

# 岡山医学会雑誌

第82巻 11, 12 合併号 (第912, 913号)

昭和45年12月30日発行

## Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームおよび リボゾームタンパクに関する研究

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 田中早苗教授)

日 域 大 陸

〔昭和45年11月2日受稿〕

### 目 次

第1章 緒 言	第2節 紫外線吸収スペクトルによる分析
第2章 Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームの 分画およびリボゾームダイジェストの抽出	第3節 蛋白質定性反応
第1節 実験材料ならびに主な試薬	第4節 化学的成分の定量
第2節 腫瘍リボゾームの分画	第5節 超遠心分析
第3節 腫瘍リボゾームダイジェストの抽出	第6節 アミノ酸分析
第4節 DEAE-Sephadex A50 によるリボゾーム ダイジェストの分画	第7節 ディスク電気泳動
第5節 試料の脱塩	第8節 ペーパークロマトグラフィー
第3章 諸試料についての生化学的分析	第9節 小 括
第1節 はじめに	第4章 考按ならびに総括
	第5章 結 語
	第6章 文 献

### 第1章 緒 言

悪性腫瘍に対する治療方法には、外科的治療、放射線治療、抗癌剤などによる化学的治療などがあるが、これらの治療方法もほとんどの症例に対して根治的といえるものではない。

近年、癌の免疫学的研究が各方面より行われ、その結果、癌に特異抗原が存在することが広く論じられているが、このことは癌に対する免疫療法の可能性を暗示している<sup>1)</sup>、われわれの教室においても、

岡野<sup>2)</sup>、中島<sup>3)</sup>らが細胞性抗体の抗腫瘍性について追求し、また只友<sup>4)</sup>は、Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボプロテインおよびリボゾーム蛋白に腫瘍抗原の存在を求め、さらに矢吹<sup>5)</sup>はリボゾーム上で合成されていると考えられる蛋白質をとり出し、その特異抗原性について追求した。

リボゾームは蛋白質合成の場であり、何らかの臓器特殊性が存在すると考えられる。そこで、私は、Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾーム、およびリボゾームダイジェストよりえた蛋白質を精製し、その



some fraction をえる。

この ppt 2 を、ガラスホモゲナイザーを用いて約 100 ml の TKM 緩衝液に懸濁し、5% のデオキシコル酸ナトリウム (DOC-Na) を、終濃度が 0.8% になるように加え、よく振盪し、溶解したのをたしかめ、室温で約 2 時間放置する。つぎに、これを  $144,000 \times g$ 、90 分間超遠沈し、その沈渣 (ppt 3) に粗リボゾーム (crude ribosome) をえる。この粗リボゾームの半量は精製リボゾームの調製に、あとの半量は次節にのべるリボゾームダイジェストの調製に使用する。

まず、精製リボゾームをえるために、粗リボゾームの 0.001 M  $MgCl_2$  溶液 20 ml の  $Mg^{++}$  濃度を 0.05 M にして、 $600 \times g$ 、15 分間遠沈し、金属蛋白質、グリコーゲンなどを上清 (sup 4) として除く、この沈渣 (ppt 4) をさらに 0.01 M の  $MgCl_2$  溶液に分散し、 $600 \times g$ 、15 分間再遠沈する。この沈渣を約 20 ml の蒸留水に懸濁し、Visking Tube に入れ、約 1 l の蒸留水に対して一夜放置し透析する。翌朝、これを  $13,000 \times g$ 、20 分間遠沈し、その上清 (sup 5) に精製リボゾームをえる。

この精製リボゾームを、化学的成分の定量、紫外線吸収スペクトルによる分析、超遠心分析の試料とした。

### 第 3 節 腫瘍リボゾームダイジェストの抽出

第 2 節でえた粗リボゾームの半量を、約 30 ml の TKM 緩衝液に懸濁し、1 ml につき、RNase を 1.0 mg、DNase を 0.5 mg の割合で加え、 $37^\circ C$  で、約 2 時間インキュベートする。これを  $144,000 \times g$  で、90 分間超遠沈すると、その上清 (sup 4) にリボゾームの RNase、DNase digest (以下リボゾームダイジェストと呼ぶ) をえる。このリボゾームダイジェストを、DEAE-Sephadex A50 によるカラムクロマトグラフィーの試料とした。

### 第 4 節 DEAE-Sephadex A50 によるリボゾームダイジェストの分画

実験方法：

#### 1) DEAE-Sephadex A50 の調製

約 100 gr の DEAE Sephadex A50 (PHARMACIA UPPSALA SWEDEN) を、約 2 l の蒸留水に懸濁してよく攪拌し、約 30 分間静置した後、浮遊している微細粒子を除去する。この操作を 2~3 回くりかえす。つぎに膨潤した Sephadex を 1 l の 0.1N NaOH、2 l の蒸留水、1 l の 0.1N HCl、2 l の蒸留水の順で、Büchner ろうとを用いて吸引びんでろ過しなが

