奈良医科大学, 第1解剖学教室 (主任: 上田教授).
Dept. of Anat., Nara Med. College, Nara-ken (Head: Prof. T. UEDA).

分離核における塩基性蛋白質および残余蛋白質の量と 核体積との関係.*

A Relationship between Nuclear Size, Contents of Basic- and
Residual-Proteins of Nucleus.

山田正興, 浦上 勉, 藤沢靖憲.

Masaaki YAMADA, Tutomu URAGAMI, Yasunori FUJISAWA.

(Received June 8, 1960.)

高等動物の細胞核に特有とみられる DNA について, 細胞の系統さえ定めれば, 1 核あたりの量は動物の栄養に関係なくほぼ一定している. 一方, 細胞核の蛋白質についてはその総蛋白量を問題にする限り, 先人の報告, 或は当教室の成績においても, 動物の栄養に大きく支配されるようである. その変動は細胞核のどの蛋白部分に由来するものであろうか. 細胞核に存在する各種の蛋白質のなかで, DNA と同じく, すくなくとも核に特有な蛋白質と考えられ, また細胞質の蛋白質と明確に区別されて考えられているものはいわゆるヒストンである. しかもそれは核内において DNA と相伴って存在するとされている. 従ってこの報告では細胞核の蛋白質を塩基性 (ヒストン) 蛋白と, 残余 (非塩基性) 蛋白質とに大別して, 栄養状態が飽食, 飢餓の両極端にある動物についてそれらの量を比較した. 実験の結果から核の蛋白量の変動は主として非塩基性蛋白量の変動であることを示した. またこの報告では, 同時に, 核の体積に関係した上記の結果に対応した1つの結論をのべる.

I. 材料と方法.

用いた実験材料はモルモットの肝臓である. 体重, 性別に関係なく使用した. 飽食のグループは動物を入手後約5日間, 十分に餌を与えて飼育し, 体重の増加するのを確かめて後に, また飢餓のグループは水以外の餌を与えることなく, 飢餓死の寸前に昏睡に陥いたのを確かめたのち屠殺した. 屠殺後ただちに肝臓を取り出し, 氷冷したのち, 以下の操作を行った.

1. 組織ホモジェネートの作製. 氷冷した肝臓によく冷却した約 160 ml. の 0.7% クエン酸を加え, 市販のミキサーの中で1分間攪拌, そのうち約 15 ml. を組織の蛋白量および核数測定に残し, のこり全部を細胞核の分離のために使用した.
2. 細胞核の分離. 組織ホモジェネートの約 145 ml を 2000 r. p. m. 10分間遠心.

* 本研究費の一部は文部省科学研究費 (昭和 35 年度, 各個研究 No. 710067) の援助による.

得られた沈渣に 160 ml. の 0.7 % クエン酸を加えてミキサー中で攪拌後, 直ちに遠心, 同様な操作を合計 4—5 回くり返した. 最終に得られた沈渣を 15 ml. の 0.7 % クエン酸に分散して分離核分割とした. 光学顕微鏡にて観測した場合, 細胞および細胞成分の混入を認めない.

3. 細胞核体積の計測. 核分割の 1 滴を Lee-Ramsden 型測微接眼レンズを着装した光学顕微鏡下に, 核の長径と短径とを測定し, 回転楕円体として体積を計算した. 計測した核数は約 100 である. カバーガラスとスライドガラスとの間にパラフィン片を挿入し, 核の圧迫による変形を防ぎ, またカバーガラスの周囲をパラフィンで封じて液の蒸発を防止した.

4. 核数の計算. 組織ホモジェネートおよび分離核分散液を 2 ないし 5 倍に稀釈して, Thoma 型血球計算盤を用いて核数をかぞえ, 1 ml. の核数を計算した.

5. 細胞核の塩基性蛋白質の抽出. 強酸を用いる一般的な方法 (安藤ら 1955) に従った. ただし酸の濃度は Butler ら (1957) の示唆に従って 1/4 N を用いた. 10 ml. の核分散液に等容の 1/2 N 硫酸を加えて冷蔵庫中に 20 分間置き, その間たんねんに攪拌した. その分散液を 4000 r. p. m. 15 分遠心して得られた上澄を塩基性蛋白質の分割として保存し, 沈渣から再び 1/4 N 硫酸により塩基性蛋白質を抽出した. このような操作を合計 5 回くり返して, 塩基性および残余 (非塩基性) 蛋白質の両分割を得た. 塩基性蛋白質の分割は苛性ソーダにて中和したのち, 最終 10 % になるように三塩化醋酸を加え, 10000 r. p. m. 10 分間遠心して沈渣として回収した. 試料は全操作を通じて, できるだけ低温に保つよう注意した.

6. 蛋白質の定量. Biuret 反応によった. 組織ホモジェネートの一定量, 分離核の塩基性および残余蛋白質は最終 3.5 % (W/V) の苛性ソーダに溶解し, その溶液 10 ml. に対して 5 % 硫酸銅溶液 1 ml. を加えて発色させ, それぞれの蛋白量を測定した. 卵白アルブミン乾燥粉末 (Merck) を標準として biuret 反応の extinction を卵白アルブミン等量に換算し記載した.

