

チュウザンウイルスの分子遺伝学的研究

山 川 睦

目 次

緒 言	1
-----	---

第 1 章 チュウザンウイルス 2 本鎖 RNA ゲノムのクローニングと 構造解析	5
--	---

1. 要旨	6
2. 序文	7
3. 材料と方法	8
4. 結果	11
cDNA クローニング	11
ウイルスゲノムの基本構造	11
ウイルスゲノム各分節の遺伝子構造と他血清群オルビウイルス 遺伝子との比較	12
RNA 分節 1・VP1	12
RNA 分節 2・VP2	13
RNA 分節 3・VP3	13
RNA 分節 4・VP4	14
RNA 分節 5・NS1	14
RNA 分節 6・VP5	15
RNA 分節 7・VP7	15
RNA 分節 8・NS2	15
RNA 分節 9・VP6	16
RNA 分節 10・NS3	16
オルビウイルスの分子系統樹解析	17
5. 考察	18

第 2 章 チュウザンウイルスコアタンパク質 VP7（パリアム血清群 特異抗原）の発現と性状解析	22
---	----

1. 要旨	23
2. 序文	24
3. 材料と方法	25
4. 結果	29
組換えバキュロウイルスによるチュウザンウイルス VP7 の発現	29
組換え VP7 の抗原性状	29

組換え VP7 を用いた寒天ゲル内沈降反応	3 0
5. 考察	3 1

第3章 チュウザンウイルス及びパリアム血清群ウイルスの 分子疫学的解析	3 3
--	-----

1. 要旨	3 4
2. 序文	3 5
3. 材料と方法	3 6
4. 結果	3 9

チュウザンウイルスとパリアム血清群ウイルスの RNA 電気泳動

パターンの比較	3 9
ノーザンブロットハイブリダイゼーション	3 9
RT-PCR によるパリアム血清群特異遺伝子の検出	4 0
PCR 産物の塩基配列の比較	4 0
パリアム血清群ウイルスの分子系統樹解析	4 2
PCR 産物の RFLP 解析	4 2
5. 考察	4 4

総 括	4 7
-----	-----

謝 辞	5 0
-----	-----

引用文献	5 1
------	-----

表及び図	6 4
------	-----

緒 言

アルボウイルス（Arthropod-borne virus；節足動物媒介ウイルス）は、蚊やヌカカ、ダニなどの吸血昆虫によって媒介され、人を含む脊椎動物に感染して種々の疾病を引き起こすウイルスの総称である。我が国では呼吸器症状を伴う急性熱性感染症の原因である牛流行熱ウイルス（ラブドウイルス科エフェメロウイルス属）、嚥下障害を主徴とする疾病の病因であるイバラキウイルス（レオウイルス科オルビウイルス属）、流行性異常産を引き起こすアカバネウイルス（ブニヤウイルス科 ブニヤウイルス属）など牛を主体とする家畜に様々な病原性を示すウイルスの存在が知られている。一度流行すれば多大な経済的損失を被ることから、これらアルボウイルス感染症は家畜衛生上重要な問題として挙げられており、家畜伝染病予防法によって監視伝染病の中の届出伝染病に指定されている。

1985 年 11 月から 1986 年 4 月にかけて南九州を中心に水無脳症・小脳形成不全症候群（hydranencephaly-cerebellar hypoplasia syndrome）を主徴とする異常仔牛の出産が多発し、その総数は 2463 頭に達した。その後の血清疫学的・病因学的研究により、本病は従来から牛異常産の原因として知られていたアカバネウイルスに起因するものではなく、1985 年におとり牛血液及びウシヌカカ（*Culicoides oxystoma*）から分離されたウイルス（61）に起因するものであることが明らかにされた（23, 24, 62, 63）。このウイルスは分離地である鹿児島市中山町にちなんでチュウザンウイルスと命名され、本ウイルスによる感染症は「チュウザン病」と呼称された（63）。初発以来チュウザン病の発生は影を潜めていたが、1997 年以降再び九州地方での散発的な流行が認められている。

チュウザンウイルスは形態学的特徴、理化学的性状及び Bunyip Creek、CSIRO Village、D'Aguilar の各ウイルスと寒天ゲル内沈降反応で交差するという血清学的性状から、レオウイルス科オルビウイルス属パリアム（Palyam）血清群に分類されている（61）。現在のパリアム血清群の分類は極めて複雑であり、中和試験による交差反応の程度によって 6 つの antigenic complex（Palyam、Kasba、Vellore、D'Aguilar、Petevo 及び Gweru）に分けられている（45, 103）。さらにこの antigenic complex の下に少なくとも Palyam、CSIRO Village（以上 Palyam）、Kasba、Abadina、Marrakai（以上

Kasba)、Vellore、Bunyip Creek、Marondera (以上 Vellore)、D'Aguilar、Nyabira (以上 D'Aguilar)、Petevo (Petevo)、Gweru (Gweru) の 12 の血清型が存在することが確認されている。当初チュウザンウイルスがどの antigenic complex のどの血清型に属するか不明であった。しかしその後の研究により、カゴシマウイルス (49) とともに、1956 年にインドで蚊 (*Culex vishnui*) から分離された Kasba ウイルスと血清学的に同一であることが判明した (42)。パリアム血清群に属するウイルスは、日本、インドなどのアジア諸国、中央アフリカ、ナイジェリア、ジンバブエなどのアフリカ諸国及びオーストラリアを含む世界中の熱帯・亜熱帯地域に分布し (45, 49, 61, 92, 103)、蚊、ヌカカ、ダニなどの多様な吸血昆虫によって媒介され、牛を主体とする反芻動物に感染する。1970 年代にジンバブエで牛流産胎仔から Nyabira ウイルスや Gweru ウイルスが相次いで分離されたことから、パリアム血清群ウイルスの流産・先天性奇形を伴う牛の異常産への関与が示唆されていた (92, 103)。しかしながら、日本におけるチュウザン病の発生をみるに至るまで、その病原性について明確にされることはなかった。世界に分布するパリアム血清群ウイルスの中で病原性が確認されているものは、現在もチュウザンウイルスのみであり、その他のウイルスの病原学的意義については依然不明確のままである。

オルビウイルス属には、国際貿易上重要視されているブルータングウイルス (bluetongue virus : BTV)、アフリカ馬疫ウイルス (African horsesickness virus : AHSV) さらにイバラキウイルスやシカ流行性出血熱ウイルス (epizootic hemorrhagic disease virus : EHDV)、ウマ脳炎ウイルス (equine encephalosis virus : EEV) など主要家畜に感染する多数の病原ウイルスが含まれている (67, 88)。これらのウイルス同様に、パリアム血清群ウイルスも 10 分節からなる 2 本鎖 RNA ゲノムを有している。RNA-RNA プロットハイブリダイゼーション実験によって、RNA 分節 2 及び 6 の 2 分節が血清型特異性に関与していること、特に RNA 分節 2 が血清型特異的ウイルス中和抗原をコードしていることが示唆された (4, 5)。また、RNA 分節 5、7 及び 9 の 3 分節がパリアム血清群ウイルス間で最も良く保存されていることも明らかとなった。さらにウサギ網状赤血球を用いた *In vitro* translation 実験により、他のオルビウイルスと同様に、RNA 分節 1、2、3、4、6、7 及び 9 がウイルス構造タンパク質 VP1、VP2、VP3、VP4、VP5、VP7 及び VP6 を、RNA 分節 5 及び 8 が非構造タンパク質 NS1 及び NS2 をそれぞれコードしていることが判明した (17)。

最小の遺伝子である分節 10 は、同じ open reading frame (ORF) の異なる開始コドンから翻訳される 2 つの非構造タンパク質 NS3 及び NS3A をコードしていることが報告された (98)。

一般にオルビウイルス粒子は直径約 70 nm の正二十面体構造をなし、2 本鎖 RNA ゲノム及び内外二層のカプシドから構成される (34)。内殻カプシド (コア) は、2 つの主要タンパク質 VP3、VP7 と内在する 3 つのタンパク質 (VP1、VP4 及び VP6) からなり、VP2 及び VP5 で構成される外殻カプシドで覆われて二重殻粒子となる (34, 87, 88)。VP2 は血清型特異抗原、VP3 及び VP7 は血清群特異抗原である (33)。コア内にウイルスゲノムとともに取り込まれる 3 つのタンパク質 VP1、VP4 及び VP6 には、ウイルスゲノムの転写・複製に必要な酵素としての活性があることが BTV において報告されており、それぞれ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (97)、グアニリルトランスフェラーゼ (53) 及び RNA ヘリカーゼ (89) として機能することが示唆されている。ウイルス粒子に取り込まれない非構造タンパク質 (NS1、NS2、NS3 及び NS3A) は、ウイルス複製・形態形成の過程で重要な働きをされている (34, 88)。また、NS1 は感染細胞中に多量に出現する管状構造物 (tubules) の本体であることが知られている (32, 34, 88)。近年、BTV のクライオ電子顕微鏡観察や X 線結晶解析によって、オルビウイルス粒子の微細構造や 2 本鎖 RNA ゲノムの存在状態が明らかにされつつある (25, 29, 87)。

このように、これまでに BTV を中心にオルビウイルス属の分子レベルでの研究が進められ、ウイルス遺伝子やタンパク質の構造・機能が明らかにされてきている。しかしながら、チュウザンウイルスの属するパリアム血清群ウイルスに関する分子レベルの研究はほとんど行われていないのが現状である。チュウザン病の新しい診断・予防法の開発、チュウザンウイルスの動態解明や分子疫学的研究、その抗原性・病原性の詳細な解析に資するためにも、本ウイルスの分子生物学的研究を推進する必要がある。

本論文は以下の 3 章から構成される。第 1 章では、チュウザンウイルスの遺伝子構造の解明を目的として、cDNA ライブラリーを構築し、全ゲノムの塩基配列を解析して得られた成績を記載した。第 2 章では、第 1 章から得られた知見をもとに、パリアム血清群特異抗原であるコアタンパク質 VP7 を組換えバキュロウイルスを用いて発現させ、性状解析を行って血清診断用抗原としての有用性を検討

した。第 3 章では、第 1 章で得られた知見をもとに、遺伝子診断や分子疫学的解析に有用な reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を確立し、チュウザンウイルス及び他のパリアム血清群ウイルスを分子レベルで比較した成績を記載した。

第 1 章

チュウザンウイルス 2 本鎖 RNA ゲノムのクローニングと構造解析

要 旨

1985 年におとり牛血液より分離されたチュウザンウイルス K-47 株をブラッククローニング後、BHK-21/c13-NIAH 浮遊培養細胞に接種し、感染細胞よりウイルス 2 本鎖 RNA を抽出・精製して cDNA ライブラリーを構築した。コロニーハイブリダイゼーションにより cDNA クローンを同定し、全 10 分節の塩基配列を決定した。その結果、チュウザンウイルスゲノムは、総塩基数にして 18915 塩基対 (base pair ; bp) からなり、6071 個のアミノ酸をコードしうることが明らかとなった。各 RNA 分節にはオルビウイルス共通の特徴がみられた。すなわちいずれの RNA 分節も介在配列のない単一の ORF を有しており、その 5' 及び 3' 末端には共通の塩基配列 (5' GU (U/A) UAAA..... (A/G) C (U/A) (U/C) AC 3') が存在していた。また、末端部に近接して逆位反復配列 (inverted repeat) が認められた。チュウザンウイルス遺伝子と他の血清群に属する BTV、EHDV、AHSV 及び Broadhaven ウイルス (BRDV) の遺伝子をアミノ酸レベルで比較した結果、コアタンパク質 VP3 が最もよく保存されていた (35.5 ~ 63.9%)。一方、ウイルス中和抗原の本体である外殻カプシドタンパク質 VP2 間の相同性は 19.7 ~ 22.5% と最も低かった。また、オルビウイルス間では、VP2 の場合を除いて、非構造タンパク質より構造タンパク質の方が保存されていることが判明した。さらに分子系統樹解析を行ったところ、宿主域や分布地域、病性が異なるにも関わらず、チュウザンウイルスは遺伝的に AHSV に最も近縁であることが明らかとなった。

序 文

オルビウイルス属は、レオウイルス科の中で最も多様性に富み、少なくとも 19 の血清群、150 を越える血清型から構成される (88)。その中にはプロトタイプである BTV をはじめ、AHSV、イバラキウイルスの属する EHDV 及び EEV などの家畜衛生上重要なウイルスが多数含まれている。近年の遺伝子工学技術の発展に伴い、オルビウイルスの遺伝子解析が進められ、BTV 及び AHSV の 2 つのウイルスについては、すでに全ゲノムの構造が明らかにされている (84, 101)。得られた塩基配列情報をもとにウイルスタンパク質の抗原解析や機能解析、分類学的・分子進化学的解析、遺伝子診断法の開発など多方面にわたる研究が展開されている (88)。

チュウザンウイルスの属するパリアム血清群ウイルスの分子生物学的性状については、Bunyip Creek ウイルスを用いた *In vitro* translation による解析から、BTV、AHSV 同様に RNA 分節 1、2、3、4、6、7 及び 9 が構造タンパク質 VP1、VP2、VP3、VP4、VP5、VP7 及び VP6 を、RNA 分節 5、8 及び 10 が非構造タンパク質 NS1、NS2 及び NS3 をそれぞれコードしていることが明らかにされている (17)。分節 10 は NS3 のみならず、同じ ORF の 2 番目の開始コドンから翻訳される NS3A をコードしていることも報告されている (98)。また、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによるウイルス遺伝子の比較から、VP2 及び VP5 が血清型特異性に関与していること、VP2 がウイルス中和抗原の本体であることが示唆されている (4, 5)。しかしながら、パリアム血清群ウイルスの遺伝子構造については、D'Aguilar ウイルス分節 3 及び Palyam ウイルス分節 10 の部分塩基配列以外に報告されていない (27, 98)。

そこで本章では、チュウザンウイルスの分子レベルでの性状解析を目的として、本ウイルスの cDNA クローニングを実施し、ウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。また、分子系統樹解析により、チュウザンウイルスと他の血清群に属するオルビウイルスとの遺伝的関連性を明らかにした。

材料と方法

ウイルスと細胞

実験には、1985年に鹿児島県のおとり牛血液から分離されたチュウザンウイルス K-47 株 (61) を BHK-21/13 細胞でブラッククローニングしたものを用いた。ウイルス増殖には、農林水産省家畜衛生試験場で作出された BHK-21/c13-NIAH 浮遊培養細胞を使用した。

ウイルス RNA の抽出と精製

Sugiyama ら (91) 及び Diaz-Ruiz と Kaper (16) の方法に準じてウイルス接種後 3 日の細胞から直接ウイルス RNA の抽出を行った。ウイルス感染細胞をリン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄後、2mM Tris-HCl (pH8.0) に浮遊し、ガラスホモジナイザーで乳剤を作製した。4℃で 2000 rpm、5 分間遠心して得られた上清に SDS (最終濃度 1%) 及び酢酸ナトリウム (最終濃度 0.3M) を加えて処理した後、フェノール抽出・エタノール沈殿により核酸を回収した。ウイルス 2 本鎖 RNA を単離・精製するため、得られた核酸を 1mM EDTA (pH5.0) に溶解し、等量の 4M 塩化リチウムを加えて 4℃で 8 時間放置後、9000 rpm、30 分間遠心して細胞由来の mRNA (1 本鎖 RNA) を沈殿させた。さらに、ウイルス RNA を含む上清に等量の 8M 塩化リチウムを加え、同様に処理した。遠心してウイルス 2 本鎖 RNA を沈殿させ、細胞由来 DNA を含む上清を除去した。塩化リチウムを完全に除去するため、2mM Tris-EDTA (pH8.0) に溶解後、エタノール沈殿を行った。回収されたウイルス RNA を滅菌蒸留水に再溶解し、セファロース CL-2B カラム (Pharmacia Biotech) で精製した。

cDNA ライブラリーの構築

ウイルス 2 本鎖 RNA のクローニングは Cashdollar ら (9) の方法に準じて行った。精製ウイルス RNA を DMSO で変性させ、3'末端にポリ A を付加後、オリゴ dT をプライマーとして、逆転写酵素により cDNA を合成した。さらにアルカリ (水酸化ナトリウム) 処理により鋳型 RNA を除去し、セルフアニーリングさせて得た 2

本鎖 DNA の 3'末端を T7 DNA ポリメラーゼ (USB) で修復した。ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) (Gibco BRL) を用いて 2 本鎖 DNA の末端にオリゴ dC を付加した後、*Pst* I 切断部位にオリゴ dG を付加したプラスミドベクター pBR322 に挿入して大腸菌 DH5 を形質転換させた。その結果出現した組換え体 (アンピシリン感受性・テトラサイクリン抵抗性のコロニー) については、アガロースゲル電気泳動で単離したチュウザンウイルスの各 RNA 分節を ³²P 標識してプローブを作製後、コロニーハイブリダイゼーションを行い、それぞれの分節がどの組換え体にクローニングされているかを確認した。また、組換え体よりアルカリ法によってプラスミドを抽出し、制限酵素 *Pst* I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行ってクローニングした cDNA のサイズを調べた。

塩基配列の決定

各分節ごとに完全長と予測される cDNA クローンを中心に解析を行った。pBR322 より切り出した cDNA を制限酵素で切断後、M13 または pBluescript II (stratagene) にサブクローニングした。長い cDNA 断片については、サブクローニング後、Kilo-Sequence Deletion kit (Takara) を用いて段階的に欠失させたクローンを作製した。これらをもとに 1 本鎖 DNA を調製し、常法に従って塩基配列を決定した。クローニングの過程で homopolymer tail が付加されている末端部については、マクサム・ギルバート法 (57) 及び解析した塩基配列をもとに合成したプライマーを用いたプライマー伸長法により、その塩基配列を確認した。また、同じプライマーを用い、Weiner と Joklik (105) 及び Kowalik と Li (47) の方法に準じて精製ウイルス RNA から直接末端の塩基配列を決定した。

RT-PCR 及び 5'-RACE

cDNA ライブラリーに含まれていなかった領域については、RT-PCR 法及び 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) 法によって増幅後、pCR-Script SK+ (Stratagene) の *Srf* I 切断部位にクローニングして塩基配列を決定した。

ウイルス RNA と解析した塩基配列をもとに合成したプライマーを混合して 95℃ で 5 分間熱変性後、37℃ 30 分間逆転写反応を行って cDNA を合成した。次に *Pfu* DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を添加し、変性 95℃ 1 分、アニーリング 55℃ 1

分、伸長反応 72℃ 1 分の反応を 30 サイクル繰り返す条件のもとで PCR を行い、目的とする遺伝子領域を増幅した。また、5'-RACE システム (Gibco BRL) を用いて末端領域を増幅した。まず、ウイルス RNA 及び cDNA 合成用プライマーに DMSO (最終濃度 10%) を加えて熱変性後、逆転写反応を行って cDNA を合成した。次いで RNase H を添加して鋳型 RNA を分解後、GlassMAX DNA スピニングカートリッジ (Gibco BRL) で cDNA を精製した。TdT で精製 cDNA の 3'末端にオリゴ dC を付加後、ポリ G 配列を持つアンカープライマーと PCR 用プライマーを用い、上記の条件に従って PCR を行った。RT-PCR 及び 5'-RACE によって得られた cDNA 断片を 2%アガロースゲル電気泳動で分離後、GENECLEAN II kit (BIO 101) で精製し、pCR-Script™ Amp Cloning kit (Stratagene) を用いてクローニングした。

コンピューター解析

塩基配列の二次構造予測、ORF の検索、アミノ酸配列への翻訳、推定アミノ酸の分子量や等電点予測、ホモロジー解析、モチーフ検索、分子系統樹解析などを行うため、GENETYX (Software Development CO., LTD.) を使用した。分子系統樹解析を行うに当たっては、unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) 法を採用した。

結 果

cDNA クローニング

cDNA クローンを作製後、チュウザンウイルスの各分節 RNA をプローブに用いてコロニーハイブリダイゼーションを実施した。各分節に対応する組換えプラスミドを制限酵素 *Pst* I で切断し、1%アガロース電気泳動によって分析した。その結果、ウイルスゲノム全 10 分節に対応する約 400 ～ 3300 塩基のサイズからなる 146 個の cDNA クローンが得られた。全塩基配列が明らかにされている BTV-10 の RNA をマーカーとしてチュウザンウイルス RNA の電気泳動を行い、各分節のサイズを予測した。この成績を cDNA のサイズと比較したところ、分節 1 及び 3 を除く 8 分節で完全長と予測されるクローンが得られたことが判明した。cDNA ライブラリーに含まれていなかった分節 1 の 1-409 及び 3654-3930 塩基に相当する両末端部及び 1828-1871 塩基に相当する中央領域、分節 3 の 1048-2774 塩基に相当する 3'末端側 1727 bp は、RT-PCR 及び 5'-RACE で増幅することによって解析可能となった。

ウイルスゲノムの基本構造

cDNA ライブラリーから各分節ごとに複数の cDNA クローンを選び出し、全塩基配列を解析した。表 1-1 に示したように、分節 1 (3930 bp) から分節 10 (728 bp) までを合計したチュウザンウイルスゲノムの総塩基数は 18915 bp であり、BTV-10 (19218 bp) (84) 及び AHSV (19528 bp) (101) に比べて短かった。塩基組成は、アデニン (A) 32.92%、ウラシル (U) 27.82%、グアニン (G) 23.73% 及び シトシン (C) 15.53% から構成されていた。各分節ごとに塩基組成を調べた場合もほぼ同様であり、総じて GC 含量 (37.26 ～ 44.48%) が低かった。各分節 RNA は、5'末端及び 3'末端に特有の共通配列である 5' GU (U/A) AAA..... (A/G) C (U/A) (U/C) AC 3' を有しており、分節 1、2、3、5 及び 10 の 5 分節の場合、BTV 及び EHDV で認められる共通配列 5' GUUAAA.....ACUUAC 3' (58, 82) に完全に一致していた。しかし、分

節 7 及び 8 では 5'末端から 3 番目の U が A に、分節 4 では 3'末端から 3 番目の U が C に、分節 9 では 3'末端から 4 番目の U が A に、分節 6 及び 7 では 3'末端から 6 番目の A が G に置換していた。末端部に近接して逆位反復配列が存在しており、mRNA として働く + 鎖 RNA がこの配列を介して各分節に特異的な 2 次構造をとることが示唆された (図 1-1)。非翻訳領域はウイルスゲノム全体の 3.7% を占めるに過ぎず、それぞれの分節を通じて 5'末端側が 3'末端側より短いという特徴を備えていた (表 1-1)。ORF 検索の結果、いずれの分節も単一の ORF を有し、分節 1 を除いて、最初に現れる AUG コドンからウイルスタンパク質の合成が開始されることが判明した。分節 1 の場合、最初の AUG コドンから始まる ORF はわずか 21 個のアミノ酸をコードするのみであるため、2 番目に現れる AUG コドンが実際の開始コドンであることが示された。分節 2 ~ 8 の開始コドン周辺の塩基配列は、真核細胞における翻訳開始点であることを示す Kozak の配列 (A/GXXAAUGG) (48) に一致していた。アミノ酸配列の解析結果から、チュウザンウイルスゲノムは計 6071 個のアミノ酸をコードしていることが明らかとなった。分節 9 では - 鎖にも 131 個のアミノ酸 (推定分子量 14.3kDa) をコードする ORF が認められたが、その他の分節では + 鎖及び - 鎖ともに有意なサイズの ORF は検出されなかった。

ウイルスゲノム各分節の遺伝子構造と他血清群オルビウイルス遺伝子との比較

ホモロジー解析により、各分節の塩基配列から推定されたチュウザンウイルスのアミノ酸配列と遺伝子データバンクに登録されているアミノ酸配列データとを比較した結果、オルビウイルス属の BTV、EHDV、AHSV 及び Great Island 血清群に属する BRDV と有意な相同性を示し (表 1-2)、他血清群ウイルスと同様な様式でタンパク質をコードしていることが確認された。以下に各分節の塩基配列及びアミノ酸配列の解析結果を示した。

RNA 分節 1・VP1

分節 1 は 3930 bp から構成されていた。この分節は 5'末端より 23 ~ 25 番目に存在する AUG コドンから始まり 3908 ~ 3910 番目の UAG コドンで終わる 3885 塩基

の ORF を有し、1295 アミノ酸残基から構成される分子量 149589 のコアタンパク質 VP1 をコードしていた。チュウザンウイルス VP1 を他血清群のオルビウイルスの VP1 (84, 101) と比較したところ、BTV-10 との間で 55.0%、AHSV-9 との間で 63.3% の相同性が認められた。これら VP1 はアミノ酸配列全域にわたってよく保存されていた (図 1-2)。また、アミノ酸残基 511 ~ 801 番目の領域に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ間に共通して認められる複数のモチーフ (GDD 配列を含む) が存在していた (46, 73, 79)。

RNA 分節 2・VP2

分節 2 の塩基数は 3055 bp であり、BTV (2923 ~ 2943 bp) (84, 110) 及び EHDV の分節 2 (2968 ~ 3002 bp) (12, 39) よりも長く、AHSV の分節 2 (3203 ~ 3229 bp) (40, 106) より短かった。この分節は 15 ~ 17 番目の AUG コドンから始まる 3006 塩基の ORF を有し、1002 アミノ酸残基より構成される分子量 117610 の外殻カプシドタンパク質 VP2 をコードしていた。このタンパク質のアミノ酸組成、親水性・疎水性パターンを調べたところ、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジンなどの残基に富み (含有量 29.7%)、分子全体にわたって高い親水性を示すタンパク質であることが判明した。チュウザンウイルス VP2 を上記オルビウイルスの VP2 と比較したところ、これら諸性状がよく似ているにも関わらず、19.7 ~ 22.5% の低い相同性を示したに過ぎなかった。また、VP2 間のハープロット解析においても明瞭な類似性は確認されなかった。VP2 はオルビウイルスタンパク質の中で最も多様性を示すユニークなタンパク質であるが、C 末端側約 1/3 の領域に比較的保存されている領域が認められた。特にチュウザンウイルス及び AHSV-4 間には、41.4% の相同性を示す 111 アミノ酸残基からなる保存領域が存在していた (図 1-3)。C 末端部の 12 アミノ酸残基は、BTV-10、EHDV-1、AHSV-4 及びチュウザンウイルスを通じてよく保存されていた。

