

Title	トリ赤芽球症ウイルスR株 (AEV-R) の発癌遺伝子RNAの解析
Author(s)	釜洞, 俊雄
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32705
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)	釜 淵 俊 雄
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 2 0 4 号
学位授与の日付	昭 和 5 6 年 3 月 2 5 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	トリ赤芽球症ウイルス R 株 (AEV-R) の発癌遺伝子 RNA の解析
論文審査委員	(主査) 教 授 豊島久真男 (副査) 教 授 加藤 四郎 教 授 松原 謙一

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

トリ赤芽球症ウイルス (Avian Erythroblastosis Virus : AEV と略す) は, MC29, MH2 などと共に, 急性白血病をおこす C-type RNA ウイルスである。このウイルスは *in vivo* で接種したヒヨコに赤芽球系の白血病をおこし, 2~3 週間後には宿主を死に致らしめる。又筋肉に接種するとその部分に肉腫を形成することが知られている。*in vitro* では, ニワトリ骨髄由来の造血細胞に感染し赤芽系の幹細胞を形質転換 (transform) する。又ニワトリ胎児線維芽細胞 (CEF) に感染するとこれを transform する。以上のように AEV は異なる target cell を transform する能力つまり multiple oncogenicity を持つ大変興味深いウイルスであり, このウイルスの研究及び target cell との相互関係の研究は, トリの白血病ウイルスの研究にとどまらず, ウイルスによる発癌に新たな知見を提供することが期待される。そこで AEV の RNA の遺伝子構造を中心とし, その生物学的性状を調べて以下のような知見を得た。

[方 法]

virus : AEV-R は家衛試の清水博士より分与された。

cell : 微研観音寺研究所より供給される SPF ニワトリの 11 日卵 c/o gs^- , chf^- を 2 代培養したものをを用いた。細胞維持のために日水製 199 Medium (10% TPB, 5% Calf Serum, 1% Chick Serun) をを用いた。

ウイルスの精製 : 感染培養上清を 8,000rpm, 10 分遠心し, Cell debris を落した後, 上清を 9,000rpm, 16 時間遠心する。沈渣を STE buffer (0.1M NaCl, 0.01M Tris, pH 7.4, 1mMEDTA) で

suspendし15%—30%(W/V) ショ糖密度勾配遠心にかけ、密度1.16付近を集めて、精製ウイルス標品とした。

RNAの抽出：精製ウイルスに200 μ g/mlのproteinase K, 1% SDS及びcarrier RNAを加えて37°, 20分放置後、飽和フェノールで2回、クロロホルムで1回抽出した。塩濃度を0.2Mに調整した後、2.5vol エタノールを加えて-20°Cに2時間以上放置後、遠心により回収した。

polyacrylamide disk gel電気泳動：2.4% acrylamide gel(0.02M NaCl, 0.04M Tris pH 7.4, 2mMEDTA, 2.4% Urea)で100V, 4~6時間泳動し、凍結させた後、ガラス管から取り出しgel slicerで1mm間隔に切り、RNAが $[^3\text{H}]$ で標識されている時は、gel solubilizerで溶出した後、シンチレーション・カウンターで測定した。 $[^{32}\text{P}]$ で標識されている時は、Cerenkov光を測った。

agarose slab gel電気泳動：シーケム・アガロース(LE)を最終濃度1.5%になるようにした。用いたバッファー系は(90mM Tris, pH 7.4, 90mM Boric acid 2.5mM EDTA, 0.1% SDS)である。泳動は100Vで約4時間行った。ゲル乾燥後 autoradiogramでRNAの移動度を確認した。ウイルスRNAは主に agarose gel から elution buffer(0.1M NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 0.5% SDS)で室温で行った。

2次元gel電気泳動：ウイルスRNAはcarrier RNA 40 μ gとともに、RNase T₁ 20unitで(37°, 20分) digestした。1次元目は8% acrylamide(6M Urea, Citric acid pH 3.30)で850V, 6~8時間泳動した。2次元目は22% acrylamide(pH 8.3, Boric acid)で500V, 14~16時間泳動した。泳動の目安としてBPBを用いた。autoradiogramにはKodak RX-1 Filmを用い、増感紙Dnpont Cronex Lightning Plusを用いた。

[結果]

- (i) AEVのdefectiveness AEVをc/o CEF上でテストした結果、いわゆる defective virusであることが確認された。NP(Non producer)細胞であることを確認した細胞に Rous Associated Virus-1(RAV-1)を重感染することによってAEVゲノムを含んだVirus液を回収した。このことからAEV stockは少くとも二つ以上のvirus speciesからなり、erythroblastosisをおこし、CEFをtransformする能力を持つが、それ自身では複製できないもの及び、helperとして用いたLymphatic leukemia virus RAV-1を含んでいる。
- (ii) AEV RNAのfingerprinting analysis AEV(RAV-1)を ^3H -Uridineでラベルし、viral RNAを抽出後 polyacrylamide disk gelで電気泳動した。その結果、35Sと約30Sにbandが確認された。marker RNAの位置から35SがRAV-1のRNA, 30SがAEVのRNAを表わしていることが推察される。そこで ^{32}P でラベルしたAEV(RAV-1)のRNAを agarose slab gelで電気泳動し、bandからRNAをeluteし、RNase T₁でdigest後、acrylamide 2次元電気泳動でfingerprintを作製した。得られたpatternの中で特異性の高いspotのみを比較した。30S RNAには6個の35S RNAと共通なspot及び、7個のuniqueなspotが見られた。又、AEV本来の helper virusのoligonucleotide mapと照らし合わせて考えると、30Sのspotのうち35Sと共通な6コのspotはすべて5'側と3'側の両端に分布していることがわかった。

[総括]

以上の事柄をまとめると、AEVのtransformationには30S RNAゲノムが必要であり、AEV-Rに由来する2種のRNAのうち30S RNAにuniqueなspotが存在することから、AEVのoncogenicityは30S RNAがになっている。AEVの30S RNAはそのuniqueなsequenceをそのウイルスゲノムの中央に、約ゲノムsizeの半分の長さで持っていることなどが示唆される。30S RNAは、増殖能に大幅な欠損があるため、その複製には、Lymphatic leukemia virusのhelperとしての働きが必要である。

論文の審査結果の要旨

本研究は、トリ赤芽球症ウイルスR株に特異的な遺伝子RNAが約30Sの大きさを持つこと、アクリルアミド二次元ゲル電気泳動法によって、この遺伝子RNAがヘルパー・ウイルスRNAには存在しない7個の固有なoligonucleotideを持つこと、更にそのoligonucleotideが30S RNAのmap上でほぼ中央に30Sゲノムの半分の大ききで位置づけられることなど、トリ赤芽球症ウイルスR株の発癌遺伝子を世界に先がけて分離・同定したものである。

現在、このウイルスは世界の多くの研究室で盛んに研究が進められ、腫瘍ウイルス研究の重要な分野となっている。

以上の研究は、単に赤芽球症ウイルスR株の発癌遺伝子RNAの解析にとどまらず、今後C型RNA腫瘍ウイルスの研究に寄与するところ大と考えられる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。