するがこれにともなつて酵素液の比活性は低くなつた。しかし蛋白抽出量の増加は HeLa 細胞の場合ほど顕著ではない。これは細胞核等の強さにも基くものであつて細胞核は上記処理によつても多少毀れずに残っているが HeLa 細胞では核も痕跡をとどめないほど殆ど完全に破壊されている。KCl の添加が酵素の活性を保持するに有効なことは同様であつて破壊後直ちに KCl を加えた試料 C および D が遠心分離後に加えた試料 B および A よりも何れの操作においても高い DNA 合成酵素および DNase 活性を示した。しかし合成酵素の全活性は HeLa 細胞の場合と異なつて音波処理区が浸透圧区よりも低いことは抽出効果の増大による全活性の増加よりも音波による酵素の失活度が上廻るためではないかとも考えられる。

遠心分離：細胞抽出液の調製に際しては Spinco L 型超遠心分離機を用いて 105,000×g で 60 分間遠心分離するのが普通である。しかし HeLa 細胞での実験のようにごく少量の細胞を処理する場合には細胞破壊液の全容量は少なく従つて小遠心分離管を用いるため沈降距離も少ない。このような場合遠心分離の所要時

間も短縮出来るのではないかと思われる。

$6.5 \times 10^5$  細胞を 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+-PO_4$ , pH 7.5 で 2 回洗滌後同じ溶液に懸濁、2 等分した後 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離してそれぞれ容量 0.4 ml の細胞を得た。常法通り 15 倍容 6 ml の冷水に懸濁、細胞破壊、KCl および  $K^+-PO_4$  を添加し 105,000×g で 15 分ならびに 30 分間遠心分離した。その活性を第 4 図、抽出液 7.2 ml の全活性を第 4 表に示した。

Table 4. Effect of centrifuging time on the total activities.

Time, min.	Total protein, mg	DNA polymerase, mmoles TMP/2 hrs	DNase I, $\mu$ g DNA/2 hrs
15	21.8	50.61	2939.76
30	21.9	45.88	3118.56

15 分ないし 30 分の遠心分離でも一応差支えないことが認められた。この両者では蛋白質の含量には大差はないが遠沈時間が長い場合 DNase 活性は多少高くそのため DNA 合成酵素の活性が若干低い酵素液が得られた。しかしこの問題は粒子の酵素の関連もあり、また浸透圧ショックで細胞を毀しているので小粒子が多少残るおそれもあるから更に検討を要するが、当分は従来の常識通り十分に遠心分離を行うことが無難である。

細胞分画：動物細胞の DNA 合成酵素は細胞破壊液を高速遠沈して得た上澄液からの方が細胞核その他の細胞内粒子を含む沈澱からよりも容易に得られることが知られている。しかし細胞内での核酸代謝を研究するにあつては細胞内の各分画について検討しなけれ

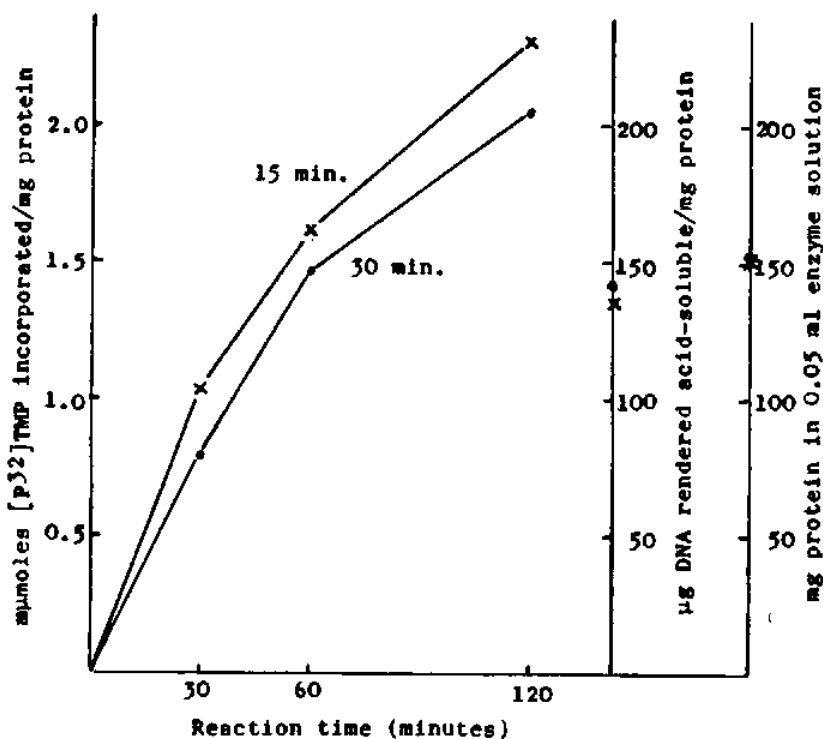


Fig. 4. Effect of centrifuging time on the specific activities of the extracts of HeLa cells.