RNA 分節 3・VP3

分節 3 の塩基数は 2774 bp であった。この分節は 14 ~ 16 番目の AUG コドンから始まる 2712 塩基の ORF を有し、904 アミノ酸残基から構成される分子量 103894 の主要コアタンパク質 VP3 をコードしていた。チュウザンウイルス VP3 は BTV-10、

EHDV-1、AHSV-4 の VP3 (40, 52, 84) との間でそれぞれ 57.6、59.1 及び 63.9%の相同性を示し、オルビウイルスタンパク質の中で最もよく保存されていた (表 1-2、図 1-4)。また、このタンパク質はイソロイシン、ロイシン、バリンなどの疎水性アミノ酸に富み (含有量 37.8%)、他血清群オルビウイルス VP3 と同様の特徴を備えていた。チュウザンウイルス VP3 は、ダニ媒介オルビウイルスである BRDV のコアタンパク質 VP2 (70) と 35.5%の相同性を示した。

RNA 分節 4・VP4

分節 4 の塩基数は 1967 bp であった。この分節は 10 ～ 12 番目の AUG コドンから始まる 1920 塩基の ORF を有し、640 アミノ酸残基からなる分子量 74680 のコアタンパク質 VP4 をコードしていた。その 5'末端側の非翻訳領域の長さは 9 bp で、全 RNA 分節の中で最も短かった。チュウザンウイルス VP4 は BTV-10 VP4 (84) との間で 49.8%、AHSV-4 VP4 (65) との間で 51.2%の相同性を示した。VP1 でみられたように、これらのタンパク質もアミノ酸配列全域にわたってよく保存されていた (図 1-5)。BTV-2、-10、-11、-13 及び-17 の VP4 の C 末端側 523 ～ 551 番目のアミノ酸残基に共通して認められるロイシンジッパー構造 (31) は、チュウザンウイルス及び AHSV-4 には存在しなかった。

RNA 分節 5・NS1

分節 5 の塩基数は 1764 bp であった。この分節は 545 アミノ酸残基からなる分子量 64111 の非構造タンパク質 NS1 をコードしていた。その非翻訳領域は 5'末端側が 35 bp、3'末端側が 94 bp で、ともに全 RNA 分節中最も長かった。このタンパク質と他血清群のオルビウイルスの NS1 (64, 71, 84, 107) の間には 19.9%～ 33.6%の相同性が認められた。チュウザンウイルス NS1 はシステイン残基に富み (15 個)、そのうちの 5 個がオルビウイルス間で保存されていた。BTV、EHDV、AHSV 及び BRDV の NS1 と同様に、チュウザンウイルス NS1 もジスルフィド結合によって密に折り畳まれた構造物 (tubules) を形成しうることが示唆された。その C 末端部には、システイン残基を含まない、自由度の高い配列 (47 アミノ酸残基) が認められた (図 1-6)。

RNA 分節 6・VP5

分節 6 の塩基数は 1610 bp であった。この分節は 21 ～ 23 番目の AUG コドンから始まる 1563 塩基の ORF を有し、521 アミノ酸残基からなる分子量 59046 の外殻カプシドタンパク質 VP5 をコードしていた。このタンパク質は、もう一つの外殻カプシドタンパク質である VP2 とは対照的に、オルビウイルス VP5 (38, 40, 68, 84) 間で比較的よく保存されており、26.8 ～ 47.6% の相同性を示した。ハープロット解析により、18 ～ 92 (I)、201 ～ 272 (II)、355 ～ 400 (III) 及び 451 ～ 506 番目 (IV) のアミノ酸残基に相当する 4 カ所の保存領域が認められ (図 1-7)、これらは疎水性領域に一致して分布していた。また、チュウザンウイルス VP5 に含まれる唯一のシステイン残基 (374 番目) は、BTV 各血清型 (381 番目) 及び EHDV-1 (382 番目) の間で保存されていた。N 末端側の保存領域 I 及び II の間には親水性に富んだユニークな配列が認められた。

RNA 分節 7・VP7

分節 7 の塩基数は 1151 bp であった。この分節は 19 ～ 21 番目の AUG コドンから始まり 1063 ～ 1065 番目の UGA で終わる 1044 塩基の ORF を有し、348 アミノ酸残基からなる分子量 37994 の主要コアタンパク質 VP7 をコードしていた。このタンパク質は、他血清群のオルビウイルスの VP7 (39, 70, 84, 85) との間で 24.4 ～ 53.3% の相同性を示した。特に N 末端部の 102 アミノ酸残基がオルビウイルスを通じてよく保存されていた (図 1-8)。チュウザンウイルス VP7 と AHSV-4 VP7 の間には、アミノ酸配列全域にわたって相同性の高い領域が認められた。N 末端領域に含まれている 15 番目及び 65 番目のシステイン残基も、BRDV を除くオルビウイルス間で保存されていた。BTV、EHDV 及び AHSV 同様に、チュウザンウイルス VP7 にも細胞への吸着に関与するといわれる RGD 配列がアミノ酸残基 178 ～ 180 番目に認められた (28)。

RNA 分節 8・NS2

分節 8 の塩基数は 1059 bp であり、BTV、EHDV 及び AHSV (それぞれ 1125 bp、1185 bp 及び 1166 bp) (84, 99, 108) より短かった。この分節は 22 ～ 24 番目の AUG から始まる 999 塩基の ORF を有し、333 アミノ酸残基からなる分子量 37259 の非構造タ

ンパク質 NS2 をコードしていた。チュウザンウイルス NS2 と他血清群のオルビウ
イルスの NS2 との間には 33.4 ~ 38.0%の相同性が認められた。チュウザンウイル
ス NS2 の 153 ~ 242 番目のアミノ酸残基からなる中央領域は、親水性残基に富み、
この領域と他のオルビウイルス NS2 の当該領域との間にみられる相同性は低かつ
た(図 1-9)。しかし、N 末端部の 163 アミノ酸残基はよく保存されていた。また、
アミノ酸残基 73 ~ 81 番目には 1 本鎖 RNA 結合 (ssRNA-binding) モチーフが存在
していた。このモチーフは、一般的に (I/L)XXM(I/L)(S/T)XXG からなり、1 本鎖 RNA
結合能を持つレオウイルス科の非構造タンパク質に共通して認められる (99)。
チュウザンウイルスの場合には、モチーフ内の 4 番目のメチオニン残基(M)がイ
ソロイシン残基(I)に置換しており、その配列は ISLIISEEG であった。

RNA 分節 9・VP6

分節 9 の塩基数は 877 bp であり、BTV (1049 bp) (84) より 172 bp、AHSV (1169 bp)
(96) より 292 bp も短かった。この分節は 20 ~ 22 番目の AUG コドンから始まる 816
塩基の ORF を有し、272 アミノ酸残基からなる分子量 29763 のコアタンパク質 VP6
をコードしていた。このタンパク質は、チュウザンウイルスタンパク質の中で親
水性残基の含有量が 34.2%と最も高く、かつメチオニン残基やプロリン残基、芳
香族アミノ酸などの疎水性残基の含有量が 25.0%と最も低いという特徴を備えて
いた。また、グリシン残基の含有量が 11.0%と高く、その 66.3% (30 残基中 19 残
基) が N 末端部の 55 ~ 139 番目のアミノ酸残基からなる親水性領域に存在して
いた。アミノ酸残基 92 ~ 99 番目には GDGGSGES というプリン NTP 結合モチーフ
(purine NTP- binding motif ; (A/G)XXXXGK(S/T)) (22) に類似した配列が認められ
た。チュウザンウイルス VP6 と BTV-10 及び AHSV-3 の VP6 との間の相同性はそれ
ぞれ 31.1%、29.8%であり、他の構造タンパク質に比べて低い値を示した。これら 3
者間で保存されている領域は C 末端部の 58 アミノ酸残基のみであった(図 1-10)。
しかしながら、これらオルビウイルス VP6 の間には上記のような特徴が共通して
みられた。

RNA 分節 10・NS3

分節 10 の塩基数は 728 bp であり、BTV (822 bp) (84)、EHDV (809 bp) (41)、AHSV

(746 ~ 764 bp) (55) より短く、BRDV (702 bp) (69) より長かった。他の分節が単一の ORF を有するのに対し、分節 10 は in-frame のもう一つの ORF を持ち、2 種の非構造タンパク質 NS3 及び NS3A を合成することが Palyam ウイルスを用いた実験で明らかにされている (98)。したがって、チュウザンウイルス分節 10 の場合、19 ~ 21 番目の AUG コドン及び同じ ORF 内の 52 ~ 54 番目の AUG コドンから、それぞれ 211 アミノ酸残基からなる分子量 23666 のタンパク質である NS3、及び 200 アミノ酸残基からなる分子量 22388 のタンパク質である NS3A が合成されることが示唆された。チュウザンウイルスと他血清群のオルビウイルスの NS3 とを比較した結果、24.9 ~ 34.3% の相同性が認められ、N 末端領域の 46 ~ 87 番目のアミノ酸残基が保存されていることが判明した (図 1-11)。また、他のオルビウイルスと同様に、チュウザンウイルス NS3 の C 末端側には transmembrane 部位と考えられる 114 ~ 137 番目及び 146 ~ 167 番目のアミノ酸残基からなる 2 つの疎水性領域が認められた (2, 41, 100)。

オルビウイルスの分子系統樹解析

チュウザンウイルスと他のオルビウイルス (BTV、EHDV、AHSV 及び BRDV) との分子進化学的関連性を明らかにするため、各分節ごとにアミノ酸レベルで比較し、UPGMA 法により分子系統樹を作製した (図 1-12)。VP6 を除くすべての場合でチュウザンウイルスは AHSV と、BTV は EHDV と遺伝的に近縁であることが判明した。VP6 の分子系統樹解析では、チュウザンウイルスはむしろ BTV に近縁であるという結果が得られた。また、チュウザンウイルスを含むこれらヌカカ媒介ウイルスは、ダニ媒介ウイルスである BRDV とは遺伝的に遠縁であることが示された。

考 察

チュウザンウイルスの遺伝子解析の結果から、その遺伝子の特徴やコードするタンパク質の性状、他の血清群に属するオルビウイルスとの分子遺伝学的関連性が明らかとなった。分節間で保存されている末端塩基配列及びこの部分に近接して存在する分節に特異的な逆位反復配列は、ウイルスゲノムの転写・複製に働く RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの認識部位であり、翻訳の調節や各 RNA 分節の粒子内へのパッケージングにも関与すると考えられる (1, 90)。同じレオウイルス科に属するロタウイルスでは、1 本鎖 RNA 結合能を有する非構造タンパク質 NSP3 によって + 鎖 RNA 3' 末端の 4 塩基 (GACC) が認識されること (80)、また、+ 鎖 RNA 3' 末端 7 塩基が - 鎖 RNA 合成に必須であることが明らかにされている (10, 78)。BTV の場合、ロタウイルス NSP3 と同様の機能を有する NS2 と種々の欠失変異を導入したウイルス RNA 転写産物との反応性が調べられているが、ロタウイルスとは異なり、ウイルス mRNA の末端保存配列は NS2 との結合には直接関与しないことが判明している (95)。チュウザンウイルスゲノムの存在状態や複製機構を解明するためには、ウイルスタンパク質機能のより詳細な解析を行うとともに、末端領域のシグナル配列の同定やその作用機序を明らかにしていく必要がある。

各分節のコードするアミノ酸配列のホモロジー解析により、BTV や AHSV と同様にチュウザンウイルス RNA 分節 1、2、3、4、6、7 及び 9 が構造タンパク質 VP1、VP2、VP3、VP4、VP5、VP7 及び VP6 を、RNA 分節 5、8 及び 10 が非構造タンパク質 NS1、NS2 及び NS3 をそれぞれコードしていることが判明した。この結果は Bunyip Creek ウイルスの *In vitro* translation の結果に一致していた (17)。チュウザンウイルスと BTV-10 (及び AHSV) の間にみられるアミノ酸配列の相同性は、表 1-2 に示したように VP1 55.0 (63.3) % ; VP2 19.7 (22.5) % ; VP3 57.6 (63.9) % ; VP4 49.8 (51.2) % ; VP5 41.7 (47.6) % ; VP6 31.1 (29.8) % ; VP7 42.1 (53.3) % ; NS1 28.9 (33.6) % ; NS2 33.9 (38.0) % ; NS3 30.9 (32.6) % であり、外殻カプシドタンパク質 VP2 間で最も低く、主要コアタンパク質 VP3 間で最も高かった。また、VP2 を除いて、非構造タンパク質より構造タンパク質の相同性が高かった。この結果は、宿主の抗体による選択圧力を受ける外殻カプシドタンパク質は変異しやすいこと、ウイルス特

有の機能や構造維持に必要なコアタンパク質は、抗体による選択を受けにくい上、変異しにくいことを示していると考えられる。

オルビウイルス間では VP2 の相同性は極めて低い、チュウザンウイルス VP2 の C 末端側 1/3 の領域、特に C 末端部 12 アミノ酸残基は BTV 各血清型、EHDV、AHSV を通じて比較的よく保存されていた。この部分は多様性を示す VP2 の中でも他のカプシドタンパク質との分子間結合、あるいは分子内結合に重要な領域であると考えられる。ウイルス粒子の形態形成に必要な他の 3 つの主要カプシドタンパク質、すなわちもう一つの外殻カプシドタンパク質である VP5、主要コアタンパク質 VP3 及び VP7 に認められた保存領域や保存されたシステイン残基も、同様に分子内・分子間結合によってオルビウイルスに特有な立体構造の維持に働くと考えられる。

チュウザンウイルス VP2 の親水性に富む N 末端側 2/3 領域は、中和エпитープ (43) や赤血球凝集 (15)、宿主細胞への吸着 (30) に関与する領域を含み、VP5 の親水性領域、特に N 末端側の 93 ～ 200 番目のアミノ酸残基からなる領域とともにウイルス粒子表面に露出していると推察される。BRDV の属する Great Island 血清群を除き、一般にオルビウイルス VP5 は血清型特異性やウイルス中和に関与しているものの、それ自体は中和能を持たないとされている (59)。チュウザンウイルス VP5 の感染防御能については検討する必要があるが、BTV と同様の機能を持つとすれば、親水性領域に血清型特異的エпитープを有し、VP2 の立体構造に影響を与えることにより宿主の免疫応答を増強すると考えられる。これら外殻カプシドタンパク質は、感染防御のみならず病原性にも関与していることが BTV、AHSV 及び Great Island 血清群ウイルスの遺伝子再集合 (reassortant) ウイルスを用いたマウスへの感染実験によって確認されている (3, 8, 74, 75)。したがって、チュウザンウイルスの抗原性状や発病機構を解明するためには、分節 2 及び 6 の機能をより詳細に解析する必要がある。

チュウザンウイルス VP3 及び VP7 は、コア粒子を形成するとともに、パリアム血清群特異抗原として働くと考えられる (33, 34, 88)。一方、コア粒子表面に位置する VP7 は、媒介昆虫細胞への吸着・感染に重要な働きをすることが BTV で報告されている (60, 109)。したがって、BTV、EHDV 及び AHSV 同様に RGD 配列 (28) を持つチュウザンウイルス VP7 は、*Culicoides* 属ヌカカの消化管内で外殻カ

プシドが分解された後、消化管細胞膜表面に存在するレセプターとの結合に働くと推察される。

チュウザンウイルスのコア粒子内に存在する 3 つのコアタンパク質のうち VP1、VP4 はオルビウイルス間でよく保存されている。VP6 の場合、相同性は低いものの、VP1、VP4 同様にオルビウイルス共通の特徴やモチーフを有し、同一の機能を持つタンパク質であると考えられる。特に、保存された C 末端部は VP6 の構造上あるいは機能上重要な領域であると考えられる。これらのタンパク質は、チュウザンウイルスゲノムの転写・複製に必要な一連の酵素群、すなわち RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (VP1)、mRNA 5' 末端のキャップ構造の形成にあずかる グアニリルトランスフェラーゼ (VP4) 及び RNA ヘリカーゼ (VP6) であると推測されるが、それらの機能については今のところ直接的に証明されていない。VP6 をコードする分節 9 の一鎖 RNA にみられた ORF は、BTV、AHSV に同等の ORF が認められないことから、実際には翻訳されないと考えられる。

分節 5、8 及び 10 のコードする非構造タンパク質 NS1、NS2 及び NS3 はチュウザンウイルスの複製・形態形成に関与している調節タンパク質であると推察される。BTV、EHDV、AHSV 及び BRDV の NS1 は感染細胞中に tubules と呼ばれる特徴的な管状構造物として多量に出現するが (32)、その機能については不明な点が多い。チュウザンウイルス NS1 の場合も tubules として合成される可能性が示唆されるものの、このような構造物の出現はチュウザンウイルス感染細胞には認められていない。アミノ酸配列の比較から、NS1 の C 末端領域が高次構造形成に影響している可能性が高いと考えられるため (66)、今後、本タンパク質の発現実験を行い、tubules 形成の有無、感染細胞内での分布や動態などを確認する必要がある。

チュウザンウイルス NS2 は、リン酸化されること (104)、1 本鎖 RNA 結合モチーフを持つことからウイルス mRNA と結合すること、また、ウイルス複製工場といわれる viroplasma を構成するタンパク質であることが予想される。Theron ら (93, 94) は、EHDV NS2 を用いて 1 本鎖 RNA 結合モチーフそのものがこれらの機能に重要な役割を担うことを報告している。チュウザンウイルス NS2 ではモチーフ内のメチオニン残基 (M) がイソロイシン残基 (I) に置換しているが、この置換がチュウザンウイルス NS2 と他血清群オルビウイルス NS2 との間の機能の相違を反映

しているか否かは今のところ不明である。

NS3 はウイルス複製の最終段階で感染細胞からのウイルスの放出に働くことが BTV で報告されている (35, 36)。チュウザンウイルス NS3 の場合も、C 末端側の 2 つの疎水性領域により細胞膜に結合し、オルビウイルス間で保存されている N 末端領域が機能してウイルスを細胞外へ放出すると考えられる。また、分節 10 からは NS3 と同等の機能を有するもう一つのタンパク質 NS3A が合成されることが考えられる (98)。他のオルビウイルスの分節 10 と同様に、チュウザンウイルス分節 10 の AUG コドン周囲の塩基配列は Kozak のルール (48) に完全には一致していない。したがって、リボソームによる翻訳開始部位の認識が甘くなることによって、2 つの AUG コドンからタンパク質が合成されると推察される。

分子系統樹解析の結果から、宿主域や分布地域、病性が全く異なるのにも関わらず、チュウザンウイルスは AHSV に最も近縁であることが明らかとなった。このことはオルビウイルスの分子進化を考える上で大変興味深い。チュウザンウイルスのゲノムがクローニングされ、全塩基配列が決定されたことにより、遺伝子発現系を用いたウイルスタンパク質の機能解析や本ウイルスの分子遺伝学的・疫学的解析が可能となった。

第 2 章

チュウザンウイルスコアタンパク質 VP7（パリアム血清群特異抗原） の発現と性状解析

要 旨

第 1 章で得られたチュウザンウイルスゲノムの塩基配列をもとに、組換えバキュロウイルスを作製して主要コアタンパク質 VP7 の発現を試みた。組換えタンパク質の性状解析を行うとともに、その血清診断用抗原としての有用性を検討した。

発現した VP7 は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によってアミノ酸配列から推定される分子量 38K に一致する単一のバンドとして検出され、抗チュウザンウイルス血清を用いた間接蛍光抗体法によって組換えウイルス感染 SF21 細胞質内に確認された。その発現量は細胞 1×10^6 個当たり約 $10 \mu\text{g}$ と推測され、バキュロウイルス発現系で効率よく発現されることが判明した。各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清などの他血清群に属するウイルスの抗血清を用いて組換え VP7 の抗原性状について検討したところ、免疫沈降法とイムノブロット法で異なる結果が得られた。免疫沈降法では、VP7 はパリアム血清群ウイルスに対する抗血清すべてと強く反応し、通常の血清試験では交差反応を示さない抗 BTV 及び抗 EHDV 血清とも反応した。一方、イムノブロット法では、VP7 は抗チュウザンウイルス血清を含むすべての抗血清と反応を示さなかった。チュウザンウイルス VP7 はパリアム血清群特異抗原であることが確認されたが、その抗原決定基は一次構造によって直接決定される linear なものではなく、立体構造に依存する conformational なものであることが示唆された。また、VP7 には血清群を越えて保存されている抗原決定基の存在も示された。組換え VP7 を用いて寒天ゲル内沈降反応を行ったところ、パリアム血清群ウイルスに対する抗血清と VP7 の間に明瞭な沈降線が確認された。しかしながら、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清と VP7 の間には交差反応は認められなかった。以上のことから、組換えバキュロウイルスを用いて発現させたチュウザンウイルス VP7 は、チュウザン病やパリアム血清群ウイルスに起因する牛異常産の血清診断用抗原として有用であることが明らかとなった。

序 文

ウイルスや大腸菌、酵母、哺乳類細胞を用いた外来遺伝子の高発現システムの確立は、種々のタンパク質の機能解析や新しい診断薬、治療薬、ワクチンなどの医薬品の開発を容易にし、従来の生物学・医学研究方法を劇的に変えるほどの威力を発揮した。オルビウイルス研究においても、ゲノム構造が明らかにされるにつれ、ウイルスタンパク質の抗原解析や機能解析のための有力な手段として遺伝子発現系が繁用されるようになった（84）。大腸菌や酵母、ワクシニアウイルス発現系が用いられることもあるが（14, 18, 51, 56, 102）、現在ではおもにバキュロウイルス発現系による研究が進められている。特に血清群特異抗原や非構造タンパク質を発現させて血清診断用試薬としての可能性を検討したり（13, 72, 76）、主要カプシドタンパク質の共発現によってコア様粒子（core-like particle）やウイルス様粒子（virus-like particle）を作製し（19, 20）、その免疫原性を検討したりすることによって（86）、新しい診断薬・ワクチンの開発が精力的に試みられている。近年、国際獣疫事務局編集の診断マニュアル（OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines）にも、BT 及び AHS の血清診断法の一つとして組換えウイルスタンパク質を用いた酵素抗体（ELISA）法（51, 56, 76）が記載されるようになった。

そこで本章では、チュウザン病の新しい血清診断用抗原の開発を目的として、第 1 章で得られたチュウザンウイルス RNA 分節 7 の cDNA を組み込んだ組換えバキュロウイルスを作製し、VP7 の発現と抗原解析を行った。さらに寒天ゲル内沈降反応によって、その診断用抗原としての有用性を検討した。

材料と方法

ウイルスと細胞

組換えバキュロウイルスを作製するための親株として、ポリヘドリン遺伝子の代わりに *LacZ* 遺伝子を組み込んだバキュロウイルス BacPAK6 (Clontech) を、またウイルス対照としてバキュロウイルス野生株である *Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV) のクローン C6 を用いた。BacPAK6、AcMNPV C6 及び組換えウイルスの培養は、*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来細胞株である IPLB-SF21 (SF21 細胞) とグレース昆虫細胞培養用培地 (Gibco BRL) にイー스트レート溶液 (Gibco BRL)、ラクトアルブミン水解物 (Gibco BRL)、牛胎仔血清 (10%) 及び抗生物質 (50 U / ml ペニシリン、50 μ g / ml ストレプトマイシン) を添加した TNM-FH/FBS 培地を用いて 27 °C で実施した。

トランスファーベクターの構築

5'末端側に *BamH* I 切断部位を付加した RNA 分節 7 特異的プライマー CVS7-1 ; 5'-GGCGGATCCGTAATAAATCTCCTC-3' 及び CVS7-2 ; 5'-TTAGGATCCGTAAGCGTATACCC C-3' と *Pfu* DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を用い、チュウザンウイルス RNA 分節 7 に対する完全長 cDNA を含むプラスミド pBR322/CVS7-2-75 を鋳型に 94 °C 1 分、52 °C 1 分、72 °C 1 分の反応を 25 サイクル繰り返す条件のもとで PCR を行った。*BamH* I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動で分離した PCR 産物を GENECLAN II kit (BIO 101) によって精製し、バキュロウイルストランスファーベクター pBacPAK9 (Clontech) のポリヘドリンプロモーター下流の *BamH* I 切断部位に挿入した (pBacPAK9/CVS7)。RNA 分節 7 の cDNA の挿入方向を制限酵素による切断で確認し、さらに外来遺伝子挿入部位を挟むように設計されている Bac1 プライマー 5'-ACATCTCGCAAATAAATAAG-3' 及び Bac2 プライマー 5'-ACAACGCACAGAATCTAGCG-3' を用いて、挿入部位周辺及び RNA 分節 7 の cDNA の塩基配列を確認した。

VP7 発現組換えバキュロウイルスの作出

トランスファーベクター pBacPAK9/CVS7 500 ng と組換え効率を上げるため

Bsu36 I で切断したバキュロウイルス BacPAK6 の直鎖状 DNA 100 ng を緩やかに混合し、リポフェクチン (LIPOFECTIN Reagent ; Gibco BRL) 5 μ g を添加して室温に 15 分間静置した。このリポフェクチン-DNA 混合物を 1.5×10^6 個の SF21 細胞に接種し、27 $^{\circ}$ C で 5 時間培養後、TNM-FH/FBS 培地を加えてさらに 60 ~ 72 時間培養を続けた。この培養上清からブラック法によって組換えウイルスを選択した。まず、回収した培養上清を TNM-FH/FBS 培地で 10 倍階段希釈し、その 100 μ l を直径 35mm シャーレ中の 1.5×10^6 個の SF21 細胞に接種して室温に 1 時間置いた。次に、接種材料を除去後、等量の TNM-FH/FBS 培地と混合して 37 $^{\circ}$ C に保温しておいた 1% SeaPlaque アガロース (FMC BioProducts) 1.5 ml を細胞に重層した。アガロースが固化した後、さらに TNM-FH/FBS 培地 1.5ml を重層し、27 $^{\circ}$ C 湿潤下で培養した。培養 4 日目に 0.03% ニュートラルレッド及び 0.03% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside (X-Gal) を含む PBS 1 ml を加えて 27 $^{\circ}$ C 5 時間染色後、染色液を除いて暗所 (室温) に一晩静置した。この方法では、組換えが起こらなかったウイルスのブラックは、親株である BacPAK6 同様に β ガラクトシダーゼの発現によって X-gal を加水分解するため、青色を呈し、組換えウイルスの白色ブラックと容易に識別できる。したがって、得られた白色ブラックを滅菌パスツールピペットで拾い、TNM-FH/FBS 培地 0.5ml に入れて 4 $^{\circ}$ C で一晩置いた。上記のブラッククローニングを 2 回繰り返してチュウザンウイルス VP7 を発現する組換えバキュロウイルス (BacCVS7) を得た。

