

筋肉corninおよび角膜corninのDNA合成抑制因子について

岡山大学医学部第一生理学教室

西田 勇・村上 哲英・牧山 政雄
大野 尚文・半井 昭英・垣内 一郎
池宗 宏典・大月 恒・智片 芳子

〔昭和47年6月6日受稿〕

著者等は、角膜、筋肉をはじめ種々の組織から、一定の方法によって抽出したcorninが、ウニ受精卵を含む数種の細胞の分裂を抑制することを報告してきた。¹⁻⁴⁾ウニ卵に対して強い分裂抑制効果をもつ筋肉corninおよび角膜corninは、培養哺乳動物細胞に対しては、ウニ卵に対する有効濃度の $10^3 \sim 10^4$ 倍の濃度で、はじめて増殖抑制効果やDNA合成抑制効果を示す。ウニ卵分裂抑制効果については、DEAE-cellulose columnによって分けた、筋肉corninおよび角膜corninの夫々の分画のうち、2つの分画に共に強くみられた。⁵⁾これらは、いずれもまだ均一なものではないが、核酸成分を含む点で共通しており、他の知見⁶⁾とも合わせて、核酸誘導体と分裂抑制因子との関連が示唆された。

一方、哺乳動物細胞のDNA合成抑制因子については、それがウニ卵分裂抑制因子と同じであるか否かは別として、DEAE-celluloseによる分画の収率が低いために、未だ分離精製の試みがなされていなかった。

今回、著者等は、培養細胞を用いて、DNA合成抑制効果を指標に、筋肉corninおよび角膜corninの活性因子の精製を試みた。その結果、部分的に精製された分画と活性の関係について報告する。

材 料 と 方 法

1. corninの抽出および分画

筋肉corninおよび角膜corninは、各々ウサギ骨格筋およびウシ角膜より、西田等の方法⁵⁾に従って抽出した。

2~5% cornin水溶液をセロファンチューブ(Visking)に入れ、氷室で、蒸留水に対して、48時間以上透析を行った。チューブ内液はそのまゝ、外液は30~40℃でロータリーエバポレーターによって濃縮の後、凍結乾燥し、各々U分画、D分画として、ひきつづきゲル濾過法による細分画を行った。

0.1M-NaClで洗ったSephadex G-25(medium)をカラム(2.8×40cm)に充填、蒸留水で洗い流した後、試料1回につき50mgを蒸留水にて溶出した。溶出速度は36ml/h、流出液は3mlづつ分取、OD₂₁₀およびOD₂₅₀(角膜corninの場合はOD₂₆₀)を測定した。筋肉cornin D分画の流出液については、Gomori法⁷⁾による無機燐の定量を行った。吸光度の溶出パターンに従って、流出液を数区域に分けて集め、濃縮、凍結乾燥した。各分画の紫外外部吸収測定には日立分光光度計を使用した。

2. ribonucleotide組成の分析

筋肉corninも角膜corninも、かなり低分子のpolyribonucleotideを含むので、PCA(perchloric acid)可溶性部分と、PCA不溶性部分に分け、大沢等の方法⁸⁾に従って、ribonucleotideの分析を行った。即ち、アルカリ分解した試料を、Dowex(1×2)200~400 mesh ギ酸型カラム(0.6×23cm)にかけ、蒸留水から始めて4Nまで連続的にギ酸の濃度を高めて溶出した。溶出速度は12ml/h、溶出後各nucleotideのピークを集め、デシケーター中で十分に溶媒を除いて、250、280および290mμの各波長にける吸収と260mμの吸収の比を求める方法、ならびにギ酸分解して、既知の核酸塩基を標準として、paper chromatographyを行うことにより同定した。

