



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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	岡	芳	弘
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 4 4 5	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 H I X 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。NIH 3 T 3 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°C (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°C で培養を続けた。その約 2 週間後に 39°C (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°C 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°C および 39°C 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°C/35°C) 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 NIH 3 T 3 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°C および 39°C で培養後コロニー数をカウントし, その比が 0.1% 以下であることを確認した。

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Cell Lysateを抗gag抗体で免疫沈降させprotein A-sepharose 4B 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 μ Ci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。