



Title	ジフテリア毒素耐性細胞の分離とその性状および耐性細胞染色体の感受性細胞への導入による耐性形質の獲得
Author(s)	杉田, 一之
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32704
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

氏名・(本籍)	杉田一之
学位の種類	医学博士
学位記番号	第5209号
学位授与の日付	昭和56年3月25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	ジフテリア毒素耐性細胞の分離とその性状および耐性細胞染色体の感受性細胞への導入による耐性形質の獲得
論文審査委員	(主査) 教授 岡田善雄 (副査) 教授 加藤四郎 教授 深井孝之助

論文内容の要旨

[目的]

ジフテリア毒素は、細胞のEF2を不活化して蛋白合成を阻害するフラグメントAと、細胞膜レセプタと結合することによりフラグメントAが細胞質内に入るのを促すフラグメントBの、二つのコンポーネントから成る。そのためこの毒素に対する耐性ミュータントも、毒素の各々の構成成分に対応したものが得られるはずである。

体細胞遺伝学の研究に用いるため、ヒト細胞からジフテリア毒素耐性のミュータントを分離してその性状を解析した。

さらにその形質を利用して毒素感受性細胞に対する遺伝子導入のひとつの試みを行った。

[方法および成績]

ヒト由来の株化細胞であるFL細胞に、変異源として紫外線照射を行った後、ジフテリア毒素(0.1Lf/ml)添加培地で4日間の選択培養を2回繰り返して、24個の耐性細胞クローンを得た。

各クローンにつき以下の実験により性状の解析を行った。

(1) ジフテリア毒素による蛋白合成の阻害;

各々の細胞に種々の濃度の毒素を加え、37°C 5時間培養した後 $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H ロイシンで90分間ラベルし、得られるカウントを測定した。

この場合、各々の株についての各毒素濃度における蛋白合成は、その株の毒素を加えないコントロールで得たカウントに対する百分率としてグラフに表現した。

(2) ジフテリア毒素のフラグメントAによるEF2のADPリボシル化;

各細胞株より得たEF2を含む細胞抽出物に、DTT, $^{14}\text{C-NAD}^+$, フラグメントAを加えて37°Cで5分間反応させ、フラグメントA無添加のものをコントロールとしてEF2のADPリボシル化を測定した。

(3) ^{125}I 標識ジフテリア毒素との結合：

各細胞にメチルアミンを加えて30分間室温培養した後、 ^{125}I 標識ジフテリア毒素を加えて種々の時間37°Cで培養し、細胞に結合した毒素を測定した。

以上の3実験の結果、得られた耐性株は初めに予想した通り二種類で、I) 毒素による蛋白合成の阻害パターンは感受性細胞に似ているが、全体にグラフが毒素の高濃度側にシフトしていること、フラグメントAによるEF2のADPリボシル化は感受性細胞にはほぼ等しいこと、かつ ^{125}I 標識ジフテリア毒素との結合が感受性細胞に比べて極端に低いこと、の三点を特徴とするものが18株、II) 毒素の濃度が低いうちは感受性細胞と同程度に蛋白合成が阻害されるが、 10^{-3}Lf/ml 以上の濃度では蛋白合成はコンスタントに毒素非添加時の50%を示すこと、EF2のADPリボシル化は感受性細胞の約半分であること、かつ ^{125}I 標識毒素との結合は感受性細胞と同様に良好であるという特徴を持つものが6株あった。

前者は毒素のフラグメントBに対する細胞膜リセプタが変化したか、または数が減少したかによって、毒素との結合性が低下したと考えられるタイプのものであり、後者は、毒素の細胞内への侵入は野性株と変わらないが、EF2が変異したためフラグメントAによるADPリボシル化に抵抗するタイプのものである。

この二種類のミュータントのうち、EF2が変異したものは優性変異であるので、その遺伝子を感受性細胞に入れた場合に、毒素耐性形質が獲得されるかどうかをさらに試みた。

その手技として染色体導入を用いた。

EF2変異ミュータントであるAB-10株からM期染色体をRuddleらの方法に従って分離し、これをリン酸カルシウムゲル法によって毒素感受性のFL細胞に導入した。染色体を感受性細胞に添加後、DMSOあるいはHVJ処理で導入効率を高める事にした。

その結果相当の効率で導入染色体の形質発現が見られ、感受性細胞が毒素耐性形質を獲得することが判った。その頻度は、染色体を添加しないコントロールが 10^6 個の受与細胞あたり3.3個しかコロニーを生じなかったのに比べ、染色体を添加したHVJ処理例では181.7個、DMSO処理例では231個のコロニーが見られた。

[総括]

ジフテリア毒素感受性のFL細胞を紫外線照射して24クローンの毒素耐性細胞を得た。各クローンにつき性状の解析を行った結果、毒素が細胞に結合しにくいタイプのものと、毒素は結合するがEF2が変異しているためにフラグメントAによるADPリボシル化に抵抗するタイプの二種類が実際に得られた。

EF2が変異したミュータントのM期染色体を、リン酸カルシウムゲル法によてもとの感受性細胞に導入すると耐性形質が獲得された。

論文の審査結果の要旨

ヒト培養細胞から体細胞遺伝学研究に有用な変異株を得る目的でジフテリア毒素に抵抗性変異株採取を試みた研究である。

多数の抵抗株が分離されたがこれ等は毒素による蛋白合成阻害パターンから2群に分類可能であった。さらにジフテリア毒素Aフラグメントによる無細胞系でのEF2のNADリボシル化の定量、或は細胞表面の毒素レセプターをメチルアミン存在下で定量する事により、第一群の変異株は毒素レセプターには変化がなく、EF2がフラグメントAによってNADリボシル化を受けないような変異をおこしているもの、第2群はEF2は正常で毒素レセプターに変異をおこしているものである事が明らかとなった。この第一群の変異は優性の表現等を示す筈なので、この遺伝子を感受性ヒト細胞に導入して毒素抵抗性を附与できる事を染色体導入法を用いて示すことにも成功した。

以上の成果は、遺伝子導入のco-transformationのマーカー遺伝子として、この変異EF2遺伝子が使えることを示唆したもので高い評価が与えられる。博士論文として適當と認められる。