

Marmur 変法による株化腫瘍細胞 DNA の抽出

菱田市和* , 山本一郎, 小松正隆

松本歯科大学口腔外科第2講座 (主任 待田順治 教授)

平岡行博

松本歯科大学 口腔生化学講座 (主任 原田実 教授)

DNA Extraction from the Cultured Tumor Cells, and its Properties

ICHIKAZU HISHIDA, ICHIRO YAMAMOTO and MASATAKA KOMATSU

Depart of Oral Surgery II, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. J. Machida)

YUKIHIRO HIRAOKA

Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. M. Harada)

Summary

The present study was aimed, firstly to apply the modified Marmur's method (by Hill) in extracting DNA from the cultured tumor cells, and secondly to investigate some properties of the extracted DNA.

The cultured tumor cells had been taken from the rhabdomyosarcoma in rats induced by injecting DMBA, as reported before, and been kept in the Department of Oral Surgery II, Matsumoto Dental College. Five samples were taken from the 70th to 80th generation of the cultured cells.

The DNA was extracted by employing the modified Marmur's method of Hill, which is excellent in obtaining the pure DNA.

The extracted DNA was examined by the ultra-violet spectrograph, using the Hitachi Spectrophotometer Model 101, and weight measurements in the Burton's method. The

* 現大阪大学歯学部口腔外科学第1講座 (主任 宮崎正 教授)

(1979年11月5日受理)

ratio of the ultra-violet absorption at the 260nm wave length to that at 280nm varied little, with an average of 1.9, which coincided with the studies reported by other investigators. The mean weight measure was 100 μ g/ml, with slight deviation.

These results might indicate that the modified Marmur's method of Hill is excellent for obtaining the pure DNA from the cultured tumor cells of rats.

現在, ヒト発癌の原因の1つとして化学発癌剤の存在があげられ, その作用機序が明らかにされつつある¹⁾. Todaro らの oncogene theory²⁾ は, そのような化学発癌の過程を解明する一助となりうるものと考えられている. つまり宿主 DNA に内在する調節遺伝子の抑制作用が化学発癌剤のために不能となり, その結果, 正常細胞が癌化するという考えである.

化学発癌過程と oncogene theory との関連性を追求する第一段階として, 私たちは化学発癌剤ジメチルベンズアントラセン (DMBA) により Rat 皮下に誘発した腫瘍を *in vitro* において培養し (以下 RaTC と略す) 株化細胞として確立するとともに, その細胞に C 型ウイルスが存在することを電子顕微鏡学的に証明した³⁾.

つぎの段階としては, RaTC 細胞より DNA (以下 RaTC-DNA と略す) を抽出し, その腫瘍原性について研究する必要があると考えられる⁴⁾⁻⁷⁾.

それに先立つ予備実験の1つとして, 今回, RaTC-DNA の抽出を Marmur 変法^{8) 9)} によりおこない, 抽出された DNA について若干の検討を加えたのでその概要を報告する.

実験材料および方法

1. 実験材料

松本歯科大学口腔外科学第2講座において確立し継代している RaTC 株化細胞³⁾ の70代ないし80代のものから5試料を使用した. なおこれらの細胞の培養液には, 10% 仔牛血清 (阪大微生物研究会, 大阪) と, 2mM の L-グルタミンを添加した Eagle の最少必須培地 (MEM, 日本製薬, 東京) をもちいた¹⁰⁾.

2. DNA の抽出

図1に示すように, Marmur 法の Hill らによる変法^{8) 9)} をもちいた.

