

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	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36037
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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)	はぎ 萩	わら 原	まさ 正	ひさ 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、 r 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り、いずれ死滅してしまうため研究するのに十分な検体が得られないことにある。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。 r 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、ヒトリンバ芽球様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回繰り返して、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⁶⁰Co r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した。³²Pで標識したSV40及びpBR322をプローブとしてサザンブ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, 一カ所に1コピーが, AT-T28-2-2とXP2OS-SV40では, 数カ所に複数コピーの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 transformation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ずれ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無いとさ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 SV40 DNA の宿主細胞染色体中での存在様式を解析した。染色体中に挿入された SV40 DNA 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思われる。