

オーエスキー病ウイルスの  
分子生物学的研究

山田 俊 治

①

オーエスキー病ウイルスの  
分子生物学的研究

山田俊治

# 目次

緒言	1
第1章 制限酵素によるオーエスキー病ウイルスゲノムの多型性解析	4
序論	4
材料と方法	4
ウイルスと細胞	4
ウイルス感染細胞DNA	4
制限酵素(RE)解析	5
成績	5
オーエスキー病ウイルス(PrV)ゲノムの物理地図と基本制限酵素(RE)切断型	5
野外オーエスキー病ウイルス(PrV)ゲノムの <i>Bam</i> HI 制限酵素(RE)解析	5
野外オーエスキー病ウイルス(PrV)ゲノムの <i>Kpn</i> I 制限酵素(RE)解析	6
考察	6
要約	8
第2章 モノクローナル抗体を用いたオーエスキー病ウイルスの主要糖タンパク質の抗原解析	10
序論	10
材料と方法	10
ウイルスと細胞	10
ウイルスの精製	10
固相酵素免疫測定法	11
モノクローナル抗体(MAb)の作成	11
放射性免疫沈降法	11
免疫蛍光抗体法	12
ブラック減少中和試験	12
中和耐性変異ウイルスの作出	12
成績	13
モノクローナル抗体(MAb)の性状	13

野外ウイルスに対するモノクローナル抗体(MAb)の反応性	13
中和活性耐性変異ウイルスの作出	13
考察	14
要約	15
第3章 糖タンパク質gⅢ遺伝子の解析	16
序論	16
材料と方法	16
ウイルスと細胞	16
オーエスキー病ウイルス(PrV)DNAの調製	16
バキュロウイルス(BV)DNAの調製	16
プラスミド	17
gⅢ遺伝子組換えバキュロウイルス(BV)の作出	17
gⅢ遺伝子組換えワクチニアウイルス(VV)の作出	17
gⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の作出	18
サザンブロット解析	18
放射性免疫沈降法	18
モノクローナル抗体(MAb)	18
免疫蛍光抗体法	18
固相酵素免疫測定法	19
中和試験	19
赤血球凝集(HA)試験	19
赤血球凝集(HA)阻止試験	19
動物接種試験	19
成績	20
gⅢ遺伝子組換えバキュロウイルス(BV)の作出とgⅢタンパク質の発現	20
gⅢ遺伝子組換えワクチニアウイルス(VV)の作出とgⅢタンパク質の発現	21
gⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の作出	21
gⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の増殖性	22
gⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の赤血球凝集(HA)活性	22
マウスに対するgⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の病原性	22

バキュロウイルス(BV)発現gⅢを用いた固相酵素免疫測定法(ELISA) -----	22
マウスに対するバキュロウイルス(BV)発現gⅢの抗原性 -----	22
ウサギに対するgⅢ遺伝子発現ワクチニアウイルス(VV)の抗原性 -----	23
マウスに対するワクチニアウイルス(VV)発現gⅢの免疫原性 -----	23
ブタに対するgⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の免疫原性 -----	23
オーエスキー病ウイルス(PrV)感染豚血清中の抗gⅢ抗体 -----	23
考察 -----	24
要約 -----	27
第4章 前初期制御タンパク質IE180遺伝子の解析 -----	28
序論 -----	28
材料と方法 -----	29
ウイルスと細胞 -----	29
オーエスキー病ウイルス(PrV)DNAの調製 -----	29
バキュロウイルス(BV)DNAの調製 -----	29
プラスミド -----	29
オーエスキー病ウイルス(PrV)特異抗体 -----	30
IE180発現細胞の作成 -----	30
IE180欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の作出 -----	31
サザンブロット解析 -----	31
固定細胞における $\beta$ -ガラクトシダーゼの検出 -----	31
$\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -gal)活性の測定 -----	32
IE180遺伝子組換えバキュロウイルス(BV)の作出 -----	32
免疫ブロット解析 -----	32
異種間細胞融合 -----	33
成績 -----	33
41°CにおけるtsG1株とIndiana S株の増殖 -----	33
pIEとpSV2neoによるIE180発現細胞の作出 -----	33
IE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の予備作出 -----	34
pRMIE180neoによるIE180発現細胞の作出 -----	34
V4V細胞を用いたIE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の作出 -----	35

IE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(PrV)の性状	35
IE180遺伝子発現バキュロウイルス(BV)の作出	36
IE180遺伝子発現バキュロウイルス(BV)の性状	36
バキュロウイルス(BV)産生IE180によるIE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス (PrV)の増殖相補試験	36
考察	37
要約	40
総括	41
謝辞	45
文献	46
表	55
図	65

## 略語一覧

ABTS	:2,2'-azinobis(3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid)
bp	:base pair (塩基対)
BV	:baculovirus バキュロウイルス
$\beta$ -gal	: $\beta$ -galactosidase $\beta$ -ガラクトシダーゼ
CBB	:Coomassie brilliant blue クマシー・ブリリアント・ブルー
CPE	:cytopathic effect 細胞変性効果
Da	:dalton ダルトン
DMEM	:Dulbecco's modified Eagle medium ダルベッコ変法イーグル最小必須培地
DMSO	:dimethyl sulfoxide ジメチルスルフォキシド
E	:early 初期
EDTA	:ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	:enzyme-linked immunosorbent assay 固相酵素免疫測定法
FITC	:fluorescein isothiocyanate
HA	:hemagglutination 赤血球凝集
HI	:hemagglutination-inhibiting 赤血球凝集(HA)阻止
HSV	:herpes simplex virus 単純ヘルペスウイルス
IE	:immediate-early 前初期
IFA	:immunofluorescence assay 免疫蛍光抗体法
kbp	:kilobase pair (キロ塩基対)
kBq	:kilobecquerel (キロベクレル)
kDa	:kilodalton (キロダルトン)
L	:late 後期
LD <sub>50</sub>	:50% lethal doses (半数致死用量)
LTR	:long terminal repeat
MAb	:monoclonal antibody モノクローナル抗体
MEM	:minimum essential medium 最小必須培地
moi	:multiplicity of infection 多重感染度

NT	:neutralizing test 中和試験
ORF	:open reading frame 読み取り枠
OD	:optical density (光学密度)
PAGE	:polyacrylamide gel electrophoresis ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	:phosphate-buffered saline リン酸緩衝食塩水
PFU	:plaque-forming unit プラーク形成単位
PrV	:pseudorabies virus オーエスキュー病ウイルス
RE	:restriction endonuclease 制限酵素
RIPA	:radioimmunoprecipitation assay 放射性免疫沈降法
SDS	:sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
TCID <sub>50</sub>	:50% tissue culture infectious doses (半数組織培養感染用量)
TK	:thymidine kinase チミジンキナーゼ
VV	:vaccinia virus ワクチニアウイルス
X-Gal	:5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside



## 緒言

1902年ハンガリーのAladar Aujeszkyは狂犬病様の症状を呈したウシ、イヌ、ネコの脳乳材を実験動物に接種したところ、狂犬病とは異なる症状や病変が認められたことから、新しい疾病因子の存在を示唆した(1)。その後、病因としてヘルペスウイルスが分離され、その疾病を仮性狂犬病(pseudorabies)あるいは最初の報告者の名に因んでオーエスキー病(Aujeszky's disease)と称するようになった。原因ウイルスはヘルペスウイルス科のアルファヘルペスウイルス亜科、パリセロウイルス属、プタヘルペスウイルス1に分類されるが、慣用名として仮性狂犬病ウイルス(PrV)あるいはオーエスキー病ウイルスが使われている。種名が示すように、PrVの本来の宿主はブタであるが、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコなどの家畜をはじめ、キツネ、アライグマ、ミンク、アナグマ、タヌキ、シカ、コヨーテなどの野生動物に自然感染し、実験的にはハト、ムクドリ、ニワトリなどの鳥類にも感染する(23)。ブタ以外の動物が感染すると、多くの場合搔痒を特徴とする神経症状、いわゆる狂搔(mad-itch)を起し急性経過で死亡する。一方、本来の宿主であるブタの感染の場合、新生豚では急性脳炎を起こして死亡するが、成豚は搔痒を示すことなく軽症あるいは不顕性感染に終わることが多い。加齢に伴って無症状傾向が強くなるが、妊娠豚は死産産を起こす。感染耐過したブタは潜伏感染に移行し、時として再発を繰り返す。この潜伏感染と再発がヘルペスウイルス感染症の最大の問題となっている。

ウイルス粒子は直径150~180 nmでエンベロープを有し、110 nmのヌクレオキャプシッドを包含している(23)。PrVゲノムは一对の倒置反復配列に挟まれたUS(unique short)領域とUL(unique long)領域からなる分子量約95×10<sup>6</sup> ダルトン(Da)の線状二本鎖DNAで(6,7)、約150 kbp(kilobase pair)に相当する。ゲノムには約70種の遺伝子がコードされ、現在ゲノムの60%である約40種の遺伝子の塩基配列が決定されている(43)。PrVの遺伝子はカスケード様式に基づいて発現され、転写時期により3群に分けることができる。ウイルスが細胞に感染すると直ちに転写される前初期(IE,  $\alpha$ )遺伝子群、その遺伝子産物によって転写が活性化される初期(E,  $\beta$ )遺伝子群、それらの遺伝子発現に続いて転写される後期(L,  $\gamma$ )遺伝子群である(19,20)。IE遺伝子はウイルスタンパク質の合成に非依存性に転写される遺伝子と定義され、タンパク質合成阻害剤の存在下でもその転写が行われる(28)。PrVのIE遺伝子は一種のみで、倒置反復配列内に存在するため、ウイルスゲノムに重複して存在

する(28)。E遺伝子はチミジシンキナーゼ(TK)(33)やプロテインキナーゼ(74,81)などの非構造タンパク質をコードする遺伝子群である。最近、PrVにおいても、ヒトの単純ヘルペスウイルスではIE遺伝子群に定義されているICP0(IE0,  $\alpha$ 0, Vmw110)遺伝子と相同性を有する遺伝子が同定された。しかし、その転写がIE遺伝子産物に依存することから、E遺伝子群に分類され初期タンパク質0(EPO)遺伝子と呼ばれている(11)。L遺伝子群は糖タンパク質g I (55), g II (59), g III (60), gp50(54), gp63(55), gX(58), gH(32), gL(30)や主要キャプシッドタンパク質(79)などをコードし、エンベロープやキャプシッドなどウイルス粒子を構成するタンパク質遺伝子である。