ばならないことも少なくない。そのためには等張蔗糖溶液による分画がしばしば用いられる。

常法通り採集した洗滌 HeLa 細胞 0.4 ml を以後の操作の便宜上やや過剰に 9 ml の冷水に懸濁して破壊し、以下既述の方法に従い等張下に分別遠心分離を行なう。細胞核を 3 ml、小粒子を 2 ml の 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+$ - $PO_4$ , pH 7.5 に懸濁。1 分間音波処理。遠心分離後それぞれ補正して 3 ml および 2 ml の抽出液を得た。又 105,000 $\times$ g 90 分間遠心分離した細胞質抽出液は KCl および  $K^+$ - $PO_4$  を加えて 14.3 ml とした。これら抽出液の酵素活性を第 5 図、全活性およびその細胞内分布の割合を第 5 表に示す。

細胞質からの抽出液の DNA 合成酵素活性は高いが細胞核からのものは極めて低いことが認められた。このことは Smellie 等<sup>32)</sup> によつて既に報告されていることと一致する。全蛋白質含量も細胞質区で高くこれにともなつて大部分の酵素活性も細胞質に含まれていることが認められる。DNA 合成酵素の割合は粒子部分において DNase の粒子部分におけるものよりも低い。先に述べたように音波による粒子からの抽出について受けた影響に基くものと推定される。

**pH 4.8 沈澱:** これまでも述べたように細胞レベルでの試験のため抽出液を下として用いたが場合によつては pH 4.8 での沈澱を使用することもあつた。HeLa

Table 5. Distribution of the enzymes within HeLa cells.

Fraction	Total proteins		DNA polymerase		DNase I	
	mg	%	$\mu$ moles TMP/2 hrs	%	$\mu$ g DNA/2 hrs	%
Cell sap	10.30	67.3	18.746	86.2	2349.43	67.8
Small particles	3.02	19.8	2.017	9.3	260.37	24.7
Nucleus	1.98	12.9	0.976	4.5	853.98	7.5

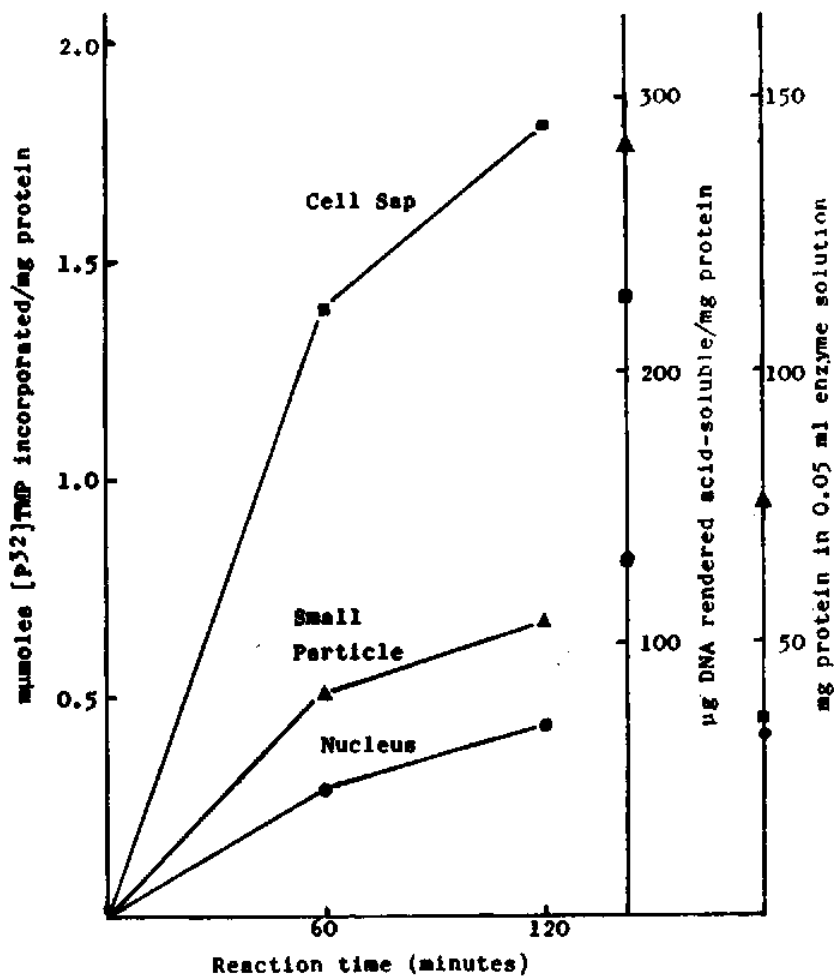


Fig. 5. Specific activities of the extracts of fractions within HeLa cells.

Table 6. Activities of acid-precipitates.

Sample	Total volume, ml	Total protein, mg	Specific activity		Total activity	
			DNA polymerase	DNase I	DNA polymerase	DNase I
A	Sup	23.9	2.784 (100)	167.0 (100)	66.62 (100)	3996.3 (100)
	Ppt	4.4	4.537 (163)	81.8 (49)	64.47 (97)	1162.3 (29)
B	Sup	23.9	2.708 (100)	183.9 (100)	62.20 (100)	4224.2 (100)
	Ppt	4.4	4.159 (154)	85.2 (46)	57.23 (92)	1172.4 (28)
C	Sup	9.5	3.675 (100)	201.2 (100)	33.66 (100)	1843.0 (100)
	Ppt	1.8	2.218 (60)	40.3 (20)	9.27 (28)	168.5 (9)
D	Sup	9.5	4.208 (100)	394.0 (100)	48.18 (100)	4511.3 (100)
	Ppt	1.8	3.669 (87)	239.3 (61)	14.53 (30)	947.6 (21)
E	Sup	14.3	2.065 (100)	151.4 (100)	30.13 (100)	2208.9 (100)
	Ppt	2.4	2.766 (134)	103.3 (68)	23.90 (79)	892.5 (40)

F	Sup Ppt	72.4 10.3	343.0 82.9	11.168 (100) 17.220 (154)	102.8 (100) 45.9 (45)	3830.62 (100) 1427.54 (37)	35261.4 (100) 3803.3 (11)
---	------------	--------------	---------------	------------------------------	--------------------------	-------------------------------	------------------------------

Samples A, B and C are soluble cell sap fraction from HeLa cells prepared by sucrose-fractionation.