SDS-PAGE

組換えバキュロウイルス感染細胞を Laemmli (50) の方法によって可溶化し、2-メルカプトエタノールを添加して 100 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱した後、SDS 含有 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で解析した。泳動後、ゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) R-250 で染色して発現タンパク質のバンドを確認した。³⁵S-メチオニンで標識した感染細胞を試料として用いた場合には、泳動後、フルオログラフィーによって発現タンパク質を検出した。

間接蛍光抗体法

2×10^6 個の SF21 細胞を含む LAB TEK チェンバースライド・4 チェンバー (Nalge

Nunc International) の各チェンバーに BacCVS7 及び AcMNPV、BacPAK6 をそれぞれ MOI 20 (4×10^6 pfu) で接種し、接種後 2 日目に間接蛍光抗体法を実施した。培養上清を除去後、感染細胞を冷 PBS で洗い、70%アセトン・30%メタノールで固定した。一次抗体として 200 倍に希釈した抗チュウザンウイルス血清 (SF21 細胞で吸収済みの牛血清) を、二次抗体として 400 倍希釈した FITC 標識抗ウシ IgG ウサギ血清 (Sigma) を用い、常法に従って反応を行った後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。

イムノプロット法

SDS-PAGE 終了後、ゲルをブロッキング溶液 (25 mM トリス、192 mM グリシン、20% メタノール) に室温 1 時間浸漬して、タンパク質を疎水性 PVDF 膜 Immobilon-P (Millipore) に転写した。膜を短冊状に切断し、ブロッキング溶液 (3% スキムミルクを含む TBS ; 25 mM トリス、150 mM NaCl) に室温 1 時間または 4℃ 一晩浸漬後、それぞれ 2500 倍希釈した抗チュウザンウイルス血清、D'Aguilar、CSIRO Village、Bunyip Creek、Nyabira、Gweru 及び Marondera の各パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV-1 血清、抗 EHDV-1 及び抗 EHDV-2 血清を加えて室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 を含む TBS (TBST) で洗浄後、5000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 IgG 血清 (Sigma) を膜に添加して室温で 1 時間反応させた。再度 TBST による洗浄を行い、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate p-Toluidine Salt (BCIP) 及び Nitroblue Tetrazolium Chloride (NBT) を用いた発色により VP7 の検出を行った。

免疫沈降法

BacCVS7 を MOI 20 で SF21 細胞に接種し、接種後 2 日目に感染細胞を ^{35}S -メチオニンで標識した。NP-40 lysis buffer (1% NP-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0) で感染細胞を可溶化後、イムノプロット法と同様に各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清を加えて 4℃ で 3 時間以上反応させた。次いで 50% Protein A または G-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia Biotech) を添加してさらに 1 時間反応させた。常法に従い、得られた免疫沈降物を SDS-PAGE によって展開後、フルオログラフィーによって VP7 の検出を行った。

組換えタンパク質の精製

寒天ゲル内沈降反应用抗原として用いるため、Chuma ら (13) の AHSV VP7 の精製法に準じ、BacCVS7 接種後 4 日目の SF21 細胞 (6×10^8 個) から組換え VP7 を精製した。回収した感染細胞を NP-40 lysis buffer で可溶化して核を除き、30 ~ 80% ショ糖密度勾配を用いて 26000 rpm で 2 時間超遠心を行った。遠心後、VP7 を含む画分を採取し、10mM Tris-HCl pH 7.5 で透析した。低速遠心により不溶物を除去し、SDS-PAGE によってその上清に VP7 が含まれることを確認した (図 2-5)。

組換えタンパク質を用いた寒天ゲル内沈降反応

組換え VP7 を抗原液とし、各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清との反応性を Ouchterlony 法 (77) によって検討した。沈降線はイムノビュアーによって確認した。

結 果

組換えバキュロウイルスによるチュウザンウイルス VP7 の発現

チュウザンウイルス RNA 分節 7(1151 bp) の cDNA を PCR で増幅することにより、クローニングの過程で末端に付加された homopolymer tail を除去するとともに、*Bam*H I 切断部位を付加してバキュロウイルストランスファーベクター pBacPAK9 のポリヘドリンプロモーター下流に挿入した。このトランスファーベクター (pBacPAK9/CVS7) をバキュロウイルス BacPAK6 の直鎖状 DNA とともに昆虫培養細胞 SF21 に導入し、ブラッククローニングを行って組換えウイルス (BacCVS7) を得た。BacCVS7 を SF21 細胞に接種し、接種後 4 日目に感染細胞を回収して SDS-PAGE により解析した結果、発現タンパク質は RNA 分節 7 のアミノ酸配列から推定される分子量 38K に一致する明瞭なバンドとして検出され、抗チュウザンウイルス血清を用いた免疫沈降法により VP7 であることが確認された (図 2-1)。組換え VP7 は BacCVS7 感染後 12 ～ 24 時間に出現し始め (図 2-2)、間接蛍光抗体法の結果にみられるように、感染細胞質内に蓄積していくことが明らかとなった (図 2-3)。既知の濃度のウシ血清アルブミン (BSA) とともに SDS-PAGE し、デンストメーターで比較することによって組換え VP7 の定量を試みたところ、その発現量は SF21 細胞 1×10^6 個 (直径 35mm シャーレ) 当たり約 $10 \mu\text{g}$ と推測され、バキュロウイルス発現系で VP7 が効率よく発現されることが判明した。

組換え VP7 の抗原性状

組換え VP7 の抗原性について、抗チュウザンウイルス血清をはじめとする各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清を用いてイムノプロット法及び免疫沈降法により検討した。免疫沈降法では、組換え VP7 は実験に供したパリアム血清群ウイルスに対する抗血清すべてと強く反応した (図 2-4)。また、このタンパク質は、補体結合試験等の通常の血清試験では交差反応を示さない抗 BTV 及び抗 EHDV 血清とも反応した。対照的にイムノプロット法で

は、組換え VP7 はすべての抗血清と反応を示さなかった（表 2-1）。反応条件を検討したが、バックグラウンドに影響が出るだけで、抗チュウザンウイルス血清を用いた homologous な反応においてさえも組換え VP7 を検出することはできなかった。

組換え VP7 を用いた寒天ゲル内沈降反応

チュウザン病の血清学的診断法には、BT、EHD 及び AHS と同様に、補体結合試験、寒天ゲル内沈降反応、蛍光抗体法、血球凝集阻止試験、中和試験などがある（67）。一般的には血清群特異反応である寒天ゲル内沈降反応、血清型特異反応である中和試験を用いた診断が行われている。そこで、精製組換え VP7 を抗原として用いた寒天ゲル内沈降反応を行い、抗チュウザンウイルス血清をはじめとする各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清との反応性を調べた。その結果、パリアム血清群ウイルスに対する抗血清と組換え VP7 の間に明瞭な沈降線が確認された（図 2-6）。この場合、免疫沈降反応でみられた抗 BTV 及び抗 EHDV 血清と組換え VP7 の間の交差反応は認められなかった。また、陰性対照として用いた正常血清と組換え VP7 との間にも非特異反応は認められなかった。抗血清との間に明瞭な沈降線を形成させるために必要な組換え VP7 の最小量は約 250 ng と推測され、直径 35 mm シャーレ 1 枚から得られる量で少なくとも 120 検体の血清を検査できることが計算上示された。

考 察

BTV の研究から、VP7 はオルビウイルスカプシドの約 35%を占める主要成分であり、コア粒子表面に位置する血清群特異抗原であることが知られている (33, 34, 88)。近年、VP7 をコードする RNA 分節 7 の遺伝子構造が次々と明らかにされ、モノクローナル抗体や合成ペプチド、遺伝子発現系を利用した分子レベルでの抗原解析が盛んに行われるようになった (18, 54, 102)。一方、BT や AHS などの国際重要疾病においては、組換え VP7 の血清診断用抗原への応用も検討され、すでに実用化されている (13, 56, 76)。

チュウザン病のようなウイルス性異常産の診断は、ウイルス感染から時間が経過した段階で行われる場合が多く、病原学的診断よりむしろ血清学的診断の方が有用性が高い。その対象はおもに初乳未摂取の異常子牛であり、血清中の抗体証明が診断の主体となる。したがって、簡便・正確かつ多検体処理が可能な血清診断用抗原の開発は重要である。そこでチュウザンウイルス VP7 を発現させ、その抗原性状を調べて診断用抗原としての有用性を検討した。発現量が多く、発現タンパク質にみられる修飾や生物活性、免疫応答が本来のものと同様であることから、VP7 の発現にはバキュロウイルス発現系を採用した。その結果、SF21 細胞中に多量の VP7 を発現させることに成功した。組換え VP7 と D'Aguilar、CSIRO Village、Bunyip Creek、Nyabira、Gweru 及び Marondera の各パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV-1 血清、抗 EHDV-1 及び抗 EHDV-2 血清を用いた免疫沈降反応の結果から、チュウザンウイルス VP7 はパリアム血清群特異抗原であることが確認された。また、VP7 には血清群を越えて保存されている抗原決定基が存在することが判明した。さらにイムノプロット解析の結果から、VP7 上に存在する抗原決定基は、一次構造によって直接決定される linear なものではなく、立体構造に依存する conformational なものであると考えられた。BTV、AHSV の VP7 にも同様な特徴が認められているが、これらには linear な抗原決定基の存在も知られている (13, 54)。チュウザンウイルス VP7 にこのような抗原決定基が存在するか否かは、今後、詳細な検討を行って確認する必要がある。第 1 章で示したように、チュウザンウイルスと他血清群ウイルスの VP7 のアミノ酸配列を比較すると N 末端部の

102 アミノ酸残基がよく保存されている。したがって、この領域内に血清群を越えて交差反応を示す conformational な抗原決定基が存在すると考えられる。

組換え VP7 を診断用抗原として用いる場合、上記のような他血清群との交差反応が非特異反応として現れる可能性がある。実際 BTV の組換え VP7 を用いた ELISA 法では、抗 AHSV 血清、抗 EHDV 血清との間に交差反応が認められている (13, 14, 76)。しかしながら、今回組換え VP7 を用いて実施した寒天ゲル内沈降反応では、懸念された非特異反応は認められなかった。非特異反応を極力抑えることを目的として精製 VP7 を用いたが、単に BacCVS7 感染細胞を可溶化しただけのものを抗原として用いた場合でも同様の結果が得られた。以上のことから、組換えバキュロウイルスを用いて発現させたチュウザンウイルス VP7 は、チュウザン病及びパリアム血清群ウイルスに起因する牛異常産の血清診断用抗原として利用可能であることが示された。また、チュウザンウイルス VP7 を大量に生産する系が確立したことで、ヌカカ細胞レセプター結合タンパク質としての VP7 の機能解析や組換え VP7 を応用したサブユニットワクチンの開発が可能となった。

第 3 章

チュウザンウイルス及びパリアム血清群オルビウイルスの 分子疫学的解析

要 旨

チュウザンウイルスとパリアム血清群に属するウイルスの遺伝的関連性を明らかにするために、ウイルスゲノムの電気泳動パターンの比較、第 1 章で述べたチュウザンウイルスの cDNA クローンをプローブとして用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション、さらに RT-PCR 法によるパリアム血清群特異遺伝子の検出と分子疫学的解析を試みた。チュウザンウイルスは RNA ゲノムの電気泳動により他の血清群と容易に区別されたが、パリアム血清群ウイルスとは共通のパターンを示した。また、ハイブリダイゼーションの結果、外殻カプシドタンパク質をコードする RNA 分節 2 及び 6 を除く 8 分節は血清群内で保存されていることが明らかとなった。これらの成績をもとにパリアム血清群ウイルス RNA 分節 5、7 及び 9 を特異的に検出する RT-PCR 法を確立し、日本、オーストラリア及びジンバブエ分離株 24 株のウイルスから得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。チュウザンウイルス分離株の遺伝子変異を年代順に調べたところ、これら RNA 分節にはほぼ同時期に塩基の置換が認められた。また、同じ地域で分離されたウイルス株は、血清型に関係なく相互に遺伝的に近縁であり、地域型 (topotype) 別に分類されることが判明した。分子系統樹解析により、1991 年に日本で分離された D'Aguilar ウイルス KY-115 株は、異なる地域型間で起こった RNA 分節の交換 (reassortment) によって生まれた可能性が示された。

PCR 産物を用いて制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism ; RFLP) 解析を行った結果、調べたオーストラリア及びジンバブエ分離株の全 8 株、日本分離株の KY-115 株 1 株の計 9 株の同定が可能であった。KY-115 株以外の日本分離株は塩基配列が同一であったため、個々の同定はできなかったが、1991 年を境に 2 つの群に分けられた。この方法は、新たに分離されたパリアム血清群ウイルスの地域型や遺伝子の変異を迅速かつ簡便に知るための有力な手段となることが示された。

序 文

BTV や EHDV、AHSV の遺伝子解析が進むにつれ、オルビウイルス血清群間のみならず、血清群内の分子疫学的・進化学的関連性もまた明らかにされつつある。特に Gould と Pritchard (26, 27, 81) は、いろいろな地域で分離された BTV の RNA 分節 3 の塩基配列を解析し、BTV には血清型とは関係のない“地域型”が存在することを示している。チュウザンウイルスの属するパリアム血清群の場合、RNA-RNA ハイブリダイゼーション実験によって同群内のウイルスの遺伝的関連性が明らかにされているが(4, 5)、その分子疫学的・進化学的関連性を示した報告はない。チュウザンウイルスと他のパリアム血清群ウイルスとの関連性についても、これまでに血清学的な比較(61)及びウイルスタンパク質の電気泳動パターンの比較(37)によって調べられたに過ぎない。

血清疫学調査の結果から、日本本土におけるチュウザンウイルスの流行は 1985 ～ 1986 年の牛異常産の発生以前には認められておらず、本ウイルスは海外から沖縄・南西諸島を介して本土に侵入したものと考えられている(23)。したがって、パリアム血清群の疫学や進化を理解するためには、チュウザンウイルス遺伝子の年代による変化を追求することだけでなく、海外の様々な地域で分離されたパリアム血清群ウイルスとチュウザンウイルスを分子レベルで比較することが重要である。

そこで本章では、日本、オーストラリア及びジンバブエ由来ウイルスを用いた RNA 電気泳動パターンの比較及びノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うとともに、パリアム血清群ウイルス遺伝子の特異的に検出する RT-PCR 法の開発を試みた。さらに得られた PCR 産物の塩基配列を比較し、分子系統樹解析及び RFLP 解析を実施してパリアム血清群ウイルスの分子疫学的・進化学的性状を明らかにした。

材料と方法

ウイルスと細胞

パリアム血清群ウイルス日本分離株 16 株（カゴシマウイルス 1 株、チュウザンウイルス 14 株、D'Aguilar ウイルス 1 株）、オーストラリア分離株 5 株（DPP66、D'Aguilar、CSIRO Village、Bunyip Creek、Marrakai）及びジンバブエ分離株 3 株（Nyabira、Marondera、Gweru）（表 3-1）、さらに比較のために BTV-17、EHDV-2、イバラキウイルス、AHSV-4、Eubenangee ウイルス（EUBV）の計 29 株を実験に用いた。カゴシマウイルス KC-05Y84 株は、チュウザン病が流行した前年（1984 年）にウシヌカカから分離されたウイルスで、血清学的にチュウザンウイルスと同じウイルスである（49）。これらのウイルスを BHK-21/13 細胞または HmLu-1 細胞でブラッククロニング後、BHK-21/13 細胞で培養した。

ウイルス RNA の抽出と精製

電気泳動パターンの比較及びノーザンブロットハイブリダイゼーションに用いるウイルス RNA は、第 1 章と同じ方法を用いて抽出・精製し、分光光度計により定量した。RT-PCR 用の鋳型 RNA は、High Pure™ Viral Nucleic acid kit（Boehringer Mannheim）または TRIzol 試薬（Gibco BRL）を用い、ウイルス感染細胞及び培養上清から調整した。

ウイルス RNA の電気泳動

精製ウイルス RNA（各 0.5 μ g）を Laemmli（50）の方法に準じ、10%ポリアクリルアミドゲル及びトリス-グリシン緩衝液を用いて電気泳動を行った。また、Seakem ME agarose（FMC BioProducts）及びトリス-ホウ酸-EDTA（TBE）緩衝液を用いた 1%アガロースゲル電気泳動も実施した。ともに電気泳動後、0.5 μ g / ml に調整したエチジウムブロマイド溶液で染色し、紫外線下で観察した。

ノーザンブロットハイブリダイゼーション

精製ウイルス RNA の 10 分節を 1%アガロースゲルで展開後、Ritter と Roy（83）

の方法に従ってノーザンブロッティングを行った。ゲルを 50mM 水酸化ナトリウム溶液に 20 分間浸漬後、25mM リン酸ナトリウム溶液で 4 回（1 回につき 5 分間）洗浄し、RNA をナイロン膜 Hybond-N+（Amersham Pharmacia Biotech）に室温で 16 時間転写した。転写終了後、50mM 水酸化ナトリウム溶液をしみ込ませた 2 ～ 3 枚の濾紙上にナイロン膜を乗せて 5 分間放置し、2 × SSC 中で振とうしながら 10 ～ 60 秒間洗浄した。

cDNA プロブの作製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出には ECL ランダムプライム DNA ラベリング・検出システム（Amersham Pharmacia Biotech）を用いた。チュウザンウイルス全 RNA 分節の cDNA それぞれ 50 ng をフルオレセイン修飾 dUTP で標識し、ナイロン膜に添加して 42 °C または 60 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 1 × SSC、0.1%（W/V）SDS で 15 分間、0.5 × SSC、0.1%（W/V）SDS でさらに 15 分間洗浄した。シグナルは、HRP 標識抗フルオレセイン抗体と ECL 検出試薬を用い、ルミノールの酸化による化学発光で検出した。

プライマー及び RT-PCR

チュウザンウイルスと他血清群に属する BTV、EHDV 及び AHSV の RNA 分節 5、7 及び 9 の塩基配列を比較して相同性の低い領域を選び出し、表 3-2 に示す 3 種類のパリアム血清群特異的プライマーセットを合成した。

第 1 章で記載した条件に準じて RT-PCR を実施した。すなわちウイルス感染細胞及び培養上清から調整した RNA と各プライマーセットを混合し、95 °C で 5 分間熱変性後、モロニーマウス白血病ウイルス（M-MLV）由来の逆転写酵素を用いて 37 °C 30 分反応させ、cDNA を合成した。次いで *Pfu* DNA ポリメラーゼ（Stratagene）を加えて PCR（94 °C 1 分、55 °C 1 分、72 °C 1 分の反応を 30 サイクル）を行い、1.5% アガロースゲル電気泳動により増幅された cDNA 断片を確認した。

PCR 産物の塩基配列の決定と RFLP 解析

得られた PCR 産物を GENECLEAN II（BIO 101）または Wizard PCR preps DNA purification system（Promega）によって精製し、両方向から塩基配列を決定した。プライマー領域を除いた塩基配列を第 1 章と同じ方法で解析した。RNA 分節 5 の

PCR 産物の場合、*Hha* I、*Mbo* II、*Rsa* I 及び *Taq* I を、RNA 分節 7 の PCR 産物の場合、*Rsa* I 及び *TspE* I を、RNA 分節 9 の PCR 産物の場合、*Alu* I、*Dde* I、*Hinf* I 及び *Rsa* I を用いて切断後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して RFLP 解析を行った。

結 果

チュウザンウイルスとパリアム血清群ウイルスの RNA 電気泳動パターンの比較

チュウザンウイルス RNA は、第 1 章で示したように RNA 分節 8、9 及び 10 の 3 分節のサイズが他の血清群と比べて小さいため、電気泳動により BTV、EHDV、イバラキウイルス、AHSV 及び EUBV と容易に区別することができた（図 3-1）。しかし、同じパリアム血清群に属するウイルス（オーストラリア分離株及びジンバブエ分離株）との比較では、チュウザンウイルスを特定することは困難であった。ポリアクリルアミドゲルを用いた場合、RNA 分節 2 及び 6 の移動度の差からある程度これらのウイルスを区別することはできたが、Bunyip Creek ウイルスや Gweru ウイルスのように、血清型や分離地域に関わらずチュウザンウイルスと極めて類似した RNA 電気泳動パターンを示す例が認められた。一方、アガロースゲルを用いた場合、パリアム血清群に属するウイルスの RNA 電気泳動パターンは同一であった。

ノーザンブロットハイブリダイゼーション

チュウザンウイルス K-47 株、カゴシマウイルス KC-05Y84 株、オーストラリア及びジンバブエ分離株の計 10 株の精製 RNA をナイロン膜に転写し、ハイブリダイゼーションを行った（図 3-2）。42℃の緩やかな反応条件で実施した場合、チュウザンウイルス RNA 分節 1、3、4、5、7、8、9 及び 10 の cDNA プローブは、実験に用いたすべてのウイルス RNA の当該分節と交差反応性を示した。血清型特異遺伝子である RNA 分節 2 の cDNA プローブは、カゴシマウイルス及び DPP66 ウイルスの RNA 分節 2 と反応した。血清型特異性に関与するもう一つの遺伝子である RNA 分節 6 の cDNA プローブは、上記 2 株のウイルスの RNA 分節 6 だけでなく、Marrakai ウイルス CSIRO 82 株及び Gweru ウイルス 1726/76 株の RNA 分節 6 とも交差反応した。60℃の厳しい反応条件でハイブリダイゼーションを実施した場合、全体的にシグナルは弱くなったが、RNA 分節 5 及び 9 の反応性は RNA 分

節 1、3、4、7、8 及び 10 に比べて保たれていた。また、RNA 分節 2 の cDNA プローブは、カゴシマウイルス分節 2 とのみ交差反応し、DPP66 ウイルス RNA 分節 2 とは反応しなかった。RNA 分節 6 の cDNA プローブは、厳しい反応条件下においてもカゴシマ、DPP66、Marrakai 及び Gweru ウイルスの RNA 分節 6 と依然交差反応性を保持していた。

RT-PCR によるパリアム血清群特異遺伝子の検出

RNA 分節 5、7 及び 9 を標的とする 3 種類のプライマーセットを用いて RT-PCR を行ったところ、実験に用いた 24 株のパリアム血清群ウイルスすべてにおいて、分節 5 では 305 bp、分節 7 では 266 bp、分節 9 では 229 bp の目的とする DNA 断片の増幅が確認された（図 3-3）。しかし、BTV、EHDV、イバラキウイルス、AHSV 及び EUBV RNA を鋳型に用いた場合、遺伝子の増幅は認められず、いずれのプライマーセットもパリアム血清群特異的に働くことが示された。

PCR 産物の塩基配列の比較

RT-PCR によって増幅されたパリアム血清群ウイルスの DNA 断片から RNA 分節 5、7 及び 9 の部分塩基配列を決定し、それぞれを比較した（表 3-3）。いずれの場合も、血清型に関わらず、同じ地域で分離された株間の相同性は高く、異なる地域で分離された株間の相同性は相対的に低いという特徴が認められた。

RNA 分節 5 の PCR 産物間の相同性は 85.8 ～ 100%であった。日本分離株間では 96.6 ～ 100%、オーストラリア分離株間では 96.2 ～ 99.6%、ジンバブエ分離株間では 98.5 ～ 99.2%の相同性が認められた。日本分離株はオーストラリア分離株よりむしろジンバブエ分離株に近縁であった。塩基の置換はコドンの 3 番目の位置に集中して認められたため、PCR 産物から推定される NS1 の N 末端側 87 個のアミノ酸配列も 24 株間でよく保存されており、その相同性は 96.6 ～ 100%であった。日本分離株 16 株を分離年順に比較したところ、1984 ～ 1990 年の間に分離された株の塩基配列は全く同じであったが、1991 年に分離されたチュウザンウイルス ON-91-5 株及び D'Aguilar ウイルス KY-115 株では 3.4%、1997 年に分離されたチュウ

ザンウイルス ON-1/E/97 株及び MZ-16/E/97 株では 3.1%の塩基の置換が認められた。これら 16 株のアミノ酸配列に相違は認められなかった。

RNA 分節 7 の PCR 産物間の相同性は 83.9 ～ 100%であった。日本分離株間では 95.1 ～ 100%、オーストラリア分離株間では 84.8 ～ 100%、ジンバブエ分離株間では 99.6 ～ 100%の相同性が認められた。しかしながら、オーストラリア分離株である Marrakai ウイルス CSIRO 82 株及び DPP66 ウイルスは、他のオーストラリア分離株よりむしろ日本分離株に近縁であり、それぞれ 88.8 ～ 91.1%、88.4 ～ 92.0%の相同性を示した。PCR 産物から推定される VP7 のアミノ酸残基 88 ～ 161 番目に相当する配列の相同性は 98.6 ～ 100%であった。Gweru ウイルス 1726/76 株を除いた 23 株のアミノ酸配列は全く同じであり、パリアム血清群を通じて非常によく保存されていることが判明した。日本分離株 16 株を分離年順に比較したところ、1984 ～ 1990 年の間に分離された株の塩基配列は全く同じであり、1991 年以降の分離株に塩基の置換が認められた。1991 年に分離された D'Aguilar ウイルス KY-115 株では 4.9%と高い置換率を示したが、1991 年及び 1997 年に分離されたチュウザンウイルス株の置換率はそれぞれ 0.9%、1.3%と低かった。