II. 成績と考察.

われわれの前報告 (1959) によれば, 分離核の大きさと重量とは相伴って変動する. また分離核の大きさと蛋白量は動物の栄養状態によって変化し, 飽食動物ではそれらの量は大きく, 飢餓動物では小さい. これ等の結果に同意する報告として Lagerstedt (1949), Ely ら (1951), Laird ら (1955) の報告がみられる.

この報告では 2 部分にわけて, すなわち先づ分離核における蛋白質の変動を, 塩基性蛋白質と残余 (非塩基性) 蛋白質とにわけて検討したのち, その両状態において細胞核の大きさが異なることを追試した.

表 1 には 1 核あたりの組織蛋白量, 塩基性蛋白および残余蛋白量を記した. 肝臓重量は飢餓例においては飽食例の約 1/2 になり, この量は Schultz (1948), Addis ら (1936) の報告とよく似た値であり, この種の実験では最も大きい. 従って両

極端の栄養状態において比較されたと考えてよいであろう。1核あたりとして表現した組織蛋白量は約40%の減少を示した。

このような条件のもとにおいて、1/4 N 硫酸によって抽出された塩基性蛋白質の量は、1核あたりとして表現した場合、飽食例で平均 0.22×10^{-7} mg、飢餓例で 0.20×10^{-7} mg となった。両者の間には大差ないとみなしてよいであろう。核の塩基性蛋白の量は飽食、飢餓を通じてかわらない。

それに比して核の残余蛋白量は飽食、飢餓の両状態において大きく変動し、約34%減少した。

表2には分離核の体積の変化を記した。肝臓重量が約44%減少するとき、核の体積は約29%減少する。

分離核に関する部分を、飽食例の平均値を100として計算し、図に一括して示

Table 1. Protein contents in tissue and isolated nuclei per nucleus.

	Animal number	Body weight	Liver weight	Protein content per nucleus		
				Tissue	Nucleus	
				Total Protein	Basic protein	Residual protein
Well-fed	1 ♂	325 gm	10.0 gm	12.8×10^{-7} mg	0.22×10^{-7} mg	0.71×10^{-7} mg
	2 ♀	500	15.5	11.8	0.19	0.57
	3 ♀	620	32.2	8.4	0.23	0.66
	9 ♀	360	14.5	10.9	0.21	0.66
	10 ♀	350	15.0	11.7	0.20	0.64
	11 ♀	350	10.6	10.5	0.22	0.74
	12 ♂	295	10.5	10.6	0.25	0.75
	Mean		15.5 gm	11.0×10^{-7} mg	0.22×10^{-7} mg	0.68×10^{-7} mg
Starved	4 ♂	510 gm	9.4 gm	5.1×10^{-7} mg	0.19×10^{-7} mg	0.40×10^{-7} mg
	5 ♀	215	6.5	7.8	0.20	0.45
	6 ♂	270	5.6	5.5	0.21	0.45
	7 ♂	250	5.8	4.5	0.21	0.41
	8 ♀	300	8.1	—	0.18	0.43
	13 ♀	230	6.0	6.1	0.19	0.42
	14 ♀	390	12.0	6.1	0.20	0.56
	Mean		7.6 gm	5.9×10^{-7} mg	0.20×10^{-7} mg	0.45×10^{-7} mg

The liver of well-fed or of starved guinea pig was homogenized in citric acid solution and the nuclei were collected from this homogenate. Protein amount was estimated with biuret reaction and the number of nuclei was counted by using a haemocytometer. protein content in the tissue homogenate or in the nuclei per nucleus was calculated as a ratio of the protein amount to the number of nuclei. Content of tissue protein or of residual protein in the isolated nuclei per nucleus tends to decrease when animal was kept on starvation. On the other hand, the content of basic protein per nucleus was preserved nearly constant both in well-fed or starved guinea pig.

Table 2. Mean volume of nucleus.

	Animal number	Body weight	Liver weight	Nuclear volume
Well-fed	1 ♂	330 gm	13.4 gm	313 μ^3
	2 ♂	300	17.1	365
	5 ♀	340	14.8	335
	6 ♂	390	14.4	343
	9 ♀	300	13.5	339
	10 ♀	300	15.5	370
	13 ♂	340	14.1	344
	Mean		14.7 gm	344 μ^3
Starved	3 ♀	270 gm	7.1	255 μ^3
	4 ♂	280	7.1	283
	7 ♂	290	10.4	204
	8 ♀	280	8.4	266
	11 ♀	280	7.8	238
	12 ♂	290	8.5	225
	15 ♂	300	7.4	233
	Mean		8.1 gm	243 μ^3

Volume of the nucleus listed on Table 1 was observed through Ramsden microocular. Mean nuclear volume of liver in starved guinea pigs was smaller than in that of well-fed.