上述したように、PrVを含むヘルペスウイルス感染症では潜伏感染と再発が最大の問題として残されており、その解明が急務となっている。潜伏感染と再発機構を明らかにするためには、ウイルスの感染・増殖機構、特に各遺伝子の構造と機能を詳細に検討する必要がある。そこで、本論文ではPrVの感染で最初に転写されるIE遺伝子、また感染の成立と免疫反応の誘導に重要な役割を果たすと考えられる糖タンパク質gIII遺伝子に焦点をあて、それらの遺伝子産物の分子生物学的手法による機能解析を行った。

ウイルス遺伝子と遺伝子産物の機能解析には、当該遺伝子の欠損変異ウイルスの作出とベクターウイルスを用いた発現系の構築が有用な実験手法となる。PrVの研究の進展にともない、構造・非構造タンパク質にかかわらず、TK(33)をはじめ糖タンパク質g I (55), gp63(55), gIII(61), gL(30)、さらにキャプシッドの成熟に関わっているUL21(14)などウイルス増殖に必ずしも必要としない遺伝子の存在が明らかとなってきた。これら非必須な遺伝子に物理的欠損を導入したウイルスは、相同組換え法(62)によって容易に作出することができる。逆にいえば、通常の培養細胞系で遺伝子欠失変異株が得られるならば、その遺伝子はウイルス増殖に必須でないことを示す。また、ウイルス増殖に必須なタンパク質遺伝子の欠損は、そのタンパク質を恒常的に発現する遺伝子導入細胞を用いて相同組換えを行えば可能である。親ウイルスと欠損ウイルスの性状の差異が欠損遺伝子の表現型であることから、組換え手法による遺伝子欠損はその機能解析に有用である。一方、遺伝子をクローニング他の発現系に導入することは、混入する他のタンパク質の影響を排除できるため、組換え手法による遺伝子欠損とともに遺伝子産物の機能解析に有用である。特にベクターウイルス発現系は、培養細胞での遺伝子発現のみならず、ベクターウイルス自身の感染性を利用した個体レベルでの遺伝子発現も可能であることから、その利用価値が高い。近年、外来遺伝子を大量に発現できる系として昆虫ウイルスのバキュロウイルスが、また

宿主体内で直接遺伝子発現可能な系として動物ウイルスのワクチニアウイルスが広く利用されている。

本研究は、PrVの構造タンパク質gIII遺伝子と非構造タンパク質IE遺伝子について、欠損変異ウイルスと発現組換えウイルスを作出し、それらの産物である糖タンパク質gIIIと制御タンパク質IE180の機能解析を目的とする。本論文は4章からなり、第1章ではこれらの解析に必要な予備知見を得るため、日本分離ウイルス株DNAの制限酵素切断長解析により、遺伝子に欠損を導入する際に問題となるウイルスゲノムの多様性について検討した。第2章ではモノクローナル抗体を用いてウイルスの抗原性について検討した。第3章では糖タンパク質gIII遺伝子について、バキュロウイルスとワクチニアウイルスを用いた発現系および欠損変異ウイルスを作出し、gIIIの機能解析を行った。第4章ではIE遺伝子欠損変異ウイルスを作出するとともにバキュロウイルスを用いた発現系を構築し、制御タンパク質IE180の機能解析を行った。

## 第1章 制限酵素によるオーエスキー病ウイルスゲノムの多型性解析

### 序 論

大型のDNA型ウイルスであるオーエスキー病ウイルス(PrV)に遺伝子欠損や挿入を行う場合、相同組換え法を用いる。その際、使用するゲノムの相同領域の安定性が欠損・挿入変異株の組換え効率と選択の上で大きな問題となる。不安定なゲノム領域への相同組換えは挿入遺伝子の欠落を起こしやすい。また、ウイルスゲノムの物理地図を利用して遺伝子のクローニングを行うが、その地図は株によって差異があるため、使用株に応じた地図が必要となる。そこで、PrVの組換え実験を行うための予備的知見を得るため、日本国内で分離されたPrVのゲノムを制限酵素によって切断し、その断片長について制限酵素(RE)解析を行い、日本分離株の基本RE切断型を決定した。また、変異によって多様性を有しやすい領域を調べた。

### 材料および方法

ウイルスと細胞：1987年から1990年にかけて、青森、福島、埼玉、東京、神奈川、新潟、三重、熊本、鹿児島、茨城、群馬、千葉、栃木の13都県の家畜保健衛生所あるいは家畜衛生研究所で分離された合計148株のPrVを用いた。加えて、米国株であるtsG1株(第4章参照)とIndiana S株(52)、タイ国分離株のNK株、それに日本で最初に発生した豚のオーエスキー病から分離された山形S-81株(21)を比較対照に用いた。PrV分離株の種ウイルス液は、ブタ腎臓由来のPK-15細胞を用いて作成した。PK-15細胞の維持には、5%の牛血清を含むイーグル最小必須培地(日水製薬社)を使用した。

ウイルス感染細胞DNA：RE解析には、PrV感染PK-15細胞から抽出した細胞DNAを使用した。すなわち、ウイルスを多重感染度0.1ブラック形成単位でPK-15細胞に接種し、全体に細胞変性効果が認められた時点で細胞を回収し、リン酸緩衝食塩水で3回洗浄した後、10 mM トリスと1 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)からなるTE緩衝液に浮遊した。細胞浮遊液にSDS(sodium dodecyl sulfate)とプロテナーゼKを最終濃度がそれぞれ0.6%と20

単位/mlになるように添加し、37℃で3時間処理した。ついで、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールの2:1:0.04混合液(フェノール混合液)によって、感染細胞溶解液より細胞DNAを抽出した。フェノール混合液を除去するため、抽出液をジエチルエーテルで3回洗浄した後、2単位のRNase Aで37℃で1時間処理した。DNA溶液に再びプロテナーゼKを10単位添加し37℃で3時間処理した後、フェノール混合液抽出とジエチルエーテル洗浄を繰り返して、RE解析に用いた。

RE解析: PrV感染細胞から調製したDNAを *Bam*HIあるいは *Kpn*Iによって37℃で一晩消化した。消化したDNAは、1  $\mu$ g/mlの臭化エチジウムを添加した0.6% アガロースゲル(195×135×5 mm)を使用し30ボルトで18時間泳動した。泳動後、ゲルを紫外線照射下で観察し、写真撮影を行った。

#### 成 績

PrVゲノムの物理地図と基本RE切断型: 対照として用いたウイルス4株の *Bam*HIによる物理地図ならびにその切断型を図1に示した。それぞれの消化断片に付した数字は、tsGI株の報告に基づいて記入した(3)。米国株のtsGI(図1A)とIndiana S(図1B)両株はゲノムの *Bam*HI断片14'と5'の間の切断点に違いがあるものの、Herrmannらの分類(25)に従えばタイプIであった。NK(図1C)と山形S-81(図1D)株はタイプIの *Bam*HI断片2がさらに2aと2bに開裂したタイプIIであった。

野外PrVゲノムの *Bam*HI RE解析: 図2に1987年から1990年にかけて日本国内で分離された148株の *Bam*HI切断型を示した。株間でいくらかの多様性が認められたが、すべて断片2が2aと2bに開裂しておりタイプIIに分類された。

*Bam*HIを用いたRE解析で検出できたDNA断片のうち、断片3(16.1 kbp), 4(9.4 kbp), 6(7.5 kbp), 7(6.4 kbp), 9(4.2 kbp), 11(3.2 kbp), 14(1.4 kbp)は、対照ウイルスを含めすべてのウイルス株で安定的に認められた。しかし、山形S-81株の切断型を基本型(プロトタイプ; P型)として日本国内分離株と比較すると、上記以外の断片では差異がみられた。500 bp以上の断片長の違いと検出されるバンド数の変化を基準とすると、明らかな変化は *Bam*HI断片の1, 5, 8, 8', 13'に認められた。その変化に基づいて、今回検査した野外分離株はP, A8',

A5, D5, D1, L8の6型に分類された(図3)。

山形S-81株と同じ *Bam*HI 切断型を示したウイルスをP型に分類した。P型は最も優勢で、126の分離株(85%)がこの型に属した。断片8'にDNA配列が付加したと考えられるA8'型はGm13/89, Gm05/90, Ib06/89, Tc13/89, Ch03/89, Ch04/89, Tk01/89の7株、また断片5にDNA配列が付加したと考えられるA5型はGm27/90, Ib03/88, Ib04/88, Ib06/88の4株であった。反対にDNA配列が欠損した分離株もみられた。P型より断片5が短くなったD5型はTc01/88, Tc08/89, Tc09/89, Tc10/89, Tc11/89, Tc12/89, Tc13/89, Tc01/90の8株で、栃木県で分離された株のみであった。P型の断片1が短くなったものをD1型としたが、D1型に分類されたウイルスはIb14/89株のみであった。L8型は *Bam*HI 断片の8と8'および8と13の間の切断点が消滅したもので、Ch02/88とCh04/88の2株がL8型に属した。

上述した明らかな変化に加え、*Bam*HI断片の5'+14', 10, 12にも僅かながら株間に差異がみられた。この差異は同一地域から分離されたウイルスの間にも検出されるが(図4A)、バンド数に変化がなく、500 bp以下の断片長の小さな変化にすぎなかった。

**野外PrVゲノムの *Kpn*I RE解析:** PrV DNAの *Kpn*I物理地図(図5)はtsG1株の報告に基づいた(3)。調べたPrVの *Kpn*I切断型は基本的に類似していたが、異なる地域で分離されたウイルス間で断片Kの長さが異なっていた(図5)。 *Kpn*I断片Kの変化は *Bam*HI断片5の変化(図3と5)に関連していた。きわめて小さな変化は *Kpn*I断片D, E, F, H, I, Jに認められ、 *Kpn*I断片Dの変化は *Bam*HI断片5'+14'の変化に一致していた(図4AとBのレーン1-3, 7, 8)。他の *Kpn*I断片についてはすべてのウイルスで安定していた。

## 考 察

本章では、野外分離についてゲノムの多型性を *Bam*HIと *Kpn*Iを用いたRE解析によって調べた。ウイルスを分離した地域や動物種が異なっても、日本国内で流行しているPrVは基本的にHerrmannらの分類(25)によるタイプIIであった。タイプIIはタイプIの *Bam*HI断片2内にさらに1つの切断点を有していることで分類されているが、148株すべてがタイプIIであったことは、 *Bam*HI断片2は安定しており変異の少ないこと、また日本で流行しているPrVに大きな変異のないことを示している。しかし、その他の断片ではいくつかの断片長や切断点の変化がみられた。