RNA 分節 9 の PCR 産物の塩基配列もまた株間でよく保存されており、85.9 ～ 100%の相同性を示した。日本分離株間では 95.1 ～ 100%、オーストラリア分離株間では 93.0 ～ 99.5%、ジンバブエ分離株間では 96.8 ～ 99.5%の相同性が認められた。日本分離株はジンバブエ分離株よりオーストラリア分離株に近縁であった。RNA 分節 5 及び 7 の場合と異なり、塩基の置換がコドンの 1 番目の位置に集中しているため、PCR 産物から推定される VP6 のアミノ酸残基 53 ～ 113 番目に相当する配列の相同性は 60.0 ～ 100%であった。特にジンバブエ分離株は、日本分離株との間で 60.7 ～ 68.9%、オーストラリア分離株との間で 60.0 ～ 68.9%の相同性を示したのみであった。しかしながら、各アミノ酸配列の親水性・疎水性パターンや二次構造は極めて類似していた。日本分離株 16 株を分離年順に比較したところ、1984 ～ 1991 年の間に分離された株の塩基配列は D'Aguilar ウイルス KY-115 株を除いて全く同じであることが判明した。KY-115 株では 4.9%の塩基の置換が認められた。また、チュウザンウイルスの 1997 年分離株の置換率は 0.5%であった。これら 16 株間のアミノ酸配列の相同性は 86.9 ～ 100%であった。

パリアム血清群ウイルスの分子系統樹解析

パリアム血清群ウイルス間の分子疫学的・進化学的関連性をより明らかにするため、RNA 分節 5、7 及び 9 の PCR 産物の塩基配列をもとに第 1 章と同じ UPGMA 法により分子系統樹を作製した（図 3-4）。RNA 分節 5 の場合、分離地域別に 3 つの群に分けられ、日本分離株はオーストラリア分離株よりもジンバブエ分離株に近縁であることが確認された。RNA 分節 7 及び 9 の分子系統樹では、オーストラリア分離株は Marrakai ウイルス CSIRO 82 株及び DPP66 ウイルスからなる群と D'Aguilar ウイルス B8112 株、CSIRO Village ウイルス CSIRO 11 株及び Bunyip Creek ウイルス CSIRO 58 株からなる群の 2 群に分けられた。日本分離株は、RNA 分節 7 の場合には前者の群に、RNA 分節 9 の場合は後者の群にそれぞれ近縁であることが判明した。RNA 分節 5 の場合と異なり、日本分離株の RNA 分節 7 及び 9 はジンバブエ分離株とは遠縁であった。また、日本で唯一の D'Aguilar ウイルス分離株 KY-115 株の RNA 分節 7 及び 9 は、他の日本分離株と異なる独立した枝上に属していた。

PCR 産物の RFLP 解析

図 3-5 に示したように、RNA 分節 7 の PCR 産物をそれぞれ *Rsa* I、*TspE* I で切断することによって、①カゴシマウイルス KC-05Y84 株及び 1991 年以前に分離されたチュウザンウイルス株、② 1991 年以降に分離されたチュウザンウイルス株、③ D'Aguilar ウイルス KY-115 株、④ DPP66 ウイルス、⑤ Marrakai ウイルス CSIRO 82 株、⑥ Bunyip Creek ウイルス CSIRO 58 株、⑦ 上記④～⑥以外のオーストラリア分離株 2 株、⑧ジンバブエ分離株 3 株の 8 種類の RFLP パターンが確認された。⑦の D'Aguilar ウイルス B8112 株及び CSIRO Village ウイルス CSIRO 11 株は、RNA 分節 5 の PCR 産物の *Taq* I による切断、あるいは RNA 分節 9 の PCR 産物の *Dde* I による切断で区別することができた。⑧のジンバブエ分離株 3 株のうち、Gweru ウイルス 1726/76 株もまた、RNA 分節 5 の PCR 産物の *Taq* I による切断で他の 2 株と区別することができた。残る Nyabira ウイルス 792/73 株及び Marondera ウイルス 1070/78 株は、RNA 分節 5 の PCR 産物の *Rsa* I による切断、あるいは RNA 分節 9 の PCR

産物の *Alu* I による切断で区別することができた。RNA 分節 5 及び 9 の PCR 産物の場合、1 枚のゲルでより多くの情報を得るために、実際にはそれぞれ 2 種類の制限酵素を組み合わせで同時切断を行った。図 3-6 には RNA 分節 5 の PCR 産物の *Hha* I 及び *Taq* I、*Mbo* II 及び *Rsa* I による切断の結果を、図 3-7 には RNA 分節 9 の PCR 産物の *Dde* I 及び *Hinf* I、*Alu* I 及び *Rsa* I による切断の結果を示した。最終的に 11 種類の RFLP パターンが確認され、これにより実験に用いたオーストラリア分離株 5 株、ジンバブエ分離株 3 株のすべてと D'Aguilar ウイルス日本分離株 KY-115 株の計 9 株を同定することができた。KY-115 株以外の日本分離株は、塩基配列の比較及び分子系統樹解析で示されたように、1991 年を境に 2 つの群に分けることができた。

考 察

従来より、オルビウイルスを含むレオウイルス科の分子遺伝学的・疫学的解析の重要な手法として、ウイルスゲノムの電気泳動、ノーザンあるいはドットプロットハイブリダイゼーションによる解析が用いられてきた(4, 5, 7, 44, 83)。ポリアクリルアミドゲル電気泳動にみられるパターン(electropherotype)は、RNA分節のサイズや高次構造の多様性を反映し、ウイルスの同定に有用であることが確認されている。しかし、このRNA電気泳動パターンが、同じ血清型に属しながら異なる場合や、逆に異なる血清型に属しながら酷似している場合があり、この方法ではパリアム血清群ウイルスの各血清型を同定することは実際には困難であった。アガロースゲルを使用した場合、これらのウイルスは血清型に関係なく共通のRNA電気泳動パターンを示し、BTV、EHDV、イバラキウイルス、AHSV及びEUBVと容易に区別できた。以上のことから、電気泳動による解析は少なくともパリアム血清群の同定には有用であると思われる。

チュウザンウイルスのcDNAプローブを用いたノーザンプロットハイブリダイゼーションの結果は、BodkinとKnudson(4, 5)のRNA-RNAハイブリダイゼーションの結果と一致していた。すなわち血清型特異的であるRNA分節2及び6を除く8分節はパリアム血清群内で保存されていた。42℃の緩やかな反応条件でハイブリダイゼーションを行った場合、RNA分節2及び6のcDNAプローブは、カゴシマウイルスのみならずDPP66ウイルスとも反応した。60℃の厳しい反応条件下では、これらのcDNAプローブとカゴシマウイルスとの反応性は維持されていたが、DPP66ウイルスとの反応性はRNA分節2で消失し、RNA分節6で低下した。冒頭に述べたように、パリアム血清群ウイルスはPalyam、Kasba、Vellore、D'Aguilar、Petevo及びGweruの6つのantigenic complexに分類され、さらにこのantigenic complexの下に12の血清型に分類されている。DPP66ウイルスの血清学的性状については今まで明らかにされていないが(21)、少なくともKasba antigenic complexに属し、チュウザンウイルスとは若干異なる抗原性を示すことが示唆された。RNA分節6のcDNAプローブは同じantigenic complexに属するMarrakaiウイルス、さらに興味深いことに異なるantigenic complexに属するGweruウイルスとも反応した。現行の複

雑な分類を整理するためにも、今後、チュウザンウイルス以外のパリアム血清群ウイルス RNA 分節 2 及び 6 の遺伝子構造を解析し、これらの血清学的関連性を遺伝子レベルで明らかにしていく必要がある。

チュウザンウイルスの遺伝子解析及びハイブリダイゼーションの結果をもとに、パリアム血清群ウイルス RNA 分節 5、7 及び 9 を特異的に検出する RT-PCR 法を確立した。これら 3 分節の PCR 産物の比較から、同じ地域で分離された株間の塩基配列・アミノ酸配列は、血清型に関係なく非常によく保存されていることが判明した。BTV や EHDV で報告されているように (6, 11, 26, 27, 81)、パリアム血清群ウイルスも地域型別に分類されうることが示唆された。分離年別の比較では、1984 年～1990 年に分離された株の塩基配列は、分節 5、7 及び 9 のいずれの場合も全く同じであった。この結果は、チュウザンウイルスが遺伝的に安定していることを示すものと考えられる。RNA 分節 5 及び 7 で 1991 年と 1997 年に、RNA 分節 9 で 1997 年に塩基配列の変異が認められているが、このように遺伝子の変化がほぼ同時期に起こったことは、チュウザンウイルスの分子進化を考える上で大変興味深い。分子系統樹解析の結果は地域型の存在をより明確に指示するものであり、日本型 (Japanese topotype)、ジンバブエ型 (Zimbabwean topotype) 及び少なくとも 2 つのオーストラリア型 (Australian topotype) の存在が確認された。パリアム血清群ウイルスは、同一起源ながら地域特異的な遺伝子プール内で独自に進化を遂げていると考えられた。しかし、一方で D'Aguilar ウイルス KY-115 株のように、RNA 分節 5 の由来は“日本型”で、RNA 分節 7 及び 9 の由来は別の地域型である株も分離されている。これは KY-115 株が、海外から日本に侵入したウイルスと“日本型”ウイルスとの RNA 分節の交換によって生じた遺伝子再集合ウイルスであることを示唆している。したがって、分節した RNA をゲノムに持つ他のウイルス同様に、パリアム血清群の進化も同一 RNA 分節における塩基配列の連続的变化 (genetic drift) 及び RNA 分節の交換 (reassortment = genetic shift) の両機序によって起こると考えられる。その進化のメカニズムを明らかにするためには、今後、アジア・オセアニア諸国やアフリカ諸国などで分離されたより多くのウイルス株を用いた比較解析を行っていく必要がある。

PCR 産物の RFLP 解析は、分離されたパリアム血清群ウイルスの地域型や遺伝子の変異を迅速かつ簡便に知るために有用な方法であることが確認された。この

方法は、ウイルス分離と抗体調査によって行われているチュウザンウイルス及びパリアム血清群ウイルスのモニタリングの補助的手段あるいは遺伝子診断法としても応用可能であると考えられる。

総 括

チュウザンウイルスの分子生物学的性状を明らかにしてチュウザン病の新しい血清診断法を開発するとともに、パリアム血清群ウイルスの分子疫学的研究手法を確立するために、本ウイルスの遺伝子解析を行い、組換えバキュロウイルスによる VP7 の発現及び RT-PCR 法を用いたパリアム血清群ウイルスの検出と解析を試みた。

1985 年におとり牛血液から分離されたチュウザンウイルス K-47 株を BHK21/13 細胞にて増殖させ、感染細胞よりウイルス 2 本鎖 RNA を抽出・精製して cDNA ライブラリーを作製した。これをもとに全 10 分節の塩基配列を決定した結果、チュウザンウイルスのゲノムは、分節 1 の 3930 bp から分節 10 の 728 bp まで、総塩基数 18915 bp からなり、7 つの構造タンパク質及び 3 つの非構造タンパク質をコードすることが明らかとなった。各 RNA 分節は介在配列のない単一の ORF を有し、その 5' 及び 3' 末端には共通の塩基配列 (5' GU (U/A) UAAA..... (A/G) C (U/A) (U/C) AC 3') や分節に特異的な逆位反復配列が認められた。チュウザンウイルス遺伝子と他の血清群に属する BTV、EHDV、AHSV 及び BRDV の遺伝子をアミノ酸レベルで比較した結果、コアタンパク質 VP3 が最もよく保存されていた (35.5 ~ 63.9%)。一方、ウイルス中和抗原の本体である外殻カプシドタンパク質 VP2 間の相同性は 19.7 ~ 22.5% と最も低かった。また、オルビウイルス間では、VP2 の場合を除いて、非構造タンパク質より構造タンパク質の方が保存されていることが判明した。さらに分子系統樹解析を行ったところ、宿主域や分布地域、病性が異なるにも関わらず、チュウザンウイルスは遺伝的に AHSV に最も近縁であることが明らかとなった。

組換えバキュロウイルスによって主要コアタンパク質 VP7 を発現させ、性状解析を行うとともに、その血清診断用抗原としての有用性を検討した。発現した VP7 は、SDS-PAGE によって VP7 の推定分子量 38K に一致する単一のバンドとして検出され、抗チュウザンウイルス血清を用いた間接蛍光抗体法によって組換えウイルス感染昆虫細胞質内に確認された。その発現量は計算上細胞 1×10^6 個当たり約 10 μ g と推測され、バキュロウイルス発現系で効率よく発現されることが判

明した。各種パリアム血清群ウイルスに対する抗血清、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清を用いて組換え VP7 の抗原性状について検討したところ、免疫沈降法とイムノブロット法で異なる結果が得られた。免疫沈降法では、VP7 はパリアム血清群ウイルスに対する抗血清すべてと強く反応し、通常の血清試験では交差反応を示さない抗 BTV 及び抗 EHDV 血清とも反応した。一方、イムノブロット法では、VP7 は抗チュウザンウイルス血清を含むすべての抗血清と反応を示さなかった。チュウザンウイルス VP7 はパリアム血清群特異抗原であることが確認されたが、その抗原決定基は一次構造によって直接決定される linear なものではなく、立体構造に依存する conformational なものであると考えられた。また、VP7 には血清群を越えて保存されている抗原決定基の存在が示された。組換え VP7 を用いた寒天ゲル内沈降反応では、パリアム血清群ウイルスに対する抗血清と VP7 の間に明瞭な沈降線が確認された。しかしながら、抗 BTV 及び抗 EHDV 血清と VP7 の間には交差反応は認められなかった。以上のことから、組換えバキュロウイルスを用いて発現させたチュウザンウイルス VP7 は、チュウザン病及びパリアム血清群ウイルスに起因する牛異常産の血清診断用抗原として有用であることが明らかとなった。

チュウザンウイルスとパリアム血清群に属するウイルスの RNA 電気泳動パターンの比較、チュウザンウイルスの cDNA クローンをプローブとして用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション、さらに RT-PCR 法によるパリアム血清群特異遺伝子の検出と分子疫学的解析を行った。チュウザンウイルスは RNA ゲノムの電気泳動により他の血清群と容易に区別されたが、パリアム血清群ウイルスとは共通のパターンを示した。また、ハイブリダイゼーションの結果、外殻カプシドタンパク質をコードする RNA 分節 2 及び 6 を除く 8 分節は血清群内で保存されていることが明らかとなった。これらの成績をもとにパリアム血清群ウイルス RNA 分節 5、7 及び 9 を特異的に検出する RT-PCR 法を確立し、日本、オーストラリア及びジンバブエ分離株 24 株のウイルスから得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。チュウザンウイルス分離株の遺伝子の変化を分離年順に調べたところ、これら RNA 分節にはほぼ同時期に塩基の置換が認められた。また、同じ地域で分離されたウイルス株は、血清型に関係なく相互に遺伝的に近縁であり、地域型別に分類されることが判明した。分子系統樹解析により、1991 年に日本で分離された D'Aguilar ウイルス KY-115 株は、異なる地域型間で起こった RNA 分節の交換

によって生まれた可能性が示された。

PCR 産物を用いて RFLP 解析を行った結果、調べたオーストラリア及びジンバブエ分離株の全 8 株、日本分離株 1 株 (KY-115 株) の計 9 株の同定が可能であった。KY-115 株以外の日本分離株は塩基配列が同一であったため、個々の同定はできなかったが、1991 年を境に 2 つの群に分けられた。この方法は、新たに分離されたパリアム血清群ウイルスの地域型や遺伝子の変異を迅速かつ簡便に知るために有用であることが示された。

本研究で明らかになったチュウザンウイルスの全塩基配列データは、本ウイルスの抗原性・病原性の詳細な解析やサブユニットワクチンの開発を容易にするだけでなく、オルビウイルス属の分類学的・進化学的研究の推進にも貢献すると考えられる。また、組換え VP7 を用いた寒天ゲル内沈降反応や RT-PCR 法は、チュウザン病の診断や本ウイルスのモニタリングに有効利用されると思われる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、多大なご指導及びご助言を賜った元農林水産省家畜衛生試験場の古内進博士、元農林水産省農業生物資源研究所の美濃部侑三博士に深謝いたします。また、塩基配列の決定に当たりご協力賜った元農林水産省家畜衛生試験場の田中深雪女史、本稿をまとめるに当たり懇切なご助言を賜った農林水産省家畜衛生試験場の坂本研一博士に感謝いたします。

本稿のご校閲と有益なご助言を賜った東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部の高橋英司教授に謝意を表します。

引用文献

1. Anzola, J. V., Xu, Z., Asamizu, T. and Nuss, D. L. 1987. Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 8301-8305.
2. Bansal, O. B., Stokes, A., Bansal, A., Bishop, D. and Roy, P. 1998. Membrane organization of bluetongue virus nonstructural glycoprotein NS3. *J. Virol.* 72 : 3362-3369.
3. Bernard, K. A., Israel, B. A., Thompson, L. H., Homan, E. J. and Schultsz, K. T. 1994. Virulence-associated antigenic and genetic characteristics of bluetongue virus-17 isolates. *Virology* 201 : 321-329.
4. Bodkin, D. K. and Knudson, D. L. 1985. Sequence relatedness of Palyam virus genes to cognates of the Palyam serogroup viruses by RNA-RNA blot hybridization. *Virology* 143 : 55-62.
5. Bodkin, D. K. and Knudson, D. L. 1986. Genetic relatedness of Palyam serogroup viruses by RNA-RNA blot hybridization. *J. Gen. Virol.* 67 : 683-691.
6. Bonneau, K. R., Zhang, N., Zhu, J., Zhang, F., Li, Z., Zhang, K., Xiao, L., Xiang, W. and MacLachlan, N. J. 1999. Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from the United States and the People's Republic of China. *Virus Res.* 61 : 153-160.
7. Bremer, C. W., Huismans, H. and Van Dijk, A. A. 1990. Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome. *J. Gen. Virol.* 71 : 793-799.
8. Carr, M.A., de Mattos, C. C., de Mattos, C. A. and Osburn, B. I. 1994. Association of bluetongue virus gene segment 5 with neuroinvasiveness. *J. Virol.* 68 : 1255-1257.
9. Cashdollar, L. W., Esparza, J., Hudson, G. R., Chemelo, R., Lee, P. W. K. and Joklik, W. K. 1982.

Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 7644-7648.

10. Chen, D., Zeng, Q.-Y., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K. and Ramig, R. F. 1994. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68 : 7030-7039.

11. Cheney, I. W., Larson, M. D., Mecham, J. O., Wilson, W. C. 1995. Geographical genetic variation in the gene encoding VP3 from the Alberta isolate of epizootic hemorrhagic disease virus. *Virus Res.* 36 : 279-286.

12. Cheney, I. W., Yamakawa, M., Roy, P., Mecham, J. O., Wilson, W. C. 1996. Molecular characterization of the segment 2 genes of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 2: gene sequence and genetic diversity. *Virology* 224 : 555-560.

13. Chuma, T., Le Blois, H., Sanchez-Viscaino, J. M., Diaz-Laviada, M. and Roy, P. 1992. Expression of the major core antigen VP7 of African horsesickness virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *J. Gen. Virol.* 73 : 925-931.

14. Cloete, M., du Plessis, D. H., van Dijk, A. A., Huismans, H. and Viljoen, G. J. 1994. Vaccinia virus expression of the VP7 protein of South African bluetongue virus serotype 4 and its use as an antigen in a capture ELISA. *Arch. Virol.* 135 : 405-418.

15. Cowley, J. A. and Gorman, B. M. 1987. Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *J. Virol.* 61 : 2304-2306.

16. Diaz-Ruiz, J. R. and Kaper, J. M. 1978. Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure. *Prep. Biochem.* 8 : 1-17.

17. Eaton, B. T. and Gould, A. R. 1987. Isolation and characterization of orbivirus genotypic variants. *Virus Res.* 6 : 363-382.

18. Eaton, B. T., Gould, A. R., Hyatt, A. D., Coupar, B. E. H., Martyn, J. C. and White, J. R. 1991. A bluetongue serogroup-reactive epitope in the amino terminal half of the major core protein VP7 is accessible on the surface of bluetongue virus particles. *Virology* 180 : 687-696.
19. French, T. J. and Roy, P. 1990. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* 64 : 1530-1536.
20. French, T. J., Marshall, J. J. A. and Roy, P. 1990. Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J. Virol.* 64 : 5965-5700.
21. Gard, G. P., Shorthose, J. E., Weir, R. P., Walsh, S. J. and Melville, L. F. 1988. Arboviuses recovered from sentinel livestock in northern Australia. *Vet. Microbiol.* 18 : 109-118.
22. Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. and Blinov, V. M. 1988. A novel superfamily of nucleotide triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Let.* 235 : 16-24.
23. Goto, Y., Miura, Y. and Kono, Y. 1988a. Epidemiological survey of an epidemic of congenital abnormalities with hydranencephaly-cerebellar hypoplasia syndrome of calves occurring in 1985/1986 and seroepidemiological investigations on Chuzan virus, a putative causal agent of the disease, in Japan. *Jpn. J. of Vet. Sci.* 50 :405-413.
24. Goto, Y., Miura, Y. and Kono, Y. 1988b. Serologic evidence for the etiologic role of Chuzan virus in an epizootic of congenital abnormalities with hydranencephaly-cerebellar hypoplasia syndrome of calves in Japan. *Am. J. Vet. Res.* 49 : 2026-2029.
25. Gouet, P., Diprose, J. M., Grimes, J. M., Malby, R., Burroughs, J. N., Zientara, S., Stuart, D. I. and Mertens, P. P. C. 1999. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 97 : 481-490.

26. Gould, A. R. and Pritchard, L. I. 1990. Relationships amongst bluetongue viruses revealed by comparisons of capsid and outer coat protein nucleotide sequences. *Virus Res.* 17 : 31-52.
27. Gould, A. R. and Pritchard, L. I. 1991. Phylogenetic analyses of the complete nucleotide sequence of the capsid protein (VP3) of Australian epizootic haemorrhagic disease virus of deer virus (serotype 2) and cognate genes from other orbiviruses. *Virus Res.* 21 : 1-18.
28. Grimes, J., Basak, A. K., Roy, P. and Stuart, D. 1995. The crystal structure of bluetongue virus VP7. *Nature* 373 : 167-170.
29. Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P. P. C. and Stuart, D. I. 1998. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 395 : 470-478.
30. Hassan, S. S. and Roy, P. 1999. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J. Virol.* 73 : 9832-9842.
31. Huang, I. -J., Hayama, E., Jeong, Y. -J. and Li, J. K.-K. 1993. Conservation of the segment 4 gene sequence and of a leucine zipper motif in VP4 among five US bluetongue viruses. *Virology* 195 : 772-779.
32. Huismans, H. and Els, H. J. 1979. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology* 92 : 397-406.
33. Huismans, H. and Erasmus, B. J. 1981. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48 : 51- 58.
34. Huismans, H. and Van Dijk, A. A. 1990. Bluetongue virus structural components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 162 : 21-41.
35. Hyatt, A. D., Gould, A. R., Couper, B. and Eaton, B. T. 1991. Localization of the nonstructural

protein NS3 in bluetongue virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 72 : 2263-2267.

36. Hyatt, A. D., Zhao, Y. and Roy, P. 1993. Release of Bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology* 193 : 592-603.

37. Ito, T., Akashi, H., Yamakawa, M., Kurogi, H. and Inaba, Y. 1990. Structural polypeptides of a Palyam serogroup virus isolated in Japan. *Aus. Vet. J.* 67 : 153-154.

38. Iwata, H., Hirasawa, T. and Roy, P. 1991. Complete nucleotide sequence of segment 5 of epizootic haemorrhagic disease virus: the outer capsid protein VP5 is homologous to the VP5 protein of bluetongue virus. *Virus Res.* 20 : 273-281.

39. Iwata, H., Chuma, T. and Roy, P. 1992. Characterization of the genes encoding two of the major capsid proteins of epizootic haemorrhagic disease virus indicates a close genetic relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 73 : 915-924.

40. Iwata, H., Yamakawa, M. and Roy, P. 1992. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horsesickness, bluetongue and epizootic haemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology* 191 : 251-261.

41. Jensen, M. J. and Wilson, W. C. 1995. A model for the membrane topology of the NS3 protein as predicted from the sequence of segment 10 of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 1. *Arch. Virol.* 140 : 799- 805.

42. Jusa, E. R., Inaba, Y., Kadoi, K., Kurogi, H., Fonseca, E. and Shope, R. E. 1994. Identification of Kagoshima and Chuzan virus of Japan as Kasba virus, an orbivirus of the Palyam serogroup. *Aus. Vet. J.* 71 : 57.

43. Kahlon, J., Sugiyama, K. and Roy, P. 1983. Molecular basis of bluetongue virus neutralization. *J. Virol.* 48 : 627-632.

44. Knudson, D. L., Butterfield, W. K., Shope, R. E., Walton, T. E. and Campbell, C. H. 1982. Electrophoretic comparison of the genomes of North American bluetongue viruses, one Australian bluetongue virus, and three other related orbiviruses. *Vet. Microbiol.* 7 : 285-293.
45. Knudson, D. L., Tesh, R. B., Main, A. J., St George, T. D. and Diagoutte, J. P. 1984. Characterization of the Palyam serogroup viruses (*Reoviridae : Orbivirus*). *Intervirology* 22 : 41-49.
46. Koonin, E. V. 1992. Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-stranded RNA viruses. *Semin. Virol.* 3 : 327-339.
47. Kowalik, T. F. and Li, J. K. -K. 1989. Sequence analyses and structural predictions of double-stranded RNA segment S1 and VP7 from United States prototype bluetongue virus serotypes 13 and 10. *Virology* 172 : 189-195.
48. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15 : 8125-8148.
49. Kurogi, H., Suzuki, T., Akashi, H., Ito, T., Inaba, Y. and Matsumoto, M. 1989. Isolation and preliminary characterization of an orbivirus of the Palyam serogroup from biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet. Microbiol.* 19 : 1-11.
50. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
51. Laviada, M. D., Roy, P., Sanchez-Viscaino, J. M. and Casal, J. I. 1995. The use of African horse sickness virus NS3 protein, expressed in bacteria, as a marker to differentiate infected from vaccinated horses. *Virus Res.* 38 : 205-218.
52. Le Blois, H., Fayard, B., Urakawa, T. and Roy, P. 1991. Synthesis and characterization of chimeric particles between epizootic haemorrhagic disease virus and bluetongue virus: functional domains are

conserved on the VP3 protein. J. of. Virol. 65 : 4821-4831.

