

Title	A part of Amino Acid Sequence of the Gastro-colonic Cancer Inducing Virus Protein in WF-Osaka (WF/0sp) Rats
Author(s)	赤井, 啓二
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42698
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 >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	あか い けい じ 赤 井 啓 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 6 0 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 12 年 5 月 8 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	A Part of Amino Acid Sequence of the Gastro-colonic Cancer Inducing Virus Protein in WF-Osaka (WF/Osp) Rats (WF/Osp ラットにおける胃・大腸癌の腫瘍誘発ウィルス蛋白に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 青笹 克之 教 授 上田 重晴 教 授 堀井 俊宏

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

我々の研究室で飼育している WF/Osp ラットの自然発生大腸癌の発癌率は約40%でその 8 %に胃癌が併発する。また大腸癌ラットの約40%は自然消退する。この大腸癌、胃癌を用いて可移植性胃癌、大腸癌系を確立した。腫瘍を移植された宿主ラットの胃大腸癌発生率は非常に高率になるとともに大腸癌または胃癌を移植された雌 WF/Osp ラットに子宮体部腺癌が高頻度に新たに誘発された。また WF/Osp 雌ラットで授乳された ACI ラットに同様の大腸癌が見られた。そこで ACI、Wistar/Shi、LE ラット新生児に WF/Osp 担癌ラット血清を450nm フィルターで濾過後、腹腔内投与したところ胃大腸癌の誘発が見られた。即ち、腫瘍誘発因子はラットの系に関係無く感染する伝播性ウィルスであることが予測された。作製した IgM モノクロナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法では培養系大腸癌細胞と可移植性胃癌組織の細胞質内に FITC 陽性の顆粒を認め、電子顕微鏡的にも、可移植性胃癌培養液上清の免疫固相電顕法で約50nm の大きさの円形のウイルス粒子を確認した。更にこのウイルスはラットの膀胱癌培養細胞 NBT-II に感受性があることを確認した。今回は、大腸癌誘発ウイルスのアミノ酸配列について追求した。

(方法ならびに成績)

移植420継代目の可移植性胃癌組織を20mM NaHCO₃バッファー中で細切、粉碎したものを遠心分離後、その上清を200nm pore size フィルターで濾過、抗原蛋白として使用した。胃大腸癌の腫瘍誘発ウイルスに対する IgM モノクロナル抗体を Pharmacia-FPLC システムを用いて、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにて精製した。これをリガンドとしてアフィニティカラムにカップリング、抗原蛋白溶液を反応させ、蛋白の溶出には 0.1モル グリシン HCl (pH3) を用いた。さらに2-Mercaptoethanolを含まない Laemmli Sample バッファーを用い、37℃、15分加温した後、2枚のゲル(5-20%レディゲル)を同時に泳動した後、PVDF膜とニトロセルロース膜に転写した。PVDF膜は BIO-RAD CBBR-250blue で染色し、ニトロセルロース膜のウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングで陽性に染まるバンドのうち約50kDa位置の同一部位に相当する PVDF 膜上のバンドを選び出し、蛋白のシーケンスを行った。その結果、バリン-プロリン-アスパラ酸-リジン-スレオニン-バリン-リジン-トリプトファン-アスパラギン (VPDKTVKWN) と 9 個の N 末端アミノ酸配列が解析された。このアミノ酸配列を GenomeNet 上 FASTA E-mail Server 内の SwissProt プロテインシーケンスデータベースでの検索では、相同する蛋白は見つからず、また、WWW の Viral Genome Sequence Data of All the Virology 上の BLAST

内の Animal virus information system (AVIS) での検索でも、1700種の腫瘍ウイルスのアミノ酸配列の中に相同性は認めなかった。ただ、Swiss Prot プロテインシーケンスデータベースには当該9アミノ酸配列中、8アミノ酸配列 (VPDKTVKW) がラットの serotransferrin に相同する事が判明した。しかし、このラット serotransferrin を www net 上で調べたところ、腫瘍誘発ウイルスとの関連性は見られなかった。この事実は、ウイルス抗原蛋白の一部分であるアミノ酸配列 VPDKTVKWN はこのウイルス蛋白に固有のものである事を示唆している。

(総括)

WF/Osp ラットの胃大腸癌誘発ウイルスの抗原蛋白の構造を解明するため、高度に精製したモノクロナル抗体をリガンドとしてアフィニティーカラムに固定し、胃癌組織から溶出したウイルス蛋白をカラムに吸着させ、その後分離、溶出をおこなった。抗原蛋白を SDS-PAGE で泳動後、PVDF 膜、ニトロセルロース膜に転写させ、ウェスタンブロッティングにて得られた陽性のバンドに対応する PVDF 膜上のバンドを、プロテインシーケンスした結果、VPDKTVKWN のアミノ酸配列が明らかになったこの配列は Genome Net 上での検索の結果、相同する蛋白、ウイルスが存在しないことから、このウイルス蛋白に固有のものであることが判明した。

論文審査の結果の要旨

我々が飼育している WF/Osp ラットの自然発生大腸癌の発癌率は約40%でその8%に胃癌が併発する。また大腸癌ラットの約40%は自然消退する。この大腸癌、胃癌を用いて可移植性大腸癌、および可移植性胃癌を確立した。腫瘍を移植された宿主ラットの胃大腸癌発生率は非常に高率になるとともに大腸癌または胃癌を移植された一部の雌 WF/Osp ラットに子宮体部腺癌が誘発された。一方、WF/Osp 雌ラットで授乳された ACI ラットに同様の大腸癌が見られた。そこで担癌 WF/Osp ラット血清を450nm フィルター濾過後、他系ラット新生児 (ACI、Wistar/Shi、LE) の腹腔内に投与したところ、約3ヶ月後に胃大腸癌の誘発が見られた。即ち、腫瘍誘発因子はラットの系に関係無く感染する伝播性ウイルスであることが予測された。作製した IgM モノクロナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法では培養系大腸癌細胞と可移植性胃癌組織の細胞質内に FITC 陽性の顆粒を認め、電子顕微鏡的にも、可移植性胃癌培養液上清の免疫固相電顕法で約50nm の大きさの円形のウイルス粒子を確認した。更にこのウイルスはラット膀胱癌培養細胞 NBT-II に感受性があることを確認した。このウイルス抗原蛋白の構造を解明するため、高度に精製したモノクロナル抗体をリガンドとしてアフィニティーカラムに固定し、胃癌組織から溶出したウイルス蛋白をカラムに吸着させ、その後分離、溶出を行った。抗原蛋白を SDS-PAGE で泳動後、PVDF 膜、ニトロセルロース膜に転写させ、ウェスタンブロッティングにて得られた陽性のバンドに対応する PVDF 膜上のバンドをプロテインシーケンスした結果、N末端アミノ酸配列バリニン-プロリン-アスパラ酸-リジン-スレオニン-バリニン-リジン-トリプトファン-アスパラギン (VPDKTVKWN) が明らかになった。この配列は Genome Net 上での検索の結果、相同する蛋白、ウイルスが存在しないことから、このウイルス蛋白に固有のものであることが判明した。本論文は、この腫瘍誘発ウイルスを精製して、その蛋白の一部分のアミノ酸配列を分析した結果、そのアミノ酸配列がどの蛋白にもウイルスにも相同しないことから、このウイルスが新種の腫瘍ウイルスであるという可能性を示唆した。これらの結果は将来の癌研究に役立つものと考えられる。その意味において本論文は学位に値すると思われる。