Sample D is soluble cell sap fraction from HeLa cell infected with herpes virus prepared by sucrose-fractionation.

Sample E is extract from HeLa cells after osmotic disruption.

Sample F is extract from ascites tumor cells after osmotic disruption.

細胞や腹水癌細胞からの抽出液に 0.2 N 酢酸を滴加して調製した種々の標品の活性をその原液のものと一括して第 6 表に示した。

標品 A, B, C はいずれも HeLa 細胞から等張蔗糖分別によつて調製した細胞液分画のものであり標品 D も同じ抽出液であるが herpes ウィルスで感染した HeLa 細胞を用いた。E も HeLa 細胞、F は腹水癌細胞からどちらも滲透圧ショックによつて破壊したも

の抽出液である。

一般に pH 4.8 沈澱から比活性の高い酵素液を調製することが出来たが場合によつては却て低いものが得られた。原則として出来るだけ少量に溶かせば活性の高いものが得られるが比活性は必ずしも高いものとは限らない。しかもこの場合沈澱を完全に溶解することは無理であつて酵素の損失をも来した。又しばしば冷蔵庫に貯蔵中に再び不溶物を析出したので使用に先

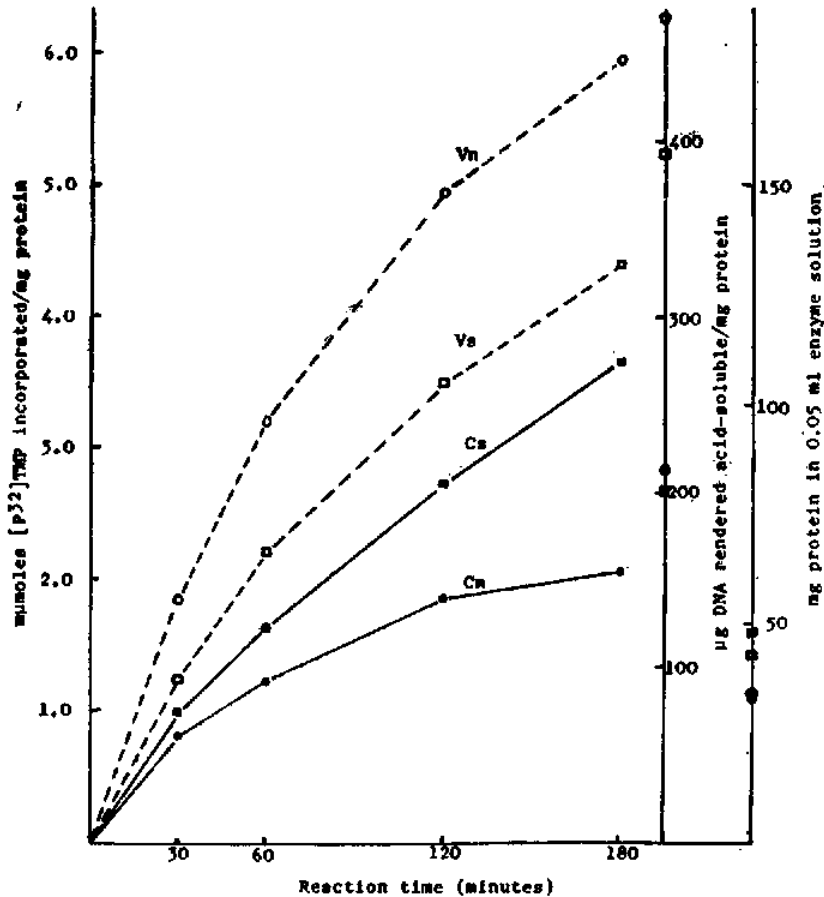


Fig. 6. Activation of the enzymes of HeLa cells after infection with herpes simplex virus.