塩基配列の付加や欠失の結果起こる *Bam*HI 消化断片長の変化は断片 5, 8', 10, 12 でみられ、それぞれの変化は *Kpn*I 断片の K, E, J, I に連関していた。これらの断片はすべてゲノムの反復配列とユニーク領域との接続部配列を含んでおり(図1)、その多様性は接続部配列内の小繰り返し配列のためと考えられる。事実、*Bam*HI 断片 10 とその倒置配列である断片 12 には2種類の小繰り返し配列の存在が明らかにされている(80)。しかし、*Bam*HI 断片 8' は *Bam*HI 断片 13 の倒置配列の一部を含んでいるが、断片 13 に変化は認められなかった。これは *Bam*HI 断片 13 自体が小断片であるため、*Bam*HI 断片 8' に連関したその変化を検出することが困難であったためと考えられる。

ゲルで可視化されたバンドの強度は低かったが、ゲノムの左末端部を含む *Bam*HI 断片 5'+14' と *Kpn*I 断片 D も明らかに多型性を示した。それら断片の移動度は、同地域や同時期に分離された株の間でも異なっていた(図4)。これらのバンドの低強度は、おそらく RE 解析に感染細胞 DNA を用いたことによるものと考えられる。ゲノム末端部を含む *Bam*HI 断片 5'+14' と 13 あるいは *Kpn*I 断片 D と H は、ウイルス複製の際にゲノム DNA が環状化するために消失することが知られている。成熟ウイルス粒子から調製した DNA を分析材料とすれば、これらの断片はより明瞭なバンドとして検出できるものと思われた。

山形 S-81 株との比較において、*Bam*HI 切断点の消失がもたらす変化は断片 8 と 8' および断片 8 と 13 の間においてのみ認められたが(L8型)、これらの断片もまた反復配列を含んでいる。塩基配列の付加あるいは欠失に関連した変化は PrV を培養細胞やブタで実験的に継代した際に生じることが報告されているが(36, 42)、ウイルス継代によって RE 切断点の出現や消失にともなう変化の起こることは報告されていない。今回、後者のような変化をともなったウイルスである L8 型や D1 型が見つかったことは興味深い。L8 型と D1 型は日本でオーエスキー病の発生が最も顕在化している関東地方の千葉県と茨城県からそれぞれ分離された。1985 年までに日本で分離された PrV の RE 解析については、Nishimori の報告(49)がある。同報告では今回のような型別は行っていないが、その RE 切断型をみる限り 1985 年以前に分離したウイルスに L8 型ウイルスはなかったと考えられる。しかし、1985 年に関東地域において分離した 5 株のウイルスはすべて L8 型の RE 切断型を示している。一方、今回関東地方で分離した 130 株のうち、L8 型に属するウイルスはわずか 2 株(1.5%)にすぎなかった。このことは関東地方では L8 型が 1984 年末頃から出現し、翌年には P 型に置き変わり、P 型が優勢になったことを示唆する。しかし、その RE 切断型の変化が新しいウイルス株の侵入によるためか、あるいは既存のウイルス株の変異によるものかは明らかではない。D1 型ウイ

ルスはすでに1985年に愛知県で分離されたことがある(49)。しかし、愛知県の発生と今回D1型ウイルスが分離された茨城県の発生に関わる疫学的な関連は不明である。以上のように、日本で流行しているウイルスのゲノム型は基本的にはHerrmannらのタイプIIであったが、様々な小変異のあることが明らかとなった。図6に示したように、それらの変異はウイルスゲノムの反復配列、反復配列とユニーク領域の接続部位、さらに左末端に頻繁に生じると結論できる。

RE切断型の多型は反復配列、接続部やゲノムの左末端部を含む断片に限って生じているが、同地域や同農場あるいは疫学的に関連した発生において分離されたウイルスの間ではRE型の類似性が認められた。例えば、新潟県(Nt01/89-Nt03/89)と三重県(Me01/90-Me05/90)で分離されたウイルスは*Bam*HI断片10と12の長さが県間で異なっているが、それぞれの県内の株間では同じであった(図2)。さらに、三重県の発生から分離されたウイルスのRE型は熊本県と鹿児島県で分離されたKu01/90とKs01/90株のRE切断型と完全に一致した。これら3県の発生農場間ではブタの流通が行われていたという疫学的事実があり、今回の結果はウイルス学的にも3県の発生の間に関連のあった証拠を支持するものであろう。また、タイプD5は栃木県に限って分離されており、他地域からは分離されていない。これらの事実はRE解析がオーエスキー病の疫学的調査に有効であることを示唆する。

本章では、PrV感染細胞から調製したDNAのRE解析によって、ウイルスゲノムの反復配列、反復配列とユニーク領域との接続部位、左末端に頻繁に多型が生じることを明らかにした(図6)。

## 要 約

1987年から1990年の間に分離した148株のPrV由来DNAを制限酵素*Bam*HIと*Kpn*Iで消化し、その切断型を日本国内で1981年に最初に分離された山形S-81株、米国由来のIndiana S株とtsGI株、タイ国由来のNK株と比較した。その結果、最近分離されたウイルス株のDNAは基本的に同一の切断型を示し、山形S-81株およびNK株と同様に*Bam*HIの切断型タイプIIに分類された。一方、米国由来の2株はタイプIであった。これらの結果から、初発生以来日本で流行しているPrVには顕著な変異が起こっていないことが示唆された。しかし、ゲノムの反復配列、反復配列とユニーク領域との接続部位および左末端には、切断点の獲得と消失、あるいは塩基配列の挿入と欠失に起因する変異が認められ、これらの領域では変



異の起こり易いことが明らかとなった。これらの変異は同一地域や農場で同時期に分離されたウイルス、疫学的に関連のある発生から分離されたウイルスの間で共通して認められる傾向にあり、ウイルスDNAの制限酵素による分析がオースキー病の疫学調査に有用であることが示された。

## 第2章 モノクローナル抗体を用いたオーエスキー病ウイルス の主要糖タンパク質の抗原解析

### 序 論

オーエスキー病ウイルス(PrV)のエンベロープに存在する主要な糖タンパク質の抗原決定基に関する詳細な研究は少ない。Ben-Poratらは糖タンパク質g I, g II, g IIIの抗原変異について研究を行い、g Iと g IIIには高率に抗原変異が生じるが、g IIには起きないことを示した(4)。第1章ではPrVゲノムの多様性を制限酵素解析により示した。しかし、ウイルスゲノムに物理的の差異を生じても、タンパク質に抗原変異として反映されるとは限らない。抗原変異の解析には免疫学的方法が有効である。本章ではPrVに対するモノクローナル抗体(MAb)を作成し、これを用いて抗原の多様性を解析した。特にMAbの中和活性を利用して抗原変異株の作出を行い、抗原変異出現の可能性について検討した。

### 材料と方法

ウイルスと細胞: PrVの標準株として日本分離株の山形S-81株と米国分離株のIndiana S株を用いた。また、日本の流行ウイルスの抗原変異を検討するため、第1章で用いた野外分離株148株の内39株をMAbを用いた免疫蛍光抗体法および中和試験によって検査した。ウイルスの増殖はブタ腎臓由来細胞(PK-15ならびにCPK細胞)を使用して行った。細胞培養には5% 牛胎児血清、200 mM L-グルタミン、0.15% 炭酸水素ナトリウムを含むイーグル最小必須培地(日本製薬社)を用いた。

ウイルスの精製: PrV感染PK-15細胞を遠心により回収した後、リン酸緩衝食塩水(PBS)に再浮遊させ、超音波によって細胞を破砕した。細胞片を遠心により除去し、その細胞破砕液を15%と30%のシロ糖溶液上に重層し、Beckman SW28ローターで20,000 rpmで1時間遠心した。沈殿物をPBSに再浮遊させ、15-30%のシロ糖密度勾配上に重層し、Beckman SW28ローターで10,000 rpmで2時間20分間遠心した。シロ糖密度勾配の中間層を採取し、PBSで透析して精製ウイルスを得た。

固相酵素免疫測定法(ELISA)：Mab産生細胞のスクリーニングはELISAによった。ELISA抗原は精製ウイルスより調製した。精製ウイルスを0.2% Nonidet P-40, 10 mM 塩化ナトリウム, 1.5 mM 塩化マグネシウムを含む10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)によって可溶化後、15,000 rpmで1時間遠心し、その上清を抗原液とした。抗原液を50 mM 炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈し、ELISA用プレートに1穴あたり0.1 mlずつ分注した。4℃で一昼夜固定した後、プレートをPBSで洗浄した。ついで、風乾し使用時まで-20℃に保存した。一次反応にはハイブリドーマの培養上清0.1 mlを使用し、二次反応にはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を用いた。発色基質にはABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid))を用い、反応は405 nmの波長で測定したOD(optical density)値で表した。

Mabの作成：紫外線照射により不活化した精製PrV 山形S-81株を免疫原(1頭あたりタンパク質量100 μg)とし、BALB/cマウスにフロイント完全アジュバントとともに皮下注射した。14日目に追加免疫として同じ抗原をフロイント不完全アジュバントとともに腹腔内注射した。さらに、35日目に同じ抗原を腹腔内注射し、追加免疫を行った。38日目に免疫マウスの脾細胞を採取し、P3-X63-Ag8-U1マウスミエローマ細胞と融合した。脾細胞とミエローマの細胞数比を5:1になるよう混合後、50% ポリエチレングリコール4000(Merck社)を含むRPMI1640培地(水産薬社)によって融合し、HAT培地によりハイブリドーマを選択した。ついで、PrV粒子を抗原とするELISAによって、PrV特異抗体産生ハイブリドーマを選抜した。抗体産生ハイブリドーマのクロニングは限界希釈法によって行った。プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を前処置したBALB/cマウスの腹腔内に抗体産生ハイブリドーマを移植し、7から14日後に回収した腹水を実験に用いた。Mabのアイソタイプ決定はマウス・ハイブリドーマ・サブタイピング・キット(Boehringer Mannheim社)を用いて行った。

放射性免疫沈降法(RIPA)：ウイルスを多重感染度(moi)5ブランク形成単位(PFU)で感染させたPK-15細胞に1 mlあたり370 kBqになるように[<sup>35</sup>S]-メチオニンあるいは[<sup>14</sup>C]-グルコサミンを添加した培養液を加え、16時間放射性標識を行った。標識感染細胞を1% デオキシコレート, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.3 M NaCl, 1 mM フッ化フェニルメチルス

