



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32705">https://hdl.handle.net/11094/32705</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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 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	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, ニワトリ骨髓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<sup>-</sup>, chf<sup>-</sup> を2代培養したものを用いた。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  $\mu$ 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, 2mM EDTA, 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 [<sup>3</sup>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。[<sup>32</sup>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 100 V 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  $\mu$ g とともに、RNase T<sub>1</sub> 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 500 V, 14—16 時間泳動した。泳動の目安として B P B 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 <sup>3</sup>H-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 <sup>32</sup>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 T<sub>1</sub> 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さに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。