ら洗浄する。おわりに pH を 7.0 に調整して低温室に保存する。

#### 2) 溶出装置

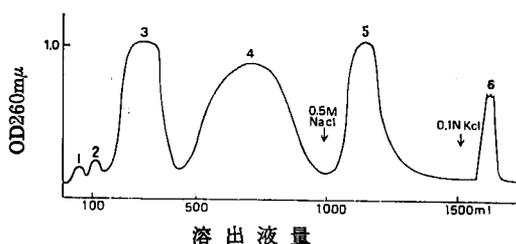
このようにして活性化された DEAE-Sephadex A50 を、使用する 3 日くらい前から TKM 緩衝液に懸濁し、放置し、朝夕 decantation を行つて新しい溶媒に懸濁しておく、これを直径 2.5 cm、高さ 40 cm のガラスカラムに、高さ 25~30 cm まで層が乱れないように充填し、bed volume の約 5 倍量の TKM 緩衝液を流して安定化させる。

#### 3) 溶出

第 3 節でえた約 20 ml のリボゾームダイジェストを自然流下でカラムに添加し、三段階の stepwise elution を行つた。すなわち、最初に 1 l の TKM 緩衝液を流し、つぎに 0.5 M NaCl を加えた TKM 緩衝液を 500 ml 流し、最後に 0.5 M NaCl、0.1 N KOH を加えた TKM 緩衝液 300 ml を流した。溶出される試料の検出は Toyo Uvicon-540 Optical Unit (東洋科学産業株式会社) をもちいて、波長  $280 m\mu$  の紫外線をあてて行い、Toyo Fraction Collector SF-200A により溶出される試料の収拾にあつた。

実験成績：図 1 に示すごとく、6 つの分画 (Peak) がえられた。まず、TKM 緩衝液により Peak 1, 2, 3, 4 が溶出され、2 番目の溶媒により Peak 5 が溶出された。さらに 3 番目の溶媒により Peak 6 が溶出された。各々の試料は冷凍乾燥して保存した。

図 1. DEAE-Sephadex A50 によるリボゾームダイジェストの溶出分画



### 第 5 節 試料の脱塩

第 4 節でえられた主要なる分画、第 3, 4, 5 の分画試料について、さらに化学的分析をすすめてゆくために、Sephadex G25 を担体としたカラムクロマトグラフィーにより試料の脱塩を行つた。

実験方法：

#### 1) Sephadex G25 の調製

約 100 gr の Sephadex G25 を蒸留水に懸濁し、よく攪拌して静置する。のちに、表面に浮遊してい

る微細粒子を decantation によつて除く。この操作を 2~3 回行つたのち、蒸留水に懸濁したまま保存する。

### 2) 溶出装置

カラムは直径 5cm, 高さ 30cm のものを使用した。このカラムに、調製した Sephadex G25 を高さ約 10cm まで充填し、bed volume の 5 倍量の溶媒（蒸留水）を流して安定化させる。

### 3) 展開

冷凍乾燥した試料を、約 15ml 蒸留水に溶解し、自然流下でカラムに添加し、約 800ml の蒸留水を流して溶出を行った。溶出される試料の検出ならびに収拾は、第 4 節と同様の装置を使用した。

実験成績：溶媒を 200~400ml 流した頃に試料が溶出されてきた。溶出された試料について紫外線吸収スペクトルを描き、脱塩する前の試料と同一のものであることを確かめた。脱塩された各々の試料は冷凍乾燥して保存した。

## 第 3 章 諸試料についての化学的分析

### 第 1 節 はじめに

Ehrlich 腹水癌移植腫瘍より精製されたリボゾームについて、紫外線吸収スペクトルによる分析、化学的成分の定量、超遠心分析を行つた。また、DEAE-Sephadex A50 によるリボゾームダイジェストの分画試料について、紫外線吸収スペクトルによる分析を行つた。矢吹<sup>5)</sup>は分画 3 (Peak 3) について、その抗原としての特異性について検討した。したがつて私は、Peak 3 について、さらに蛋白質定性反応、化学的成分の定量、超遠心分析、アミノ酸分析、ディスク電気泳動を行い、その化学的性質について検討を加えた。また、Peak 4, Peak 5 について、核酸成分の追求のためにペーパークロマトグラフィを行つた。

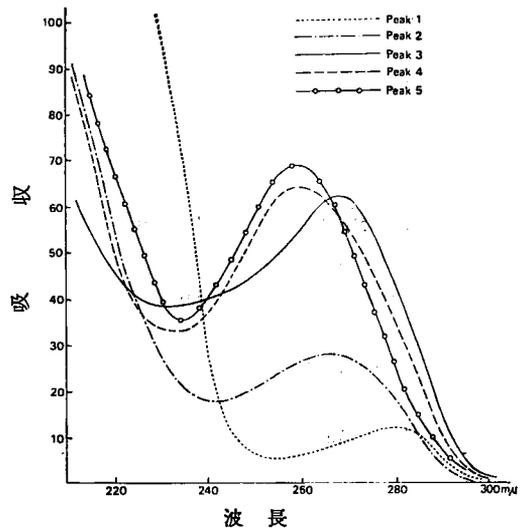
### 第 2 節 紫外線吸収スペクトルによる分析

実験方法：腫瘍リボゾーム、および DEAE-Sephadex A50 による腫瘍リボゾームダイジェストの分画試料について、EPS-3 型日立自記分光光度計を使用し、紫外線吸収スペクトルを描いた。