ルフォニルを含む0.1 M トリス塩酸(pH 7.5)からなるRIPA緩衝液で可溶化し、遠心した上清を標識抗原とした。標識抗原液とMabを10:1の割合に混合して室温で1時間反応させ、さらにMabと同容量のプロテインAセファロースCL-4Bビーズ(Sigma社)を加えた。4℃で16時間反応させた後、ビーズをRIPA緩衝液で6回洗浄し、ビーズと等量の125 mM トリス塩酸(pH 6.8), 20% グリセロール, 5% SDS, 0.002% プロモフェノールブルーからなる2×ローディング緩衝液を加えた。95℃で10分の加熱後、その上清についてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィを行った。

**免疫蛍光抗体法(IFA)：**IFAはカバースリップを用いた間接法で行った。カバースリップ上に単層を形成した培養細胞にウイルスをmoi 0.001 PFUで感染させ、16時間培養した後アセトンで5分間固定した。固定感染細胞に一次抗体を載せ、37℃で1時間反応させた。一次抗体にはMabを2倍階段希釈したものを使用した。PBSでカバースリップを洗浄した後、二次抗体のFITC(fluorescein isothiocyanate)標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を載せ、37℃で1時間反応させた。PBSで洗浄後、カバースリップを10% グリセロールPBSによって封入し、蛍光顕微鏡によって観察した。

**ブラック減少中和試験：**中和試験は補体存在下あるいは非存在下の50% ブラック減少法で行った。ウイルス液を0.5 mlあたり60,000 PFUになるように調整し、2倍階段希釈したMabの各希釈1.0 mlと、さらに補体として新鮮モルモット血清、また対照として培養液の0.5 mlを混合し、37℃で1時間反応させた。6穴プレート上の細胞に1穴あたり各反応液を0.2 ml接種し、1時間吸着の後、0.8% 寒天を含む培養液を重層して37℃で培養した。2日後、さらに0.005% ニュートラルレッドを含む寒天培養液を重層し、一昼夜培養後ブラック数を計数した。ブラックを半数に減少させたMabの希釈倍数を算出し、中和抗体価とした。

**中和耐性変異ウイルスの作出：**基本的には変異原物質として臭化デオキシウリジンをを用い、Wathenらの方法(77)に準じて行った。PrV山形S-81株をmoi 0.01 PFUでPK-15細胞に接種し、1 mlあたり10 μgの臭化デオキシウリジンを含む培養液で培養した。24時間後培養液を回収し、変異ウイルスのストックとした。変異しなかった親ウイルスの山形S-81株を中和するため、ウイルスストックを96穴プレートの各穴に100 PFUずつ分注し、10倍の補

体依存性中和活性のあるMAbと補体を添加した。37℃で3時間反応させた後、PK-15細胞を各穴に添加し37℃で培養した。最大の細胞変性効果が出現した時点で培養液を回収し、この操作を2回繰り返した。最終的に増殖したウイルスをブランク純化し、ブランク減少中和試験により抗原変異の有無を確認した。

## 成 績

MAbの性状：数十クローンのPrV特異MAbを得ることができた。そのうち、中和活性を有する4クローンを選択し、実験に用いた。 $[^{14}\text{C}]$ -グルコサミン標識抗原を用いたRIPAにより、3クローン(5A4, MA11, MA15)は110 kDa、68 kDa、55 kDaの3つのポリペプチドを沈降し、糖タンパク質gIIに対する抗体であった(24, 78)。他のクローン(MA37)は82 kDaのポリペプチドを沈降し、糖タンパク質gIIIに対する抗体と考えられた(24)(図7)。これら4クローンについて、IFA抗体価ならびに中和抗体価を調べた(表1)。その結果、MA11とMA15、MA37は中和活性は補体依存性であったが、5A4は補体の有無にかかわらず中和活性を示した。IFA抗体価はいずれの抗体も高い値を示した。

野外ウイルスに対するMAbの反応性：米国分離株のIndiana S株と山形S-81株を含めた日本分離株40株、計41株のウイルスについて、4つのMAbに対する反応性をIFAならびに補体依存性中和試験によって調べた。その結果、MAb 5A4とMA11, MA37はいずれのウイルス株ともよく反応し、10,240倍以上のIFA抗体価あるいは100倍以上の中和抗体価を示した(表2)。一方、MA15は日本分離株とのみ反応し、10,240倍以上のIFA抗体価と50倍以上の中和抗体価を示した。しかし、米国分離株のIndiana S株とは反応せず、Indiana S株に対する両抗体価はともに10倍未満であった。

中和耐性変異ウイルスの作出：gII特異MAbの5A4はIndiana S株とは反応しなかったことから、gIIタンパク質にも多様性があることが示唆された。そこで、PrVにおける抗原性の多様性を実験的に証明するため、変異原物質として臭化デオキシウリジンをを用い、各MAbの中和活性から回避するウイルス株の作出を試みた。その結果、変異原物質処理した山形S-81株からMAbの5A4とMA37の中和から回避するウイルス株が分離され、それぞれYmrG2-3株とYmrG3-1株と命名した。YmrG2-3株とYmrG3-1株はそれぞれMAb 5A4とMA37とは反応しな

ったが、その他の抗体に対しては親株の山形S-81と同様に反応した(表3)。

### 考 察

山形S-81株に対するMabを作製し、補体添加時に中和活性を示す4抗体について性状を調べた。その結果、5A4とMA11, MA15は糖タンパク質gIIを、またMA37はgIIIを認識するMabであった。5A4はMA11とMA15とは異なり補体を添加しない場合にも中和活性を示し、同じgIIに対するMabでも認識する抗原決定基が異なるものと示唆される。さらにMA11は調べたすべてのウイルスと反応したが、MA15はIndiana Sに対しIFAや中和試験での反応性を欠いていた。このことから、MA11とMA15の認識する抗原決定基も異なると考えられる。したがって、3種の抗gII MAbは互いに異なる抗原決定基を認識しているものと思われる。また、日本の流行ウイルス株と米国分離株Indiana S株の糖タンパク質gIIに抗原決定基レベルで変異のあることが示唆される。PrVの糖タンパク質の抗原性については、gIとgIIIに多様性のあることが知られているが、gIIにはその多様性がないと考えられてきた(4)。しかし、今回の検討でgIIにも抗原的多様性の存在することが明らかとなった。

PrVの糖タンパク質の抗原的多様性を実験的に証明するため、親ウイルス株に山形S-81株、変異原物質臭化デオキシウリジン、選択にMA15を除く3種類のMabを用い、Mabの中和作用から回避するウイルスの選抜を試みた。その結果、MA11の中和作用から回避するウイルスクローンは得られなかったが、抗gII MAbの5A4と抗gIII MAbのMA37の中和作用からそれぞれ回避するウイルスクローンYmrG2-3とYmrG3-1を得ることができた。これらの結果は、PrVの糖タンパク質gIIのホモログであるHSVのgBで示されているように(26)、PrVのgIIは中和抗体を誘導する抗原ドメインに多様性を有していることを示すものであろう。また、今回調べたウイルスの間にはgIIIの多様性が認められなかった。しかし、YmrG3-1が得られたことは、Ben-Poratらが報告しているようにgIIIにも多様性があることを示すものであろう。

一般に、PrVゲノムの制限酵素(RE)解析では、抗原タンパク質のコード領域のRE切断型に差異の認められることはほとんどない。しかし、本研究でPrVの糖タンパク質遺伝子に抗原ドメインレベルで多様性の存在することが明らかとなった。したがって、抗原ドメインレベルでの多様性は、塩基置換などの生じやすい変異に起因するものではないかと推察される。一般に塩基置換による変異は可逆的であることが多く、復帰変異の起こることが

知られている。したがって、抗原タンパク質の解析を行う際、使用ウイルス株の選択に注意し、継代歴などを明らかにしておくことが必要である。

#### 要 約

PrV山形S-81株を抗原として中和抗体陽性Mabを作出した。糖タンパク質gIIに対するMab 3種、またgIIIに対するMab1種を用い、PrV41株の抗原解析を行った。抗gII MAbのうちMA15はIFAや中和試験で山形S-81株をはじめ日本の分離株と反応したが、米国防離株のIndiana S株とは反応しなかった。他の2種類はすべてのウイルス株と反応したが、Mab MA11の中和作用は補体依存性、また、5A4は非依存性であった。さらに、変異原物質臭化デオキシウリジンで処理した山形S-81株を各Mabで選択した結果、抗gII MAbの5A4と抗gIII MAbのMA37の中和作用から回避するウイルスが得られた。以上の結果から、今まで報告されていなかったPrVの糖タンパク質gIIにも、gIIIと同様に抗原変異の存在することが明らかとなった。

### 第3章 糖タンパク質gIII遺伝子の解析

#### 序 論

オーエスキー病ウイルス(PrV)の糖タンパク質gIIIはウイルス増殖に必ずしも必要としない糖タンパク質であるが、gIIとともにウイルスエンベロープの主要構成成分である(24)。gIIは感染細胞表面にも分布し(44)、PrVの感染あるいは免疫動物に中和抗体を誘導する免疫有効抗原としても知られている(4)。また、赤血球凝集(HA)活性が示唆されるなど、gIIIは様々な機能を有するものと推定される。そこで、本章ではgIIIの機能解析を目的に、第1章で作成したPrVゲノムの物理地図に基づいてgIII遺伝子をクローニングし、バキューロウイルス(BV)とワクチニアウイルス(VV)を用いた発現系を確立した。さらに、山形S-81株を親ウイルスとしてgIII遺伝子欠損PrVを作成し、gIIIの機能解析を行った。

#### 材料と方法

**ウイルスと細胞：**gIII遺伝子組換えBVには*Autographa californica*核多角体ウイルス(AcNPV)を用いた。BVの増殖と解析には*Spodoptera frugiperda*卵巣細胞由来のIPLB-SF-21AE(SF21AE)昆虫細胞を用い、細胞の維持培養は10%牛胎児血清(FCS)添加のTC100培地を使用し28℃で行った。VVを用いたgIII遺伝子組換え体の作出には、Lister株由来の弱毒株LC16m0株を使用した。VVの増殖と解析はRK-13細胞を用いて行い、細胞は10% FCS添加イーグル最小必須培地(MEM)で維持した。遺伝子組み換えに用いたgIII遺伝子のソース、gIII遺伝子欠損株作出の親ウイルスには山形S-81株を使用した。免疫マウスの攻撃試験にはPrV Indiana S株を用いた。PrVの増殖はブタ腎臓由来のPK-15細胞を用いて行った。

