Osaka University Knowledge Archive

Title	温度感受性変異Abelsonマウス白血病ウイルスの突然変異部位の塩基配列及び機能解析
Author(s)	相馬, 俊裕
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38278
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

【16】

氏　　名	相馬俊裕（そうまとしひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士　（医　学）
学位記番号	第　10319　号
学位授与年月日	平成4年5月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**温度感受性変異 Abelson マウス白血病ウイルスの突然変異部位の塩基配列及び機能解析**
論文審査委員	（主査）教授　岸本　忠三 （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）は癌遺伝子 v-abl を持ち，感染マウスに主としてリンパ系の悪性腫瘍を作る。以前我々の研究室で分離された A-MuLV の温度感受性変異株は NIH3T3 細胞に感染させトランスフォームすると，軟寒天培地中でのコロニー形成能は温度感受性を示すが形態変化と自己燐酸化能は温度感受性を示さないという特性を持っている。そこでこの性格をもたらすと考えられる v-ab l遺伝子の変異を明らかにすると共にさらに広範囲の血球系細胞の分化の研究にこの変異遺伝子を利用する目的でこの温度感受性株のウイルスゲノムをクローニングし温度感受性に関与する突然変異部位の同定を試みた。

［方　法］

温度感受性株の作製に使用したウイルス非産生性の A-MuLV 転換株細胞 ANN-1からウイルスゲノムを回収した p Ann-1 と JCRB 遺伝子バンクから供与を受けた ANN-1由来のウイルスゲノム全長を含むプラスミッド pAB6.1を野生株のウイルス源とするとともに塩基配列解析した。

温度感受性株として以前我々の研究室で分離した59-1-24株を用いた。この株は上記の ANN-1 細胞にヘルパーウイルスとして HIX ウイルスを感染させて回収されたウイルスに変異原として5-アザシチジンを用いて突然変異を誘発しＮＩＨ3Ｔ3細胞に感染させ，35℃と39℃の軟寒天培地中でのコロニー形成能の差を指標に分離されたものである。このウイルスゲノムをクローニングし，得られたクローンの温度感受性を確認したものを塩基配列の解析に用いた。トランスフェクションは岡山らによる燐酸カルシウム法の変法を用いた。またヘルパーウイルスとしてクローン化したモロニー白血病ウイルスゲノムをコトランスフェクションした。温度感受性の検定はトランスフェクションで得られた上清を NIH3T3 細胞に感染させたのち，ソフトアガーにまきこみ，35℃と39℃でのコロニー数の比でみた。また野生型と温度感受性株の雑種ウイルスを作製し，同様にコロニー形成能の温度差を見た。

［結　果］

塩基配列解析を行い温度感受性株には7つの突然変異が発見された。そのうち2つが LTR と gag 部の間の非コード

部にあり，いずれも1塩基の置換である。3つがgag部にありそのうち2つが近接しており，合わせて53番目のグリシンをアルギニンに変えている。残りの1つはアミノ酸の変化を起こさない。v-ab 1癌遺伝子内にある突然変異は2つで，1つは566番のロイシンがアルギニンに変化しており，チロシンキナーゼ活性部位内にある。もう1つは塩基配列3447番目で2塩基の欠失をおこしその結果アミノ酸784番以降がフレームシフトを起こし，3526番目の塩基配列で停止コドンが出現する。この分析によりv-ab 1内のチロシンキナーゼ活性部位内にある突然変異が温度感受性に関与していることが予想された。温度感受性ウイルス作製に用いた野生株細胞からクローニングしたpAnn-1の塩基配列には突然変異は見いだされなかった。さらにこのチロシンキナーゼ活性部位の突然変異のみを含む雑種ウイルスと，このチロシンキナーゼ部位の突然変異のみをもたない雑種ウイルスを作製し，コロニー形成能の温度感受性を見たところ，上記のチロシンキナーゼ部位内の566番目のロイシンがアルギニンに変わっている突然変異のみをもつ雑種ウイルスが温度感受性を示し，この部の突然変異のみを欠く雑種ウイルスは野生型を示した。

［総　括］

A-MuLVの温度感受性変異株の塩基配列を解析し7カ所に突然変異を認め，さらに野生型株と温度感受性株との雑種ウイルスを作製し温度感受性の検定を行ったところ，566番目のアミノ酸の変化がこの温度感受性株の形質に重要であることが判明した。

論文審査の結果の要旨

以前我々の研究室で分離された温度感受性Abelsonマウス白血病ウイルス（A-MuLV）の温度感受性をもたらす遺伝子変化をあきらかにし，さらに広範囲の血球系細胞の分化現象の解析にこのウイルスゲノムを用いる目的でこの温度感受性株のウイルスゲノムをクローニングし温度感受性に関与する突然変異部位の同定を試みた。

まず温度感受性株ウィルスを産生するNIH3T3細胞株59-1-24と野生型ウイルスゲノムを持つウイルス非産生細胞ANN-1細胞よりウイルスゲノムを回収し，塩基配列解析した。その塩基配列結果を元に野生型ウイルスゲノムとの組換えウイルスを作製し，各々の温度感受性を解析した。温度感受性はNIH3T3細胞にヘルパーウイルスとしてモロニーマウス白血病ウイルスゲノムを燐酸カルシウム法でコトランスフェクションし，得られた転換細胞の培養上清をNIH3T3細胞に感染させ，35℃と39℃の軟寒天培地中でのコロニー形成能の差を検定した。

塩基配列解析の結果温度感受性株に7カ所の突然変異が見られた。LTRとgag部の間に2カ所，gag部に3カ所，abl部に2カ所である。このうち温度感受性に重要と思われるチロシンキナーゼ部位内には566番のアミノ酸のロイシンがアルギニンに変化している突然変異がみられ，この突然変異を目標に組換えウイルスを作製し，コロニー形成能の温度感受性を検定した結果この突然変異1カ所で温度感受性を起こしうることがしめされた。