立つてかさねて遠沈除去しなければならない。しかしいずれにしても DNase の比活性は低下した。さらに全酵素活性は DNA 合成酵素, DNase ともに減少したが DNase の減少度は合成酵素のものよりも著しく酸に対する安定性が弱いことを示した。その上酸沈澱による酵素活性の回収率も再現性にとぼしく代謝を検討するにあたっては避けなければならないことを示している。

#### ウイルス感染細胞

同じ動物でも組織によつて酵素活性が異なることは既に指摘されているが、同じ細胞でもその生理的条件によつて活性が異なることは容易に推定される。特にウイルスのようにその増殖に寄主細胞の代謝系を利用するものが感染した場合は顕著である。山藤等<sup>46)</sup>は蚕が DNA ウイルスである多角体病に侵されると細胞核に顕著な変化が起ることを認め組織の DNase が活性化され DNA 含量も多くなる等 DNA 代謝が活潑になることを認めている。このような研究はその後主として組織培養細胞を用いて詳細に進められるよう

になつたが、<sup>29,30)</sup> DNA 合成酵素活性の挙動は極めて重要な因子の1つである。

Herpes simplex ウイルス HFEM 株で感染、4ないし4.5時間後の HeLa 細胞と対照細胞とをそれぞれ  $2 \times 10^6$  宛ウイルス研究所から得て酵素液を調製した。即ち 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+-PO_4$ , pH 7.5 で2回洗滌しそれぞれ 0.3 ml の細胞を分離し、これから滲透圧ショック、等張蔗糖溶液での分別遠心分離、音波破壊による細胞核抽出を行ない 9.5 ml の細胞液分画と 2 ml の核抽出液とを調製した。これについての酵素活性を測定し第6図に示した。

未感染細胞では既に第5図に示したように細胞質部の活性は細胞核のものよりも高かつた。しかしウイルスが感染すると DNA 合成酵素だけでなく DNase の活性化がおこりしかも核部分で顕著であつた。DNA ウイルスは一般に細胞核で増殖が起ることが知られており DNA の生成も促進されていることが推定される。DNA 合成酵素の活性化はこのことを裏付けるものと考えてよい。

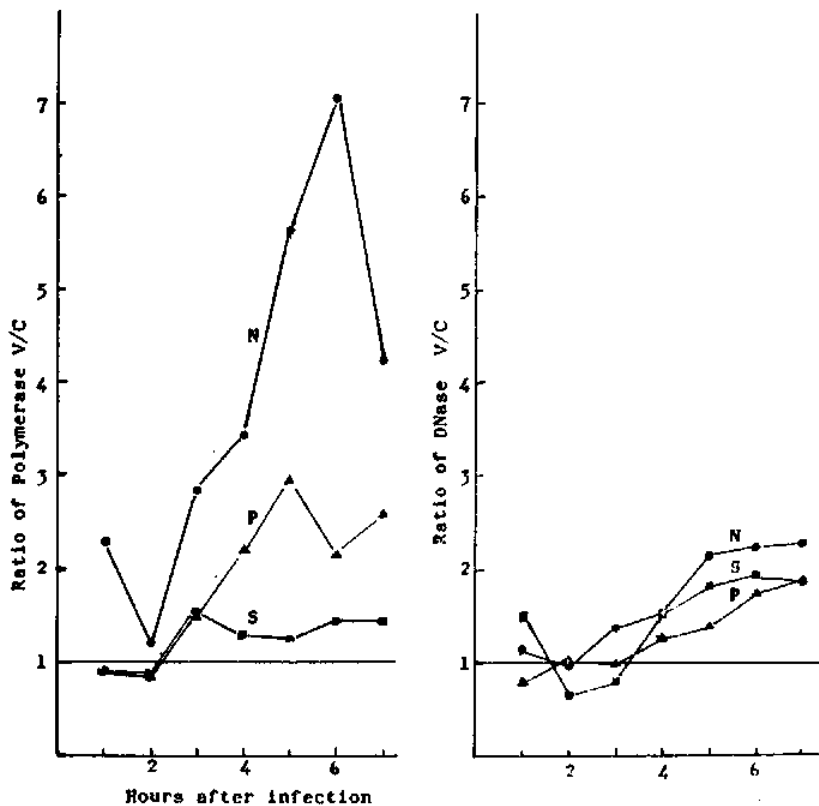


Fig. 7. Ratio of the enzymatic activities of infected cells to those of control.

しかしこのような酵素の活性化特にその割合はウィルスの増殖時期と密接な関係があるのでこれを考慮しなければならぬ。

例えば HeLa 細胞に herpes simplex ウィルスを感染させ 1 時間後から 7 時間後までの DNA 合成酵素と DNase の活性をそれぞれ細胞核, 細胞液および小粒子について未感染のものと比較して第 7 図に示す。この場合各時間毎に遠心分離して集めた約 0.4 ml の細胞から, 前記細胞分画試験に従って各分画の抽出液を調製して活性を測定したが同一時間の細胞は勿論感染および対照両区を同時に平行して取り扱った。これは我々を含めて Wildy 一派が herpes ウィルスの増殖機構を解明するために行なつた実験の一部であつて dense(herpes) DNA, complement-fixing antigens, morphological particles, 感染性ウィルス, 全 DNA 含量および全蛋白質含量等も同時に測定されてそれらの生化学的変化が追及されその結果については既に報告されている。<sup>39)</sup> 第 7 図の結果からウィルスの感染による細胞内各分画における両酵素活性の挙動が認められるがこれらはいずれもウィルスの増殖にともなう他の諸因子の変動と常に関連して考察されなければならぬ。

#### 酵素吸着濾紙片での活性測定

ウィルスの感染にともなつて増強された DNA 合成酵素が宿主細胞のものと同じのものであるか否かは大変興味をひく問題である。しかしたびたび述べたよ

うに HeLa 細胞は組織培養によるために材料を多く集めることはむづかしく従つて常法による酵素の精製操作で分別を試みることはかなり困難なものと予想される。近年 isozyme が電気泳動法によつて分別されている事実にもとづいて本法による可能性が考えられる。しかし酵素活性が反応の条件によつて影響され易いので測定法そのものについても多くの検討を必要とする。さらに酵素量が少ないために濾紙から抽出して供試するよりは濾紙に吸着されたまま活性を測定することが出来れば望ましいと考える。このような点から予備的に酵素液を濾紙片に吸着させて DNA 合成酵素活性の測定を試みた。