3. DNA合成抑制効果の測定

使用した培養細胞株は、ドンリウ系ラット肝由来の上皮性細胞RLN-10⁹⁾、バツファローラット肝由来の上皮性細胞BuL(43代)、dimethyl amino azo benzene誘発ラット肝癌由来の腹水肝癌細胞C83T、SV40ウイルス誘発ハムスター線維肉腫由来のHE13TMR、¹⁰⁾マウス線維芽細胞L、およびミドリザル腎由来のVero細胞であった。

細胞の増殖培地は、RLN-10、BuL、C83Tが牛血清20%添加LD(ラクトアルブミン5%添加D塩類溶液)、HE13TMRが仔牛血清10%添加Eagle

MEM, Lが牛血清10%添加YLE, Veroが牛血清5%添加YLEであった。

これら培養細胞への H-thymidine(TdR) の取りこみにより DNA 合成を測定した。各々の系の細胞は、TD型培養びんに 5×10^4 /ml で 8 ml ずつ植えこみ 24 時間又は 48 時間後に、cornin と $^3\text{H-TdR}$ 0.5 又は $0.6 \mu\text{C}/\text{ml}$ を含む無血清培地に変えて、5 時間後に細胞を回収した。回収には、まず cold TdR 0.1 mg/ml 含有 PBS (phosphate buffered saline) で 2 回細胞表面を洗った後、EDTA 0.02%-trypsin 0.25% 含有 PBS で 37°C 5 分間処理し、pipetting して細胞浮遊液を得た。 $^3\text{H-TdR}$ の取りこみは、DNA 当りの取りこみ量と、培養びん当りの総取りこみ量の両者を測定した。まず、培養びん当りの総取りこみ量を測る場合は、1 びん当りの細胞を、吸引濾過装置を用いて Millipore filter HA (0.45μ) 上に集め、PBS で 1 回洗った後、0.5 N PCA で洗い、更にエタノールで固定した。もう一度、0.5 N PCA で 0°C にて 2 時間処理して可溶性成分を除き、エタノールで PCA を充分除去した後、toluene scintillator 中に filter を入れ、液体 scintillation counter (Packard 3003) により放射能活性を測った。一方、DNA 当りの比活性として $^3\text{H-TdR}$ の取りこみを測定する場合は、細胞浮遊液を 5 回凍結融解した後、Schmidt-Tannhauser の方法¹²⁾ で DNA 分画を抽出、その一部で $260 \text{ m}\mu$ での吸光度による DNA の定量を行い、残りを Bray の scintillator に加え、放射能活性を測定した。これらの方法で求めた $^3\text{H-TdR}$ 取りこみ量の control に対する割合で DNA 合成抑制効果を比較した。

結 果

既に報告したように、¹⁵⁾ 筋肉 cornin、角膜 cornin はラット肝細胞由来の RLN-10 株に対して、DNA 合成抑制効果を有する。細胞の種類によって、このような効果に差があるかどうかを、まず調べるため

Table 1
The inhibitory effect of cornin (0.5% RMCU)
on DNA synthesis in different cell lines.

cell line	origin	$^3\text{H-TdR}$ incorporation (% of control)
RLN-10	rat liver	56
BuL	"	77
CB3T	rat ascites hepatoma induced by DAB	56
L	mouse fibroblast	59
HE12THR	hamster tumor induced by SV40	70
Vero	monkey kidney	74

に、数種の細胞株について、 $^3\text{H-TdR}$ 取りこみにおよぼす筋肉 cornin U 分画の影響を比較した (Table 1)。この結果だけから cornin の抑制効果と細胞種の間を論ずることはできないが、使用したかぎりの細胞では、それほど大きな差はないと考えられるので、以下 RLN-10 を用いて cornin の活性を追求した。

次に、活性測定条件を検討するため、cornin の量、および作用させる時間と $^3\text{H-TdR}$ の取りこみとの関係を調べた。

Figure 1.
Dose response curves of the incorporation
of $^3\text{H-TdR}$ into RLN-10 cells.

