Osaka University Knowledge Archive

Title	温度感受性を示すAbelsonマウス白血病ウイルス変異株の分離とその機能の解析 : コロニー形成能, 細胞形態, チロジンキナーゼ活性
Author(s)	岡, 芳弘
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36726
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【99】

氏名・(本籍)	岡(おか)　芳(よし)　弘(ひろ)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　8445　号
学位授与の日付	平成元年2月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**温度感受性を示すAbelsonマウス白血病ウイルス変異株の分離とその機能の解析－コロニー形成能，細胞形態，チロジンキナーゼ活性－**
論文審査委員	(主査) 教授　岸本　進 (副査) 教授　濱岡　利之　教授　羽倉　明

論文内容の要旨

〔目　的〕

Abelsonマウス白血病ウイルス（A－MuLV）はv－abl癌遺伝子を持っており，リンパ球系細胞および繊維芽細胞をtransformする事ができる。このv－abl癌遺伝子によるtransformation機構の解明に役立てる目的でA－MuLV温度感受性変異株の分離を試みた。

〔方法ならびに成績〕

ANN－1にHIXウイルスを重複感染させ5－azacytidineの存在下で培養し，その培養上清を集めて変異ウイルス源とした。NIH3T3にこのウイルス源をm.o.i.(multiplicity of infection) 0.01－0.1で感染させ35℃（許容温度）で培養した。10－14日後にそれらの細胞を集め5％FCS，1.7％メチルセルロースを含むE－MEM半固形培地中にまき込み35℃で培養を続けた。その約2週間後に39℃（非許容温度）にシフトし2日間培養後5－fluoro－2′－deoxyuridine，uridineを加えた。さらに2日間培養後，半固形培地より細胞を回収し液体培地（E－MEM，5％FCS）中に移し35℃で培養を続けた。以上の実験操作で行き残った細胞を半固形培地中でクローニングした。これらの細胞クローンの軟寒天培地中コロニー形成能に関する温度感受性を検討するために，あらかじめ下層としてしいた0.5％軟寒天培地の上で，これらの細胞を0.33％軟寒天培地中にまきこみ，35℃および39℃で培養し2～3週間後にコロニー数をカウントした。コロニー数の比（39℃／35℃）が0.1以下のものを，A－MuLV温度感受性変異株細胞クローンとした。この温度感受性がウイルスの変異に基づくものである事を確認するために，各細胞クローンの培養上清をNIH3T3に感染させその細胞を同様に軟寒天培地中にまきこみ2～3週間35℃および39℃で培養後コロニー数をカウントし，その比が0.1％以下である事を確認した。

以上により，7株の独立した軟寒天培地中コロニー形成能に関するA－MuLV温度感受性変異株（tsOS－41, tsOS－59, tsOS－110, tsOS－119, tsOS－121, tsOS－156, tsOS－170）を分離する事ができた。

これら7株のA－MuLV温度感受性変異株の感染したＮＩＨ３Ｔ３細胞の形態は許容温度で7株ともrouod, refractileであり，非許容温度にシフトしてもrouod, refractileのままであった。

また，これら7株の許容温度，非許容温度でのチロジンキナーゼ活性（P120gag－ablの自己リン酸化）を以下の方法で測定した。ここで分離されたA－MuLV温度感受性変異株の感染したＮＩＨ３Ｔ３を5－10日間35℃および39℃で培養し，それらにＲＩＰＡバッファーを作用させ遠心しCell Lysateを得た。そのCall Lysateを抗gag 抗体で免疫沈降させprotein A－sepharose 4 B beadsに結合させたその免疫複合体を用いて活性を測定した。5 μCiの〔γ－^{32}P〕ＡＴＰを加えて10分間30℃で反応させ，反応終了後そのサンプルを10％ＳＤＳ－polyacrylamide gel電気泳動で解析した。その結果，7株とも両温度での活性の有意な差は認められなかった。

〔総　　括〕

1）7株の独立した軟寒天培地中コロニー形成能に関するA－MuLV温度感受性変異株を分離する事が出来た。

2）これらのA－MuLV温度感受性変異株は軟寒天培地中コロニー形成能に関しては温度感受性を示したが，形態，チロジンキナーゼ活性に関しては温度感受性を示さなかった。

3）軟寒天培地中コロニー形成能，形態，チロジンキナーゼ活性の間で解離がみられた事により，v－ab癌遺伝子産物は細胞内に複数の作用部位を持つ事が示唆された。

論文の審査結果の要旨

v－abl oncogeneによるtransformation機構の解析に役立てる目的で，独自の方法によりAbelsonマウス白血病ウイルスの独立した7株の軟寒天培地中コロニー形成能に関する温度感受性変異株を分離した。これらは分離の指標としたコロニー形成能に関しては温度感受性を示したが，形態，チロジンキナーゼ活性に関しては温度感受性を示さず，これら3つのtransformation parameterの間で乖離を示し得る事が示唆された。