実験成績：腫瘍リボゾームの紫外線吸収極大値は 260 m $\mu$ 、極小値は 237 m $\mu$  であつた。また、リボゾームダイジェストの各分画試料の紫外線吸収スペクトルは図 2 に示すごとくで、Peak 1 の吸収極大値は 280 m $\mu$ 、極小値は 255 m $\mu$ 、Peak 2 の吸収極大値は 267 m $\mu$ 、極小値は 240 m $\mu$ 、Peak 3 の吸収極大値

は 268 m $\mu$ 、極小値は 232 m $\mu$ 、Peak 4 の吸収極大値は 258 m $\mu$ 、極小値は 228 m $\mu$ 、Peak 5 の吸収極大値は 259 m $\mu$ 、極小値は 235 m $\mu$  であつた。

図 2. DEAE-Sephadex A50 により溶出分画されたリボゾームダイジェストの各分画の紫外線吸収スペクトル



### 第 3 節 蛋白質定性反応

実験方法：試料 Peak 3 について、次のような蛋白質定性反応を行つた。

#### 1) ニンヒドリン反応

試料溶液に 1% ニンヒドリン溶液を加えて加熱する。

#### 2) ビュウレット反応

試料を 1N NaOH に溶解し、1% の CuSO<sub>4</sub> 溶液 1~2 滴を加える。

#### 3) Pauli 氏反応

試料溶液に炭酸ソーダを少量加えてアルカリ性とし、これにジアゾベンゼンスルホン酸の結晶少量を加えて溶解させる。

#### 4) キサントプロテイン反応

試料溶液に少量の濃硝酸を加えて煮沸する。

#### 5) Millon 氏反応

試料溶液に少量の Millon 氏試薬を加えて煮沸する。

実験成績：ニンヒドリン反応陽性、ビュウレット反応陽性、Pauli 氏反応陽性、キサントプロテイン反応陰性、Millon 氏反応陰性であつた。

### 第 4 節 化学的成分の定量

腫瘍リボゾーム、および Peak 3 について、主な

化学成分として、窒素，リン，リボースの定量を行った。

#### 実験方法：

##### 1) 窒素の定量

Folin-Nessler の原法 Koch-Mc Meekin の改良法にもとづいて Lang<sup>8)</sup> が確立した Folin-Nessler 比色法を応用した。まず、試料溶液 0.1 ml をケールダールの小酸化コルペンにとり、0.1 ml の95%以上の濃硫酸を加えて酸化台のうえで、約3時間湿性灰化する。無色にならなければ、一滴の過酸化水素を加えてコルペンをよく振盪し、約1分間しづかに沸騰させて、おわりに冷却する。つぎに、5ml の水を加えてよく振盪し、このうちの 1ml をとり、これに 0.5ml の 5% NaOH と 1.5ml の水を加え、さらに 2ml のネスラー試薬（窒素定量用）を加えると薄黄色の溶液となる。発色10分後に 420 m $\mu$  の波長において 1cm のガラスセルを使用し、島津光電分光光度計 QR-50 形によつて吸光度を測定する。対称は 0.1ml の溶媒（TKM 緩衝液）について同様の方法を行う。以上の方法によりえられた値を、あらかじめ 0.2N 硫酸に溶解した硫酸アシモニウム溶液を試料として作った標準曲線にてらし合わせ、窒素量を測定した。

##### 2) リンの定量

W. R. Morrison<sup>9)</sup> の方法に従つた。すなわち、0.1ml の試料溶液をケールダールの小酸化コルペンにとり、それに濃硫酸を 0.3 ml 加えて、酸化台の上で約3時間湿性灰化する。おわりに一滴の過酸化水素を加えてよく振盪し、約1分間しづかに沸騰さ

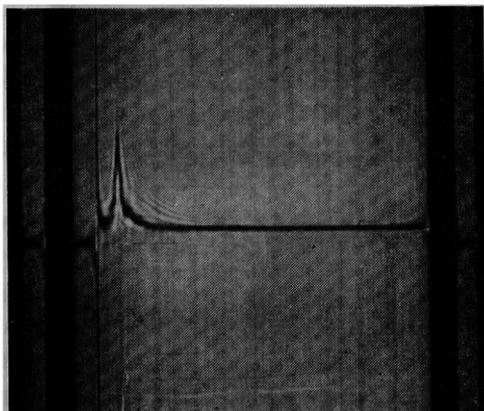
せ、水道水で冷却する。つぎに、管壁を洗い流しながら水を加え、全部で 4ml にする。ついで、33%硫酸ソーダ溶液を 0.1 ml 加えてよく振盪し、さらに 2%モリブデン酸アンモニウム溶液 1.0ml, 0.01gr のアスコルビン酸を加えてよく振盪した後、沸騰水のなかで約10分間放置する。そのあと、水道水で冷却すると薄青色の溶液となる。これを 822 m $\mu$  の波長において 1cm のガラスセルを使用し、上記の分光光度計によつて吸光度を測定する。対称は 0.1ml の溶媒について同様の方法を行う。以上の方法によりえられた値を、あらかじめ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O の水溶液を試料として作った標準曲線にてらし合わせ、リンの値をえる。