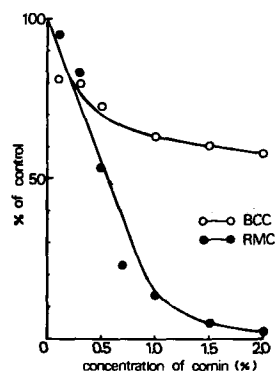
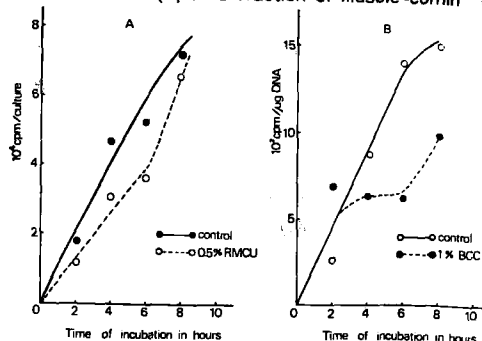


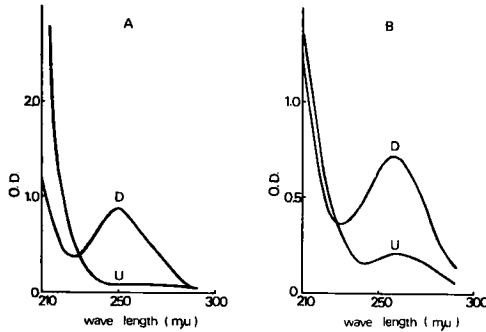
Figure 1 の dose-response 曲線から、濃度 0.5% 以上での筋肉 cornin と角膜 cornin の作用の違いが示された。筋肉 cornin は、濃度の増加に伴いほとんど 100% まで DNA 合成を抑えるが、角膜 cornin は検べた範囲では高々 40% までしか抑制しない。筋肉 cornin 1.5% 以上では、細胞の viability はほとんど 0 に近く、この濃度の筋肉 cornin は強い殺細胞効果を持つと言える。一方、角膜 cornin の殺細胞効果は非常に弱い。濃度 0.5% における作用時間と活性の関係では、両 cornin とも同様に、作用開始後 6 時間以上経過すると、細胞が抑制から回復する傾向がみられた (Figure 2)。

Figure 2.
Time study of the incorporation of $^3\text{H-TdR}$
into RLN-10 cells in the presence of
cornea-cornin (A) or U fraction of muscle-cornin (B).



この現象については以前にも述べた¹⁵⁾。これらの結果から、corninの抑制効果測定条件としては、濃度0.5%、作用6時間が最も適当と考えられた。

Figure 3. Ultra violet absorption spectra of D-fraction and U-fraction from muscle-cornin (A) or from cornea-cornin (B).



まず透析により分けられた cornin のセロファン膜透過性分画Dと非透過性分画Uの吸収曲線(Figure 3)から、筋肉cornin、角膜corninともに、D分画に明瞭な核酸塩基の吸収極大(250mμおよび260mμ)がみられる。従って、核酸成分は大部分が低分子の polynucleotide の形で存在していることがわかる。

両 corninのribonucleotide の形について分析を行い、Table 2の如き結果を得た。ここでは、corninをそれぞれ5%PCAに可溶性の低分子部分と不溶性の高分子部分とに分けて分析した。筋肉corninのribonucleotide組成は、主としてイノシン酸で、ほとんどすべて低分子であった。筋肉corninのPCA不溶性部分には、この方法ではnucleotideが検出されなかったため、Table 2には、筋肉 corninは全corninとPCA可溶性部分についての分析値を挙げた。

Figure 4. The elution pattern of Sephadex gel column chromatography of D fraction (A) and U fraction (B) from muscle-cornin. The yield of each fraction are indicated.

