

国内出張報告書

提出日 22年 3月11日



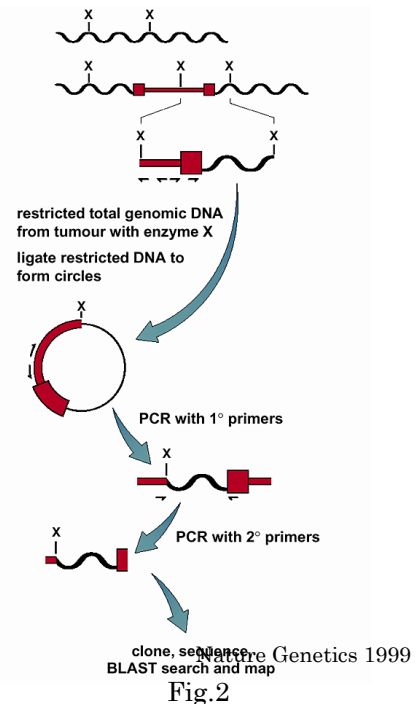
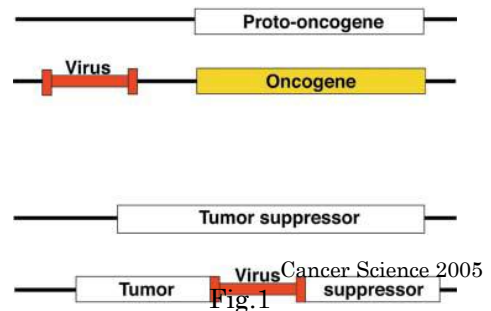
申請者	氏名	昆 俊亮
	所属・職	加齢医学研究所・免疫遺伝子制御分野・助教
出張期間	2010年1月5日 ~ 3月5日	
出張先	癌研究所	
出張目的	技術習得	
研究課題名	モロニー白血病ウイルスを用いた mutagenesis 実験	

技術解説・プロトコル・得られた成果など

〈技術解説〉

モロニー白血病ウイルス (MoMLV) は、マウスに白血病を誘発させるレトロウイルスである。MoMLV 白血化のメカニズムとして、ウイルスが原がん遺伝子の発現を亢進する場合と、がん抑制遺伝子の発現を抑制することにより、血液細胞のがん化を誘導するものと考えられている (Fig.1)。クローナルに増殖した白血病細胞のゲノム DNA より、ウイルス統合部位を同定することにより、白血病原因遺伝子の候補を探索することができる。また、特定遺伝子を改変したマウスを用いることにより、その遺伝子と協調的に白血化に貢献する遺伝子をスクリーニングすることが可能となる。

MoMLV のゲノム挿入部位の同定は inverse PCR 法により行う (Fig.2)。ゲノム DNA を適当な制限酵素で断片化し、セルフクローニングさせた後、ウイルス配列内に設定した primer で primary PCR をかける。増幅された DNA を鋳型にして、ゲノム側に近接した primer を用いた secondary PCR を行う。これら一連の nested PCR により得られた DNA 配列を blast サーチにかけ、ウイルス統合部位を決定する。



〈プロトコル〉

-マウス表現型解析-

1. 新生児マウスに MoMLV を腹腔内注射する。
2. 定期観察を行い、明らかな病変異常が見られたマウスに限り、解剖を行う。この時、
 - a. 白血病細胞の浸潤が疑われる組織（脾臓、肝臓、胸骨、胸腺、脳）もしくはリンパ節（顎下、腸間、腋下、鼠径）を病理標本用にホルマリン固定する。
 - b. また、DNA、RNA 精製用に上記組織を 4mm² 大に細切れにしたものを凍結保存する。
 - c. 大腿骨より骨髓細胞を採取し、サイトスピン標本の作成、FACS 解析を行う。

-ウイルス統合部位の同定/inverse PCR-

1. 組織より DNA を抽出する。
2. DNA を digest する。（今回の場合は、BamH I , Nco I , HindIII）
3. self ligation させる。
4. primary PCR
5. secondary PCR
6. 増幅された DNA 断片が
 - < 1kb の場合
pGEM-T easy system (Promega) を用いて、TA クローニングする。
 - > 1kb の場合
TA クローニングの効率が低下することが懸念されるため、GATC 4 base cutter である Sau3A I で制限酵素処理を施し、クローニングする。
7. sequence

〈得られた成果〉

MoMLV 挿入変異を用いた発がん誘導実験を遂行するうえで必要な手技・手法を習得することができた。

- ※ 出張後 10 日以内に報告書を提出してください。HP に掲載することがあります。
- ※ 技術解説・プロトコルに焦点をあてたものを記載してください。
- ※ 可能であれば写真も添付してください。
- ※ 用紙が不足する場合は、適宜加えてください。