



Title	SV40形質転換細胞株におけるウィルスゲノム挿入部位の検討
Author(s)	萩原, 正久
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36037">https://hdl.handle.net/11094/36037</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	萩	原	正	久
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8620	号	
学位授与の日付	平成元年	3月	24日	
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	SV40形質転換細胞株におけるウィルスゲノム挿入部位の検討			
論文審査委員	(主査) 教授 谷澤 修			
	(副査) 教授 吉川 邦彦 教授 野村 大成			

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

色素性乾皮症 Xeroderma Pigmentosum (以下XP) は、紫外線に、毛細血管拡張性運動失調 Ataxia Telangiectasia (以下AT) は、 $\gamma$ 線に高感受性であり、共に高頻度に発癌の起こる常染色体劣性遺伝性疾患である。これらについて、遺伝子座の決定を含め、精力的な研究がおこなわれているが、現在までのところまだ確定的な知見は得られていない。その理由の一つとして、通常の培養細胞では数代～数十代の継代の後老化が起こり、いずれ死滅してしまうため研究するのに充分な検体が得られないことがある。そのため、細胞の株化がおこなわれている。線維芽細胞の株化にはSV40ウイルスによる形質転換が、しばしば用いられている。しかしながら、完全に形質転換を起こし、株化できる率は極めて低い。本研究では、SV40形質転換細胞としてXP cell line 2株、AT cell line 1株の細胞の特徴と性質を解析し、またSV40ウイルスゲノムの挿入部位の検討をおこない、挿入部位近傍の制限酵素地図を作製した。

## 〔方法ならびに成績〕

## 1. 材料

UV感受性をしめすXP cell lineとして、XP2OS-SV40とXP-T11-1の2株。 $\gamma$ 線感受性をしめすAT cell lineとして、AT-T28 1株。他に、放射線感受性に関しては野生型をしめすSV40 transformantのWA38VA13、ヒトリンパ芽球様EB transformant HLBG1、ヒト初代培養線維芽細胞HFB1、HFB2を用いた。この内XP2OS-SV40とWI38VA13は、SV40ウイルスのinfectionにより、またXP-T11-1及びAT-T28は、大腸菌EK-2ベクターpBR322にクローニングされた

SV40全ゲノム (pSV40) の transfection により樹立された細胞株である。

## 2. 染色体分析

コンベンショナルギムザ法により50ずつの分裂中期細胞の染色体数をカウントした。また、Qバンド法により分染して、染色体分析を行った。XP-T11-1 及び AT-T28共にその親株である、XP5NI と AT1OS の核型は46、XYであった。継代数320代で XP-T11-1 の核型の mode は 102、XXYYとなっていた。

AT-T28は、subcloning を3回繰り返し、T28-2, T28-2-2, T28-2-2-2という subclone を得ているが、T28-2-2 の60代(通算継代数174代)迄は、染色体数は42-3の低二倍体を示していたが、T28-2-2 の264代(通算継代数378代)以降は、染色体数60付近の低三倍体を示した。

## 3. 紫外線、r線感受性

紫外線、または<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線の線量を変えて照射し、コロニー形成能を指標に生存曲線を作製した。XP-T11-1 及び AT-T28は、それぞれ親株である XP5NI, AT1OS と同様の感受性を示した。

## 4. Southern blot hybridization

XP-T11-1, AT-T28-2-2, WI38VA13, XP2OS-SV40 より抽出したDNAをいくつかの制限酵素で切り、0.8%アガロースで電気泳動をおこなった後、ナイロンメンブレンにブロッティングをおこなった。<sup>32</sup>Pで標識した SV40 及び pBR322 をプローブとしてサザンプロット ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、SV40DNAの染色体上での挿入部位、コピー数に差がみられた。XP-T11-1 と WI38VA13では、一ヵ所に1コピーが、AT-T28-2-2 と XP2OS-SV40 では、数ヵ所に複数コピーの SV40DNA の挿入が観察され、infection, transfection といった樹立方法の違いによる一定の傾向というものはみられなかった。またこれから制限酵素地図を作製したところ、SV40の ori と large T の coding region はいずれの場合も保存されていた。

AT-T28の subclone における染色体数の変化は先に述べたとおりであるが、各 subclone での SV40 のコピー数の変化を調べたところ、ploidy の変化とともに、挿入されている SV40 のコピー数は減少していた。

## 5. Northern blot hybridization

SV40 large T, fibronectin, c-myc, 各遺伝子の発現を調べた。large T については組み込まれた SV40DNA のコピー数が多いほど、mRNA が増加していた。fibronectin に関しては、一般に形質転換細胞では mRNA がさがるといわれているように、初代培養細胞に比べ SV40 transformant では、mRNA レベルが低下していた。細胞株による c-myc の mRNA レベルの差は、顕著ではなかった。

SV40による細胞の transformation では、ウイルスが extrachromosome にある場合でも一過性に形質転換が起こるがいすれ phenotype は元に戻ってしまう。ウイルスが宿主 DNA にうまく組み込まれ、T抗原を安定に作り続けられる場合にのみ不死性を獲得できると考えられる。現在までのところ、SV40による線維芽細胞の形質転換に於て、SV40DNA が挿入される染色体上の部位に一定の規則性はないといわれているが詳細な検討はなされていない。XP-T11-1, AT-T28, WI38VA13での SV40 の挿

入部位のクローニングを続けており、その点の解明を急いでいる。

〔総括〕

1. SV40により形質転換されたXP cell line 及び、AT cell line は、株化後も親株の特徴である放射線感受性を持っていた。
2. SV40により形質転換されたcell line 4株について SV40の染色体上での挿入部位、コピー数に差がみられたが、SV40ウイルスの infection, pSV40の transfection といった細胞株の樹立方法の違いによる一定の傾向はみられなかった。しかしながら、large Tの発現はコンスタントにおこなわれていた。
3. AT-T28の subclone で、染色体の rearrangement の増加、染色体数の変化、染色体DNA中のSV40のコピー数の減少傾向等がみられた。

論文の審査結果の要旨

本論文において色素性乾皮症及び血管拡張性運動失調症患者由来の線維芽細胞を SV40ウイルスDNAによって形質転換した細胞株における SV40DNAの宿主細胞染色体中の存在様式を解析した。染色体中に挿入された SV40DNAは、その中に初期遺伝子である large T抗原をコードする領域を完全な形で含み、large T抗原のメッセンジャー RNAとして転写されていた。SV40形質転換細胞株は継代を経るにつれ、染色体数が低2倍体から低3倍体へと変化し、染色体中の SV40 DNAは、その大部分が欠落したが、large T領域を含む一定の挿入部位は保存された。これらの事実により、SV40ウイルスによる細胞形質転換に large T抗原領域が必要であることが明かとなった。

よって本論文は、ウイルスによる細胞形質転換について新しい知見をもたらすものであり、学位論文に値すると考えられる。