53. Le Blois, H., French, T., Mertens, P. P. C., Burroughs, J. N. and Roy, P. 1992. The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. Virology 189 : 757-761.

54. Li, J. K.-K. and Yang, Y.-Y. 1990. Mapping of two immunodominant antigenic epitopes conserved among the major inner capsid protein, VP7 of five bluetongue viruses. Virology 178 : 552-559.

55. Martin, L. -A., Meyer, A. J., O'Hara, R. S., Fu, H., Mellor, P. S., Knowles, N. J. and Mertens, P. P. C. 1998. Phylogenetic analysis of African horse sickness virus segment 10: sequence variation, virulence characteristics and cell exit. Arch. Virol. Suppl. 14 : 281-293.

56. Martyn, J. C., Gould, A. R. and Eaton, B. T. 1990. High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. Virus Res. 18 : 165-178.

57. Maxam, A. M. and Gilbert, W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65 : 499-560.

58. Mertens, P. P. C. and Sangar, D. V. 1985. Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. Virology 140 : 55-67.

59. Mertens, P. P. C., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J. N. Corteyn, A. H., Jeggo, M. H., Jennings, D. M. and Gorman, B. M. 1989. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. Virology 170 : 561-565.

60. Mertens, P. P. C., Burroughs, J. N., Walton, A., Wellby, M. P., Fu, H., O'Hara, R. S., Brookes, S. M. and Mellor, P. S. 1996. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. Virology 217 : 582-593.

61. Miura, Y., Goto, Y., Kubo, M. and Kono, Y. 1988a. Isolation of Chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus *Orbivirus*, from cattle and *Culicoides oxystoma* in Japan. Am. J. Vet. Res. 49 : 2022-2025.
62. Miura, Y., Goto, Y., Kubo, M. and Kono, Y. 1988b. Pathogenicity of Chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus *Orbivirus* for cattle. Jpn. J. Vet. Sci. 50 : 632-637.
63. Miura, Y., Goto, Y., Kubo, M. and Kono, Y. 1990. Hydranencephaly-cerebellar hypoplasia in a newborn calf after infection of its dam with Chuzan virus. Jpn. J. Vet. Sci. 52 : 689- 694.
64. Mizukoshi, N., Sakamoto, K., Iwata, A., Tsuchiya, T., Ueda, S., Watanabe, T., Kamada, M. and Fukusho, A. 1992. The complete nucleotide sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS1 of bluetongue virus. J. Gen. Virol. 73 : 2425-2428.
65. Mizukoshi, N., Sakamoto, K., Iwata, A., Tsuchiya, T., Ueda, S., Apiwatnakorn, B., Kamada, M. and Fukusho, A. 1993. The complete nucleotide sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 4, which encodes the minor core protein VP4. Virus Res. 28 : 299-306.
66. Monastyrskaya, K., Booth, T., Nel, L. and Roy, P. 1994. Mutation of either of two cysteine residues or deletion of the amino or carboxy terminus of nonstructural protein NS1 of bluetongue virus abrogates virus specified tubule formation in insect cells. J. Virol. 68 : 2169-2178.
67. Monath, T. P. and Guirakhoo, F. 1996. Orbiviruses and Coltiviruses. In: Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.), Fields Virology, 3rd, edn, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 1735-1766.
68. Moss, S. R., Fukusho, A. and Nuttall, P. A. 1990. RNA segment 5 of Broadhaven virus, a tick-borne orbivirus, shows sequence homology with segment 5 of bluetongue virus. Virology 179 : 482-484.

69. Moss, S. R., Jones, L. D. and Nuttall, P. A. 1992a. Comparison of the nonstructural protein, NS3, of tick-borne and insect-borne orbiviruses. *Virology* 187 : 841-844.
70. Moss, S. R., Jones, L. D. and Nuttall, P. A. 1992b. Comparison of the major structural core proteins of tick-borne and *Culicoides*-borne orbiviruses. *J. Gen. Virol.* 73 : 2585-2590.
71. Moss, S. R. and Nuttall, P. A. 1995. Comparison of the non-structural protein, NS1, of tick-borne and insect-borne orbiviruses. *Virus Res.* 36 : 287-292.
72. Nagesha, H. S., Gould, A. R., White, J. R., Lunt, R. A. and Duch, C. J. 1996. Expression of the major inner capsid protein of the epizootic haemorrhagic disease virus in baculovirus and potential diagnostic use. *Virus Res.* 43 : 163-169.
73. Nakashima, N., Koizumi, M., Watanabe, H. and Noda, H. 1996. Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: a putative member of the genus *Fijivirus*. *J. Gen. Virol.* 77 : 139-146.
74. Nuttall, P. A., Moss, S. R. Jones, L. D. and Carey, D. 1989. Identification of the major genetic determinant for neurovirulence of tick-borne orbiviruses. *Virology* 172 : 428-434.
75. O'Hara, R. S., Meyer, A. J., Burroughs, J. N., Pullen, L., Martin, L.-A. and Mertens, P. P. C. 1998. Development of a mouse model system, coding assignments and identification of the genome segments controlling virulence of African horse sickness virus serotype 3 and 8. *Arch. Virol. Suppl.* 14 : 259-279.
76. Oldfield, S. Adachi, Y., Urakawa, T., Hirasawa, T. and Roy, P. 1990. Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. G. Virol.* 71 : 2649-2656.
77. Ouchterlony, O. 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5 : 1-78.
78. Patton, J. T., Wentz, M., Xiaobo, J. and Ramig, R. F. 1996. cis-Acting signals that promote genome

replication in rotavirus mRNA. *J. Virol.* 70 : 3961-3971.

79. Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8 : 3867-3874.

80. Poncet, D., Laurent, S. and Cohen, J. 1994. Four nucleotides are the minimal requirement for recognition by rotavirus nonstructural protein NSP3. *EMBO J.* 13 : 4165-4173.

81. Pritchard, L. I., Gould, A. R., Wilson, W. C., Thompson, L., Mertens, P. P. C. and Wade-Evans, A. M. 1995. Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-2). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Res.* 35 : 247-261.

82. Rao, C. D., Kiuchi, A. and Roy, P. 1983. Homologous terminal sequences of the genome double-stranded RNAs of bluetongue virus. *J. Virol.* 46 : 378-383.

83. Ritter, D. G. and Roy, P. 1988. Genetic relationships of bluetongue virus serotypes isolated from different parts of the world. *Virus Res.* 11 : 33-47.

84. Roy, P., Marshall, J. J. and French, T. J. 1990. Structure of the bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 162 : 43- 87.

85. Roy, P., Hirasawa, T., Fernandez, M., Blinov, V. M. and Sanchez-Vixcain Rodrique, J. M. 1991. The complete sequence of the group-specific antigen, VP7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 72 : 1237-1241.

86. Roy, P., French, T. and Erasmus, B. J. 1992. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine* 10 : 28-32.

87. Roy, P. 1996. Orbivirus structure and assembly. *Virology* 216 : 1-11.

88. Roy, P. 1996. Orbiviruses and their replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.), *Fields Virology*, 3rd, edn, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 1709-1734.
89. Stauber, N., Martinez-Costas, J., Sutton, G., Monastyrskaya, K. and Roy, P. 1997. Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J. Virol.* 71 : 7220-7226.
90. Stockle, M. Y., Shaw, M. W. and Choppin, P. W. 1987. Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 2703-2707.
91. Sugiyama, K., Bishop, D. H. L. and Roy, P. 1981. Analyses of the genomes of bluetongue viruses recovered in the United States. 1. Oligonucleotide fingerprint studies that indicate the existence of naturally occurring reassortant BTV isolates. *Virology* 114 : 210-217.
92. Swanepoel, R. and Blackburn, N. K. 1976. A new member of the Palyam serogroup of orbiviruses. *Vet. Rec.* 99 : 360.
93. Theron, J., Huismans, H. and Nel, L. H. 1996a. Identification of a short domain within the non-structural protein NS2 of epizootic haemorrhagic disease virus that is important for single strand RNA-binding activity. *J. Gen. Virol.* 77 : 129-137.
94. Theron, J., Huismans, H. and Nel, L. H. 1996b. Site-specific mutations in the NS2 proteins of epizootic haemorrhagic disease virus markedly affect the formation of cytoplasmic inclusion bodies. *Arch. Virol.* 141 : 1143-1151.
95. Theron, J. and Nel, L. H. 1997. Stable protein-RNA interaction involves the terminal domains of bluetongue virus mRNA, but not the terminally conserved sequences. *Virology* 229 : 134-142.
96. Turnbull, P. J., Cormack, S. B. and Huismans, H. 1996. Characterization of the gene encoding core

protein VP6 of two African horsesickness virus serotypes. J. Gen. Virol. 77. 1421-1423.

97. Urakawa, T., Ritter, D. G. and Roy, P. 1989. Expression of largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. Nucleic Acids Res. 17 : 7395-7401.

98. van Staden, V. and Huismans, H. 1991. A comparison of the genes which encode non-structural protein NS3 of different orbiviruses. J. Gen. Virol. 72 : 1073-1079.

99. van Staden, V., Theron, J., Greyling, B. J., Huismans, H. and Nel, L. H. 1991. A comparison of the nucleotide sequences of cognate NS2 genes of three different orbiviruses. Virology 185 : 500-504.

100. van Staden, V., Stoltz, M. A. and Huismans, H. 1995. Expression of nonstructural protein NS3 of African horsesickness virus (AHSV): evidence for a cytotoxic effect of NS3 in insect cells, and characterization of the gene products in AHSV infected Vero cells. Arch. Virol. 140 : 289-306.

101. Vreede, F. T. and Huismans, H. 1998. Sequence analysis of the RNA polymerase gene of African horsesickness virus. Arch. Virol. 143 : 413-419.

102. Wang, L.-F., Hyatt, A. D., Whiteley, P. L., Andrew, M., Li, J. K. -K. and Eaton, B. T. 1996. Topography and immunogenicity of bluetongue virus VP7 epitopes. Arch. Virol. 141 : 111-123.

103. Whistler, T. and Swanepoel, R. 1988. Characterization of potentially foetotropic Palyam serogroup orbiviruses isolated in Zimbabwe. J. Gen. Virol. 69 : 2221-2227.

104. Whistler, T. and Swanepoel, R. 1990. Proteins of Palyam serogroup viruses. J. Gen. Virol. 71 : 1333-1338.

105. Wiener, J. R. and Joklik, W. K. 1987. Comparison of the reovirus serotype 1, 2 and 3 S3 genome segments encoding the nonstructural protein σ NS. Virology 161 : 332-339.

106. Williams, C. F., Inoue, T., Lucas, A.-M., Zanotto, P. M. de A. and Roy, P. 1998. The complete sequence of four major structural proteins of African horse sickness virus serotype 6: evolutionary relationships within and between the orbiviruses. *Virus Res.* 53 : 53-73.
107. Wilson, W. C. 1994a. Development of a nested-PCR test based on sequence analysis of epizootic hemorrhagic disease viruses non-structural protein (NS1) . *Virus Res.* 31 : 357-365.
108. Wilson, W. C. 1994b. Sequence analysis of the non-structural protein 2 from epizootic hemorrhagic disease viruses. *Virus Res.* 34 : 63-68.
109. Xu, G., Wilson, W. C., Mecham, J., Murphy, K., Zhou, E. -M. and Tabachnick, W. 1997. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J. Gen. Virol.* 78 : 1617-1623.
110. Yamakawa, M., Krasnykh, V. and Roy, P. 1994. Phylogenetic relationships of the VP2 protein of a virulent isolate of bluetongue virus (BTV-23) compared to those of 6 other BTV serotypes. *Virus Res.* 34 : 81-92.

表 及 び 図

表1-1 チュウザンウイルスK-47株の遺伝子とコードタンパク質

RNA 分節	塩基数 (bp)	GC 含量 (%)	5' / 3' 非翻訳領域 塩基数	コード タンパク質	ORF (アミノ酸数)	推定 分子量	等電点 (pI)	存在部位	コードタンパク質 の性状	Accession number
1	3930	38.12	22 [*] / 23	VP1	1295	149589	8.54	コア内部	RNA依存性RNAポリメラーゼ	AB018086
2	3055	38.49	14 / 35	VP2	1002	117610	7.23	外殻カプシド	中和抗原、血清型特異抗原、血球凝集素	AB014725
3	2774	39.29	13 / 49	VP3	904	103894	6.15	コア	主要構造タンパク質 (VP7の足場)	AB014728
4	1967	37.26	9 / 38	VP4	640	74680	9.11	コア内部	グアニリルトランスフェラーゼ	AB018087
5	1764	38.32	35 / 94	NS1	545	64111	6.52	感染細胞内	非構造タンパク質 (ウイルス粒子の細胞内輸送?)	AB018089
6	1610	40.68	20 / 27	VP5	521	59046	5.73	外殻カプシド	主要構造タンパク質	AB014726
7	1151	44.48	18 / 89	VP7	348	37994	6.96	コア表面	血清群特異抗原、ヌカカ細胞への吸着	AB014727
8	1059	40.60	21 / 39	NS2	333	37259	5.57	感染細胞内	非構造タンパク質 (mRNA結合、リン酸化)	AB018090
9	877	41.28	19 / 42	VP6	272	29763	5.63	コア内部	RNAヘリカーゼ	AB018088
10	728	40.38	18 / 77	NS3	211	23666	9.19	感染細胞内	非構造タンパク質 (膜結合タンパク質)	AB018091
				NS3A	200 [†]	22388	8.94			
合計	18915	39.26	189/513		6071	720001				

* 最初の AUG (13-15番目) から始まるORF は、21個のアミノ酸をコードするのみである。2番目のAUG (23-25番目) から始まるORFがVP1をコードしている。

† NS3AはのNS3の2番目のAUGから翻訳されるタンパク質であるため、総アミノ酸数 (6071) には含まれていない。

表1-2 チュウザンウイルスと他血清群オルビウイルスとのアミノ酸レベルでの比較

ウイルス タンパク質	アミノ酸配列の相同性 (%)			
	BTV-10	EHDV-1	AHSV-4	BRDV
VP1	55.0	—	63.3 *	—
VP2	19.7	19.9	22.5	—
VP3	57.6	59.1	63.9	35.5 ‡
VP4	49.8	—	51.2	—
VP5	41.7	42.7	47.6	26.8
VP6	31.1	—	29.8 †	—
VP7	42.1	42.1	53.3	24.4
NS1	28.9	26.4	33.6	19.9
NS2	33.9	33.4	38.0 *	—
NS3	30.9	34.3	32.6	24.9

—: 比較の対象となる遺伝子の塩基（アミノ酸）配列が報告されていない。

*はAHSV-9と、†はAHSV-3と比較した結果を示す。

‡はBRDV VP2と比較した結果を示す（ダニ媒介ウイルスであるBRDVの場合、ヌカカ媒介ウイルスのVP3に相当するタンパク質はVP2である）。

表2-1 組換えVP7の抗原性状

抗体 (ポリクローナル抗体)		チュウザンウイルスVP7		
		IB	IP	AGID
バリアム血清群	Chuzan K-47	-	++	+
	CSIRO Village CSIRO 11	-	++	+
	D'Aguilar B8112	-	++	+
	Buniyp Creek CSIRO 58	-	++	+
	Nyabira 792/73	-	++	+
	Marondera 1070/78	NT	NT	+
	Gweru 1726/76	-	++	+
他血清群	BTV-1	-	+	-
	EHDV-1	-	+	-
	EHDV-2	-	+	-
正常（陰性）血清		-	-	-

IB；イムノブロッティング、IP；免疫沈降反応、AGID；寒天ゲル内沈降反応。
 -； 反応なし。 +、++；反応の強度を示す。 NT；未検査。

表3-1 実験に用いたパリアム血清群ウイルス

分離株	血清型	Antigenic complex	由来 (分離材料)	分離地域	分離年
KC-05Y84	Chuzan (Kasba)	Kasba	<i>C. oxystoma</i>	Japan	1984
K-47			Bovine plasma		1985
C-4			<i>C. oxystoma</i>		1985
C-8			<i>C. oxystoma</i>		1985
K-20			Bovine erythrocyte		1985
K-21			Bovine erythrocyte		1985
31			Bovine erythrocyte		1985
181			Bovine erythrocyte		1985
165			Bovine erythrocyte		1985
422			Bovine plasma		1985
FO-88-2			<i>Culex</i> spp.		1988
FO-90-8			<i>Culex</i> spp.		1990
ON-91-5			Bovine erythrocyte?		1991
ON-1/E/97			Bovine erythrocyte		1997
MZ-16/E/97			Bovine erythrocyte		1997
KY-115	D'Aguilar	D'Aguilar	Bovine erythrocyte		1991
B8112	D'Aguilar	D'Aguilar	<i>C. brevitarsis</i>	Australia	1972
CSIRO 11	CSIRO Village	Palyam	<i>Culicoides</i> spp.		1974
CSIRO 82	Marrakai	Kasba	<i>C. schultzei</i> & <i>C. peregrinus</i>		1975
DPP66	?	Kasba	Bovine blood		1981
CSIRO 58	Bunyip Creek	Vellore	Bovine blood		1976
792/73	Nyabira	D'Aguilar	Aborted bovine fetus	Zimbabwe	1973
1726/76	Gweru	Gweru	Aborted bovine fetus		1976
1070/78	Marondera	Vellore	Bovine viscera		1978

表3-2 パリアム血清群特異的RT-PCR用プライマー

プライマー	塩基配列	プライマーの位置	PCR産物のサイズ
S5-1	5'- TGGCTTTCTGAGGCGTTTCAGA -3'	14-35	305 bp
S5-2	5'- GGTTGCTCAATATGCCAAGCGA -3'	297-318	
S7-1	5'- ATCTCAAACCTATAGACCATC -3'	258-278	266 bp
S7-2	5'- GAACTATTGTTTCCTTGCTGGA -3'	503-523	
S9-1	5'- GATGAGGATGGACAAGATCAAC -3'	152-173	229 bp
S9-2	5'- CACTTGACGTGAGAACGAACAC -3'	359-380	

表3-3 パリアム血清群ウイルスPCR産物の核酸・アミノ酸レベルでの比較

分節5(NS1)	K-47	ON-91-5	ON-1/E/97	KY-115	DPP66	CSIRO 82	B8112	CSIRO 11	CSIRO 58	792/73	1070/78	1726/76
K-47		100	100	100	97.7	97.7	96.6	96.6	96.6	97.7	97.7	97.7
ON-91-5	96.6		100	100	97.7	97.7	96.6	96.6	96.6	97.7	97.7	97.7
ON-1/E/97	96.9	99.6		100	97.7	97.7	96.6	96.6	96.6	97.7	97.7	97.7
KY-115	96.6	99.2	99.6		97.7	97.7	96.6	96.6	96.6	97.7	97.7	97.7
DPP66	88.1	90.0	89.7	89.3		100	98.9	98.9	98.9	97.7	97.7	97.7
CSIRO 82	87.1	89.7	89.3	88.9	99.6		98.9	98.9	98.9	97.7	97.7	97.7
B8112	86.6	88.5	88.1	87.7	97.3	97.7		97.7	97.7	96.6	96.6	96.6
CSIRO 11	86.6	88.5	88.1	87.7	96.6	96.2	96.6		97.7	96.6	96.6	96.6
CSIRO 58	85.8	87.7	87.4	87.0	96.6	96.9	97.7	96.6		96.6	96.6	96.6
792/73	90.4	92.0	92.3	92.7	89.7	89.3	88.5	88.5	87.7		100	100
1070/78	90.4	92.0	92.3	92.7	90.0	89.7	88.9	88.9	88.1	99.2		100
1726/76	89.7	90.4	90.8	91.2	88.5	88.1	87.4	87.4	86.6	98.5	98.5	

分節7(VP7)	K-47	ON-91-5	ON-1/E/97	KY-115	DPP66	CSIRO 82	B8112	CSIRO 11	CSIRO 58	792/73	1070/78	1726/76
K-47		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98.6
ON-91-5	99.1		100	100	100	100	100	100	100	100	100	98.6
ON-1/E/97	98.7	99.6		100	100	100	100	100	100	100	100	98.6
KY-115	95.1	96.0	96.4		100	100	100	100	100	100	100	98.6
DPP66	92.0	91.1	90.6	88.4		100	100	100	100	100	100	98.6
CSIRO 82	91.1	90.2	89.7	88.8	97.3		100	100	100	100	100	98.6
B8112	85.7	85.7	86.2	84.8	84.8	85.3		100	100	100	100	98.6
CSIRO 11	85.7	85.7	86.2	84.8	84.8	85.3	100		100	100	100	98.6
CSIRO 58	86.6	85.7	86.2	83.9	85.7	86.2	97.3	97.3		100	100	98.6
792/73	85.7	85.7	86.2	86.6	84.8	85.3	85.3	85.3	86.6		100	98.6
1070/78	85.7	85.7	86.2	86.6	84.8	85.3	85.3	85.3	86.6	100		98.6
1726/76	85.3	85.3	85.7	86.2	84.4	84.8	84.8	84.8	86.2	99.6	99.6	

分節9(VP6)	K-47	ON-91-5	ON-1/E/97	KY-115	DPP66	CSIRO 82	B8112	CSIRO 11	CSIRO 58	792/73	1070/78	1726/76
K-47		100	98.4	86.9	90.0	91.7	90.2	91.8	88.5	68.9	65.6	67.2
ON-91-5	100		98.4	86.9	90.0	91.7	90.2	91.8	88.5	68.9	65.6	67.2
ON-1/E/97	99.5	99.5		88.5	88.3	90.0	88.5	90.2	86.9	67.2	63.9	65.6
KY-115	95.1	95.1	95.7		81.7	83.3	83.6	85.2	82.0	63.9	60.7	62.3
DPP66	95.7	95.7	95.1	93.0		95.1	85.0	86.7	83.3	63.3	63.3	65.0
CSIRO 82	96.8	96.8	96.2	94.1	97.8		86.7	88.3	85.0	60.0	60.0	61.7
B8112	96.8	96.8	96.2	94.1	93.5	94.6		98.4	98.4	67.2	63.9	65.6
CSIRO 11	96.8	96.8	96.2	94.1	93.0	94.6	98.9		96.7	68.9	65.6	67.2
CSIRO 58	96.2	96.2	95.7	93.5	93.0	94.1	99.5	98.4		65.6	62.3	63.9
792/73	89.2	89.2	88.6	86.5	87.0	85.9	88.6	88.6	88.1		90.2	91.8
1070/78	88.6	88.6	88.1	85.9	86.5	86.5	88.1	88.1	87.6	96.8		98.4
1726/76	89.2	89.2	88.6	86.5	87.0	87.0	88.6	88.6	88.1	97.3	99.5	

太字は塩基配列の相同性（％）を、標準字体はアミノ酸配列の相同性（％）を示す。
 いずれの分節の場合も、1984～1990年に分離されたチュウザンウイルス株の塩基配列は同じであるため、その代表としてK-47株のデータを示した。また、1997年に分離された2株の塩基配列も同じであるため、ON-1/E/97株のデータのみを示した。