**PrV DNAの調製：**相同組換えに用いたPrVのDNAは、精製ウイルスからヨウ化ナトリウム密度勾配を利用した超遠心によって調製した(79)。

**BV DNAの調製：**gIII遺伝子組換えBVの作出に必要なBVのDNAは、精製AcNPVより塩化セシウム密度勾配を利用した超遠心によって分離調製した(38)。



プラスミド：完全なgⅢ遺伝子のソースとして用いたpG3Sプラスミドは、山形S-81株DNAの4.3 kbpのPstI断片をpUC18プラスミドにクローニングすることにより構築した(図8)。組換えBV作成用のトランスフェクターには、AcNPVポリヒドロリンプロモーター制御下で外来遺伝子が発現するpAcYM1Sプラスミドを用いた(38)。pAcPRG3プラスミドは、gⅢ遺伝子の読み取り枠(ORF)をpG3Sプラスミドの2.8 kbp NcoI消化断片として切り出し、Klenow処理後、pAcYM1SのSmaI消化部位に挿入して構築した(図9)。組換えVV作成用のトランスフェクターは、VVの初期-後期プロモーターであるp7.5プロモーターを有するp2401プラスミドとHA遺伝子を含むpHA13プラスミドから構築した(68)。p7.5gⅢプラスミドは、gⅢ遺伝子のORFをpG3Sプラスミドの2.8 kbp DraI-HindⅢ消化断片として切り出し、Klenow処理後、p2401プラスミドのSmaI消化部位に挿入して構築した。pHAP-gⅢプラスミドは、p7.5gⅢプラスミドをHindⅢ/EcoRI消化して得られる3.1 kbpの断片をKlenow処理し、pHA13のNruI消化部位に挿入して構築した(図10)。gⅢ遺伝子欠損PrV作出のトランスフェクターpdIG3プラスミドは、pG3Sから1.6 kbpのXhoI断片を除去して作成した。

**gⅢ遺伝子組換えBVの作出：**gⅢ遺伝子組換えBVの作出は、AcNPV DNAとpAcPRG3プラスミドとの相同組換えによって行った。10 ngのAcNPV DNAと1.0 μgのpAcPRG3プラスミドをLipofectinトランスフェクトキット(Bethesda Research Laboratories社)を用い、35 mmのシャーレに増殖したSF21AE細胞に同時にトランスフェクトした。28℃で3日間培養後、産生ウイルスを回収し、透明ブラック法によりポリヒドロリン陰性ウイルスを選択した。

**gⅢ遺伝子組換えVVの作出：**gⅢ遺伝子組換えVVの作出は、VV DNAとpHAP-gⅢプラスミドとの相同組換えによって行った。100 mmのシャーレに培養したRK-13細胞にVVを多重感染量(moi)0.1ブラック形成単位(PFU)で感染させ、1時間後にCellPfectトランスフェクトキット(Pharmacia社)を用い5.0 μgのpHAP-gⅢプラスミドをトランスフェクトした。32℃で4時間培養した後、25% ジメチルスルフォキシドにより細胞にショックを与え、0.6% アガロースを含む培養液を重層し、再び37℃で培養した。3日間の培養後、ニフトリ赤血球を用いた赤血球吸着反応を行い、HA陰性のウイルスを選別した。ついで、gⅢに対するモノクローナル抗体(MAb)を用いた黒色ブラック検査(77)を行い、gⅢ陽性のクローンを選択した。

**gIII遺伝子欠損PrVの作出：**gIII遺伝子欠損PrVの作出は、PrV DNAとpdIG3プラスミドとの相同組換えによって行った。0.5  $\mu$ gのPrV DNAとPstIで消化した2.5  $\mu$ gのpdIG3プラスミドをCellPfectトランスフェクトキット(Pharmacia社)を用い、90 mmのシャーレに培養したPK-15細胞と同時にトランスフェクトした。37°Cで6時間培養した後、細胞に15%のグリセロールでショックを与え、抗gIII MAbと補体源としてモルモット新鮮血清を添加した培養液を加えた。37°Cで12時間培養後、産生ウイルスを回収し、抗gIII MAbを用いた黒色ブランク検査(77)を行い、白色ブランクよりgIII遺伝子欠損変異株を選択した。選択したウイルスは抗gIII MAbを添加しない培地を用い、ブランク純化を3回行った。

**サザンブロット解析：**DNAを制限酵素で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動によって分画し、ニトロセルロースフィルターあるいはGeneScreen Plusナイロンフィルター(DuPont/NEN Research Products社)にトランスファーした。プローブDNAはランダム・プライミング・キット(Amersham社)と $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTPを用いて放射性標識を行い、Sambrookらのマニュアル(84)に従ってハイブリダイゼーションを行った。

**放射性免疫沈降法(RIPA)：**ウイルスをmoi 5.0 PFUで感染させた細胞に[ $^{35}$ S]-メチオニンあるいは[ $^{14}$ C]-グルコサミン、または[ $^3$ H]-ロイシンあるいは[ $^3$ H]-グルコサミンを370 kBq添加し、感染細胞を標識した。ウイルス感染細胞のツニカマイシン処理を行う場合には、[ $^3$ H]-ロイシン標識の際にツニカマイシン5  $\mu$ g/ml添加した。RIPAは第2章で述べた方法に準じて行った。

**MAb：**糖タンパク質gIII遺伝子組換えウイルスによるgIII発現の確認、またgIII遺伝子欠損ウイルスの選択は抗gIII MAbのMA37を用いて行った。MA37の作出と性状は第2章で述べた。

**免疫蛍光抗体法(IFA)：**gIII遺伝子組換えウイルスによるgIIIの発現、欠損ウイルスのgIIIの欠損性はIFAによって確認した。また、免疫動物の抗体産生をIFAによって検討した。抗原細胞には、必要に応じてアセトン固定あるいは未固定のウイルス感染細胞を用いた。IFAの方法は第2章で述べた。

固相酵素免疫測定法(ELISA)：gⅢ遺伝子組換えウイルス感染細胞の抽出液を抗原としたELISAを検討した。一次抗体にはMAb、免疫マウスおよびウサギ血清、PrV感染豚血清を、二次抗体にはそれぞれマウス、ウサギ、ブタの免疫グロブリンに対するホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた。ELISAの方法は第2章で述べた。

中和試験：マイクロタイタープレートを用いた中和試験(NT)を行った。被検血清を56℃で30分間の熱処理によって非働化し、2倍階段希釈列を作成した。希釈血清を0.2 mlずつ試験管に分注し、補体依存性NTの場合にはモルモット新鮮血清、非依存性NTの場合には希釈液をそれぞれ0.1 mlずつ加えた。さらに、400 TCID<sub>50</sub>/0.1 mlに調整したウイルス液0.1 mlを加え、37℃で1時間感作させた後、反応液を96穴プレートに単層を形成したPK-15細胞に0.1 mlずつ接種した。培養3日後、細胞変性効果(CPE)出現の有無を観察し、CPEを完全に抑えた血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

HA試験：HA試験はTetsuらの方法(72)に準じて行った。0.1% 牛血清アルブミンと0.01% グラチンを含むMEMを希釈液とし、ウイルスの2倍階段希釈列を25 μlずつ作成した。さらに、希釈液25 μlと0.3% BALB/cマウス赤血球浮遊液50 μlを加えた後、25℃で2時間反応させた。HA価は完全なHAを示したウイルス液の最高希釈倍数の逆数とした。

HA阻止試験：HA阻止(HI)試験はInabaraの方法(29)に準じて行った。HI試験に用いた血清は56℃で30分間非働化し、25% カオリンで処理した後、BALB/cマウス赤血球で吸収操作を行った。血清の2倍階段希釈列を25 μlずつ作成し、4単位のHA抗原を等量加え、4℃で18時間反応させた。HA抗原は山形S-81株感染PK-15細胞から調製した。補体がPrVに対するHI力価を増強させることが知られていることから(29)、反応液に160溶血単位の補体を含む10 μlのモルモット新鮮血清を加えた。37℃で1時間反応させた後、0.3% BALB/cマウス赤血球浮遊液50 μlを加え、さらに25℃で2時間反応させた。HI力価は完全なHIを示した血清の最高希釈倍数の逆数とした。

動物接種試験：BVおよびVV発現gⅢの免疫原性を検討するため、動物の接種試験を行った。gⅢ遺伝子組換えBVの抗原は以下の操作により作成した。組換え体感染SF21AE細胞をPBSに浮遊し、等量のエーテルを添加してよく混和後エーテル層を除去した。この操作を3

回繰り返した後、水層を低速遠心し、沈殿物を免疫原とした。免疫にはフロイントの完全アジュバントを用い、BALB/cマウスの腹腔内に2週間隔で2回接種した。初回免疫から22日目血清を採取し、抗体価測定に供した。対照の抗原はAcNPV感染SF21AE細胞より調製した。

gⅢ遺伝子発現VVについては、gⅢ遺伝子発現VVおよび対照としてVV LC16m0株の $10^7$  PFUをそれぞれ2頭のウサギの背部10ヶ所に皮内接種した。ウイルス接種後0, 3, 7, 14, 21, 28日目に血清を採取し、抗体産生を調べた。また、gⅢ遺伝子発現VVの免疫原性を調べるため、マウスを用いた感染防御試験を行った。各群20匹を使用し、 $10^7$  PFUのgⅢ遺伝子発現VVあるいはVV LC16m0株、または培養液を皮下に接種した。28日目に再び同じ材料で追加免疫を行い、さらに14日目に50 LD<sub>50</sub>( $10^{8.4}$  PFU)のPrV Indiana S株で攻撃した。攻撃後臨床観察を行うとともに、生存したマウスから攻撃後14日目に血清を採材し抗体検査に供した。

gⅢ遺伝子欠損PrVと親ウイルスに対する抗体を比較するため、gⅢ遺伝子欠損PrVと山形S-81株をそれぞれ豚に接種した。2頭の豚に $10^{8.9}$  TCID<sub>50</sub>の山形S-81株を鼻腔内接種し、接種後5週間目に得た血清を親ウイルス免疫血清とした。gⅢ遺伝子欠損PrVに対する免疫血清は、2頭の豚に4週間間隔で $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>を筋肉内接種することにより得た。

gⅢ遺伝子欠損PrVの病原性を検討するため、gⅢ遺伝子欠損PrVと親ウイルスの山形S-81株のマウスに対する病原性を比較した。各ウイルスの10倍階段希釈を作成し、BALB/cマウスの皮下あるいは鼻腔内に接種した。実験には各群5頭のマウスを用いた。ウイルス接種後、毎日臨床観察を行うとともに生死を記録した。