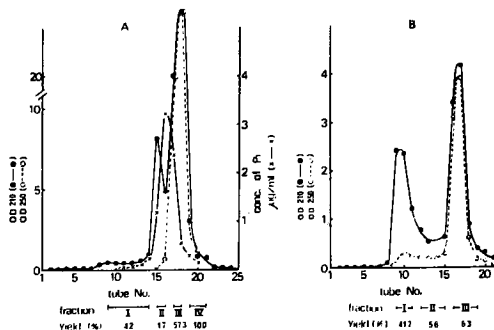


Table 2. Nucleotide composition of cornin ($\mu\text{M}/100\text{mg}$)

	cornea-cornin		muscle-cornin	
	PCA soluble	PCA insoluble	whole	PCA soluble
AMP	4.04	1.04	0.343	0.309
GMP	6.56	1.04	0.343	0.340
IMP	-	-	7.08	8.22
UMP	5.24	1.00	-	-
UMP	4.84	0.72	-	-

これに対して、角膜corninは、高分子核酸部分と、低分子poly-ないしmononucleotideを含むが、nucleotide量としては、低分子のものが多く、イノシン酸は含まれない。

corninのD分画、U分画について、ゲル透過による細分画を行った。Figure 4 (A, B)は、筋肉corninのD分画(RMCD)、およびU分画(RMCU)の溶出パターンである。RMCDはI~IVの4分画、RMCUはI~IIIの3分画に分けられた。RMCDの全回収率は73.2%であった。既に報告したように、¹⁵⁾ 筋肉corninは無機燐を含んでおり、無機燐の溶出ピークは、2つの紫外外部吸収のピーク(RMCD IIおよびRMCD III)の中間あたりに存在する。3つのピークは互に接近しており、特にRMCD IIと無機燐のピークは重なることが多く、RMCD IIおよびRMCD IIIから無機燐を除くことはできなかった。最後に溶出される紫外外部吸収ピークのうち、無機燐のピークが低下したところから後をRMCD IVとした。各分画の吸収曲線は、Figure 5 Aに示されている。RMCUの分画後の回収率は低く、蒸留水による溶出だけでは不十分と考えられる。RMCUからの3分画の吸収曲線を、Figure 5 Bに示す。この吸収曲線から、RMCU IIIにもイノシン酸が含まれることが推定されるが、量的には極く少量と思われ、透析が不完全のために残った可能性もある。角膜cornin D分画(BCCD)、およびU分画(BCCU)のSephadexゲルによる溶出パターンは、Figure 6のようになった。

Figure 5. Ultra violet absorption spectrum of each fraction from D fraction (A) or U fraction (B) of muscle-cornin.

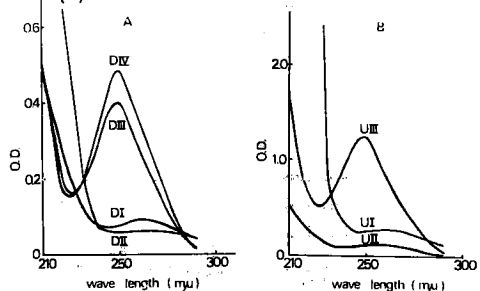
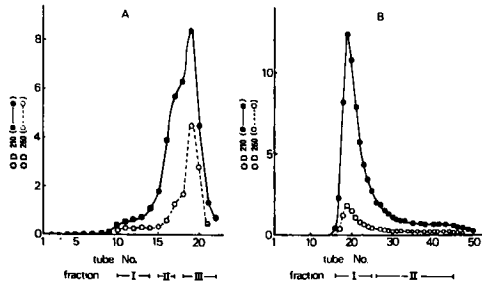


Figure 6.
The elution pattern of Sephadex gel column chromatography of D fraction (A) and U fraction (B) from cornea-cornin. The way of the effluent fractions pooled is indicated.



BCCUの分画は互にはっきり分離せず、BCCD IIも尾をひいて溶出される。これらの分画の吸収曲線はFigure 7に示す。

Figure 7.
Ultra violet absorption spectrum of each fraction from D fraction (A) or U fraction (B) of cornea-cornin.