すなわち, 密に単層培養されている RaTC 株化細胞を EDTA-トリプシン法により培養ビンから

- 10⁸ cells(10⁷/ml culture \times 10ml)
- 0.15M NaCl, 0.1M EDTA (pH 8)
 - 0.15M NaCl, 0.1M EDTA, 1% SDS (pH 8)
 - heat at 60°C for 10 min.
 - cool to room temp.
 - lyse in situ
 - equal volume of CHCl₃/iso-Amyl-OH (24/1, v/v)
 - shake for 30 min.
 - 6,000 \times g for 5 min. at room temp.
 - aqueous phase
 - 2 folds 95% Et-OH at room temp for 10 min.
 - low speed centrifugate
 - p. p. t.
 - 15ml SSC buffer for 30 min.
 - dissolve
 - equal volume of RNase A in 0.15M NaCl (50 μ g/ml)
 - equal volume of Pronase in 0.15M NaCl (500 μ g/ml)
 - equal volume of CHCl₃/iso-Amyl-OH
 - shake for 30 min.
 - 6,000 \times g for 5 min. at room temp.
 - aqueous phase
 - 2 folds of 95% Et-OH
 - low speed centrifugate
 - p. p. t.
 - 9ml SSC buffer for 30 min., shake
 - lyse
 - 1/2 volume of iso-Pro-OH for 10 min.
 - low speed centrifugate
 - sterilize with 75% Et-OH at 4°C for 24 hr.
 - remove Et-OH
 - Dulbecco's phosphate buffer
 - stock at -70°C

図1: Marmur 変法^{8,9)} によるDNAの抽出

遊離させたのち, 低速遠沈し, 沈査を集めて 10⁸ コの細胞を1試料となるようにした¹⁰⁾. これに少量の 0.15M NaCl を含む 0.1M EDTA (pH8) 液を加えて攪伴し, さらに1%の割合になるようにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えて 60°C に加熱し, 細胞の崩壊をおこなった. これに等量の CHCl₃/iso-Amyl-OH (24/1, v/v) を加え, 30分間室温にて振盪したのち, 除タンパクをおこなった.

6000 \times g 遠沈により溶液は上層から水層, タンパク層, 有機溶媒層の3層に分離される¹¹⁾. 核酸のナトリウム塩は水層に含まれているが, これに95%エタノールを加え, DNA-Na 塩を沈殿させ,

低速遠沈にて分離した。核酸ナトリウム塩をタンパク質から遊離するために¹²⁾、SSC (0.15M NaCl-0.015M Na-citrate) 緩衝液を加え、沈殿物の溶解をおこなった。

ついで RNase A (Worthington Biochemical Corp., Freedhold, N. J.) により DNA を分解させ、また Pronase (Calbiochem, La Tolla, Cal.) によりタンパク質を分解した。これらを数回くりかえしたのち、イソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ、75%エタノールにより殺菌したのち、同液を除去した。ついで Dulbecco のリン酸緩衝液¹³⁾¹⁴⁾を加えて、凍結保存した、

3. DNA の紫外線吸収

上記方法により採取した試料の波長 260nm と 280nm における紫外線吸収度を日立分光光度計 101 型により測定し、その比をもとめた¹⁵⁾。

また紫外線吸収スペクトルを島津—マルチパーパスにより記録させた。

4. DNA の定量

ジフェニールアミン反応を利用した Burton 変法¹⁶⁾により、抽出した DNA の定量をおこなった。

実験結果

1. DNA の紫外線吸収

抽出された DNA の紫外線吸収スペクトルの 1 例を図 2 に示した。また波長 260nm と 280nm における紫外線吸収スペクトルの比を表 1 にあげた。