## 成 績

gⅢ遺伝子組換えBVの作出とgⅢタンパク質の発現：gⅢ遺伝子発現BVの候補として数株のポリヒドリン陰性ウイルスを選択した。ポリヒドリン陰性ウイルスをMab MA37を用いたIFAによって調べたところ、すべてのウイルス感染細胞においてgⅢ遺伝子の発現が確認された。その内の1つをAcPRG3と名付け、以下の解析に用いた。moi 0.001 PFUで組換え体のAcPRG3あるいは親株のAcNPVをSF21AE細胞に接種し、抗gⅢMabのMA37を用いたIFAを行った。その結果、固定(図11A)および未固定(図11Bの1,2)AcPRG3感染細胞にgⅢの発現が確認され、発現タンパク質は細胞質のみならず細胞表面にも分布することが明らかとなった。発現タンパク質の性状を決定するため、感染細胞を<sup>3</sup>H]-ロイシンで標識し、細胞タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を実施し、クマシー・ブリリアント・ブル

-(CBB)染色あるいはフルオログラフィー解析を行った。フルオログラフィーではAcPRG3感染細胞にのみ認められる3本のバンド(72 kDa, 67 kDa, 55kDa)が確認され(図12A)、CBB染色ゲルにおいても72 kDaと67 kDaのバンドがスマア状に観察された(図12B)。また、抗gⅢMabのMA37を用いたRIPAでも3本のバンドが検出されたが、それらの分子量はPrV感染PK-15細胞に発現したgⅢよりも低かった(図13)。これらの差異は糖鎖付加の違いによるものと考えられるため、感染細胞を[<sup>3</sup>H]-グルコサミンにより糖鎖標識し、RIPAを行った。その結果、AcPRG3感染細胞では72 kDaと67 kDaのバンドが検出されたが、55 kDaのバンドは検出されなかった(図14A)。また、ツニカマイシンによって糖鎖の付加を抑制すると、72 kDaおよび67 kDaのバンドが消失することが明らかとなった(図14B)。

**gⅢ遺伝子組換えVVの作出とgⅢタンパク質の発現：**pHAP-gⅢプラスミドをVV感染RK-13細胞にトランスフェクトすると、一過性にgⅢを発現し、VV p7.5プロモーターの制御下にpHAP-gⅢプラスミドのgⅢ遺伝子が存在することが示された。同細胞で産生されたウイルスによって形成されたおよそ10<sup>8</sup>ブランクから、HA陰性のVVが10クローン得られた。その内、Mab MA37を用いた黒色ブランク検査によって、gⅢが陽性であったウイルスは3クローンであった。この内の1クローンをrVV-gⅢと名付け、2回のブランク純化後以下の解析を行った。まず、Mab MA37を用いたIFAを行ったところ、CPEを示した細胞領域にgⅢの発現が認められた(図15)。gⅢの発現は固定標本のみならず、未固定標本においても細胞表面に認められた(データ未掲載)。rVV-gⅢによってRK-13細胞に発現したgⅢの分子量は、Mab MA37を用いた免疫沈降法の結果から77 kDaから100 kDa(平均82 kDa)と測定され、PrV感染細胞のgⅢと同じ分子量を示した(図16)。

**gⅢ遺伝子欠損PrVの作出：**PrV DNAとpd1G3プラスミドの相同組換えにより、いくつかの欠損変異株候補が得られた。そのうち、Yd1G3-1、Yd1G3-2と名付けた2クローンを選択し、ブランク純化を3回行った。サザンブロット解析は、両クローンが親ウイルスの4.3 kbpのPstI断片の代わりに、1.6 kbpのXhoI断片を欠落した2.7 kbpのPstI断片を有していることを示した(図17)。Mab MA37を用いたIFAでは、これらの変異株感染PK-15細胞に特異蛍光は認められなかった(データ未掲載)。以上の成績から、Yd1G3-1とYd1G3-2はgⅢ遺伝子を欠失した変異ウイルスであることが確認され、以下の実験にはYd1G3-1を使用した。

gⅢ遺伝子欠損PrVの増殖性：図18にmoi 1.0 PFUでPK-15細胞に感染させたgⅢ遺伝子欠損変異株と親ウイルスの増殖曲線を示した。ブランク法により算定した産生ウイルスは、親ウイルスに比べ、Yd1G3-1は常に低かった。両ウイルスが形成したブランクの大きさに差異は認められなかった。また、親ウイルスは感染PK-15細胞では細胞の円形化を特徴とするCPEを示したが、Yd1G3-1は細胞融合タイプのCPEを発現した(データ未掲載)。

gⅢ遺伝子欠損PrVのHA活性：親ウイルスの山形S-81株とgⅢ遺伝子欠損ウイルスYd1G3-1株について、HA試験を実施した。親ウイルスはBALB/cマウスの赤血球を凝集した。別個に作成した19ストックを用いて決定した感染価とHA価との間には正の相関( $r=0.92, p<0.01$ )が認められ(図19)、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>のウイルスが1単位のHA価に相当した。一方、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>以上のウイルスを検査した場合にも、gⅢ遺伝子欠損変異株Yd1G3-1にHA活性は認められなかった。

マウスに対するgⅢ遺伝子欠損PrVの病原性：マウス接種試験により変異株と親ウイルスの病原性を比較した。高力価のウイルスを接種した場合、いずれの群のマウスも接種後2日目に神経症状を呈し、1から2日後に死亡した(表4)。親ウイルス接種群と変異株接種群との間に臨床症状の差異は認められなかった。しかし、1 LD<sub>50</sub>に必要なウイルス量は両ウイルス間で異なっており、特に皮下接種群でその差が顕著であった。マウスに対する変異株の1 LD<sub>50</sub>は、皮下接種で $10^{2.3}$  PFU以上、鼻腔内接種では $10^{2.5}$  PFUであった。一方、親ウイルスの1 LD<sub>50</sub>は皮下接種で $10^{4.7}$  PFU以上、鼻腔内接種では $10^{2.9}$  PFUであった(表4)。

BV発現gⅢを用いたELISA：抗gⅢ抗体を検出する抗体検査法を確立するため、BV発現gⅢを抗原としたELISAについて検討した。AcPRG3およびAcNPV感染SF21AE細胞の抽出物をそれぞれ陽性、陰性抗原として1:2,500から1:40,000までの希釈を行い、炭酸緩衝液を用いたマイクロプレートに吸着させた。吸着抗原に対し、1:500希釈のMab MA37あるいは1:100希釈のPrV感染豚血清を反応させ、材料と方法に記載した方法でELISAを実施した。Mab MA37とPrV感染豚血清の反応性は類似し、AcPRG3感染SF21AE細胞抽出物の1:5,000希釈でおおよそ1.0 ODを示した(図20)。

マウスに対するBV発現gⅢの抗原性：AcPRG3によって発現したgⅢが抗原性を有するか否

かを検討するため、AcPRG3あるいはAcNPV感染細胞抽出物をマウスに接種した。接種後22日目に血清を採取し、PrV感染PK-15細胞を抗原としたIFAによって抗体の検査を行った。その結果、抗AcNPV感染細胞血清はPrV感染細胞とは全く反応しなかったが、抗AcPRG3感染細胞血清はMab MA37と同等に反応した(図21)。また、抗AcPR3感染細胞血清がPrVに対し中和活性を有するか否かを、補体非依存性および依存性NTによって調べた。その結果、抗AcNPV感染細胞血清では中和活性は全く認められなかったが、抗AcPRG3感染細胞血清は補体非依存性試験で32倍から64倍、補体依存性試験では128倍から256倍の中和抗体価を示した(表5)。

ウサギに対するgIII遺伝子組換えVVの抗原性：親VVあるいはrVV-gIIIを接種したウサギの接種部位に接種後3日目からポックが形成されたが、10日目には消失した。rVV-gIII接種ウサギではELISA抗体とIFA抗体のみならず、NTで検出できる抗gIII抗体が産生された(表6)。PrVに対する中和抗体は接種後14日目に初めて検出され、抗体価は16倍から32倍に達した。中和抗体は補体の存在下でのみ検出された。

マウスに対するVV発現gIIIの免疫原性：ウサギと異なり、rVV-gIII接種マウスの接種部位に局所反応は生じなかった。rVV-gIII接種マウスは抗VV抗体を産生したが、追加免疫を行った後も抗PrV抗体は認められなかった(表7)。追加免疫2週間目に50 LD<sub>50</sub>(10<sup>6.4</sup> PFU/匹)のPrV Indiana S株で攻撃した。rVV-gIIIで免疫した20匹のマウスの内、4匹は致死的な攻撃から防御され、攻撃後14日目にPrVに対するIFA抗体と中和抗体が検出された(表7)。一方、親VV免疫マウスはすべて攻撃後3日以内に死亡した。

ブタに対するgIII遺伝子欠損PrVの免疫原性：親ウイルスあるいはgIII遺伝子欠損変異株YdIG3-1を免疫した豚の血清について、NTとHI試験を行った。同時にgIII特異抗体を検出するため、rVV-gIII感染RK-13細胞を抗原としたIFAを行った。結果を表8に示した。親ウイルス接種豚は中和抗体とHI抗体を産生し、gIII特異抗体も陽性であった。変異株YdIG3-1は、親ウイルスと同様に中和抗体を誘導した。しかし、変異株接種豚の血清からはHI抗体とgIII特異抗体は検出されなかった。

PrV感染豚血清中の抗gIII抗体：PrV感染豚71頭の血清について、rVV-gIIIとPrV感染細胞

抽出物を抗原とするELISAを行った。図22に示したように、抗gⅢ抗体量と抗PrV抗体量との間には正の相関が認められた( $n=71, r=0.98$  ( $p<0.01$ ),  $y=2.08x+0.08$ )。OD値から推定した抗gⅢ抗体の平均比は抗PrV抗体の43.6%と算出され、抗gⅢ抗体がPrV感染豚の血清抗体の主な部分を占めていることが示された。しかし、抗gⅢ抗体量は血清のウイルス中和活性の補体依存性増強の程度とは比例しなかった。