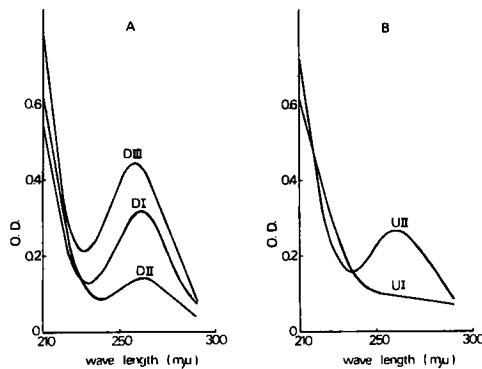
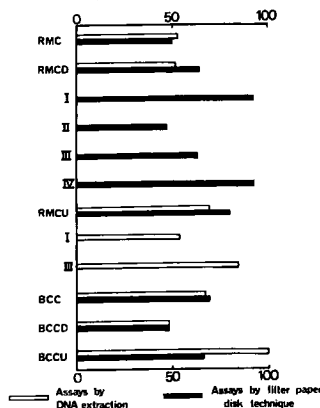


Figure 8.
Effect of cornin and of the fractions from cornin at each purification step on the incorporation of ^3H -TdR.

^3H -TdR incorporation (% of control)



以上の各分画について、方法の項に述べた如く、2通りの方法で、RLN-10細胞のDNA合成におよぼす抑制効果を測定した結果がFigure 8で、controlに対する ^3H -TdRの取りこみの割合で示し比較したものである。最も抑制効果の大きい分画は、筋肉corninではRMCD II、角膜corninではBCCDであった。BCCDおよびBCCUのSephadex gelによる細分画の活性は未検定である。RMCD IIは無機磷含量が最も高いと考えられ、BCCDはBCCUに比べてnucleotide含量が高い低分子の分画である。

そこで、無機磷、ribonucleotide類を、筋肉corninならびに角膜corninに含まれる各々の量に等しい量だけ添加した培地での、細胞の ^3H -TdR取りこみを測定し、筋肉cornin、角膜corninの抑制効果と比較したものがTable 3である。この結果から、分画前の筋肉corninによるDNA合成抑制効果は、筋肉cornin中の無機磷による抑制効果とほぼ同程度であることがわかった。また、角膜corninと同じ塩基組成のmonoribonucleotideの混合物が、角膜corninとほぼ同程度の抑制効果を示したこと、筋肉corninと同じ塩基組成の、イノシン酸を主としたmonoribonucleotideの混合物が、ほとんどDNA合成を抑制しなかったことは興味深い。

Table 3
Effect of cornin, of nucleotide mixtures and of inorganic phosphates on the incorporation of ^3H -TdR into RLN-10 cell

material	cpm/culture	% of control
muscle-cornin (0.5%)	180708	48
cornea-cornin (0.5%)	311791	83
nucleotide mixture A [§]	351992	94
nucleotide mixture B [§]	319437	85
Na-phosphate (4.3mg/ml)	170018	45
K-phosphate (3.8mg/ml)	160700	43

[§] The nucleotide mixture A was composed of 5.8 μg AMP, 6.1 μg GMP and 306.4 μg IMP per ml of culture medium, which was as same composition with 0.5% muscle-cornin, and the nucleotide mixture B was composed of 88.4 μg AMP, 137.4 μg GMP, 100.8 μg CMP and 90.0 μg UMP per ml of culture medium, as same composition with 0.5% cornea-cornin.