常法に従つて腹水癌細胞から調製した pH 4.8 沈澱酵素液 0.01 ml を 30 mm×5 mm の濾紙片に吸着させ室温で約 30 分乾燥したのちさらに小さく切つてあらかじめ反応液を加えて氷冷中の小試験管に加える。よく混合し暫く放置したのち 37°C で 120 分間反応させ以下常法に従つて TMP のとり込みを測定した。この場合反応液の組成は常法に従つたが酵素液の使用量が 0.01 ml であるので塩濃度を調節するために 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+-PO_4$ , pH 7.5 0.04 ml を加え, 特別混合液 0.10 ml および  $H_2O$  0.11 ml で全量 0.25 ml とした。一方 KCl- $K^+-PO_4$  および  $H_2O$  に同じ酵素濾紙を加えて暫く放置後特別混合液を加えて直ちに活性を測定した。尚対照としては 0.15 M KCl-0.01 M  $K^+-PO_4$  を吸着した濾紙を使用した。

Table 7. DNA polymerase activity of enzyme-paper.

Reaction	Enzyme solution	Enzyme-paper added after SM addition	Enzyme-paper added before SM addition
mμmoles TMP/mg protein/2 hrs	1.944	1.142	1.085

酵素を吸着した濾紙のままでも DNA 合成酵素の活性を測定出来る可能性は認められたが酵素溶液に比べて活性の低下は免れない。また測定に際しては反応液と混合し多少の時間をおいて平衡させた方が直ちに測定するよりも望ましいようであつたが顕著な効果は認められなかつた。

そこでこのような酵素濾紙による反応が時間的に直線関係を示すか否かを試験した。酵素液 0.01 ml を 15 mm×10 mm の濾紙片に吸着し 15 分または 60 分室温で乾燥したのちさらに 18 の小片に切つて氷冷した反応液に加えた。また対照として酵素液を吸着後直ちに小片に切つて測定に供した。それぞれ約 5 分後に

37°C の振盪槽に移し反応を開始した。その時間的経過を第 8 図に示す。

こうして酵素濾紙についても酵素液の場合と同様に少くも 180 分まではほぼ直線関係を示すことが認められた。酵素を吸着後室温で乾燥すれば活性は低下した。

次に酵素量との関係をみるために酵素液 0.01 ml を 5 mm×5 mm, 0.02 ml を 10 mm×5 mm の濾紙片それぞれ 3 枚に吸着させ直ちにまたは 30 分後に氷冷した反応液にそのまま投入し, 37°C で 2 時間作用させた。また比較のために 0.01 ml 酵素液について濾紙に吸着させることなくそのまま活性を測定した。

Table 8. DNA polymerase activity of different amounts of enzyme-paper.

Reaction	Enzyme solution 0.01 ml	0.01 ml enzyme-paper		0.02 ml enzyme-paper	
		non-dried	dried	non-dried	dried
mμmoles TMP/mg protein/2 hrs	1.886	1.660	0.679	1.780	1.502

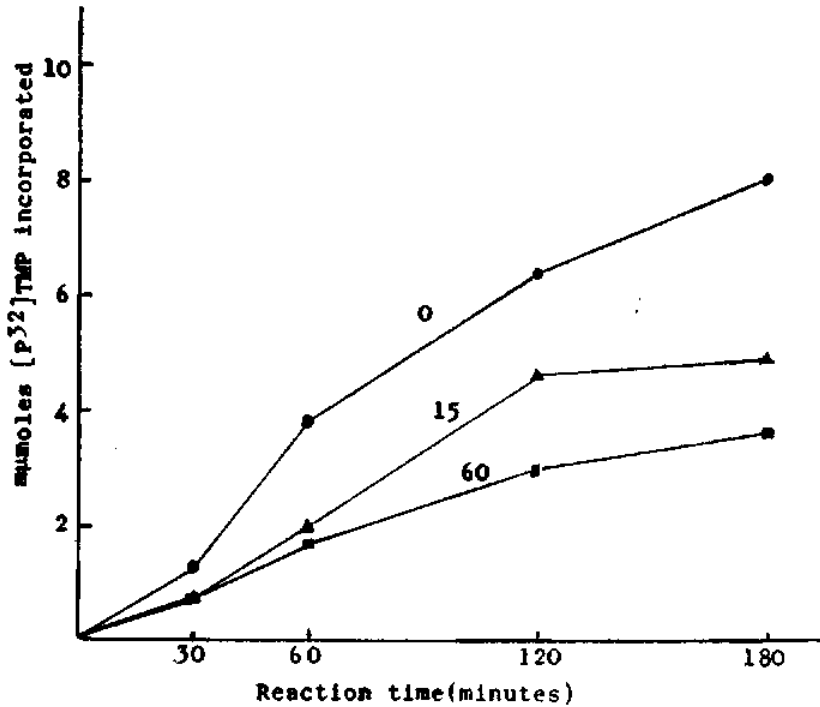


Fig. 8. DNA polymerase of enzyme-adsorbed paper.  
0, 15 and 60 mean time in minutes dried after adsorption.