2. DNA の定量

Burton 変法による DNA 定量の結果を表 2 に示した。

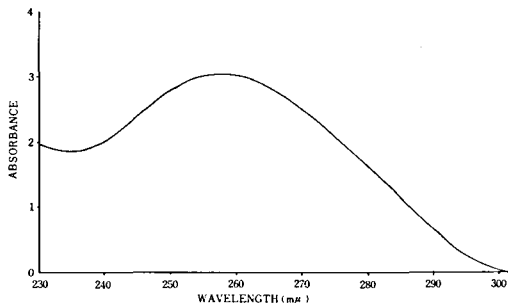


図 2：紫外線吸収スペクトル

表 1：RaTC-DNA の紫外線吸収スペクトル比

試料	比
1	1.8
2	1.8
3	2.0
4	1.9
5	2.0

表 2：RaTC-DNA の定量

試料	DNA 量*
1	85
2	95
3	110
4	110
5	100

* 単位：μg/ml

考 察

1. DNA の抽出

DNA 抽出の原理は、DNA を含む細胞成分を水に溶解させ、各成分のアルコールに対する溶解度の差を利用して DNA を最後に沈殿させることである¹⁷⁾¹⁸⁾。

その操作は、1) 細胞の溶解、2) タンパク質の除去、3) RNA の除去の 3 過程に大別される。しかし純度の高い核酸を得ようとすればするほど、各段階において機械的切断力や核酸分解酵素の作用などを強く受け、核酸の低分子化がおこる。すなわち、高純度の DNA 標品を得ることと、高分子量の DNA 標品を得ることとは、現時点では、技術的に両立しないことがらである¹⁷⁾。したがって必要とされる DNA に応じて抽出方法を選択すべきであり、主として高純度のものを得る目的で考察された Marmur 法¹⁴⁾から、高分子量のものを得るための Worcel 法¹⁹⁾にいたるまで種々の方法が報告されている。

高純度の DNA を抽出する方法といわれているもののうち、塩化ナトリウム法は操作に 2 週間以上の長期間を必要とするが、その割には純度が高くない。またドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 法は操作が難渋で、低温での迅速な操作や高速遠沈

などを必要とする¹⁷⁾¹⁸⁾。

Marmur 法¹⁴⁾の特徴はタンパク質が混入しない高純度の DNA が得られることにある。すなわち、クロロホルムと水とのエマルジョンを作りその界面でタンパク質分子を変性させ、さらに塩濃度を高めてタンパク質を DNA 部分から分離さす。またクロロホルムとイソアミルアルコールを用いることにより、有機溶媒と水層との間に折出している変性タンパク質が凝固するので、タンパク部分を水層から容易に分離できる。また本法では使用する試薬が DNA 標品に結合する可能性が非常に少ない点も長所である。他方欠点としては、溶液中の "ずり"、応力により DNA 分子が破壊されやすいので、高分子のものが得られがたい。また他の方法に比して回収率が低く、55~75%といわれている¹⁷⁾¹⁸⁾。

本研究でもちいた Hill 変法⁸⁾と Marmur 原法¹⁴⁾との相異は除タンパク操作にある。原法においては過塩素酸ナトリウム処理および吸引操作がおこなわれるのに対して、変法ではクロロホルム処理を主体としていることである。これにより Hill 変法ではより高分子の DNA が抽出される。

2. 抽出された DNA

本実験において RaTC より抽出された DNA がどのようなものであり、かつその抽出法が再現性の高いものであるかどうかを検討する目的で下記をおこなった。

1) DNA の紫外線吸収。

2) DNA の定量。

3) 他の研究者による報告との比較。

核酸塩基は紫外線(特に波長 230~310 nm 付近において)に対して特有の吸収を示すから、既知の塩基と比較することが可能である。しかし塩基の同定にもっと有効なのは、検液から得られた紫外線吸収曲線について2つの一定波長における吸光度の比が各塩基に特有の値を示すことを利用することである。その目的で波長 260 nm と 280 nm とにおける吸光度の比をとった¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。その値は表1にみられるように、比較的一定したものであり、その平均値は1.90であった。この吸収スペクトル比が1.9前後を示すことは高純度の DNA が抽出されていることを示している¹⁵⁾。

また本実験と同様に、株化された腫瘍細胞からの DNA 抽出を Marmur 変法でおこない、波長

260 nm と 280 nm での紫外線吸収スペクトル比を求めた報告(表3)と比較しても、本実験の結果が他のものとよく一致していることが知られる。

表3: 株化腫瘍細胞DNAの紫外線吸収スペクトル比

報 告 者	比
Hill, et al. ⁸⁾	
Simpson, et al. ⁹⁾	1.9
Ih-Chang, et al. ²⁰⁾	1.9
菱田ら	1.9

DNA を定量するには、その構成々分であるプリンおよびピリミジン塩基、糖、リン酸のいずれをももちいることができる。しかしもっとも一般的であり広く利用されているのは、構成糖量を比色定量することにより DNA 量を知る方法である。この目的のために、デオキシトースに対するジフェニルアミン反応を応用するのが Dische 法の原理である¹⁷⁾¹⁸⁾。