##### 3) リボースの定量

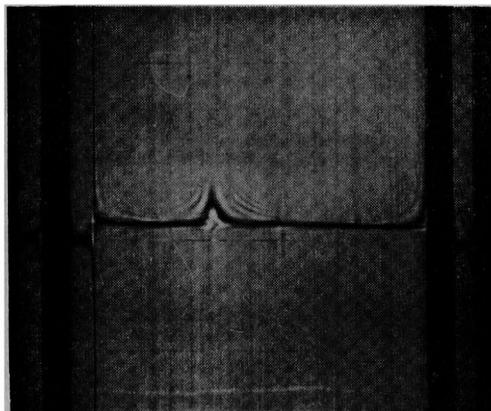
リボースの定量は、一般的に用いられている Orcinol 反応<sup>10)</sup> に従つた。すなわち、ベンゼンを用いて結晶化した 20 gr の Orcinol と 13.5gr の硫酸第二鉄アンモニウムを蒸留水に溶解して 500 ml にする。これを stock reagent として冷暗所に保存する。リボースの量を定量するにあたり、25ml の stock reagent に 415 ml の濃塩酸を加え、さらに水を加えて全量 500ml にする。この試薬 9ml を 3ml の試料溶液に加え、沸騰水のなかで20分間放置したのち、水道水で冷却すると緑色の溶液となる。これを 660 m $\mu$  の波長で 1cm のガラスセルを使用して分光光度計によつて吸光度を測定する。対称は 3ml の溶媒について同様の方法を行う。以上の方法によりえられた値を、あらかじめ純粋なりボースを試料として作った標準曲線にてらし合わせ、リボースの

図 3. Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームおよびリボゾームタンパクの超遠心分析像

#### 1. リボゾームの超遠心分析像（回転数 31,820 rpm）

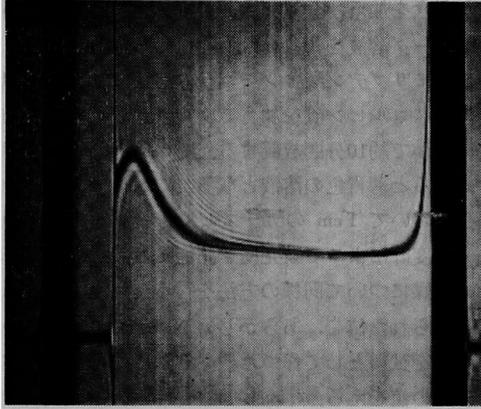


3 分後

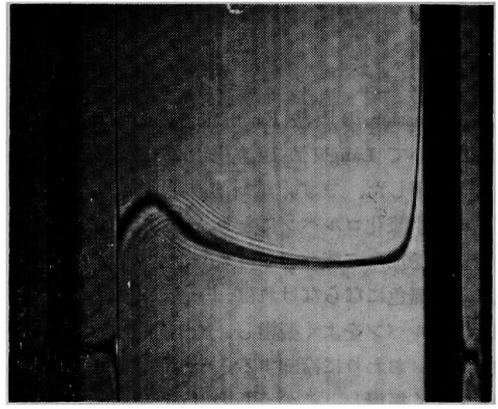


15 分後

## 2. リボゾームタンパク (Peak 3) の超遠心分析像 (回転数 60,000 rpm)



15 分 後



45 分 後

値をえる。

実験成績：リンの値を1として、それに対する窒素およびリボースの相対的なモル比を求めたところ、腫瘍リボゾームについては、P:N:Ribose=1:1.46:1.09, Peak 3 については、P:N:Ribose=1:1.7:0.005 であった。

## 第5節 超遠心分析

実験方法：腫瘍リボゾーム、および Peak 3 について、UCA-1 型日立分析用超遠心機を使用して、超遠心分析を行った。リボゾームは、回転数 31820 rpm で、Peak 3 は 60000rpm で分析した。

実験成績：両者の超遠心分析像は、図3に示す如くである。この分析結果から算出されたリボゾームの沈降定数は 75 S<sub>20w</sub>, Peak 3 のそれは 1.59 S<sub>20w</sub> であつた。また Svedberg<sup>11)</sup> らの方法で Peak 3 の分子量を算出したところ約 6000 であつた。

## 第6節 アミノ酸分析

実験方法：冷凍乾燥した Peak 3 の試料 0.2gr に 2 ml の 6N HCl を加え、110°C の恒温槽のなかに 24時間放置し加水分解を行う。これを試料として、Amberlite CG-120, Type 3 を担体とした Aminoacid Analyzer Model LC-5 によりアミノ酸分析を行い、

図 4. Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームタンパク (Peak 3) のアミノ酸分析像