## 考 察

PrVの糖タンパク質gⅢ遺伝子を組み換えたBVおよびVV、同遺伝子欠損変異株を作成し、gⅢの機能解析を行った。

gⅢ遺伝子組換えBVによって発現したgⅢはマウスに抗体を誘導し、抗原性を保持したタンパク質であった。しかし、SDS-PAGEによる解析では、分子量の異なる3種のタンパク質として検出された。最も分子量の低い55 kDaのタンパク質は $[^3\text{H}]$ -グルコサミンで標識されないこと、また感染細胞をツニカマイシンで処理しても分子量に変化が認められないことから、糖鎖が未付加のgⅢ前駆タンパク質と考えられる。gⅢ遺伝子の塩基配列から推定される分子量が50,860 Da(60)である事実も、上記推定を支持する。72 kDaと67 kDaタンパク質は $[^3\text{H}]$ -グルコサミン標識されたこと、またツニカマイシンに感受性であったことから、糖鎖が付加されていることが示された。しかし、PrV感染PK-15細胞で産生される成熟gⅢが77 kDaから100 kDaのスマア状のバンド(平均分子量82 kDa)として検出されることから、両者の間には糖鎖の付加に違いがあると考えられる。Kurodらはインフルエンザウイルスを用いたBVの解析から、昆虫細胞と哺乳動物細胞の糖鎖付加過程の違いが分子量の違いとなって表れると推測している(34)。また、PrV感染哺乳動物細胞では、一般に前駆タンパク質は検出されない。しかし、SF21AE細胞で55 kDaの前駆タンパク質が検出されたことから、昆虫細胞では糖鎖付加の効率自体も低いものと考えられる。gⅢ遺伝子発現BVは多量のgⅢを発現するため、サブユニットワクチンあるいは診断用の抗原として有用と考えられるが、機能解析を行う上では正常な糖鎖を有するgⅢが必要と考えられる。

そこで、著者は哺乳動物細胞で発現可能なgⅢ遺伝子組換えVVの作出を試み、rVV-gⅢの作出に成功した。rVV-gⅢ感染RK-13細胞で発現したgⅢの分子量は、PrV感染RK-13細胞に検出されるgⅢと同じであった(図16)。この結果は、rVV-gⅢによって発現されるgⅢはPrV感染によって発現されるgⅢと同様に糖鎖が付加されることを示唆する。



ついで、rVV-gⅢの免疫学的機能を動物接種試験によって検討した。rVV-gⅢ接種ウサギが抗PrV抗体を産生したことは、rVV-gⅢが感染ウサギの体内で抗原学的に機能を有するgⅢを発現することを示す。また、免疫ウサギの血清は補体を添加した時のみ中和活性が認められた事実は、gⅢは補体依存性中和抗体を誘導することを示すものであろう。一方、rVV-gⅢを皮下接種したマウスは抗PrV抗体を産生しなかった。その理由は明らかではないが、rVV-gⅢが接種マウスに抗PrV抗体を産生させるほど十分に増殖ができなかったことが原因の一つと考えられる。事実、ウサギと異なって、rVV-gⅢ接種マウスの接種部位には局所反応が認められなかった。しかし、興味深いことに、rVV-gⅢで免疫した20匹のマウスの内、4匹はPrVの致死攻撃から防御された。さらに、NTおよびIFAによって攻撃耐過マウスの血清中に抗PrV抗体が検出された。一部のマウスに認められた感染防御機構は不明であるが、液性反応の誘導なしにgⅢに対する細胞性免疫が惹起されたこと、あるいは検出限界以下の抗gⅢ抗体が産生された可能性などが考えられよう。同様な現象は、モルモットとラッサ熱ウイルスの系においても報告されている(48)。ラッサ熱ウイルス組換えVVはモルモットに感染防御免疫を誘導するが、血清から中和抗体が検出されることはない。また、gⅢがPrV感染動物において細胞性免疫の標的タンパク質になることが知られている(82)。

以上の成績はPrVのgⅢが免疫学的に重要なコンポーネントであることが示唆するものであろう。そこで、PrV感染豚血清中の抗gⅢ抗体をrVV-gⅢを利用したELISAによって半定量的に測定した。その結果、抗gⅢ抗体は抗PrV抗体のおよそ半分を占めることが明らかとなり、gⅢはPrVに対する液性免疫においても重要な役割を果たすと考えられる。

このように、PrVのgⅢは免疫学的に重要なタンパク質の一つと考えられるが、gⅢ遺伝子の欠失によってPrVがどのような性状の変化を示すか興味深い。そこで、日本の野外株からgⅢ遺伝子欠損変異ウイルスを作出し、その性状を親ウイルスと比較した。gⅢ遺伝子欠損ウイルスのPK-15細胞における増殖は、親ウイルスに比べて低かった。しかし、この結果は、gⅢがウイルスの細胞吸着に重要な役割を果たすことが報告されていることから(46,66)、感染PK-15細胞におけるウイルス産生量の差というよりも、むしろウイルス力価測定時のウイルス吸着効率の違いを反映するものかも知れない。PFUで示された変異株のウイルス力価は感染性ウイルスの一部に過ぎず、実際はより多量のウイルスを含む可能性がある。

精製gⅢがマウスの赤血球を凝集したことから、糖タンパク質gⅢはPrVのHAに深く関与

っていると考えられている(37)。しかし、gⅢがPrVの唯一のHA成分かどうかは不明である。本研究で作出したgⅢ遺伝子欠損ウイルスは、親ウイルスと異なりHA活性を示さなかった。さらに、欠損変異株を接種したブタは高い中和抗体を産生したにもかかわらず、HI抗体と抗gⅢ抗体を産生しなかった。一方、親ウイルス株は接種豚に中和抗体のみならず、HI抗体と抗gⅢ抗体を誘導した。これらの結果は、gⅢがPrVのHAに関与する唯一の成分であることを示している。変異株からの復帰ウイルスのHA活性の有無、また1.6 kbpの*Khol*断片の欠損が他の遺伝子に及ぼす影響などが未検討のままに残されているが、本研究の結果はgⅢがPrVのHAに関する唯一の成分であることを強く示唆する。同様に、PrVのgⅢのホモログである単純ヘルペスウイルス(HSV)のgC糖タンパク質がHAに深く関わっていることが示された(73)。gⅢがPrVのHAに関する唯一の成分であれば、HI試験をgⅢ特異抗体の検出に応用できる可能性がある。しかし、今回行ったHI試験は複雑であるばかりでなく、検出感度にも問題がある。Inabaraは反応液に補体を添加すると、PrVに対するHI抗体価が上昇することを報告した(29)。HI試験における補体の役割は不明であるが、補体によるHI抗体価の増強は、gⅢのホモログであるHSVのgCが補体C3bに結合できるという事実(27)と関係があるのかもしれない。gⅢに特異的な抗体を検出するためのHI試験の開発には、抗体、gⅢ、補体、赤血球などHI反応に関与する各因子の相互作用を検討することが必要であろう。

PrVのgⅢと病原性との関係を詳細に検討した報告は少ない。Mettenleiterらはブタとニワトリを用い、gⅢ遺伝子のみ欠損では病原性に明らかな変化は認められないが、gⅢとgⅠの両遺伝子を欠損させた変異ウイルスは親ウイルスに比べ病原性が著しく減弱したことを述べている(45)。一方、本研究で作出したgⅢ遺伝子欠損変異株のマウスに対する病原性は、親ウイルスに比べ強くなったように見える。しかし、上述したように、欠損変異株のウイルス液にはウイルス感染価よりも多くのウイルスが含まれていることが示唆されたことから、実験で観察されたYdIG3の高い病原性は見かけ上のことである可能性がある。また、実験的な事実はないが、gⅢが初期の防御機構を誘導することあるいは感染動物の非特異的防御機構の標的になっている可能性も考慮する必要がある。いずれにしても、gⅢ遺伝子単独の欠損では、PrVの病原性は減少しないと思われる。gⅢは細胞への吸着などウイルスの感染過程で重要な役割を果たしていると考えられており、gⅢ遺伝子欠損ウイルスの病原性が減じなかったことは興味深い。細胞-細胞間感染が容易に起こると言うヘルペスウイルスの特性が、gⅢ遺伝子欠損ウイルスの細胞間伝達を可能にしていると考

えられる。親ウイルスと変異株によって形成されるブランクの大きさに差がなかったという事実(データ未掲載)は、細胞-細胞間感染が親PrVと変異株では同じ程度で起こっていることを示唆する。

## 要 約

PrVの糖タンパク質gIII遺伝子を組み換えたBVとVV、また同遺伝子欠損ウイルスを作出した。組換えBVのgIII遺伝子はポリヒドリン遺伝子プロモーター制御下でポリヒドリン遺伝子領域に、組換えVVのgIII遺伝子はp7.5初期-後期プロモーター制御下でHA遺伝子領域に挿入した。組換えVV感染哺乳動物細胞ではPrV感染によって発現するgIIIと同様の糖鎖の付加が起こったが、組換えBV感染昆虫細胞では糖鎖の付加が不十分であった。しかし、組換えBV感染細胞抽出液のマウスへの腹腔内接種、また組換えVVのウサギへの皮内接種によってPrVを中和する抗gIII抗体が産生され、組換えBVとVVは抗原的に機能を持ったgIIIを発現することが示された。組換えVVのマウスへの皮下接種では抗gIII抗体は産生されなかったが、接種マウス20匹の内4匹はPrVの致死攻撃に対して防御効果を示した。生存マウスは抗PrV抗体を産生した。親ウイルスはマウスの赤血球を凝集したが、gIII遺伝子欠損ウイルスに凝集活性は認められなかった。また、親ウイルス接種豚は中和抗体ばかりでなくHI抗体と抗gIII抗体を産生したが、gIII遺伝子欠損ウイルス接種豚は中和抗体は産生したもののHI抗体と抗gIII抗体は産生しなかった。gIII遺伝子を欠損することにより、PrVのマウスに対する病原性は減弱しなかった。発現gIIIをELISAの抗原として用いると、gIIIに特異的な抗体の検出が可能であった。野外ウイルス感染豚の血清を抗gIII抗体を特異的に検出するELISAで検査したところ、血清中の抗体の約50%が抗gIII抗体であった。以上のことから、PrVの糖タンパク質gIIIは免疫学的に重要なタンパク質であること、HA活性を有する唯一のタンパク質であること、gIII遺伝子単独では病原性の発現に関与しないことが明らかとなった。