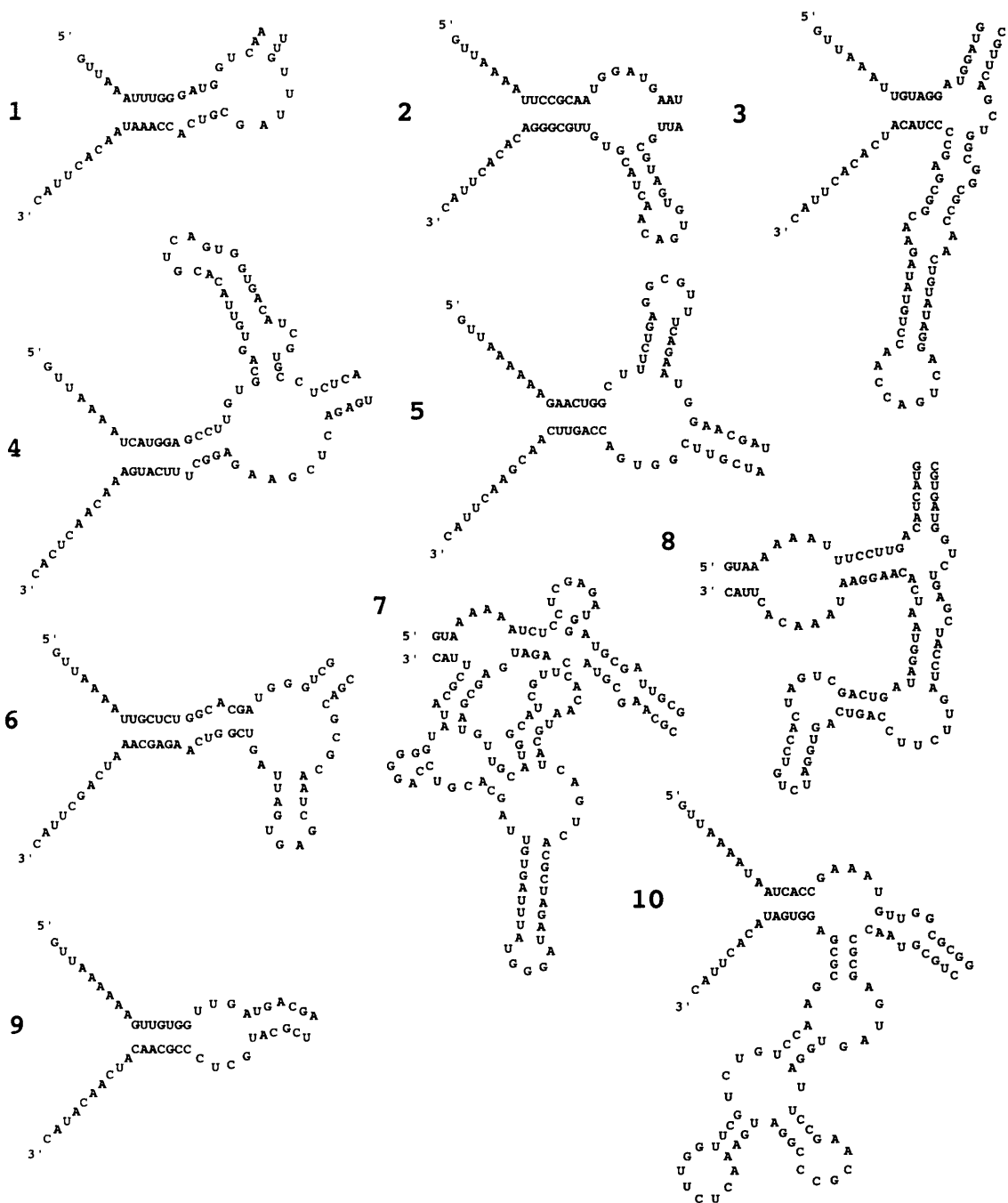


図1-1 チュウザンウイルスRNA全10分節（+鎖）の末端領域の2次構造

数字は各分節を示す。

VP1.BTV-10	1	MVAITVQGAQLIKRVVERFYPGIAFDINEGACYIYKFSDHIRRIRMKHGTKYRRQAEIIMRSISLRKERLYGIPVLDEVEWKYVFDGQTF	90
VP1.AHSV-9	1D.VR.ALN.LFKYGR.I.GTKMYVEY.RY.SKM.ET.R.K....KTDD.FLE.ERDAGRLK..DLQ.IR.AS.EDLL-YENV	88
VP1.CHUZAN	1	-----M.D.S.VRSS.Q..LKYTKI.GK.PKYIY.R..KNM.E..R.R.V..KTDDTYFE.RRDQGIILN...Q.AV.SS.EDIL-DGEP	84
	* * * * *	
VP1.BTV-10	91	QSYAFEVVNSILPWSELDPEEEFLRNYRVSRETTVEVEKFIIEFRAKNEMQIYGDIPKIVWCCFINELSIELNPIPLGMQVMADFVNRFS	180
VP1.AHSV-9	89	HTAELDI..R...KLED.E.....A.YDGVHPLKD.V.M.....F..M...A.ISVLM.I.R.TKHK...LM.AS...G..G.	178
VP1.CHUZAN	85	.YDTLKIFER.V.NLRD.I.....EKEHPPRE.V.M...A.....L.V.A..S..R.YAEQIKHE...LST.RE..HKYG.	173
	* * * * *	
VP1.BTV-10	181	PFHQGNRDLSNLEDFQVAYTTPLLFEMCCMESILEFNKIMRMREEDISALEFGDIKIDPVGLLREFFILCLPHPKINNVLAPYSWFK	270
VP1.AHSV-9	179	..E.NF....QINEYGYC.SS.....VT.....MWY....R.QS.K..LEV..FK.I...EI.....T..S.....	268
VP1.CHUZAN	174	..N.NS....QI...SMS.S.....C..LI...MFE..N..G.KE...GL..N.FD.I.....M.....	263
		* * * * *	
VP1.BTV-10	271	MWVGADPIVVLQSTAGDDRNSKDVFDKFRTEPNRYKAL-FRSSFYNESRRMNEEKILEAVKYSQNLGSHDRRLPLFEKMLKMVYTPF	359
VP1.AHSV-9	269	N..I.CSRVK..T.IG.E....E...TGYHETE.L.SEIVLK.K..R.LKQ.MT.TE..IT...K..N.G.TM.I.L...A...E.	358
VP1.CHUZAN	264CCSEVK..RARG.....V..D.VRVK.I.GPILYKTO..RQG.EE.IS.VE.TI...E..N.AC.V.SY.LT..RQ..K.E.	353
	* * * * *	
VP1.BTV-10	360	YPHKSSNMILASFLLSIQTTITGYGRAWVKNVSTEFDKQLKPNPSNLVRVSDLTREFFKQAYVEAKERREEMVKPEDLYTSMRLARNTS	449
VP1.AHSV-9	359	D.T.I.HV....LC.....V.K.SDLEA.M..SSD.Y.QR.C.Y.KNN.IK..E..RRGG..I.M..M..I...K...	448
VP1.CHUZAN	354	D.TNIKHVM..L.....SDIE..M..DK...ISR.NEY..NN.IK..D..LAAG.DI.....M.....	443
	* * * * *	
VP1.BTV-10	450	SGPSTEIYVKKRFGPRLR-DKD-LVKINSRIKALVIFTKGHTVFTDEELHKKYNSVELYQTKGSRDVPKATRTTIYSINLSVLVPQLIVT	537
VP1.AHSV-9	449S.D.F..Y..NAKGGRGEKIQ.T.....EI..PKN.AL..TT.FF.....S..IV.....I.....	538
VP1.CHUZAN	444KFN.Y.KY..GIKNSIGKQIE.T.....QE..KI.VK...E...T.QN..S.....A...I..I.....	533

VP1.BTV-10	538	LPLNEYFSRVGGITRPDYKKIGGKVIIVGDLEATGSRVMDAADCFRNSADRDITIAIDYSEYDTHLTRHNFTGMLOGIREAMAPYRALR	627
VP1.AHSV-9	539S.D.F..Y..NAKGGRGEKIQ.T.....EI..PKN.AL..TT.FF.....S..IV.....I.....	628
VP1.CHUZAN	534KFN.Y.KY..GIKNSIGKQIE.T.....QE..KI.VK...E...T.QN..S.....A...I..I.....	623

VP1.BTV-10	628	YEGYTLEQIIDFGYGEGRVANTLWNGKRRLLFKTTTDFAYIRLDESERDKGSFKVPKGVLPVSSVDV-ANRI-AVDKGFDTLIAATDGSDLA	715
VP1.AHSV-9	629DEL.EY.....M.....V..VA.ED.VM.SDEDKVQ.T..P.I..K..KNIKICEELEKKA.GRDLI.VSP.....	718
VP1.CHUZAN	624H..DE..EY.....V.....AVY.AD.AK.ME.PPED.E.E.RP.R..K.IRTTKII.RIQ-SE.PDNQI.VSPV.....	712

VP1.BTV-10	716	LIDTHLSGENSTLIANSNMHMAITLTIQRAVGREOPGILTFLEQVYVGGDTLFTYTKLHTTDITVFDKVAASIFDTPVAKCGHEASPSKTM	805
VP1.AHSV-9	719N.....L..L...V.REE.K.IFGDDIS.K.....E.R.RSVER..SIVDT..EVIM.S...M...IIT	808
VP1.CHUZAN	713	F.N.....V.....L..I..EE.KHRCA.LIS.....QPCISTEHD..CIIRV...IER...I..A...IIT	802

VP1.BTV-10	806	TPYSVEKTQTHAKGCVYPQDRMMIISERRKDIEDVQGYVRSQVQTMITKVSRGFCHDLAQLILMLKTTFGAWKMKRTIKENAMYRDR	895
VP1.AHSV-9	809	A.F.....I..I.....LV.....A..L.....LT..I.....S.E...I.F.M.SSI..HR.L....-KDGG...	897
VP1.CHUZAN	803	A.F.....I..I.....L.....R..LK.....LT..I.....S.K..RM.....SLV.FR.L....FADGV...	892

VP1.BTV-10	896	KFDSNDEGDFTLIQIRNPLALYVPIGWNGYGAHPAALNIVMTEEMYVDSIMISKLEIMAPIRRIVHDIPPWCNETQGDGRGLISATKLS	985
VP1.AHSV-9	898	..Y.DDK.....ML.D..IAFY.VE..F.....M..I..D.F...V.RGECRAW.E.LVKLIDQS..L...SA...MIGTDSM.	987
VP1.CHUZAN	893	R...D.....MYL..D..CAFL.VE..V..YYES.....DIFL-LLQTG-N.FVRHLAGFINGTL.F...EA...QIGTDA.M.	980

VP1.BTV-10	986	FFSKMARPAVQAALSDPQIMNLVEELPLGEFSPGRISRTMMHSALLKESSAKALLSSGYRLEYQKALNGWIAQV-SMRLGEESGVISTSY	1074
VP1.AHSV-9	988	..R.....RTV.TNSEVGDA.RS...D..FN..K.....KN.RS..TPA.EM...E.Q..RPRQKKFLVTSNEME.T.N.	1077
VP1.CHUZAN	981	..T.....SV.NSDELTD..KQ...DY..TN..K.....RSI.TPT.ES...RL..V-R-EEK.FKMFSDLEL..N.	1068

VP1.BTV-10	1075	AKLFDVYFEGELD-GAPYMFDPQNLSPQFYIQKMMIGPRVSSRVNSYVDRIDVILRKDVVMRGFITANTILNVIEKLGTNHSVGDLVTV	1163
VP1.AHSV-9	1078	M.M.N.GKIPLHLGLALKF...V...KE.FL..SVL.N.E.P.A.M.....S..G.....I..IL...HT..AS..T.L	1166
VP1.CHUZAN	1069	I.M...-QYS-SGVQRHFY.....S.FL..NLL..M.T..M.....S..G.....G.A.I..IL..I..HT.NAA..SML	1156

VP1.BTV-10	1164	PTLMNIETRVAEELAEYMTSEKIRFDALKLLKKGIAGDEFTMSLNVAQTQDFIDTYLAYPYQLTKTEVDAISLYCTQMVMLRAALGLPKKK	1253
VP1.AHSV-9	1167	..EI..LSSS..QR.S..I.T.RV...M..S.R.C...S...D.C.TMV.R.IRA.T.F...L.VN..VA.HI..D..T..TPSR	1256
VP1.CHUZAN	1157	..QI...S...DR...ISA.RL...M.R.C...S...D.C.EMS.NFIR..KEF...Q..AI..AS.LL.I...H.HHPGI	1246

VP1.BTV-10	1254	MKIVVTDDAKKRYKIRLQRFRTHPVKIKVLKKLIDPNRMTVRNLENQFV	1302
VP1.AHSV-9	1257	YD.N.SG.ERV.F.Q.VA..N..L..MRMV.R..ETE.LSA.LVQ...	1305
VP1.CHUZAN	1247	LI.NASAEERQKF.V.AA..KA.L..LRLIRR..QTE.LSA.MVQ...	1295

図1-2 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスVP1のアミノ酸配列の比較

ボックスは Poch (1989)ら及び Koonin (1992) によって報告されたRNA依存RNAポリメラーゼに共通して認められるモチーフを、●はレオウイルス科を通じて保存されているアミノ酸残基を示す。▼はオルビウイルス間で保存されているシステイン残基を示す。

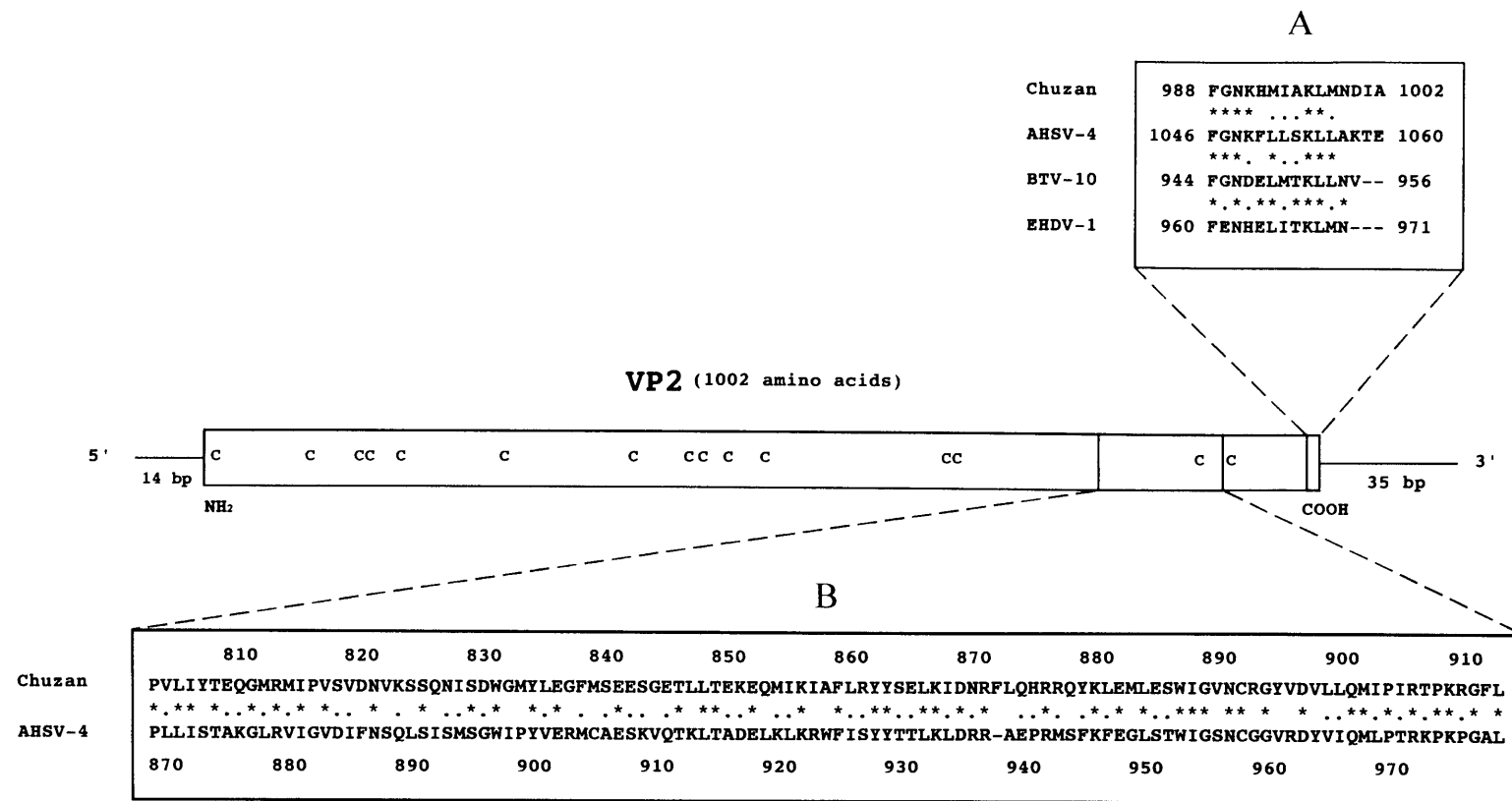


図1-3 チュウザンウイルスRNA分節2 (VP2) の構造

C ; シスチン残基を示す。ボックスAは他血清群オルビウイルスVP2との間で保存されている領域を示す。
ボックスBはAHSV-4との間でよく保存されている領域を示す。

VP5.BTV-10	1	M-----G-KIIKSLSRFGKKVGNALTSNTAKKIYSTIGKAAERFAEISEIGAATIDGLVQG	54
VP5.EHDV-1	1	-----F..Q..K.....G.....K...DT.V....D..S.A...I..	54
VP5.AHSV-4	1	-----FTSF.K.A.NATKR.....DS...M.KLA..TLQ.VV...V.S.A...VM..	54
VP5.CHUZAN	1	-----RFV.F.K.A..TTM.....S..K.V..TIQKV...L.S.A...II..	54
VP5.BRDV	1	.TSKRL.ARFPGF.N.I.SGITR.AR.D.T.R.P.AA.R.V..V.A....QRA.A.V.E.	60
VP5.BTV-10	55	SVHSIITGESYGESVQAVLLNVLGTGEELPDPLSPGGRGMQTKIKELEDEQORNELVRLK	114
VP5.EHDV-1	55	..E.VL.....T..R.....A.D.I.....Q.I.R.....MKG.V..T.	114
VP5.AHSV-4	55	AIQ...Q..NL.D.I....I...A..L.SA.....QLLYN.VS.I.KMEKEDR.IET	114
VP5.CHUZAN	55	AAR.ALE..NL...I...I...M.AANAP...I...HAIYNRLA...K.EQEDRFFDQ	114
VP5.BRDV	61	AATAAL....V.....R..I...A.VHQT.V...N.V.IET.A.LR..DLANKR.EAQIR	120
VP5.BTV-10	115	YNKEITEKFGKELGEVYDFMNGEAKEVEAVEEQYTMLCKAVDSYEKILKEEDSKMAILAR	174
VP5.EHDV-1	115	H.EQ.IRR..AD.D...K.AVS.Y..GVEEKD.FEI.K..LT..GELT.A.FGELKR.EK	174
VP5.AHSV-4	115	H.AK.E....D.LAIRKIVK..VDAEKLEGNEIKYVE..LSGLE.G.DQSERITK.Y.	174
VP5.CHUZAN	115	NE...IDEY.E..RSIRQ.GK.MISLE.SGMSEME.IR.SIKGM...ELKHTNDLQT.R.	174
VP5.BRDV	121	H..SMLQ.EAQI.--GEVQHLMTVQ.HVDQAKYEVRSGR.LQAAQA.V.G.RQQLDRVTK	178
VP5.BTV-10	175	ALQREAAERSEDEIKMVKEYRQKIDALKSAIEIERDGMQEEAIQEIAGMTADVLEAASEE	234
VP5.EHDV-1	175	...K.SS...K..SM.....E...D...V.ST.I.....S..I..S.A..	234
VP5.AHSV-4	175	...T.EDL.TR..TR.IN...E.F...E.....QQATHD.....MLDLS.E.I.T...	234
VP5.CHUZAN	175	G.TK..SM.NQR.QELISYFNNMVRV.QD..SV.QE.LH...V...LD.G.E...T.A..	234
VP5.BRDV	179	..I..NEM.TT..R.LIEGM.HNYS..AKSVADAD-SALI...VEQTVDIGGEIA.H.TAS	237
VP5.BTV-10	235	VPLIGAGMATAVATGRAIEGAYLKVKVINALSGIDLSHMRSPKIEPTIATTLHHRFK-D	293
VP5.EHDV-1	235	...F.G.V..SI..A.....G.....L.T...Q.KTLEAI..APT.EE	294
VP5.AHSV-4	235	..IF...A.NVI..T...Q.GL...EIVDK.T.....LKVAD.H.H..EKAMLR--D-T	291
VP5.CHUZAN	235	..VL...A.N.I.SV..V...L...E..QK...V...TYKSLQ.DKMSLL.RRNADG.	294
VP5.BRDV	238	I.FV.EAVSAGM..A.GAMQI.R.G.T.H.IT.LHTN.CEI.A.HQGA.E.L.TSDSPTS	297
VP5.BTV-10	294	IPD-EQLAISVLNKKTAVADNCNEIAHIKQEILPKFKQIM-NEEKEIEGIEDKVIHPRVM	351
VP5.EHDV-1	295	.K.-LS.VEGIQM.LQNLEE.R..VL..QE.....LREA.IEDH...GDER..R.L.KTA	353
VP5.AHSV-4	292	VT-DKD..MAIKS.VDVIDEMNV.TQ.VIDAV...--IVKQEY..H---DN.YHVRIPIG	343
VP5.CHUZAN	295	VIQEKD.LEV.D..LAL.RELGD.RK.LLEN.V---K.EKMYD.H---Q--PMKVHA	345
VP5.BRDV	298	DASLA.ITS.RVRHLREIESELAHLDAEVKPMQMC.DIAKLAPDHLKKRRG...MNA	357
VP5.BTV-10	352	MRFKIPRTQQPQIHIYAAPWDSDDVFFHCVSYHHRNESFFLGFGLGIDVVFEDLTSHW	411
VP5.EHDV-1	354	...V.T...V.Q..S.....M...I.H..L.....ELEY..Y...R..	413
VP5.AHSV-4	344	A-L..HSEHT.K...TT.....S..MCRAIAP..QQR...I...E.EY...TSVEG	402
VP5.CHUZAN	346	A-M..NKEFH.K...T.....Y..M.K..AP..KERG.....EL.F.Y...KVEA	404
VP5.BRDV	358	HELRV.LK.R..M..S.TS.....Y.LIL.V.GPY.SGQA.VFCL..AL.QF...ED.GSK	417
VP5.BTV-10	412	HAL-GMAQEASGRRTLTEAYREFLNLSISSTFSSAIHARRMIRSRAVHPIFLGSMHYDITY	470
VP5.EHDV-1	414	...-A...VT..S.K...S..FQ.AAQIDGAG...QK.L...KSY...Y..A....A.	472
VP5.AHSV-4	403	.I.H.G.ITVE..GFRQ..T..M.AAWGMPTTPEL.K.KLQ..MGT...YM...D.A.S.	462
VP5.CHUZAN	405	.Q.IEG.T.IV..SFRQI..D.FYFAWNVSGA.E..KK.LQ..SSA...Y...VD.Q.S.	464
VP5.BRDV	418	PPVPPPRHR.PADFSARPAPIS.SPLLAILTQRCIGPGWP.VLMIR.-CIS-AL.RTR-	474
VP5.BTV-10	471	EALKNNAQRIVYDDELQMHILRGPLHFQRRAILGALKFGVKILGDKIDVPLFLRNA-	526
VP5.EHDV-1	473	RE....LK..N.S.V.K.L...K.....S...D...I..G-V.LAE.M.Y.-	527
VP5.AHSV-4	463	.Q.VS..M.L...S.....C.....K....TLMN..LY...A-----	505
VP5.CHUZAN	465	DQ.YAH.NQL.TNE...L.V.....T.MA..LH..E.MTRPNFLTNDQAQSSD	521
VP5.BRDV	475	PPTRRC-----	480

図1-7 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスVP5のアミノ酸配列の比較

ボックスの部分はオルビウイルス間で保存されている領域を示す。

▼はBTV、EHDV、チュウザンウイルス間で保存されているシスチン残基を示す。

		1	▼	2		
VP7.BTV-10	1	MDTIAARALTVMRACATLQ	EARIVLE	ANVMEILGIAINRYNGLTL	LRGVTMRPTSLAQRNE	60
VP7.EHDV-1	1IK..N..K.V...V.S..L.....V.....S.....QE....				60
VP7.AHSV-4	1	..A.....S.V...V.VTD..VS.DPG...T.....NHS.S...QTQ.E...				60
VP7.CHUZAN	1	..A.....S.IE..T..VDS.VSMDPG...L....L....AMS.....TQQE..D				60
VP7.BRDV	1	..AYT...S.LEGL.ISGDP.SHRDPTTEATMS.FAM.F.ST.S.P.MG...QRGK.GV				59
		▼	3	4	5	
VP7.BTV-10	61	MFFMCLDMMLSAAGI	INVGPISPDYTOHMA	TIGVLA	TPEIPFTTEAANEIARVTGETS	120
VP7.EHDV-1	61	..Y.....IDA..NL...N.....I.NL.....Y.M.S.....MS...G...				120
VP7.AHSV-4	61T..V.A.LNVQI.N....D.AL..V.A...T...YNVQ.M.D.V.I..QM.Q.F.				120
VP7.CHUZAN	61V..TIA.L..QI.N..QT.RPS....A...S...Y..S.MTRVV.I..MLN.YT				120
VP7.BRDV	60	ITSTPQRCGIRDLEHH.AFVM.G.I.NPQ.LAI..RD...Y.PSTFRRVQ.YVSARMIIQ				119
			A'	B	C	
VP7.BTV-10	121	PARQPYGFFLETEETFPQ	G-R-WFMRAAQAVTAVVCGP	DMIQVSLNAGARGDVQ	QIFQGR	178
VP7.EHDV-1	121	.D...F.Y..AAP.VT.H.--FRQ.VG.N..TSIVSSTLA...M.....I.AL..NQ				178
VP7.AHSV-4	121	.SKVQT.PYAGAV.VQ.S.--YVVPQGRTRGGYINSNIAEVCMDAGA.GQVNALLAPR.				178
VP7.CHUZAN	121	.S.MYLPPYIAARDMQA...-YYVP.GRSRS..TSSNTIETSIQQGTIVQMGGTTLAPR.				178
VP7.BRDV	120	MCERNMLTPHY.AVTS..VVLPA	PAGGGPRCYAISATTLQIHIDPMQNEVLTPL..PDQ			179
		D	E	F	G	H
VP7.BTV-10	179	NDPMMIYLVW-RRIENFAMAQ	QNSQQTQAGVTVSVGGVDMR	RAGRIIAWDGQAALHVNPT		237
VP7.EHDV-1	179	...V...F...-...GT.SN.A..A.D.PQ...LN...N...V...Y...PVN.N..G				237
VP7.AHSV-4	179	G.AV...F...-PLRI.CDP..A.LESAP.TF.T.D..NVA..DVV..NTI.PVN.G..G				237
VP7.CHUZAN	179	G.A..M.FI.-QP.RV.SG.N.VT.ESG..I..T.D..EIA..N.AV..TV.PIV.T..S				237
VP7.BRDV	180	E.VI.AEFI.Q.LANGIDNNAVNMNG.NVELLRD	NAA.EGGTPFMATPR.IHVVLASYEP			239
		I	6	7		
VP7.BTV-10	238	QQNAMVQIQVVFYISMDKTLNQ	YPALTAEIFNVYSFRDHTWHGLR-TAILNRTTL	PNMLP		296
VP7.EHDV-1	238	LGQG.IE.E.IY.Y.L...MT...S.Q.H.....YKNPL.....-A.....NI.				296
VP7.AHSV-4	238	ARRSIL.FE.LW.T.L.RS.DTV.E.APTLTRC.AYVSP...A..-AV.FQQNMMPIN.				296
VP7.CHUZAN	238	NRDS..RFE.LW.TTF.R.PTLV.ETYEEMNRC..YISQ..A..-ATLCM.VG..A.H.				296
VP7.BRDV	240	VNLCTIHLTCTR.WVTGPPRVV.DSME.D.LA..TY..GF.DA..SYVLQALGMPAHHY.				299
		8	9			
VP7.BTV-10	297	PIFPPNDRDSILTLLLLSTLAD-VYTVLR	RPEFAIHGVNPMGPGLTRAIAARA	AV---		349
VP7.EHDV-1	297	..Y..H..ENV.LII...A...-AFS..A.D.NLF..V.IQ..IN..V.QN.....				349
VP7.AHSV-4	297TE.NE.VAY..VAS...-..AA...D.RMN..VAPV.QIN..LVL...H---				349
VP7.CHUZAN	297	..A.G..ETLMA...Y.A...-ACDA.K.D.DMI.-VAGVA.QN..GVAQ..R---				348
VP7.BRDV	300	TRPVTEF.QNLAIAI.SRLFDVYSQWR..STLQLR	PKVLWWLAHRLQA.LR.FRLGR			356

