

P-41

5-azacytidineによるヒトTIG-7細胞の
部位特異的クロマチン脱凝縮と小核の誘発

○佐藤卓朋¹, 山本清高², 三浦邦彦¹,
石館 基¹ (¹オリンパス光学・染色体研,
²都老人研・細胞生物)

男性胎児肺線維芽細胞株, TIG-7は, ヒト正常細胞として *in vitro* における細胞の老化／不死化の研究に広く用いられている. 我々は, これまで, TIG-7の染色体につき, 分染法による解析, flow-karyotyping, およびFISH(SKY)解析を実施してきた. その結果, 核学的には正常と判断されたが, rDNAの増幅に伴う異形性15番染色体(15p+)を保持していることが確認された. このrDNA増幅部位は, GC塩基対に特異的な蛍光染色剤, Chromomycin A₃に対して陽性であり, 銀染色では陰性であるため, メチル化によって, 遺伝学的に不活性となっていることが想定された.

今回我々は, 脱メチル化剤として知られている 5-azacytidine (5-azaC)を処理することにより, この部位のクロマチンが選択的に脱凝縮することを見出した. 即ち, 5-azaCを 0.5 μMで, 24時間連続処理した場合(約80%生存条件下)では, ほとんど全ての分裂中期細胞において, 15p+のクロマチン伸長現象のみが認められ, その他の部位では, 構造異常は認められなかった. また, 同時に誘発された小核について, ヒトrDNAをプローブとしたFISH解析を行ったところ, 15p+のrDNA領域に由来すると考えられる小核が約50%出現した.

以上の結果より, 15p+は, 脱メチル化剤, 5-azaCに対して高感受性であり, クロマチンの脱凝縮と, それに伴うDNA切断により, 高頻度に小核を形成することが示唆された.

P-42

Benzo[a]pyrene および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene で誘発された染色体の数的異常と紡錘体形成および tubulin 重合への影響

○松岡厚子, 室伏擴¹, 坂本浩子, 林 真, 祖父尼俊雄 (国立衛研・変異遺伝, ¹東大・理・生物化学)

【目的】過去2回の本学会で, 我々は, 発癌物質 benzo[a]pyrene(BP) および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)が代謝的活性化系非存在下, チャイニーズハムスター由来培養細胞株 V79-MZで特異的にかつ安定に染色体の数的異常を誘発し, 特に DMBA によって誘発された倍数体は DMBA 洗浄後, 非可逆的に2ヶ月まで維持されることを報告した. 今回は, この数的異常誘発機構解明のため, BP および DMBA の紡錘体形成および *in vitro* tubulin 蛋白重合への影響を調べた.

【材料と方法】スライドグラス上で培養した V79-MZ 細胞を BP および DMBA で 24 時間処理し, 固定後, 抗 β-tubulin 抗体で間接的に染色し, 蛍光顕微鏡下紡錘体を観察した. また, *in vitro* tubulin 蛋白の重合阻害は, 正常に形成される微小管による 350 nm での濁度の変化で測定した.

【結果および考察】BP 処理後, 紡錘体が正常な分裂期細胞は用量依存的に減少し, また, 分裂中期細胞の割合が増加した. DMBA2 および 4 μg/ml 処理により, 紡錘体が正常な細胞はなくなり, また, ほとんどが分裂前中期または中期の細胞であった. BP 処理後は主に不完全な紡錘体形成(不均衡な2極紡錘体, 多極紡錘体)が観察されたのに対し, DMBA 処理後は紡錘体が全く観察されなかった. また, tubulin 10 μM に対し, BP(31 μM)および DMBA (32 μM)を添加し, 37°Cで反応させた実験では, tubulin の重合は対照群と同様に進行し, BP および DMBA それ自身には, tubulin 重合阻害作用がないことが判明した. BP および DMBA は V79-MZ 細胞内で何らかの変化をうけ, 二次的に染色体の数的異常を誘発したと考えられる.