

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	田原真也
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 / 3 T 3 由来のクローン。PV 4, 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℃, CO₂ 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 1,000 μg/ml としたものをミリポアフィルター (HA0.45 μ) 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 (100 erg/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 transform 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 G₀ 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 8 μ g/ml 以上で著しい CPE が観察されるのに対して、後者では 10 μ g/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この予想のもとに 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 腫瘍原性をもっている。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 $^{\circ}$ C 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 G₀ 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Purothionin 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。