図1-8 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスVP7のアミノ酸配列の比較

ボックス（1～9）はBTV VP7において α ヘリックス構造、矢印（A'～I）は β シート構造を示す領域（Grimes ら；1995）である。二重下線はRGD配列を示す。▼はBRDVを除くオルビウイルス間で保存されているシステイン残基を示す。

NS2.BTV-10	1	--MEQKQRRFTKNIFVLDVTAKTLCGAIKLSQPYCQIKIGRVVAFKPVKNPEPKGYVL	58
NS2.EHDV-1	1	--.....V....QKR..I..Q..ARQ.L.....NF.LRA.AT.....	58
NS2.AHSV-9	1	MAEVR..QQ..RSVC...LGQ..Y..KVVRAVDGV.YT....T.QCGVTPT.I..S...	60
NS2.CHUZAN	1	MGD-R.--Y..TVC.Y.PQNA.F.SRG.NAGEN-.Y.V....TTQITRTNA.N..A..V	56
		*. * . * . . . * . * . . . * . * . . . *	
NS2.BTV-10	59	-NVPGPAYRIQDGDIIISLMLTPHVEATTERWEEWKFEQSVTPMATRVQYNGVMVDA	117
NS2.EHDV-1	59	-EICDV.....N.V....ISAD...G.Q.....TI.CV....VLNI..AL...	117
NS2.AHSV-9	61	EI-REC.R.....T.VL...I.ES.I.V.QN.....S..ALTPV...VA.NVGRGSF.T	119
NS2.CHUZAN	57	EIQRPCS-V.LL..N....IISEE.I.V.....L..ALTPI..VISLHIK.QKTE.	115
	 * * * . * . . . * . * . . . * . * . . . *	
NS2.BTV-10	118	EIKYCKGMGIVQPYMRNDFDRNEMPDLPQVMSNYDIRELRQIKNERESAPRLQVHVA	177
NS2.EHDV-1	118	...VS.....P..T.....R.L.E....Q..K.....RE...KGAVE.P.KP.	177
NS2.AHSV-9	120	...VR.S.A.P..TK.GM..RA..S...ITLTDVGV.D..L.MREN..AEREKMERALS	179
NS2.CHUZAN	116AS.VIA..TP.EV..RIT.Q...ITFTDVSVD.FD...MRE..--EKEK-ERT-P	171
		***. . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
NS2.BTV-10	178	PREESRWMDDEAKVDDE-AKEIVPG-TSGLEKL-REA--R-S-NV-FKEVEAVIN-WNL	228
NS2.EHDV-1	178	FKT.--.HEQPDSE.QNP.GGV.NDW.CETQ.RDQ..ER.EALEIRLA.QRQR.EAFK.	236
NS2.AHSV-9	180	GGLD-MGSCRMYGGRNDVREITLDE-A-.PSR-TPRKLSVQ.NESR-SDDV.RRHAEV	234
NS2.CHUZAN	172	--M--ITPIK----PKT.AP-V-M-----PS--TSQQY--QKEES--I-AVG-KISDYV	208
		
NS2.BTV-10	229	D-ERD-EG-DR-DE--RGDE-EQVKT-LSD--DDDQGEDASDDEHPK-THITKEYIEKVA	277
NS2.EHDV-1	237	.S..KR.DLE.SQ.QF.TQ.V.RK.SDMGEVIEEDD..SEE.GARASY..SA..RIS	296
NS2.AHSV-9	235	--.MERLRI-MKN.PV.----TESMW-CQSDS..QSD..HEVGGTEPENY..E..TRRLN	286
NS2.CHUZAN	209	----KKVK--LESNVE.-----DSD--DE.EHGSNSDS.FD-G.PKDEGY..QN.MNMIE	254
	 * * * *	
NS2.BTV-10	278	KQIKLKDERFMSLSSAMPQASGGFDRMIVTKKLKWQNVPLYCFDESCLKRYELQCVGACER	337
NS2.EHDV-1	297	RIR.I....LSM.A.M...Q..EYTTTLFI..Q..D....LI..MQ.K...S..S...	356
NS2.AHSV-9	287	EVKTKYSKELS..AMRV.KNE.NCGKP.FS..C..E...I.NY..ASGN.RFVS..SRTH	346
NS2.CHUZAN	255	TVKMKVP-GVAG.TLKI.K.A.KT.G..AA..C..IS...FNI.KDGLS.DFVA..DANG	313
		* . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
NS2.BTV-10	338	VAFVSKDMSLIILPVG---	354
NS2.EHDV-1	357GTN.....ASNPR	376
NS2.AHSV-9	347	YHCCAN.L.YM...A.GSG-	365
NS2.CHUZAN	314	FLCLRDGL.YLV...SGSVH	333
	 *	

図1-9 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスNS2のアミノ酸配列の比較

1本鎖RNA結合モチーフをボックスで囲んだ。▼はNS2間で保存されているシステイン残基を示す。

VP6.BTV-10	1	----MLLAPGDVIKRSSEELKQRQIQINLIDWIESESGKEDKAEPKEESKA--EESK-DG	53
VP6.BTV-1SA	1	MSAA.....T..T.G.TN..S...R..GD....L.-..	57
VP6.AHSV-3	1	MSSAL.....L.EKAKR..E..S.APL.REKNST.AKSKL.EDGEKKN.SEK..N.IHD	60
VP6.CHUZAN	1	MTTSLI.....LFSVRH..AE.G.RVRFTE--QFKD.-.S.-D-.D-G.-D.-D.-..	48
		. ***** ** * * . . * . * . * . .	
VP6.BTV-10	54	QGTQSESSQKKEGSKEAKDADVDRIHTAVGSGSSAKGPGVR---ANENVDRGDGK--VG	108
VP6.BTV-1SA	58	E.RNRRRAARR.RAA..T...RC.....E.....	112
VP6.AHSV-3	61	DRRVESQESEGS..ADCQRGAGS.GADC.TST.GGDG.A.A.TGIGGGG.G.V.SRSGGR	120
VP6.CHUZAN	49	.DQRISGGGGENKQ.GG-.ESS..TTE-.KSRD-TVTATE.----GK-HA.-[.----GS	96
		. . . * * *	
VP6.BTV-10	109	GGGGNADAGVG-TIGANGGRWVVL--TEEIARAIE-SKYGTKIDVY--RDKVPAQII-EV	161
VP6.BTV-1SA	113D[.....T].....R.....E.....	165
VP6.AHSV-3	121	..Q.A.SD.K.VGKS[KT.ADR.ANDGATRDVGTS.V.SS.ITSGGLQG.GGLV.KSSECG	180
VP6.CHUZAN	97	.ESDKSSTRT.-.-EIG..VF-----SSVSK.L--TE..-N.MI.--ESGGGTV.-FL	144
		*. . . . * . * * *	
VP6.BTV-10	162	ERSLQKELGMSREGVAE-QTERL-----R--DL--R--R--KEKSGAHAKAAERGGRK-	205
VP6.BTV-1SA	166I.....R.....	209
VP6.AHSV-3	181	GEP.DRTG.C.GNSKT.GEEAKVGGGDR.IGG.ATQGIADFV.K.I.VEVQVFSK.MSNF	240
VP6.CHUZAN	145	DKN..N.FNL.KSDRL.-.VDA-----E-----Q-----	174
		*. . . * . . . * * *	
VP6.BTV-10	206	-Q-GKK--PHGDVQKEG-TEE-EKTSE-EPASVGIAIEGVMSQKKLLSMIGGV-ERKMAP	257
VP6.BTV-1SA	210	-.-----A.R.-P-----T.....	261
VP6.AHSV-3	241	FTVD.SLLKR.GLGR.DILHQSDIVK.IRASDKKVK.IPLSTV.RMIAEF..TE.DEIKA	300
VP6.CHUZAN	175	-----I-----R.I-----STIA-SL.KILGER.IV.K-QQ--D-.VV.	207
		
VP6.BTV-10	258	IGARESAVMLVSNSIKDVVRATAYFTAPTGDPHWKEVAREASKKKNILAYTSTG-GDVKT	316
VP6.BTV-1SA	262AKLQ.RRT.-R.....	319
VP6.AHSV-3	301	VQTQS.SIRYI..RME..S..K.M.....EG.....KA.TQRP..M..VHE.E..GLK	360
VP6.CHUZAN	208	----TGIHHA..R.E..KD.K....C....VT.....KA.GQN..VM..YHD.KE.AGE	263
		. . . ** . ** * * . * . * . * . * . . . * * *	
VP6.BTV-10	317	EFLHLIDHL	325
VP6.BTV-1SA	320	328
VP6.AHSV-3	361	.L.....I	369
VP6.CHUZAN	264	Q.I.....M	272
		...*****	

図1-10 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスVP6のアミノ酸配列の比較

ボックスはプリンNTP結合モチーフ類似配列を示す。

NS3.BTV-10	1	MLSGLIQRFEEEK* K HNQDRVEELSLVRVDDTISQPPRYAPSAPMPSSMPTVALEILDKA	60
NS3.EHDV-1	1	...R.VPGV-.TRI- E KAS-D.V...PYQE-Q-AR..S.V...I.TA..R...D.....	56
NS3.AHSV-4	1	..-N-.ATIAKNY-S M ..GESGAIVPC.PPPYNFASA.--TF.QRTSOMES-.S.G..NQ.	54
NS3.CHUZAN	1ARSLN.Y.A M RPESEMSVVPYQPPAY--PTA.--TGTNGEKDFSS-IS.GV.NN.	52
NS3.BRDV	1	-----MLAALE K KSS.T-..P.YAAIPSTNA..SV.QN.	33
	 * * *	
NS3.BTV-10	61	MSNTTGATQTQKA E KA A FASYAEAFRDDVRLRQIKRHVNEQILPKL S DLSELKKKRA I I	120
NS3.EHDV-1	57	...Q...MA..V..V.Y.....L.....K.....MRVE.TAM.RR.. MA	116
NS3.AHSV-4	55	..S....SGAL.D....GAM...L..PEPI.....-K-.VGIRTLKN.KMELATMRRK	110
NS3.CHUZAN	53	.ND..A...AERE..V.Y..F...L..SACV.E....-K-RVSSRTIIA.EKEYNHQKR.	108
NS3.BRDV	34	VASG...NEVMRN....YGAAT.VLK..ETT.ML.MQ...YS.AEMRAAYQK...RQSRL	93
		..*.*. . . *.*. . . *.*. . . *.*. . . *	
NS3.BTV-10	121	HTTLLVAAVVALLTSVCTLSSDMSVAFKINGTKTE V PSWFKSLNPMLGVVNLGATFLMMV	180
NS3.EHDV-1	117	.MV.II.....I..AS..T..LG.II.H.T.TEATQTYI P FCAAF.II..A..MV..F	176
NS3.AHSV-4	111	K SA. K IMIFISGCVTLA.--.MVGGLSIV D DEILRGYKNNDW. M KTIHGL..LC.TVLLA	168
NS3.CHUZAN	109	YDFIRLILFIMSVIAII.--.SL.A.IVVI H ET-KTLK- E E N ISILIH.G..F..GVYVG	164
NS3.BRDV	94	.YGE L CLALV.GLTFTLMA.STAAVL S ALQ V GITGHVVTGILTSLAIF. Q HHRTRVL	153
	 * * *	
NS3.BTV-10	181	CAKSERALNQIDMIKKEVMKKQSYNDAVRMSFTEFSSIPLDGFEM-P-LT-	229
NS3.EHDV-1	177	M..N.KII.....HTR..I...DA..E.....V.....G.....DIP.E..R	228
NS3.AHSV-4	169	AG.ISDKMQEE.SRT.RDIA.RE..VS.AS..WSGDTEMS.Q.IKYGES---	217
NS3.CHUZAN	165	M S.YAER.DSFLKRTR..IV..R..IE.ANVTWDSDVD-T.NFLK-AAA---	211
NS3.BRDV	154	KR.RSVKRDIVKR.TYISLARRMGRSPETGCRKVT.GL.HGASGGSGTRQG	205
		* * *	

図1-11 チュウザンウイルス及び他血清群オルビウイルスNS3のアミノ酸配列の比較

ボックスは各NS3のtransmembrane部位を示す。NS3AのN末端は影文字で表した。

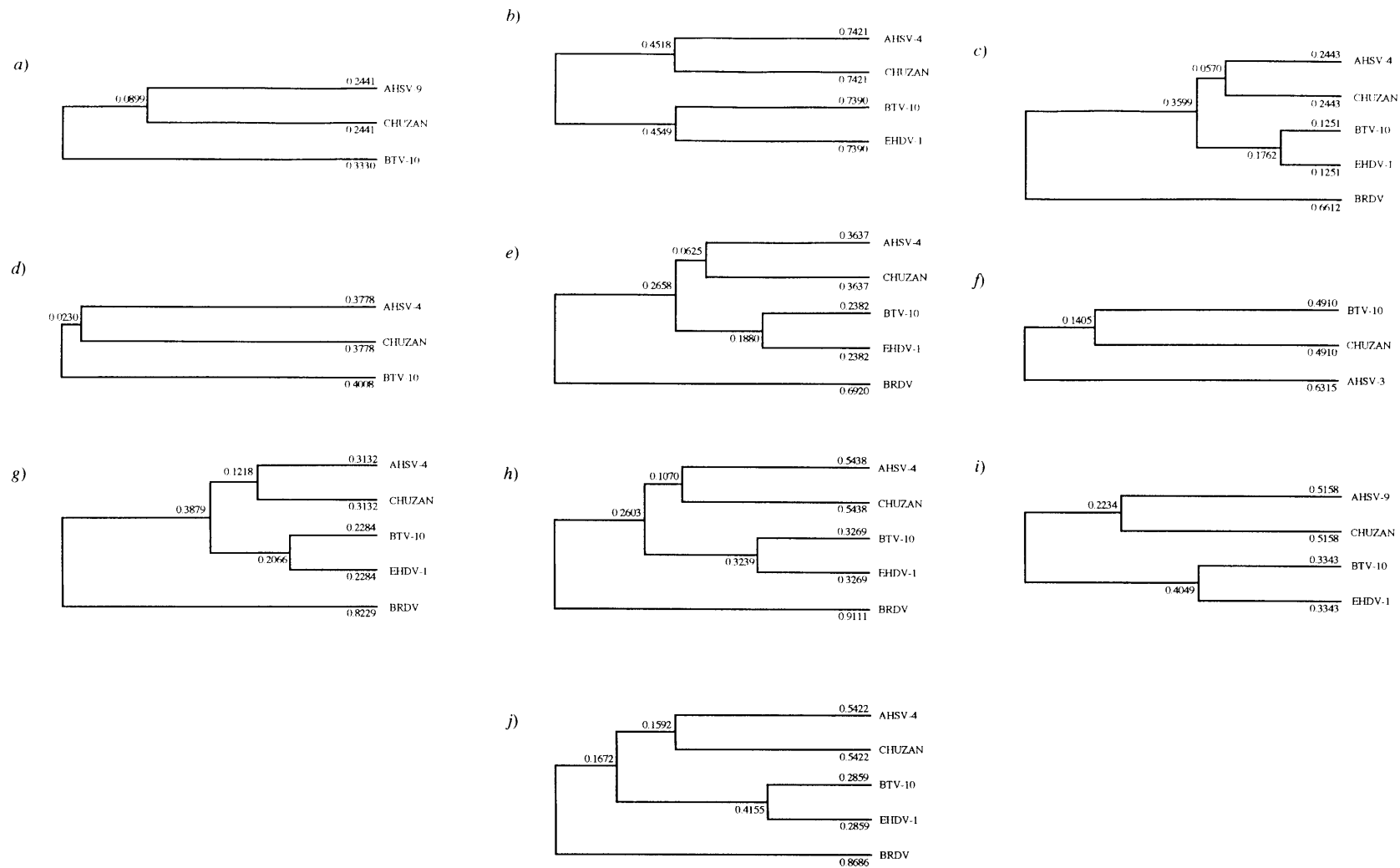


図1-12 オルビウイルス タンパク質（アミノ酸配列）の分子系統樹
 (a) VP1, (b) VP2, (c) VP3, (d) VP4, (e) VP5, (f) VP6, (g) VP7, (h) NS1, (i) NS2, (j) NS3

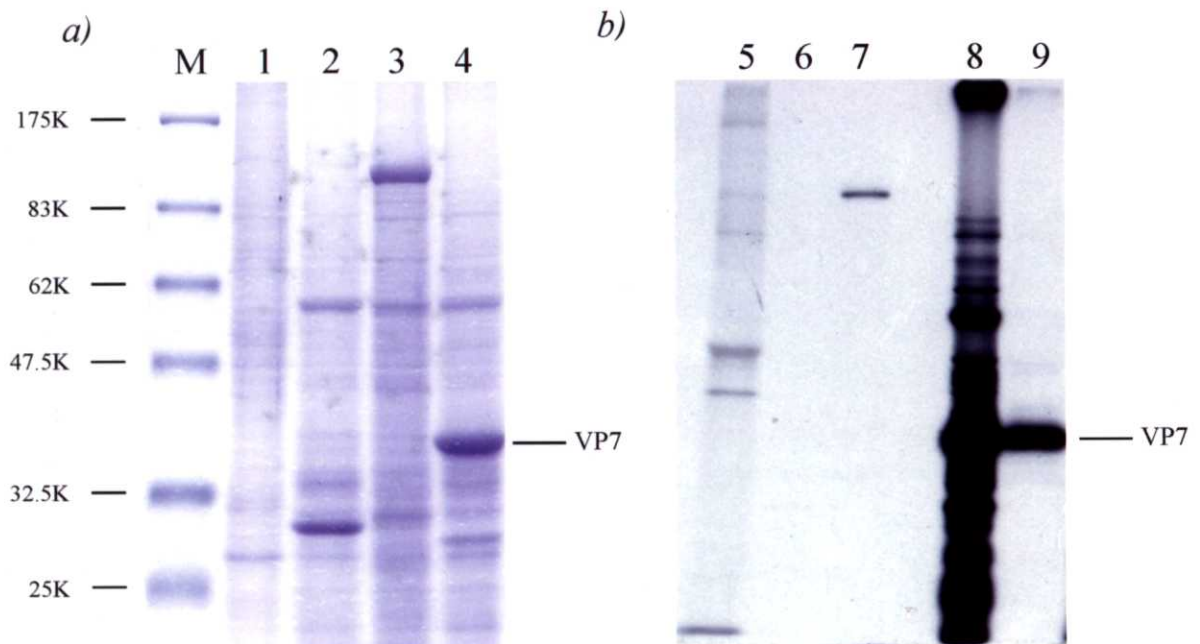


図2-1 組換えバキュロウイルスによるチュウザンウイルスVP7の発現

a) 感染細胞のSDS-PAGE像 (CBB染色) b) 抗チュウザンウイルス抗体を用いた免疫沈降反応

レーン1及び5, SF21細胞(Mock); 2及び6, AcMNPV C6; 3 及び 7, BacPAK6;
4,8及び9, BacCVS7 (4, 8はcell lysate, 9は免疫沈降物(VP7)); M, 分子量マーカー

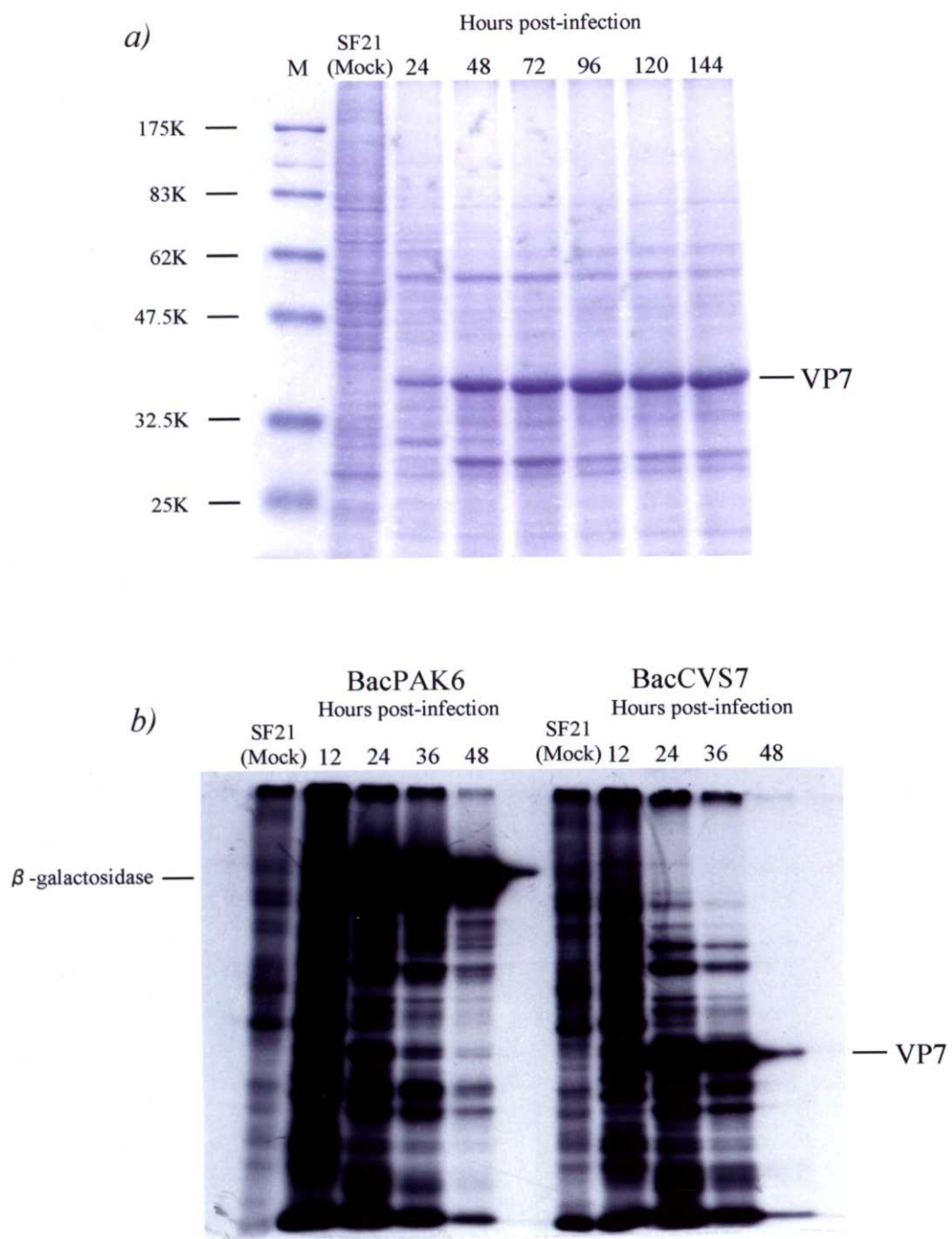


図2-2 組換えタンパク質（VP7）の経時的発現

a) SDS-PAGE像（CBB染色）、b) ^{35}S 標識した感染細胞のSDS-PAGE像（感染後12時間の段階では発現タンパク質のバンドは認められない。）