吸着後直ちに反応に使用しても酵素濾紙の活性は吸着されない酵素液の活性よりはかなり低い。しかし酵素の使用量を増加すれば比活性の低下も多少は抑えられ、また乾燥による低下も防がれるような傾向が認められた。しかし濾紙の吸着能には限界があり多量の酵素を吸着させるには多量の濾紙が必要となる。反応液の全量が少量のために濾紙が反応液で完全に被われなくなる心配も生ずるのであらかじめ充分に考慮しなければならない。

酵素を吸着後乾燥すれば活性が低下する。これは酵素蛋白と濾紙繊維との結合によるか蛋白が繊維組織の間に保持されるためかは明白でないが少なくとも酵素蛋白と反応液との接触が充分でないためと考えられる。そこで1枚の濾紙を0.02%牛血清アルブミンを含む0.05 M Tris-HCl, pH 7.5で均等に湿らし、30 mm × 5 mmの大きさに小片を作り0.01 ml 酵素液を乾燥

前および乾燥後に吸着させ、さらに小片に切つて活性を測定した。

Table 9. DNA polymerase activity of enzyme adsorbed to wet or dried paper.

Reaction	Enzyme solution	Enzyme adsorbed to wet paper	Enzyme adsorbed to dried paper
mμmoles TMP/mg protein/2 hrs	3.535	2.340	2.191

湿つた濾紙では酵素の吸着が完全でないので反応液中に再抽出される可能性が考えられる。そのため乾燥濾紙に吸着させたものよりも多少高い活性が観察された。しかしその差は僅かであつて濾紙吸着による活性の低下度に比べれば殆ど問題とならない。

たびたび述べたようにDNA合成酵素は種々の条件によつて影響され活性を低下し易い。濾紙による吸着

の場合もこのおそれが全くないことは考えられない。そのため安定剤として血清アルブミンの効果を試験した。酵素液 0.01 ml に 20 µg 含むように牛血清アルブミンを溶解し、30 mm×5 mm の濾紙片に吸着させてその活性をアルブミンを加えないものの活性と比較した。

Table 10. Effect of serum albumin on the activity of enzyme-paper.

Reaction	Enzyme solution	Enzyme-albumin paper	Enzyme paper
m $\mu$ moles TMP/mg prot./2 hrs	1.944	1.802	1.681

アルブミンの添加によつて活性の低下はある程度防止出来ることが推定される。しかしこれも蛋白含量が高いために湿つた濾紙の場合と同様に濾紙繊維による酵素の保持が充分でないためか、アルブミンが酵素活性の保護作用を持つためかは明らかでない。

これらの試験は DNA 合成酵素もその活性の低下は免れないが濾紙に吸着されたまま活性を測定出来る可能性を示した。従つて活性の高い酵素液について試験することが出来るならば濾紙電気泳動によつて分離しそのまま酵素剤として使用することが出来るものと思われる。この場合発熱による失活を防止することが前提となることは勿論である。

#### Cyanogum gel の影響

最近開発された polyacrylamide gel はそのすぐれ

Table 11. Effect of cyanogum gel on DNA polymerase activity.

Added	None	1 piece		4 pieces		Crushed		
amount, mg m $\mu$ moles TMP/mg protein/2 hrs	0 2.254	9.9 2.336	10.6 2.315	7.7 2.400	14.7 2.256	3.6 1.970	7.7 1.838	10.7 1.596

Cyanogum gel 片は酵素活性に対しては殆ど阻害作用を及ぼすことはない。しかし gel を砕くと多少 [ $P^{32}$ ]TMP のとり込みは低下した。このことは gel 成分の化学的阻害作用というよりは砕くことによつて反応液成分が gel 組織内に包含されるためであると思われる。従つて gel 電気泳動による酵素の分別も gel そのものに関する限り何等支障はないと考えられ濾紙とともにこの方向の検討が期待される。

#### 総 括

動物細胞抽出液の DNA 合成酵素の測定について特に抽出液の調製および活性測定に関する若干の問題点

た特性から電気泳動による蛋白質の分離によく利用されている。我々も腹水癌細胞より調製した pH 4.8 沈澱酵素液について電気泳動を試み蛋白質の分別についてその可能性を認めた。しかし分離された各蛋白質分画は量的に少ないためこれを抽出して活性の測定に供することは困難であると思われる。そのため前項と同じ概念で gel に保持されたまま活性を測定することが出来れば好ましい。従つて先ず酵素活性に対する gel の影響を検討した。

Gel の調製には acrylamide monomer の濃度 3~10% の cyanogum 溶液が通常用いられているが我々は 7% のものを使用した。適当な緩衝液 50 ml に 3.5 g cyanogum を溶解し、これに 1 ml 10% ammonium persulfate 水溶液および 1 ml 8% 2-dimethylaminoethyl cyanide 水溶液を混合し適当の大きさの枠に入れて固まらせる。これを用い 1 cm あたり 6 volt 程度の電圧をかけると 1 時間に 1 cm 程度の泳動が認められた。