考 察

細胞増殖の制御機構を解明しようとする研究の中で、生体組織から制御物質の分離を試みた研究は数多く報告されている。

Bullough¹⁶⁻¹⁸⁾等は、マウス、ラット等の上皮細胞から、adrenalin と結合して上皮組織の細胞分裂を抑制するchaloneと呼ばれる物質を抽出した。chaloneの分裂抑制効果は、組織特異性を持ち、同じ組織に由来する腫瘍の増殖をも抑えることが示された。chaloneは顆粒球からも、また両棲類の腎からも抽出されたと言う報告がある。¹⁹⁾最近、Bullough²⁰⁾はchaloneとagingの関係についても言及しており、今後一層の解明を期待される制御物質の一つである。

Szent-Györgyi等が、^{21,22)}最初は胸腺の抽出液から出発し、他の組織の細胞や人の尿からも抽出した分裂抑制物質retineは、同様に細胞中に存在する分裂促進物質promineとともに、広く一般の細胞の増殖を調節している物質と考えられている。

他にも、Sims & Stillman,²³⁾Schmeer,²⁴⁾Parshley,²⁵⁾Burk,²⁶⁾Nilson & Philipson²⁷⁾等、生体に由来する増殖抑制因子の報告は多い。

我国においても、寺山等²⁸⁾が、正常肝抽出液から腹水肝癌細胞のDNA合成を抑制する因子を抽出している他、同じく肝から培養細胞の増殖抑制物質を抽出した鈴木等、²⁹⁾シイタケから移植癌に有効な多糖体を抽出した千原等³⁰⁾などの多くの報告がみられる。

ブタの上皮の抽出液から、エタノール分画法とcolumn electrophoresisで部分的に精製されたchaloneは、分子量30,000~40,000の糖蛋白である。³¹⁾Szent-Györgyi等のretineの本態はglyoxalの誘導体であるらしい。³²⁾寺山等の肝臓の因子は、酵素であると言われている。しかし、特異的な増殖制御物質として、純粋な形で単離されたものは現在のところ無いと言えるであろう。

corninに関しても、これまで生物学的作用の検定、作用機序の解明に用いられたのは、かなり粗な抽出分画であった。生体内の細胞分裂制御因子としてのcorninの性格を確立するためには、精製を行い、できるかぎり単一な物質として取り出すことが必須である。

本実験では、in vitroの哺乳動物細胞のDNA合成抑制効果を指標として、corninの精製を試みた。細胞の増殖に対する効果を検定するには、細胞数、蛋白合成などを併せて測るべきであるが、ここではDNA合成活性のみについて測定した。次の段階で、

増殖との関係についても検討する必要がある。

DNA合成の測定は、DNA分画抽出による測定と、filter disk法で培養びん1本当たりの細胞の取りこみを測定する2つの方法で行った。培養びん当たりの細胞数のばらつきを考慮すると、DNA当りで求めた方がより正確であると思われる。Figure 8からわかるように2つの方法で求められた測定値は、ほぼ同じ傾向を示しているが、BCCUの場合のように、かなり差がある例があった。

透析 Sephadex gel 過渡法によって、筋肉cornin、角膜corninはいくつかの分画に分けられたが、これらの分画の中で、もとのcorninに比べて特に著しい活性を示す分画はみられず、活性は数個の分画に分散された。

角膜corninについては、ゲル過渡による細分画は未検定であるが、透過性の低分子分画Dの方が、高分子性のU分画に比べて活性が高いことが示された。D分画は、U分画に比べてnucleotide含有率が高く、それらはmonoないし低分子polynucleotideの形で含まれている。Table 2に示したように、角膜corninと同じ組成のmononucleotide混合物のDNA合成抑制効果が、角膜corninの抑制効果とほぼ等しいことは興味深い。両者の間に何らかの関係があるかどうか、これだけの結果から判断することはできない。