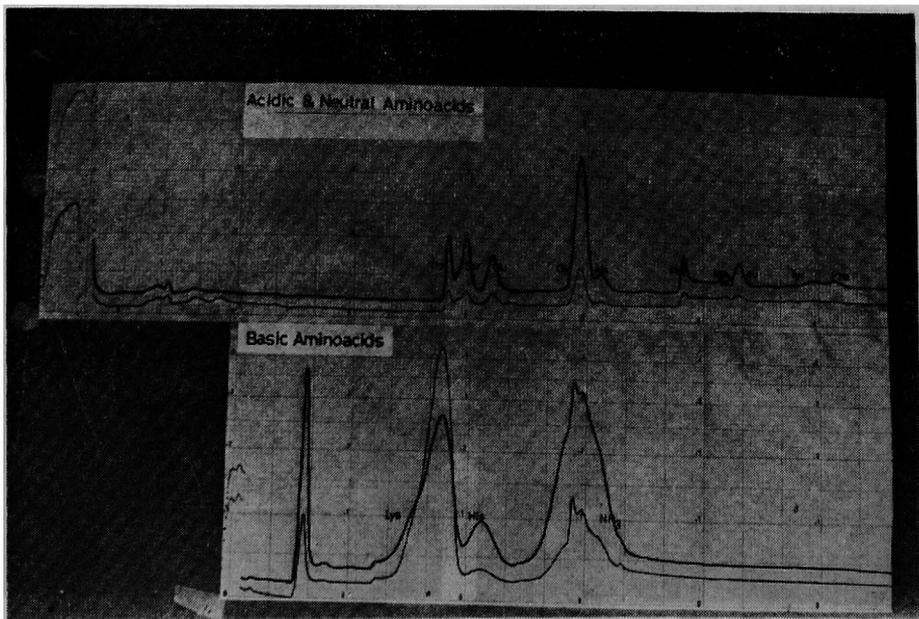


表2 Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームタンパク (Peak 3) のアミノ酸組成

threonine	4.4 %
serine	8.4
glutamic acid	6.7
glycine	30.7
alanine	4.0
methionine	3.6
isoleucine	2.2
leucine	3.1
tyrosine	1.8
phenylalanine	1.8
lysine	27.6
histidine	5.8

そのアミノ酸組成を検討した。

実験成績：図4と表2に示すごとく，グリシン，リジンに富んでおり，チロシン，フェニールアラニンに乏しいことが明らかとなった。

#### 第7節 ディスク電気泳動<sup>12)13)</sup>

実験方法：

##### 1) 装置

ミツミ化学産業株式会社より市販されているディスク電気泳動装置を使用した。泳動用ガラス管は、内径 5mm、長さ 80mm のものを使用した。そのほか、主なものとしてガラス管立て（ガラス管の下端が密閉されるように作ったもの）、ゲル調製用注射器（10～20ml）、ポリエチレンチューブ、ゲル取出し用金属製針、蛍光灯（20ワット）、脱染色用ガラス管（内径 8mm、長さ 80mm）、脱染色時使用するビスキングチューブ（脱染色用ガラス管の下端を塞ぐために使う）。

##### 2) 試薬

主な試薬は

acrylamide monomer（生化学工業株式会社）

N, N, N, N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)

（重合促進剤）（東京化学工業株式会社）

N, N-methylenebis-acrylamide (BIS)（架橋剤）

（和光純薬工業株式会社）

riboflavine（光重合用触媒）（和光純薬工業株式会社）

glycine（和光純薬工業株式会社）

Amido black 10B（第一化学薬品株式会社）

Sudan black B (E. Merck AG. Darmstedt) である。

これらの試薬を用いて、表3に示すごとく、保存溶液、使用液、電極槽用緩衝液を調製した。脱染色

表 3

1. 保存溶液		
A 溶液 (pH 2.9)	IN KOH 氷酢酸 TEMED ad qs	12 ml 53.25 ml 1.15 ml 100 ml
B 溶液 (pH 5.9)	IN KOH 氷酢酸 TEMED ad qs	48 ml 2.95 ml 0.46 ml 100 ml
C 溶液	acrylamide BIS ad qs	15 gr. 0.4 gr. 100 ml
D 溶液	acrylamide BIS ad qs	10.0 gr. 2.5 gr. 100 ml
E 溶液	riboflavin ad qs	4.0 mg 100 ml
F 溶液	glycine 氷酢酸 ad qs	28.1 gr. 3.06 ml 1.0 l
2. 使用液		
分離用ゲル溶液		
A 液	1 容	) を光重合
C 液	2 "	
E 液	1 "	
水	4 "	
試料用、濃縮用ゲル溶液		
B 液	1 容	
D 液	2 "	
E 液	1 "	
水	4 "	
3. 電極槽用緩衝液		
F 溶液を使用		