した。

1核あたりの DNA 量は、多少の例外を除いて、動物の栄養と無関係であることがほぼ確定したといえる。しかし DNA と相伴って抽出される塩基性蛋白質の一定性については明らかでない。

たとえば、Stedman ら (1947) は各種動物のクエン酸分離核について、ヒストン量は核酸量と同様に極めて一定した値をもっていることを示している。一方 Butler ら (1957) によれば Stedman と全く同じ抽出法を用いて、はるかに多量のヒストンを回収し得たといわれる。また分離核ばかりでなく、DNP* についても分析結果は著者により一定しない。

これら分析結果の変動は分析方法の差にもよるであろうが、この報告に示したように動物の栄養状態によって変動するであろう。しかし 1核あたりの量として表現した塩基性蛋白質の量は、飽食、飢餓の栄養状態に関係なく、ほぼ一定した値を示すものと思われる。そして核の蛋白質の変動は残余蛋白質の変動によってきまる。

Leuchtenberger ら (1951), Laird ら (1955) によれば、細胞核の大きさは、その内部に含まれる蛋白質の量に支配される。この報告においても彼等に同意する結

* Deoxypentosenucleoprotein.

Nuclear protein and nuclear volume.

○: Well-fed animal, ●: Starved animal, —: Mean value.

Data concerning the isolated nuclei were shown together in the figure. Each circle in the figure shows a percentage to mean value of basic- or residual-protein content in nuclei per nucleus, or to mean nuclear volume of well-fed animals. It can be seen that the mean nuclear volume follows the change observed in the residual (non-basic) protein content of nuclear fraction.

果を得た。その内容に立入って考察すれば、核の大きさの変動は核の残余（非塩基性）蛋白質の変動に支配され、塩基性蛋白質には関係しない。

Hale ら (1956) によれば、クエン酸分離核では、分離操作中に多量の蛋白質が

失われているといわれる. 従ってこの報告においては, 失われた蛋白のもつ意味については無視されている.

III. 結 語.

飽食および飢餓モルモットの肝臓のホモジェネートおよびクエン酸分離核について, 1核あたりの組織蛋白量, 核の塩基性蛋白および残余(非塩基性)蛋白量, および核の平均体積を測定して次の成績を得た.

肝組織の蛋白および核の蛋白量は全体として飢餓動物において減少する. 核の蛋白質について, 残余蛋白量は飢餓状態において減少するが, 塩基性蛋白量は不変とみなされる. 従って飢餓動物における核の体積の減少は, 核の残余蛋白質の減少量に対応する.

Author's Abstract.

Constancy of DNA content per nucleus has been resulted from various investigations, while the change of amount of various nuclear proteins and their relations to nuclear volume remain uncertain. The aim of this report was to solve those questions, using the nuclei isolated in citric acid medium from the liver of well-fed or starved quinea pig, and evaluations were made on the mean size of nuclei and on the amount of nuclear protein per nucleus separated into both basic and residual fractions. Obtained results were summarized as follows: The amount of residual protein in nuclei per nucleus and the mean volume of nuclei were lower in starved than in well-fed animals, while the content of basic protein in nuclei per nucleus was not influenced from starvation.

文 献.

Addis, T., L. J. Poo and W. Lew: The quantities of protein lost by the various organs and tissues of the body during a fast. *J. biol. Chem.* 115 (1936). P. 111-116. — **安藤鋭郎, 岩井浩一, 山崎 誠:** ヒストン. 蛋白質化学. 巻3. 19号. 頁70-88. — **Butler, J. A. V. and P. F. Davison:** Deoxyribonucleoprotein. *Adv. in Enzymol.* 18 (1957). P. 161-190. — **Ely, J. O. and M. H. Roos:** Deoxyribonucleic acid content of rat liver nuclei influenced by diet. *Science*. 114 (1951). P. 70-72. — **Hale, A. J. and R. M. Key:** A comparison of dry weights determined by chemical and interferometric method. *J. biophysic. biochem. Cytol.* 2 (1956). P. 147-158. — **Lagerstedt, S.:** Cytological studies on the protein metabolism of the liver in rat. *Acta anat. Suppl.* 9. (1949). — **Laird, A. K., A. D. Barton and O. Nygaard:** Synthesis of protein and ribonucleic acid in rat liver during refeeding after starvation. *Exptl. Cell. Rec.* 9 (1955). P. 523-540. — **Leuchtenberg, C. and F. Schrader:** Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and desoxyribonucleic acid (DNA) in various rat cells. *Biol. Bull. Wood's Hole.* 101 (1951). P. 95-98. — **尾城 勉, 藤沢靖憲, 山田正興:** 解剖誌. 巻34, 5号 (1959). 第25回近畿地方会抄録. 頁6. — **Schulz, J.:** On the nature of labile protein. *J. biol. Chem.* 178 (1949). P. 451-458. — **Stedman, E. and E. Stedman:** The chemical nature and functions of the components of cell nuclei. *Cold Spring. Har. Symp. Quant. Biol.* 12 (1947). P. 224-236.