The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	塩基性蛋白Purothionin AのA31細胞及びマウス白血病ウイルス感染A31細胞に対する影響
Author(s)	田原, 真也
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32143
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【16】

氏名・(本籍)	田原真也（たはらしんや）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4564 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**塩基性蛋白Purothionin AのA31細胞及びマウス白血病ウイルス感染A31細胞に対する影響**
論文審査委員	(主査) 教授 豊島久真男 (副査) 教授 岡田 善雄 教授 和田 博

論文内容の要旨

〔目 的〕

小麦より分離精製した低分子量の塩基性蛋白purothionin がyeast に対して極めて高い toxicity を有することはすでに報告されている。今回このPurothionin が動物の培養細胞に対して，いかなる作用を有するかを検討した。

〔材料と方法〕

細胞 A31細胞；マウスBALB/3T3由来のクローン。PV4，LP14；ポリオーマウイルスによるA31 transformed cell line 。いずれの細胞も5％牛胎児血清添加Eagle's MEM medium にて37℃，CO_2インキュベーター中で培養した。ウイルス，モロニー株，マウス白血病ウイルス（Mo－MuLV）

Purothionin 分子量約10,000 等電点10.0，PBSにて標品を溶解，濃度1,000μg/mℓとしたものをミリポアフィルター（HA0.45μ）でろ過滅菌し，使用に際して必要量をMEM mediumで希釈した。

細胞傷害効果（CPE）の判定 Purothionin で細胞を処理した後，中性赤，最終濃度0.4％で15分染色し，その後0.25％トリプシンで処理して，細胞を mediumにsuspend して中性赤を取り込んだ細胞のみを生存細胞としてBürker－Türk のhemocytometer にて算定した。

XCプラーク法 A31にMuLV を感染させた後5日目に紫外線（100erg/mm²）を照射して，細胞を静止させ，XC細胞をoverlay して翌日出現したプラークを数えた。

〔成 績〕

1．増殖期のA31細胞や，ポリオーマウイルスによってthansformしたA31細胞はPurothionin 処

理によって明瞭なＣＰＥが出現した。

2．増殖期のＡ31細胞と接触阻止によってGo 期に静止させたＡ31細胞とを各濃度のPurothionin で処理したところ，前者では8μg/mℓ以上で著しいＣＰＥが観察されるのに対して，後者では10μg/mℓでもほとんど影響を認めなかった。

3．接触阻止を利用してsemi－synchronize させたＡ31細胞でPurothionin 感受性の時間的推移を調べたところ，細胞ＤＮＡ合成期に一致して，ＣＰＥが出現することが判明した。

4．増殖期のＡ31細胞をPurothionin で処理した際ＤＮＡ，ＲＮＡ，蛋白合成のいずれかが特異的に阻害され，その結果ＣＰＥが出現するのではないかとの予想のもとにPurothionin 存在下で，チミジン，ウリジン，アミノ酸の取り込みを測定したところ，いずれも，細胞の死に先だつ形で阻害されることはなく，むしろ細胞の死の結果として，これらの合成量が低下するらしいという結論を得た。

以上１～４．に述べたように Purothionin はＤＮＡ 合成のさかんな細胞を傷害するが，ＤＮＡ合成期の正常細胞と transformant とはcyclic AMP のレベルなど多数の類似点を有している。一方MuLV は培養系においてはtransform の能力をもたないが，in vivo 腫瘍原性はもっている。これらの観点から，以下MuLV を感染させた細胞と非感染細胞との間にPurothionin に対する感受性に差異があるか否かについて検索した。

5．MuLV を感染させたＡ31細胞で接触阻止がかかるかどうかを確認するためMo －MuLV を感染させたＡ31細胞と対照細胞とを37℃で５日間培養し，顕微鏡下で細胞相互の接触を確めた上，チミジンの取り込みでＤＮＡ合成量を比較したが，両者とも極めて低く，Ｓ期のＡ31細胞のＤＮＡ合成量の 1/ 20以下であった。なおＸＣプラーク法によって前者にプラークが多数出現し，ウイルス産生が確認されたが，後者では全くプラークは観察されなかった。すなわちMuLV 感染細胞も確かに接触阻止によってGo 期に静止することが確認された。

6．MuLV を感染させたＡ31細胞と対照細胞とを接触阻止のかかった状態で，Purothionin で処理したところ，前者で著しいＣＰＥが出現するのに対して対照細胞ではＣＰＥが認められなかった。

7．MuLV の感染したＡ31細胞がPurothionin によって傷害を受けることを利用して，MuLV のtitration を試みた。10^{-1}から10^{-9}までserial dilution したMuLV をＡ31細胞に感染させ，passage を３回くり返して，そのpassage １とPassage ３について，Purothionin 処理を行なった。平行して，同じ培養細胞についてＸＣプラーク法でウイルス産生の有無を調べた。10^{-1}～10^{-6}の希釈のところではＸＣプラークが出現し，それに対応してPurothionin によるＣＰＥが観察され，10^{-7}～10^{-9}及び非感染細胞ではＸＣプラークが出現せずPurothionin 処理でも細胞はほとんど傷害を受けなかった。即ち，Purothionin によるMuLV titration はＸＣ細胞によるtitration の結果と一致することを確認した。またＸＣ細胞でdetect することのできないAmphotropic MuLV の感染したＡ31細胞もPurothionin によって傷害を受けるというpreliminary な結果も得ていることから，このようなＸＣ細胞にプラークをつくらない種類のMuLV にもこのtitration が応用で

きることが示唆される。

〔総　括〕

PurothioninはDNA 合成のさかんな細胞を特異的に傷害するが,その効果はDNA合成を直接的に阻害するのではないらしい。むしろPurothionin によって何らかの形で細胞が傷害された結果としてDNA，RNA，蛋白の合成量が低下するのであろう。このようにDNA合成期に特異的に作用して細胞を死に致らしめる薬剤は，これまでに類を見ないことから，その利用範囲は広いものと思われる。

他方，Go 期に静止したMuLV感染細胞がPurothionin に感受性であることから MuLV感染によって，一見正常に見える細胞の状態がDNA合成期の細胞に類似した性質をもつようになり，Purothionin はこの変化を認識しているように思われる。

論文の審査結果の要旨

本論文は，小麦より分離された低分子塩基性蛋白Purothionin A が Go 期静止状態の細胞や，分裂期の細胞には，ほとんど影響しないのに対して、DNA合成期の細胞を選択的に傷害し，しかもその作用がこれまで報告されているDNA合成阻害剤と異なりDNA，RNA，蛋白などの物質の合成を直接阻害するのではないらしいという特異な点を明らかにした。

またマウス白血病ウイルスを感染させた細胞では，replication cycle に関係なくPunothionin Aで傷害を受けるようになること，及びそのことを利用して白血病ウイルスの定量法を確立した。

これらPurothionin Aの作用は，細胞やウイルスのmutant　の分離にも良い手段を提供するものと期待される。