用溶液は7%酢酸溶液を使用した。

##### 3) 操作法

###### a) 分離用ゲルの調製

ガラス管をゴム栓つきのガラス管立てに垂直に立て、新しく作った分離用ゲル溶液を表3に示してある割合でポリエチレンチューブを用いて注射器に吸取り、よく混合する。つぎにチューブを通してガラス管にしづかに注ぐ。酸素との接触は重合を阻害するから溶液の表面を蒸留水で覆う。1/4 皮下針を用いてしづかにガラス管壁に沿って水を重畳する。水層は3～4mmの高さとした。これを蛍光灯下に光重合させた。ガラス管と蛍光灯との距離は約8cmに保つた。重合には数時間を要した。

###### b) 濃縮用ゲルの調製

分離用ゲルの光重合が終ると、ガラス管内の水を捨て、少量の濃縮用ゲル溶液で管内を洗ったあと、分離用ゲルの上にしづかに濃縮用ゲル溶液を加え（約8～9mmの高さ）、上面を水層で覆う。重合までに約20分を要した。

## c) 試料用ゲルの調製

濃縮用ゲルの重合が終ると、管内の水を捨て、試料用ゲル溶液(表3参照) 0.3 ml に、脱塩した Peak 3 を約 300  $\mu$ g 加えた。この溶液 0.15 ml を濃縮用ゲルの上部にのせて重合を行った。重合には 30 ~ 60 分を要した。

## d) 電気泳動

試料用ゲルの重合が終ると、ガラス管立てからガラス管をはずし、電気泳動装置の上部電極槽の底につけたゴム栓の穴に垂直にさしこみ、上下両電極槽に緩衝液(表3参照)を入れ、電極は上をプラス、下をマイナスとし、20°C、泳動時 pH 2.3 の条件下で泳動を開始した。電流は、ガラス管 1 本あたり 2.5 mA で約 90 分間泳動した。

## e) ゲルの染色

泳動終了後、ガラス管を上部電極槽からとりはずし、水を満した水槽中に移し、水中でガラス管からゲルをとり出した。とり出したゲルを染色液(Amid black 10B 液)に浸し、一昼夜放置した。

## Sudan black B による泳動前染色

染色液は、0.1 gr のズダン黒Bを 1 ml の酢酸エチルに室温で溶解し、これに 9 ml のプロピレンジリコールを加えて調製する。この染色液を泳動用試料に 5 : 1 (v/v) の割合で加え、よく攪拌し振盪後、15 分間卓上遠沈し、過剰の色素を除いた。以上の処置ののち電気泳動を行った。

## f) 脱染色

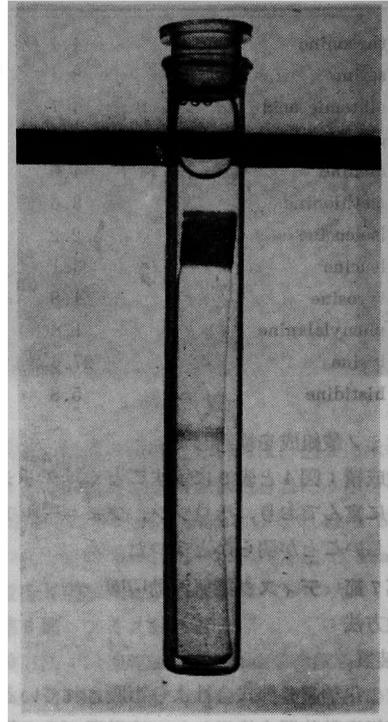
染色したゲルを脱染色用ガラス管に入れ、下端をビスキングチューブで覆い、上部電極槽に泳動用ガラス管をとりつけたのと同じ要領でとりつけ、上下両電極槽に 7% 酢酸溶液を入れ、下の電極をプラス、上をマイナスとして泳動を開始した。管あたり 10 mA の電流を通じた。自然脱染色では、脱染色に数日を要した。

実験成績：以上の方法により、Peak 3 についてディスク電気泳動を行った結果、図 5 に示すごとく、中間部に  $\gamma$ -グロブリンよりも強い塩基性の移動度を持つ単一で明瞭なバンドが認められた。すなわち、Peak 3 は電気泳動的に単一である。

第 8 節 ペーパークロマトグラフィー<sup>14)</sup>

Peak 4、および Peak 5 の紫外線吸収極大値が 260  $m\mu$  に近いことから、両者は核酸成分であると推定されるが、さらに確認するために、ペーパークロマトグラフィーによる核酸の塩基組成分析を行った。

図 5. リボゾームタンパク (Peak 3) のディスク電気泳動



## 実験方法：

## 1) 試料の加水分解

冷凍乾燥した Peak 4、Peak 5 の各粉末試料 0.2 gr に 1 N HCl 2 ml を加え、100°C で 60 分間加熱し加水分解した。この分解液そのままを分析試料とした。

## 2) ろ紙

ろ紙は東洋ろ紙 51A を使用した。

## 3) 展開溶媒

Peak 4 の分析には、Peak 4 がリンをほとんど含まなかつたので、これはヌクレオシドと考え、ヌクレオシドの分離に適する溶媒、すなわち n-butanol : 水 : 濃アンモニア = 86 : 14 : 5 の組成を持つ混合溶媒を使用した。