筋肉corninについては、無機燐の除去を充分に行うことはできなかった。低分子D分画については、主としてイノシン酸を含むD-IV分画にほとんど活性が無かったことは、Table 3の主としてイノシン酸からなるnucleotide混合物にほとんど活性がみられない事とともに、筋肉corninが多量のイノシン酸を含むという特徴は、活性とは無関係であることを示していると言えよう。また、同じくTable 3に示すように、この実験に用いた濃度の無機燐塩のDNA合成におよぼす影響が筋肉corninの効果とほぼ等しいという結果から、筋肉corninのDNA合成抑制効果が、越宗等³³⁾も指摘したように、核酸合成過程の燐酸化反応において、過剰TdRによる抑制と同様の、無機燐による拮抗作用であった可能性が示された。しかし、無機燐を含まないU-I分画にみられる抑制効果については、今後更に検討する必要があるし、別の方法で無機燐を除いた低分子分画についても、今一度検討の余地がある。

以前に報告したウニ卵の分裂抑制効果とcorninの分画の関係においても、DEAE-celluloseで分けた3つの分画を更にSephadexで分けると、いずれも低分子で核酸塩基の吸収極大をもつ分画の方が活性が高

い傾向がみられた。これは、本実験の DNA 合成抑制効果について示された傾向とよく一致している。

細胞が増殖するためには、多くの化学的・物理的変化の過程からなる細胞周期を回ることが必要である。増殖制御の機構も、単純なものではなく、おそらく多くの要素が複雑にからみあっているものと思われる。従って、細胞の増殖に対して何らかの抑制効果を示す物質は数多く存在する訳で、真の調節因子を見出すためには、細胞周期に関して、まだまだ多くの知見を集めなければならないであろう。

cornin に関しても、DNA 合成を抑えることによって細胞の増殖を抑制するのか、他の過程が阻害された結果、DNA 合成が低下してくるのか、未だ不明である。本実験の結果、分画による著しい活性の上昇は得られず、抑制効果がいくつかの分画に分布したことは、cornin の抑制効果が、いくつかの因子の集まったものであったことを示唆している。今後、いろいろな方法で分画を試みるとともに、各々の分画について、更に精製を行い、増殖抑制効果を検討してゆかねばならないであろう。

文

- 1) 日野道夫：岡山医誌，**74**， 729～740， 1962.
- 2) 西田 勇，村上哲英，藤 芳子，原田英樹：細胞化学シンポジウム，**15**， 225～231， 1965.
- 3) Ohya, T. : Acta Med. Okayama, **21**, 227～250, 1967.
- 4) 木本克彦，藤田 興，小林芳治，高橋誠一郎，藤井義信，山田俊典，智片芳子，大月 恒，村上哲英，西田 勇：岡山医誌，**80**， 1211～1222， 1968.
- 5) Nisida, I. and Murakami, T.H. : Acta Med. Okayama, **19**， 1～9， 1965.
- 6) 西田 勇，越宗猪一郎，藤田 興，小林芳治：日本生理誌（抄録），**29**， 175～176， 1967.
- 7) Gomori, G. : J. Lab. Clin. Med., **27**， 955～960， 1942.
- 8) 大沢省三，堀田康雄：蛋白質，核酸，酵素，**11**， 521～526， 1966.
- 9) Sato, J., Namba, M., Usui, K. and Nagano, D. : Japan. J. Exp. Med., **38**， 105～118， 1968.
- 10) Kimoto, K. : Acta Med. Okayama, **23**， 27～46， 1969.
- 11) 木本哲夫等：細胞生物学シンポジウム，1971（印刷中）。

結 論

著者等は、筋肉および角膜corninのDNA 合成抑制因子の精製を試みた。

透析により、両corninを各々透過性分画Dと非透過性分画Uの分け、更に Sephadex gel を用いて細分画した。

各分画の活性測定には、各々の分画を0.5%、および ^3H -thymidine を含む培養液中で6時間ラット肝細胞RLN-10を培養し、細胞にとり込まれた放射能活性を対照群と比較した。

その結果、或る特定の分画にのみ著しい活性をみることはできず、DNA 合成抑制効果は、各々の分画に分散された。しかし、それらの中では、筋肉corninのD-II分画、角膜corninのD分画が最も高い活性を示した。前者は無機燐含量の最も高い分画であり、後者は、mononucleotideないし低分子poly-nucleotideを多く含む分画である。これらの結果は、筋肉corninおよび角膜corninのDNA 合成抑制効果が、いくつかの因子から成っていることを示す。