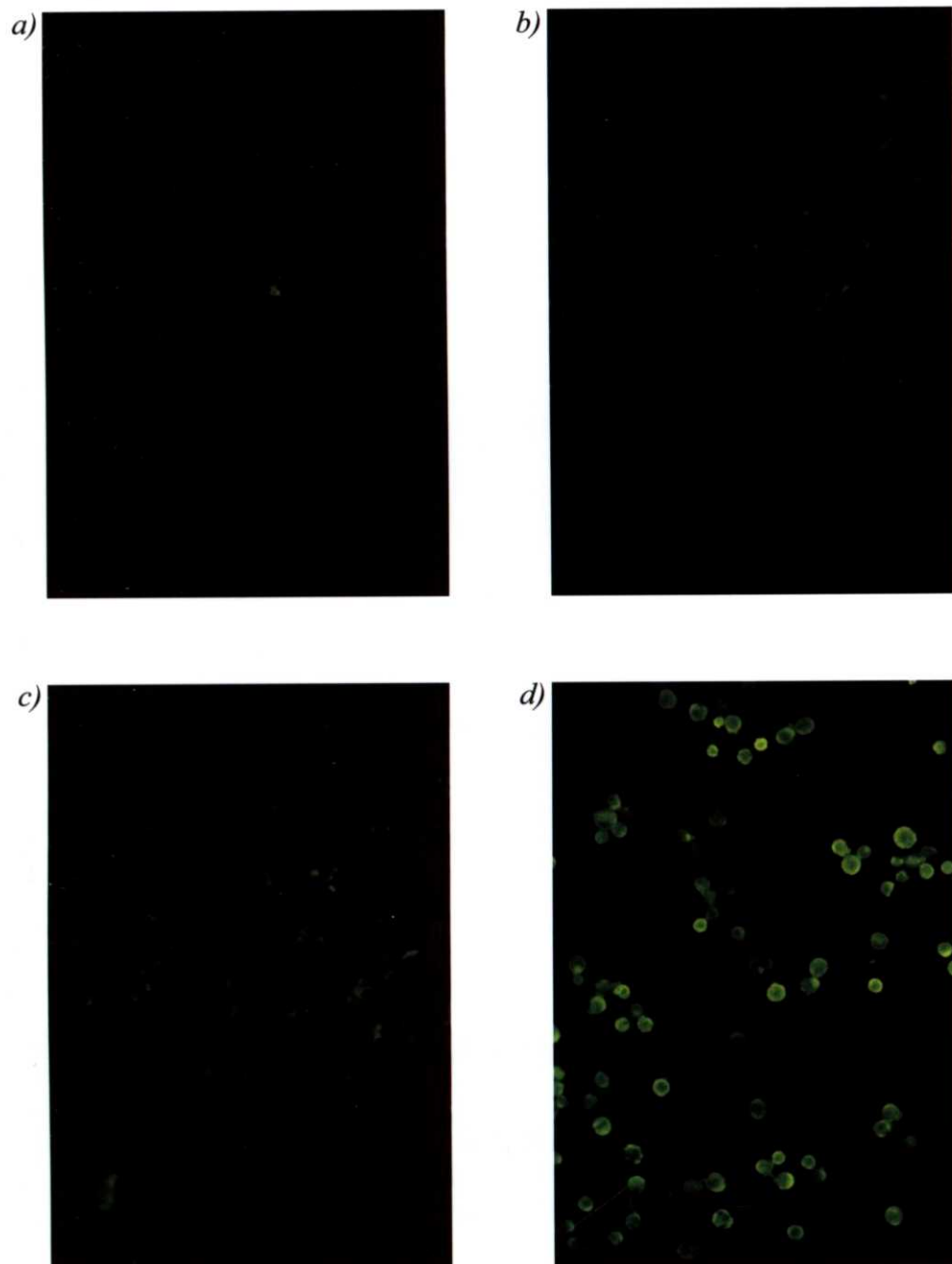


図2-3 間接蛍光抗体法によるチュウザンウイルスVP7発現の確認

a) SF21細胞、*b)* AcMNPV感染細胞、*c)* BacPAK6感染細胞、*d)* BacCVS7感染細胞

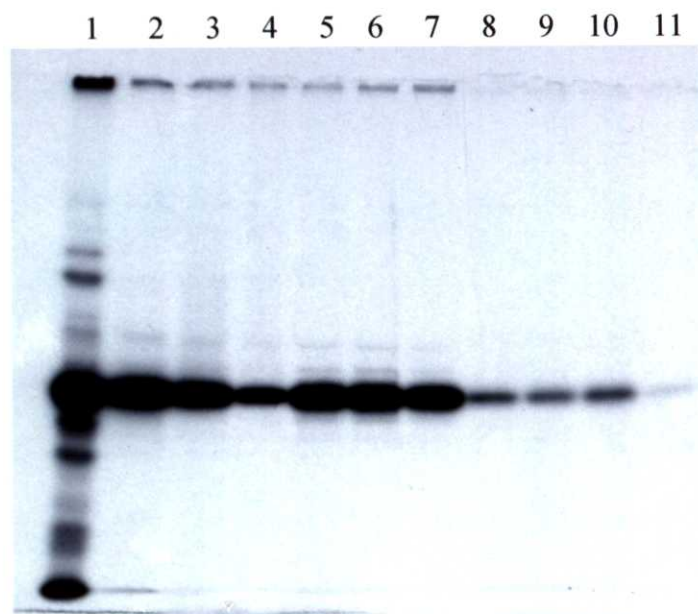


図2-4 各種抗血清を用いた組換えチュウザンウイルスVP7の免疫沈降反応

レーン1, BacCVS7 感染細胞; 2-10, 抗血清(2, Chuzan K-47; 3, CSIRO Village CSIRO 11; 4, D'Aguilar B8112; 5, Bunyip Creek CSIRO 58; 6, Nyabira 792/73; 7, Gweru 1726/76; 8, BTV-1; 9, EHDV-1; 10, EHDV-2); 11, 正常(陰性)血清

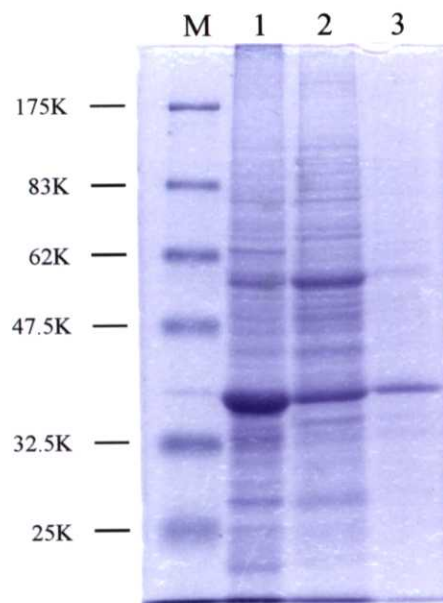


図2-5 組換えチュウザンウイルスVP7の精製

レーン1, BacCVS7感染SF21細胞; 2, NP-40処理感染細胞遠心上清; 3, 精製 VP7; M, 分子量マーカー



図2-6 組換えチュウザンウイルスVP7を用いた寒天ゲル内沈降反応

1-11, 抗血清(1, Chuzan K-47; 2, CSIRO Village CSIRO 11; 3, D'Aguilar B8112; 4, Bunyip Creek CSIRO 58; 5, Nyabira 792/73; 6, Gweru 1726/76; 7, Chuzan K-47; 8, Marondera 1070/78; 9, BTV-1; 10, EHDV-1; 11, EHDV-2); 12, 正常(陰性)血清; Ag, 組換えVP7

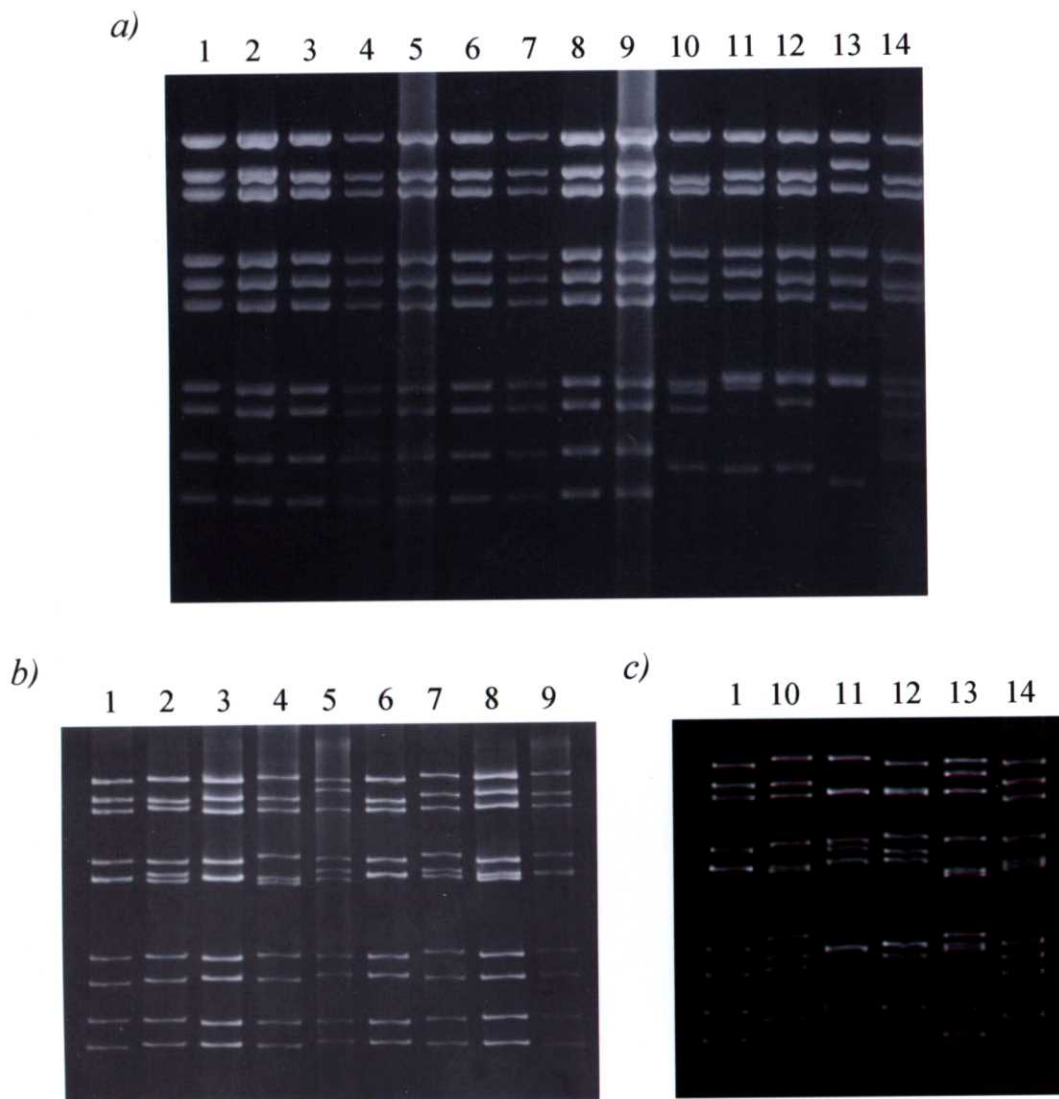


図3-1 オルビウイルスゲノムの電気泳動パターン

a) アガロースゲル(1%)、b)、c) ポリアクリルアミドゲル(10%)

レーン1-9, パリウム血清群; 1, Chuzan K-47; 2, DPP66; 3, D'Aguilar B8112; 4, Nyabira 792/73; 5, CSIRO Village CSIRO 11; 6, Bunyip Creek CSIRO 58; 7, Marondera 1070/78; 8, Marrakai CSIRO 82; 9, Gweru 1726/76; 10, BTV-17; 11, EHDV-2; 12, Ibaraki; 13, AHSV-4; 14, EUBV

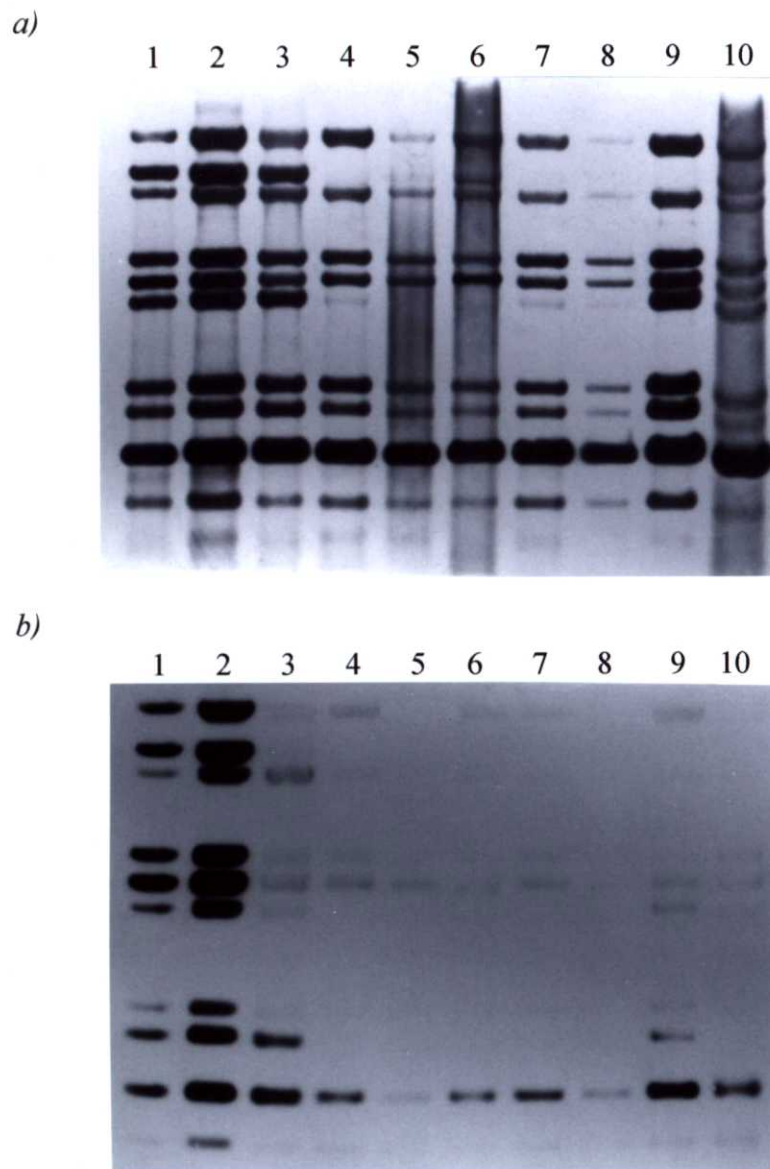


図3-2 チュウザンウイルスcDNAをプローブとして用いたノーザン
ブロットハイブリダイゼーション

a) 42°C、b) 60°Cで反応を行った。

レーン1, Kagoshima KC-05Y84; 2, Chuzan K-47; 3, DPP66; 4, D'Aguilar B8112;
5, Nyabira 792/73; 6, CSIRO Village CSIRO 11; 7, Bunyip Creek CSIRO 58;
8, Marondera 1070/78; 9, Marrakai CSIRO 82; 10, Gweru 1726/76

a)



b)



c)

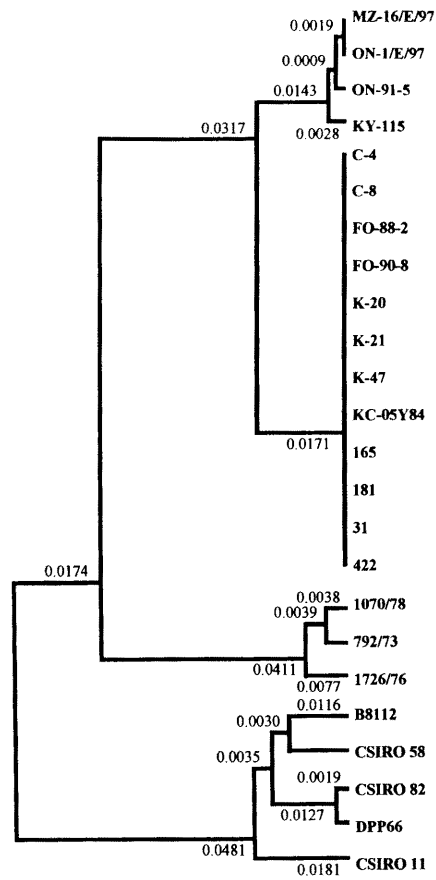


図3-3 RT-PCRによるパリアム血清群ウイルスの検出

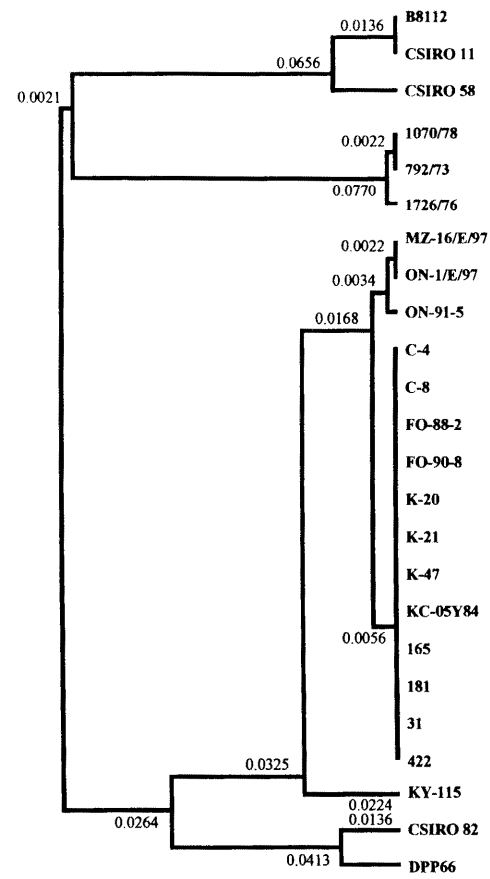
a) RNA分節5、b) RNA分節7及びc) RNA分節9のPCR断片のアガロース電気泳動像を示す。

レーン1-9、パリアム血清群; 1, Chuzan K-47; 1', Kagoshima KC-05Y84; 2, DPP66; 3, D'Aguilar B8112; 4, Nyabira 792/73; 5, CSIRO Village CSIRO 11; 6, Bunyip Creek CSIRO 58; 7, Marondera 1070/78; 8, Marrakai CSIRO 82; 9, Gweru 1726/76; 10, AHSV-4; 11, BTV-17; 12, EHDV-2; 13, Ibaraki; 14, EUBV M, 100 bp ladder (b)はφX174/Hae III digest)

a)



b)



c)

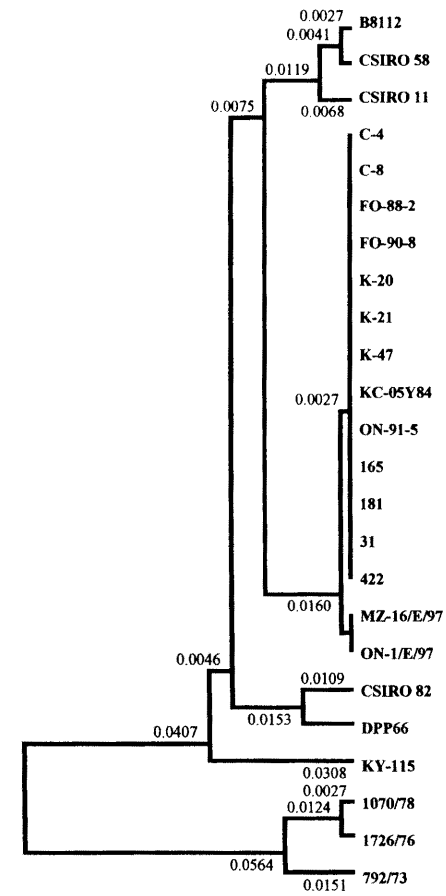


図3-4 パリアム血清群ウイルスのPCR産物の塩基配列より作成した分子系統樹

a) RNA分節5 b) RNA分節7 c) RNA分節9

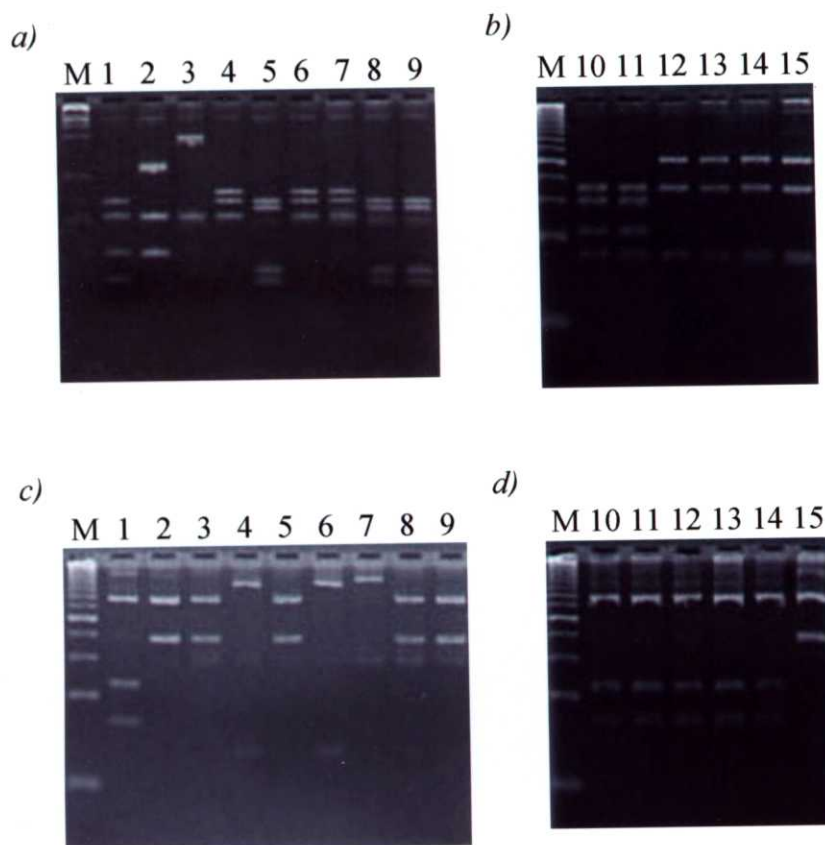


図3-5 パリアム血清群ウイルスRNA分節7のPCR産物のRFLP解析

PCR産物は*Rsa*I (a, b) 及び*Tsp*EI (c, d) で切断した。

レーン1, K-47; 2, DPP66; 3, CSIRO 82; 4, B8112; 5, 792/73; 6, CSIRO 11;
7, CSIRO 58; 8, 1070/78; 9, 1726/76; 10, FO-88-2; 11, FO-90-8; 12, ON-91-5;
13, ON-1/E/97; 14, MZ-16/E/97; 15, KY-115; M, 25 bp ladder (a)は ϕ X174/HaeIII digest)

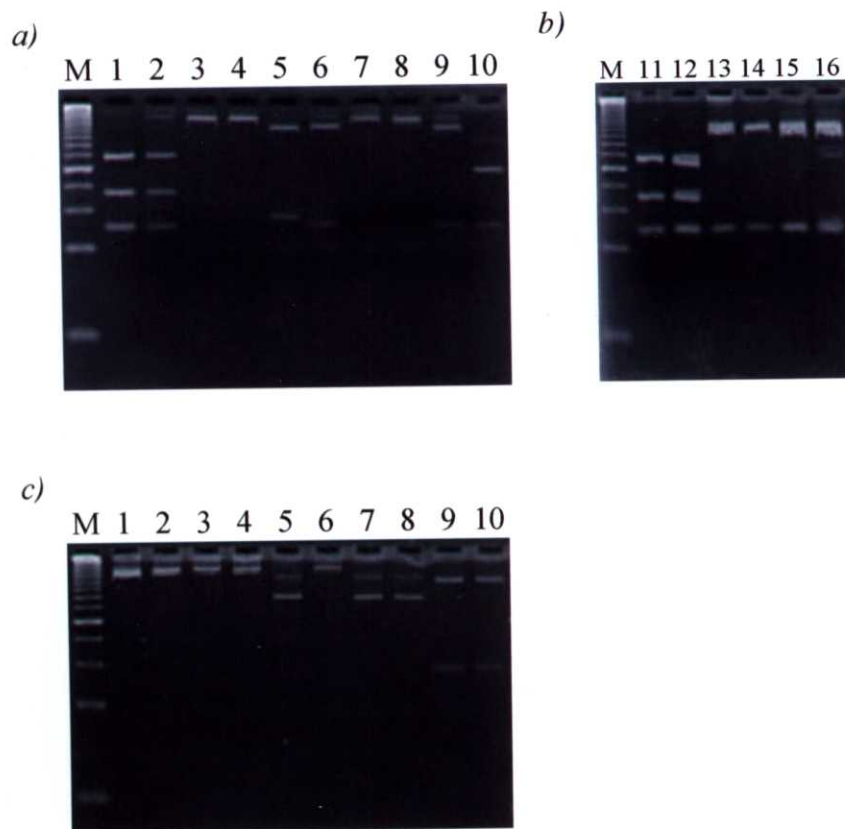


図3-6 パリアム血清群ウイルスRNA分節5のPCR産物のRFLP解析

PCR産物は*Hha* I 及び*Taq* I (a, b)、*Mbo* II 及び*Rsa* I (c) で切断した。

レーン1, K-47; 2, KC-05Y84; 3, DPP66; 4, CSIRO 82; 5, B8112; 6, 792/73;
7, CSIRO 11; 8, CSIRO 58; 9, 1070/78; 10, 1726/76; 11, FO-88-2; 12, FO-90-8;
13, ON-91-5; 14, ON-1/E/97; 15, MZ-16/E/97; 16, KY-115; M, 25 bp ladder

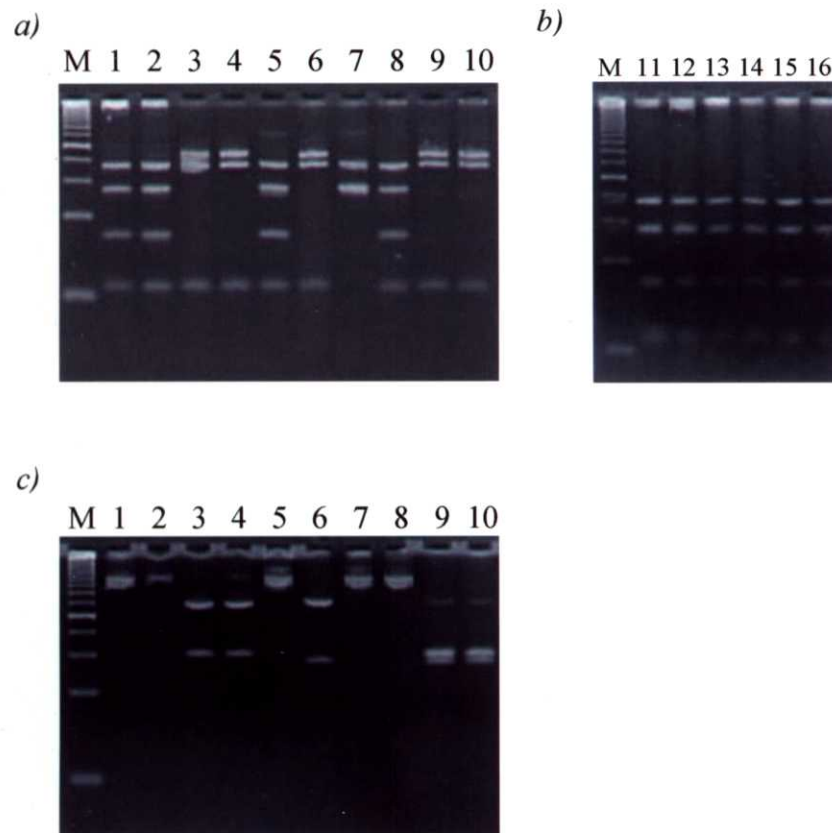


図3-7 パリアム血清群ウイルスRNA分節9のPCR産物のRFLP解析

PCR産物は *Dde* I 及び *Hinf* I (a, b)、*Alu* I 及び *Rsa* I (c) で切断した。

レーン1, K-47; 2, KC-05Y84; 3, DPP66; 4, CSIRO 82; 5, B8112; 6, 792/73;
7, CSIRO 11; 8, CSIRO 58; 9, 1070/78; 10, 1726/76; 11, FO-88-2; 12, FO-90-8;
13, ON-91-5; 14, ON-1/E/97; 15, MZ-16/E/97; 16, KY-115; M, 25 bp ladder