また、Peak 5 の分析には、Peak 5 がリンをかなり含有していたので、これはヌクレオチドと考え、ヌクレオチドの分析に適する溶媒、すなわち、イソ酪酸 : 0.5 N アンモニア水 = 10 : 6 の組成を持つ混合溶媒を使用した。

## 4) 展開

展開は 23°C の室温において、密閉したガラス容器内で、上昇法で行った。展開終了後、ろ紙はよく風乾して、波長 260  $m\mu$  付近の紫外線をあてて物

質の検出にあつた。

実験成績：試料 Peak 4 のペーパークロマトグラフィーでは、Rf 値 0.02 と 0.22 の 2 個の紫外線吸収スポットが認められ、この Rf 値から、グアノシン、およびウラシルあるいはアデノシンと考えられた。また試料 Peak 5 については、Rf 値 0.29 の 1 個の紫外線吸収スポットが認められた。この Rf 値から、グアニル酸あるいはウリジル酸と考えられた。

#### 第 9 節 小 括

腫瘍リボゾームダイジェストを試料として、DEAE-Sephadex A50 により溶出分画された Peak 1 については、その紫外線吸収スペクトルが、純品 DNase の紫外線吸収スペクトルと一致することから、これは、第 2 章、第 3 節において遠沈分離操作の際に加えた DNase が溶出されたものであり、また Peak 2 については、その紫外線吸収スペクトルが、純品 RNase の紫外線吸収スペクトルと一致することから、同じく遠沈分離操作の際に加えた RNase が溶出されたものと判定した。

Peak 3 の紫外線吸収極大値は  $268\text{m}\mu$ 、吸収極小値は  $232\text{m}\mu$  であるが、この吸収極大値は、トリプトファン、チロシン、フェニールアラニンなど芳香環を含有する蛋白質の吸収極大値  $280\text{m}\mu$  と、核酸の吸収極大値  $260\text{m}\mu$  との大体中間の値を示す。この物質の化学的成分分析は P : N : Ribose = 1 : 1.7 : 0.005 であり、リボースの量は無視されてもよい量である。また Peak 3 について、蛋白質定性反応を行つてみると、ニンヒドリン反応、ビュウレット反応、Pauli 氏反応はいずれも陽性、キサントプロテイン反応および Millon 氏反応は陰性であつた。従つて、この物質はペプチドか、あるいは蛋白質であつて、チロシン、トリプトファン、フェニールアラニンはごく少量しか含まれないものと考えられる。このことは、この物質のアミノ酸分析の結果（図 4 および表 2）とも一致する。この物質はリボゾーム上で合成された蛋白質と推察され、以下リボゾームタンパクと呼ぶことにする。

Peak 4、Peak 5 は紫外線吸収極大値が  $260\text{m}\mu$  附近にあること、またペーパークロマトグラフィーの結果から核酸成分が溶出されたものと思われる。

#### 第 4 章 考按ならびに総括

癌に対する特異抗原の存在はまだ確認されていないが、その存在性をうらずける研究は数多くなされ

ている。Maisin<sup>15)</sup> は肝癌のマイクロゾーム分画中に特異抗原らしきものを見出し、また教室の中島<sup>3)</sup> は Ehrlich 腹水癌移植腫瘍細胞で感作した局所リンパ節細胞が、癌細胞たる target cell に対して抵抗性を持つており、それは実験によると膜様構造物質に含まれていると考えられると論じている。矢吹<sup>16)</sup> は、Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾーム上で生合成されていると考えられる蛋白質（リボゾームタンパク）が、免疫化学的に Ehrlich 腹水癌細胞に特異性を示したと報告しており、興味深いことである。

私がしらべたこのリボゾームタンパクの性質をもう一度ここでまとめてみると、

- 1) 紫外線吸収極大値は  $268\text{m}\mu$ 、極小値は  $232\text{m}\mu$
- 2) 沈降係数は 1.59 S<sub>20w</sub>、分子量は約 6000
- 3) リン、窒素、リボースの成分比は、  
P : N : Ribose = 1 : 1.7 : 0.005
- 4) 蛋白質定性反応
  - a) ニンヒドリン反応 陽性
  - b) ビュウレット反応 陽性
  - c) Pauli 氏反応 陽性
  - d) キサントプロテイン反応 陰性
  - e) Millon 氏反応 陰性
- 5) 塩基性アミノ酸は、酸性、中性アミノ酸よりも多く、リジンに富み、チロシンは少い。
- 6) ディスク電気泳動で、血清  $\gamma$ -グロブリンよりも強い塩基性を持つ単一のバンドを示す。

ここにとり出したリボゾームタンパクは、DNase、RNase 処理を行つており、さらに、クロマト処理を加えているので、DNA、RNA の残基が混在する可能性は考えられない。これらのことから、この研究に用いられたリボゾームタンパクはかなり純粋なものといえよう。

このリボゾームタンパクは、その化学成分比にみられるように、かなり多量のリンを含有することから、核タンパク質あるいは磷タンパク質と考えられる。

癌細胞で合成される蛋白質に何らかの特異性があるとするれば、蛋白質が合成される場であるリボゾームに特殊性があるのか、あるいは情報伝達の役割をはたす m-RNA によつてその特異性がもたらされたものと考えられる。