この gel も寒天状の性質を示すので一定量を正しく採取することは困難であつた。そこで適宜の大きさの小片に切り取り 1 ケあるいは 4 ケを秤量して添加量とした。これらの gel 片に特別混合液 0.10 ml, H<sub>2</sub>O 0.10 ml および酵素液 0.05 ml を加えて 37°C に 120 分反応させて [ $P^{32}$ ]TMP のとり込みを測定した。蛋白質は gel の中に埋没されるので活性の測定にあつては gel を砕く必要もあるかと思われたのでガラス棒で砕いた gel の影響も同時に試験した。

を HeLa 細胞ならびに Landschutz 腹水癌細胞を用いて検討した。

(1) HeLa 細胞を浸透圧ショックで破壊して抽出液を調製する場合低濃度の KCl-K<sub>2</sub>-PO<sub>4</sub> の添加は活性の保護に有効であつて DNA 合成酵素および DNase 活性の高い抽出液が得られた。

(2) HeLa 細胞の破壊について浸透圧ショックと音波処理とを比較した。この結果前者によつて DNA 合成酵素の比活性が高く DNase のものは低い抽出液が得られた。しかし全酵素活性の抽出効果は音波処理がすぐれていた。

(3) 細胞抽出液の調製における 塩濃度の効果およ



び音波処理の影響については Landschutz 腹水癌細胞でも HeLa 細胞の場合と類似の結果が認められた。

(4) 少量の細胞からの抽出に際しては遠心分離時間を短縮することは支障ないことが認められた。

(5) 浸透圧ショック、蔗糖等張濃度での分別遠心分離および音波処理によつて HeLa 細胞から、細胞核、小粒子および細胞液各成分の抽出液を調製しその活性を測定した。大部分の DNA 合成酵素および DNase 活性は細胞液に含まれており次いで小粒子、細胞核の順であつた。

(6) HeLa 細胞および腹水癌細胞の抽出液から pH 4.8 で沈澱させ一般に比活性の高い DNA 合成酵素液を調製することが出来た。しかし DNase の活性は著しく低下した。

(7) HeLa 細胞の DNA 合成酵素は herpes simplex ウイルスの感染によつて活性化され特に細胞核で顕著であつた。類似の活性化は DNase でも認められた。さらにこれらの活性化はウイルス感染後の時間によつてかなり変動し、感染後3時間より増大した。

(8) 酵素を吸着した濾紙片でも DNA 合成酵素の活性を測定することは出来たが、活性の低下は免れなかつた。この活性の低下は吸着後の乾燥によつて増加したが、吸着剤としてのアルブミンの添加や酵素の使用量を増すことによつて多少抑制された。

(9) Cyanogum gel 小片は DNA 合成酵素活性に対しては殆ど阻害作用を及ぼさなかつたが、gel を砕くと若干の活性低下が認められた。

本研究は 1962 年度文部省在外研究員として英国 Glasgow 大学生化学教室に於て行なつたものの一部份であつて、種々御指導御便宜を賜つた同教室 J. N. Davidson 教授、ウイルス学教室 P. Wildy 博士(現 Birmingham 大学教授)、W. C. Russell 博士始め両教室の諸氏に深謝する。

## 文 献

- 1) Adler, J., Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. (1958) Proc. Nat. Acad. Sci. **44**, 641.
- 2) Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S. and Kornberg, A. (1958) J. Biol. Chem. **233**, 171.
- 3) Bollum, F. J. (1959) J. Biol. Chem. **234**, 2733.
- 4) Bollum, F. J. (1959) Annals New York Acad. Sci. **81**, 792.
- 5) Bollum, F. J. (1960) J. Biol. Chem. **235**, 2399.
- 6) Bollum, F. J., Anderegg, J. W., McElyea, A. B. and Potter, V. R. (1960) Cancer Res. **20**, 138.
- 7) Bollum, F. J. and Potter, V. R. (1958) J. Biol. Chem. **233**, 478.
- 8) Bollum, F. J. and Potter, V. R. (1959) Cancer Res. **19**, 561.
- 9) Burton, K. (1959) Data for Biochemical Research, p. 74, Oxford University Press.
- 10) Canellakis, E. S., Jaffe, J. J., Mantsavinos, R. and Krakow, J. S. (1959) J. Biol. Chem. **234**, 2096.
- 11) Canellakis, E. S. and Mantsavinos, R. (1959) Biochim. Biophys. Acta **27**, 43.
- 12) Davidson, J. N. (1961) Biological Structure and Function I. p. 95, Acad. Press, London and New York.
- 13) Davidson, J. N., Smellie R. M. S., Keir, H. M. and McArdle, A. H. (1958) Nature **182**, 589.
- 14) Gray, S. M., Weissman, S. M., Richards, J., Bell, D., Keir, H. M., Smellie, R. M. S. and Davidson, J. N. (1960) Biochim. Biophys. Acta **45**, 111.
- 15) Keir, H. M. (1962) Biochem. J. **85**, 265.
- 16) Keir, H. M., Binnie, B. and Smellie, R. M. S. (1962) Biochem. J. **82**, 493.
- 17) Keir, H. M. and Gold, E. (1963) Biochim. Biophys. Acta **72**, 263.
- 18) Keir, H. M., 大村浩久, and Shepherd, J. B. (1963) Biochem. J. **89**, 425.
- 19) Keir, H. M. and Smellie, R. M. S. (1959) Biochim. Biophys. Acta **35**, 405.
- 20) Keir, H. M., Smellie, R. M. S. and Siebert, G. (1962) Nature **196**, 752.
- 21) Keir, H. M. and Smith, S. M. J. (1963) Biochim. Biophys. Acta **68**, 589.
- 22) Kornberg, A. (1961) Enzymatic Synthesis of DNA. John Wiley & Sons, New York, London.
- 23) Kornberg, A., Kornberg, S. R. and Simms, E. S. (1956) Biochim. Biophys. Acta **20**, 215.
- 24) Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S. and Kornberg, A. (1958) J. Biol. Chem. **233**, 163.
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265.
- 26) Macpherson, I. A. and Stoker, M. G. P. (1962) Virology **16**, 147.
- 27) Mantsavinos, R. and Canellakis, E. S. (1959) J. Biol. Chem. **234**, 628.
- 28) Mantsavinos, R. and Canellakis, E. S. (1959) Cancer Res. **19**, 1239.
- 29) McAuslen, B. R. and Joklik, W. K. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. **8**, 486.
- 30) Newton, A. A. and McWilliam, S. (1962) Biochem. J. **84**, 1129.
- 31) Smellie, R. M. S. (1961) J. Chim. Phys. **58**, 965.
- 32) Smellie, R. M. S. and Eason, R. (1961) Bio-