献

- 12) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J. : J. Biol. Chem., **161**， 83～89， 1945.
- 13) Burton, K. : Biochem. J., **161** 315～323, 1956.
- 14) Bray, G.A. : Anal. Biochem., **1**， 279～285， 1960.
- 15) 智片芳子：日本生理誌，**32**， 803～812， 1970.
- 16) Bullough, W.S., Hewett, C.L. and Laurence, E.B. : Exptl. Cell Res., **36**， 192～200， 1964.
- 17) Bullough, W.S. and Rytomaa, T. : Nature, **205**， 573～578， 1965.
- 18) Bullough, W.S. and Laurence, E.B. : Nature, **220**， 134～135， 1968.
- 19) Choppa, D.P. and Simnett, J.D. : Exptl. Cell Res., **58**， 319～322， 1969.
- 20) Bullough, W.S. : Nature, **229**， 608～610， 1971
- 21) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A. and McLaughlin, J.A. : Proc. Nat. Acad. Sci., **49**， 878～879， 1963.
- 22) Hegyeli, A., McLaughlin, J.A. and Szent-Györgyi, A. : Science, **142**， 1571～1572， 1963.
- Sims, H.S. and Stillman, N.P. : J. Gen. Physiol., **20**， 621～629， 1937.

- 24) Schmeer, M.R. : Science, **114**, 413~414, 1964.
- 25) Parshley, M.S. : Cancer, Res., **25**, 387~401, 1965.
- 26) Bürk, R.R. : Growth regulating substances for animal cells in culture, The Wister Institute Press, 1967.
- 27) Nilson, G. and Philipson, L. : Exptl. Cell Res., **51**, 275~290, 1968.
- 28) Miyamoto, M. and Terayama, H. : Biochim. Biophys. Acta, **228**, 324~330, 1971.
- 29) Suzuki, S. : Japan. J. Exp. Med., **29**, 341~353, 1959.
- 30) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. : Nature, **222**, 687~688, 1969.
- 31) Boldingh, W.H. and Laurenca, E.B. : Europ. J. Biochem., **5**, 191~198, 1968.
- 32) Szent-Györgyi, A., Egyud, L.G. and McLoughlin, J.A. : Science, **155**, 539~341, 1967.
- 33) 越宗猪一郎 : 日本生理誌, **28**, 308~316, 1966.

**DNA synthesis inhibiting factors of muscle-cornin
and cornea-cornin**

**Isamu NISIDA, Tetsuhide H. MURAKAMI, Masao MAKIYAMA,
Naofumi OHNO, Akihide NAKARAI, Ichiro KAKIUCHI,
Hironori IKEMUNE, Hisashi OHTSUKI, Yoshiko CHIKATA**

Department of physiology,
Okayama University Medical school, Okayama

An attempt was made to purify the active principle (s) of cornea- and muscle-cornin, inhibiting the DNA synthesis in cultured mammalian cells.

Each of the two kinds of cornin was separated into the dialysable (D) and the undialysable (U) fraction, which were further fractionated by the use of Sephadex gel. The inhibitory rate of these fractions was indicated by percent of control estimating the incorporation of ³H-thymidine into cells or DNA fractions of cultured rat liver cells, line RLN-10, during the incubation period of 6 hours at 37°C in the presence of respective fractions at the final concentration of 0.5 percent in the culture medium.

As a result, the highest activity was shown in the D-II fraction of muscle-cornin, which corresponded to the elution peak of the inorganic phosphate, and in the D fraction of cornea-cornin, The activity, however, was also shown in several other fractions.

These data suggest that the inhibitory effect of cornin on the DNA synthesis in mammalian cells is due to combined effects of several factors present in cornin.