アミノ酸の配列を決定する因子として、DNA からの情報を伝達した m-RNA がリボゾーム上で合成されつつある蛋白質の特殊性をもたらしたとすることは、もつとも妥当な推論であろう。

Wallach<sup>17)</sup>によると、癌細胞が示す転移性、浸潤性、さらには異常な増殖性は、表面膜に代表される細胞膜系における異常蛋白質の出現に原因すると考えられている。われわれの精製したリボゾームタンパクが癌細胞のどの部分に利用されて、さらに強い癌特異性を持つようになるのかということを考えるとき、Wallach<sup>17)</sup>の考えの如く、膜構造のなかに入って癌の一部を構成し、中島<sup>9)</sup>のいう癌抗原となると想像することは大胆な推論であるが、これらのことは今後の研究にまたなければならぬ。すくなくとも、私の精製した Ehrlich 腹水癌移植腫瘍のリボゾームタンパクが Ehrlich 腹水癌細胞の特異性を示す蛋白質の何らかの骨格となるであろうことを強調したい。

#### 第 6 章 結 語

Ehrlich 腹水癌移植腫瘍より、リボゾームをとり

出し、さらにリボゾーム上で合成されていると考えられる蛋白質を精製し、癌特異性、癌抗原としての可能性などについて論じた。腫瘍リボゾームの紫外線吸収極大値は 260 m $\mu$ 、極小値は 237 m $\mu$ 、沈降係数は 75 S<sub>20w</sub> で、その化学成分比は P : N : Ribose = 1 : 1.46 : 1.09 であつた。精製したリボゾームタンパクの紫外線吸収極大値は 268 m $\mu$ 、極小値は 232 m $\mu$  であり、沈降係数は 1.59 S<sub>20w</sub>、分子量は約 6000、化学成分比は P : N : Ribose = 1 : 1.7 : 0.005 で核タンパク質あるいは磷タンパク質と考えられる。また電気泳動的に単一で、アミノ酸は塩基性アミノ酸、とくにリジンに富んでいた。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜つた田中早苗教授、山本泰久講師に深甚の謝意を表します。  
(本論文の要旨は第26回日本癌学会総会および第40回日本生化学学会において発表した)

#### 文 献

- 1) 平井秀松 : 生化学 36, 241 (1964).
- 2) 岡野 彪 : 岡山医学会雑誌 80, 411 (1968).
- 3) Youichi Nakashima : Acta Medicinæ Okayama 23, 95 (1969).
- 4) 只友康雄 : 岡山医学会雑誌 80, 677 (1968).
- 5) 矢吹安央 : 岡山医学会雑誌 82, (1970. 5, 6)
- 6) Jiro Sato, Shoko Matsuda, Tamae Yabe, Keiji Usui, and Masahiko Noda : Bull. Cancer Inst., Okayama Univ. Med. School. 1, 42 (1961).
- 7) 高浪 満 : 蛋白質, 核酸, 酵素 11, 490(1966).
- 8) Calvin A. Lang : Analytical Chemistry, 30, 1692 (1958).
- 9) W. R. Morrison : Analytical Biochemistry, 7, 218 (1964).
- 10) David Glick : Methods of Biochemical Analysis Vol. 1, Interscience Publishers, INC., New York (1961).
- 11) T. Svedberg and K. O. Pedersen : The Ultracentrifuge, Clarendon Press, Oxford (1940).
- 12) John T. Clarke : Ann. N. Y. Academy of Sciences, 428, 121 (1967).
- 13) 永井 裕 : 蛋白質, 核酸, 酵素 11, 744(1966).
- 14) 竹村彰裕ほか : 蛋白質, 核酸, 酵素 11, 516 (1966).
- 15) Maisin, J. : Arch. Sci. Med., (tor.) 113, 3 (1962).
- 16) 高浪 満 : 生化学 35, 293 (1963).
- 17) D. F. H. Wallach : Proc. Natl Acad. Sci., 61, 868 (1968).

## Studies on the Ribosomal Protein of Ehrlich Ascites Tumor

By

Dairoku JITSUIKI

The Department of Surgery, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Sanae Tanaka, M. D.)

The ribosomal protein of the Ehrlich Ascites tumor was purified.

The maximum absorbancy of the ribosome was 260  $m\mu$  and the minimum was 237  $m\mu$ . The sedimentation coefficient of the ribosome was 75  $S_{20w}$ , and the chemical composition of P:N:Ribose was 1:1.46:1.09.

The purified ribosomal protein was electrophoretically single, and the maximum absorbancy was 268  $m\mu$  and the minimum was 232  $m\mu$ . The sedimentation coefficient of the ribosomal protein was 1.59  $S_{20w}$ . The molecular weight presumed about 6000. The chemical composition of the ribosomal protein of P:N:Ribose was 1:1.7:0.005.

These results indicated that the ribosomal protein was nucleoprotein or phosphoprotein. The components of the ribosomal protein were rich in basic amino acids, especially lysin, and poor tyrosine and phenylalanine.

---