しかし本研究では Burton による変法¹⁶⁾をもちいたが、これは Dische 原法と比較して試料 DNA が少量で済み、かつ RNA が混在していてもその影響が少ないなどの特徴を有するからである。この方法による DNA 量が表2にみられるように比較的一定していることは、今回の DNA 抽出が再現性の高いものであることを示すものである。

ま と め

松本歯科大学口腔外科学第2講座において株化し継代培養している腫瘍細胞より DNA を Marmur 変法をもちいて抽出した。さらにそれらにつき波長 260 nm と 280 nm における紫外線吸収スペクトル比、Burton 変法による定量、他の研究者による同様な報告との比較をおこなった。その結果、抽出された DNA は純度の高いものであり、本実験は再現性の高いものであることが知られた。

本研究をおこなうにあたり、適切な御助言と懇切な校閲を賜りました本学口腔生化学講座 原田 実教授および口腔外科学第2講座 待田順治教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 山村雄一 (1978) がん. 蛋白核酸酵素, 26 (臨時増刊): 543—563.
- 2) Todaro, H. (1972) N. A. S. Symposium; New evidence as the basis for increased effect cancer research. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1009—1015.
- 3) 浦出雅裕, 小松正隆, 山本一郎, 待田順治 (1977). 9, 10-Dimethyl-1, 2, Benzanthracene により誘発されたラット腫瘍組織内及びその培養細胞内のC型ウイルス粒子. 日口科誌, 26: 395—404.
- 4) Fourcade, A., Huynh, J. and Lacour, F. (1974) Transfection of chicken embryo cells with DNA extracted from Avian virus-producing neoplastic cells. J. Virol. 14: 407—411.
- 5) Krepin, H. M., Nicolson, M. O. and Gilden, R. V. (1976) Infectious proviral DNA in human cells infected with transformation defective type C viruses. Virology 70: 301—312.
- 6) Temin, H. M. (1972) The RNA tumorviruses-background and foreground. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1016—1020.
- 7) Karpas, A. and Millstein, I. (1973) Recovery of the genome of Murine sarcoma virus (MSV) after infectious cells with nuclear DNA from MSV transformed non-virus producing cells. J. Cancer, 9: 295—299.
- 8) Hill, M. and Hillova, J. (1972) Recovery of the temperature-sensitive mutant of Raus sarcoma virus from chicken cells exposed to DNA extracted from hamster cells transformed by the mutant. Virology, 49: 309—313.
- 9) Simpson, R. W. and Iinuma, M. (1975) Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 72: 3230—3234.
- 10) 中井準之助 (1968) 組織培養. 45, 朝倉書店, 東京.
- 11) Sevag, M. G., Lackman, D. S. and Smolens, J. (1938) The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. J. Biol. Chem. 124: 425—436.
- 12) Simmons, N. S. (1952) Ten hour preparation and isolation of pure, highly polymerized thymus nucleic acid. Fed. Proc. 11: 390.
- 13) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1945) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. J. Exp. Med. 99: 167—182.
- 14) Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3: 208—218.
- 15) Schlenk, F. (1945) Spectrophotometric studies on nucleic acid and nucleic acid constituents. Adv. Enzymol. 9: 486—490.
- 16) Burton, K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315—323.
- 17) 日本生化学会 (編) (1975) 生化学実験講座 2, 4章 DNA の分離精製. 41—98, 東京化学同人, 東京.
- 18) 蛋白質核酸酵素編集部 (編) (1966) 核酸実験法, 動物組織の DNA 調製法. 14—31, 共立出版, 東京.
- 19) Worcel, A. and Burgi, E. (1972) On the structure of the folded chromosome of escherichia coli. J. Mol. Biol. 71: 127—147.
- 20) Ih-Chang Hsu and Wenk, Y. (1977) DNA transfection of ecotropic murine leukemia viruses in mouse cell culture. Cancer Reserch, 37: 1709—1714.