- chem. J. **80**, 39P.
- 33) Smellie, R. M. S., Gray, E. D., Keir, H. M., Richards, J., Bell, D. and Davidson, J. N. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 243.
- 34) Smellie, R. M. S., Keir, H. M. and Davidson, J. N. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 389.
- 35) Smith, S. M. J. and Keir, H. M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 578.
- 36) Staehelin, M. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 20.
- 37) Russell, W. C. (1962) *Nature* **195**, 1028.
- 38) Russell, W. C. (1962) *Virology* **66**, 355.
- 39) Russell, W. C., Gold, E., Keir, H. M., 大村浩久, Watson, D. H. and Wildy, P. (1964) *Virology* **22**, 103.
- 40) Vantsis, J. T. and Wildy, P. (1962) *Virology* **17**, 225.
- 41) Watson, D. H., Russell, W. C. and Wildy, P. (1963) *Virology* **19**, 250.
- 42) Watson, D. H. and Wildy, P. (1963) *Virology* **21**, 100.
- 43) Wildy, P., Russell, W. C. and Harne, R. W. (1960) *Virology* **12**, 204.
- 44) Wildy, P., Smith, C., Newton, A. A. and Dendy, P. (1961) *Virology* **15**, 481.
- 45) Wildy, P., Smith, C., Newton, A. A. and Dendy, P. (1961) *Virology* **15**, 486.
- 46) 山藤 雄, 嶋村 睦夫, 吉原 典子 (1954) *Enzymologia* **16**, 337.

### Summary

Concerning the estimation of DNA synthesizing enzyme (DNA nucleotidyltransferase, DNA polymerase) in extracts of animal cells, some problems in preparation of cell extracts and estimation of their enzymatic activities were investigated.

(1) HeLa cells were disrupted by osmotic shock and centrifuged with or without addition of KCl at 0.05 M. Although the concentration of salts in the final extracts was adjusted to be the same, higher activity of DNA nucleotidyltransferase and DNase in both specific and total activities was estimated in the extract with KCl, suggesting that KCl protects the activity.

(2) Activities of DNA nucleotidyltransferase and DNase were compared in extracts of HeLa cells prepared after disruption of cells by osmotic shock or 20 KC sonic treatment. By osmotic disruption, the extract of higher specific activity of DNA nucleotidyltransferase and lower one of DNase were obtained. However, the extract after sonication contained higher total activities of both enzymes.

(3) Similar effect of KCl and sonic treatment in preparing cell extract was also established from Landschutz ascites tumor cells.

(4) The cell extract was obtained by centrifuging the disrupted cell suspension of small amount of HeLa cell at  $105,000 \times g$  for 15 or 30 minutes, contrary to the common condition of centrifugation at  $105,000 \times g$  for 60 to 90 minutes.

(5) From HeLa cells, the extracts of cell nuclei, small particles and cell sap were prepared after osmotic shock followed by differential centrifugation at isotonic sucrose concentration and sonic treatment. It was found that most of both enzymes were contained in cell sap and the lowest activities were estimated in cell nuclei.

(6) The extracts of HeLa cells or ascies tumor cells were precipitated at pH 4.8 with 0.2 N acetic acid and enzyme solution of higher DNA nucleotidyltransferase activity was usually prepared. However, DNase activity was decreased by acid precipitation.

(7) DNA nucleotidyltransferase of HeLa cell, especially in cell nuclei, was activated after infection with herpes simplex virus. Similar slight activation after virus infection was observed in DNase too. In addition, activating ratios varied depending on time after infection.

(8) Enzyme solution was adsorbed on small pieces of filter paper and the estimation of DNA nucleotidyltransferase with the enzyme-paper was discussed. Linear incorporation of TMP was observed for 3 hours, although the activity was decreased by adsorbing the enzyme on paper and by drying it. However, the activity of DNA nucleotidyltransferase was more or less inhibited by crushed cyanogum gel, but not by non-crushed one.