## 第4章 前初期制御タンパク質IE180遺伝子の解析

### 序 論

オーエスキー病ウイルス(PrV)のIE180遺伝子のDNA塩基配列は2株について決定され(10, 76)、IE180が単純ヘルペスウイルス(HSV)のICP4(41)や水痘帯状疱疹ウイルスのp140(13)など他のヘルペスウイルスの前初期(IE)遺伝子と高い相同性を有することが明らかにされた。PrVのIE遺伝子はIE180遺伝子のみであるが、他のヘルペスウイルスは複数のIE遺伝子を有している。HSVにはICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47の5種のIE遺伝子が存在し、それらは感染細胞中で協調的に発現される(22)。ICP4とICP27の2種は増殖に必須であるが(17, 63)、残りの3種は必ずしも増殖に必要としない(18, 39, 56, 71)。IE180ホモログのHSV ICP4は初期遺伝子群や後期遺伝子群を活性化するが、自己の遺伝子や他のIE遺伝子の転写を抑制することが知られている(50, 51)。IE遺伝子は感染直後に転写され、その産物は他のウイルス遺伝子の活性化を制御することから、ヘルペスウイルスの複製や感染機構の解明にはIE遺伝子の機能を明らかにすることが必要である。PrVのIE遺伝子はIE180遺伝子以外知られていないため、PrVには他のヘルペスウイルスよりもIE遺伝子やそれら産物の機能解析を単純化できる利点がある。

IE遺伝子の機能を解析には、IE遺伝子欠損変異株の作出が有用と期待される。HSVでは、IE遺伝子に対する温度感受性変異株が数多く分離され、それらの性状が調べられてきた(12, 15, 17, 69)。また、温度感受性変異株の相補試験を用いIE遺伝子を機能的に発現する細胞を作出し、同細胞を利用してIE遺伝子欠損変異株が構築された(16, 40, 67)。Ben-PoratらはPrVのIE180遺伝子に変異を有する温度感受性変異株(tsG1)を分離した(5)。しかし、PrVのIE遺伝子欠損変異株の作出に関する報告はない。

本章ではPrVのIE180遺伝子欠損変異株を作出し、制御タンパク質IE180の機能解析を行った。IE180はウイルス増殖に必須と考えられるため、最初にIE180遺伝子発現細胞を作出した。ついで、同細胞を利用してIE180遺伝子欠損PrVを作出した。また、IE180遺伝子のコード領域に指示遺伝子として大腸菌のlacZ遺伝子のコード領域を挿入したPrV変異株を作出し、IE180遺伝子のプロモーター活性を調べた。さらに、IE180遺伝子をバキュロウイルス(BV)のポリヒドリン遺伝子領域に組み込んだ発現系を構築し、IE180の大量発現とそ

の機能解析を試みた。

#### 材料と方法

**ウイルスと細胞：**IE180発現細胞とIE180遺伝子欠損PrVの作出には、ブタ腎臓由来PK-15細胞とサル腎臓由来Vero細胞を用いた。細胞は5% 牛胎児血清(FCS)添加ダルベッコ変法イーグル最小必須培地(DMEM)で維持培養した。IE180遺伝子欠損PrV作出の親ウイルスには、Indiana S株を用いた。IE180遺伝子発現細胞の選択には、IE180遺伝子の温度感受性変異株tsG1株(3,5,28)を用いた。同変異株はBen-Porat博士より分与を受けた。Indiana S株とtsG1株はそれぞれ37℃と32℃で、PK-15細胞あるいはVero細胞で培養した。一方、IE180遺伝子発現のためのBVには第3章で用いた*Autographa californica*核多角体ウイルス(AcNPV)を用いた。BVの増殖と組換え体の解析には*Spodoptera frugiperda*卵巣細胞由来のIPLB-SF-21AE(SF21AE)昆虫細胞を用い、細胞の維持培養は10% 牛胎児血清(FCS)添加のTC100培地を使用し28℃で行った。

**PrV DNAの調製：**IE180遺伝子欠損ウイルスの作出に必要なPrVのDNAとサザンプロット解析に用いたDNAは、第3章と同様に精製ウイルスよりヨウ化ナトリウム密度勾配を利用して超遠心によって分離調製した。PrVの制限酵素解析には第1章同様にPrV感染細胞から抽出した細胞DNAを用いた。

**BV DNAの調製：**IE180遺伝子組換えBVの作出に必要なAcNPVのDNAは、第3章と同様に精製AcNPVより塩化セシウム密度勾配を利用して超遠心によって分離調製した。

**プラスミド：**pIEプラスミドはPrV DNAの*Sa*II消化の15 kbp断片をプラスミドベクターにクローニングしたもの(28,75)で、Ben-Porat博士より分与された。挿入断片はIE180遺伝子の全領域を含み、tsG1株の非許容温度における増殖を介助することができる。pMAMneoプラスミドは、SV40の初期プロモーターの制御下にある大腸菌のネオマイシン耐性遺伝子とマウス乳腺腫ウイルスならびにラウス肉腫ウイルスのLTR(long terminal repeat)を有しており、Clontech社より購入した。pSV2neoプラスミドは、ネオマイシン耐性細胞の選択マーカーに用いた(70)。pCHI10プラスミドは大腸菌のlacZ遺伝子の供給源として用い、

Pharmacia社から購入した。pIEの挿入断片とハイブリダイズするIndiana S株DNAのBamHI断片5,8,8'をpUC18にクローニングし、それぞれpPrB5, pPrB8, pPrB8'と命名し、IE180の機能解析の実験系を開発するために用いた。pPrB8はIE180遺伝子の読み取り枠(ORF)を含んでおり、2つのNcoI消化部位を有している。BamHI消化部位に近いほうのNcoI消化部位はIE180のORFの開始コドンATGを含んでいる(9)。IE180のORFを有するpIENBプラスミドは、pPrB8からさらに213 bpのNcoI-BamHI配列を除いて構築した(図23A)。pIENBからBamHI消化によりIE180のORFを切り出した後、DNAポリメラーゼのKlenow断片を用いて末端を平滑化し、pMAMneoの平滑化したXhoI消化部位に挿入してpRMIE180neoを構築した(図23B)。pdI88プラスミドは、IE180のプロモーター配列(8)としてpPrB5プラスミドの0.8 kbp HindIII-BamHI断片とpPrB8'プラスミドの1.4 kbp BamHI-DraI配列とをpUC19のBamHIとSmaIの消化部位に挿入して構築した(図23A)。pIEpGalAプラスミドは、pdI88のBamHI消化部位にpCH110から分離したlacZのORFを挿入することによって構築した(図23C)。組換えBV作成用のトランスファーベクターには、ポリヒドリンプロモーターの制御下で外来遺伝子が発現するpAcYM1プラスミドを用いた(38)。pAcPIE180プラスミドは、pAcYM1のBamHI消化部位にpIENBのIE180 ORFを挿入して構築した(図24)。

**PrV特異抗体：** 相補試験におけるウイルス増殖の確認には第2章で作出した抗gIIIモノクローナル抗体(MAb)のMA37を用いた。抗IE180ペプチド抗体は、塩基配列から推定されるIE180のアミノ酸配列(10,76)の第49番目から第68番目までのペプチドを合成し、ウサギに免疫し作成した。

**IE180発現細胞の作成：** IE180を発現するPK-15細胞は、CellPfectトランスフェクトキット(Pharmacia社)を用い、pIEとpSV2neoを同時にトランスフェクションすることにより作出した。2.5  $\mu$ gのpIEと0.5  $\mu$ gのpSV2neoのリン酸カルシウム共沈殿物を60 mmのシャーレに培養したPK-15細胞に滴下した。37  $^{\circ}$ Cで6時間培養した後、細胞に25%のジメチルスルフォキシド(DMSO)でショックを与え、さらに2日間培養した。ついで、細胞をトリプシンで消化し、1穴当たり5,000個の細胞数になるように24穴プレートに播き込んだ。細胞がプレートに付着した後、培養液を400  $\mu$ g/mlの合成抗生物質G418(ジェネティシン;GIBCO Laboratories社)を含んだ新しい培養液に交換し、ネオマイシン耐性細胞を選択した。2週間後、各々の培養を3分割し、内2つは非許容温度である41 $^{\circ}$ CでのtsG1株の増殖能を調べる

ために用いた。最もtsG1株を相補する活性の高かった細胞を限界希釈によりクローニングし、G418を含まない培養液で増殖させた。pRMIE180neoをトランスフェクトしたPK-15細胞とVero細胞についても、同様な方法でIE180発現細胞を選別した。

IE180欠損PrVの作出：IE180遺伝子のコード領域にlacZ遺伝子を挿入したIE180欠損変異株は、PrV DNAとpIEPgalaプラスミドとの相同組換えによって作出した。0.5  $\mu$ gのPrV DNAとHindIIIで線状化した2.5  $\mu$ gのpIEPgalaをCellPfectトランスフェクトキットを用い、90 mmのシャーレに培養したIE180発現PK-15細胞に同時にトランスフェクトした。lacZ遺伝子はIE180遺伝子欠損変異株の選択マーカーとして用いた。37°Cで6時間培養した後、細胞に25% DMSOでショックを与え、0.6% アガロースを含む培養液を重層し、再び37°Cで培養した。2から3日後、細胞にさらに200  $\mu$ g/mlのX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; 和光純薬社)を含む0.6% アガロース培養液を重層し、再び37°Cで6から24時間培養した。ついで、青変したブラックからウイルスを回収し、PK-15細胞とIE180発現PK-15細胞における増殖能を調べた。IE180発現細胞においてのみ増殖したウイルスをIE欠損変異株の候補とし、ウイルスDNAの制限酵素(RE)解析によりIE180遺伝子とlacZ遺伝子の置換を確認した。さらに、欠損挿入変異株からlacZ遺伝子を除去するため、変異株のDNAとプラスミドpdIB8を同様な方法でIE180発現細胞に同時にトランスフェクトした。細胞にX-Galを含む0.6% アガロース培養液を重層し、37°Cで6から24時間培養した。青変しない白色のブラックからウイルスを回収し、ブラック純化を行った。ウイルスDNAのRE解析によって、欠損変異ウイルスであることを確認した。

サザンブロット解析：プラスミド、ウイルスDNA、細胞DNAはBamHI、KpnIあるいはNcoIで切断後、アガロース電気泳動によって分画し、GeneScreen Plusナイロンフィルター(DuPont/NEN Research Products社)にトランスファーした。フィルターは紫外線照射により固定し、Sambrookらのマニュアル(64)に従って適当なプローブとハイブリダイズした。

固定細胞における $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -gal)の検出：IE180遺伝子欠損変異株を接種した細胞について、Sanesらの方法(65)によってlacZ遺伝子の発現を組織化学的に調べた。細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で2回洗浄し、2% フォルムアルデヒドと0.2% グルタルアルデヒドを加えたPBS溶液によって室温で5分間固定した。固定細胞をPBSで洗浄し、5 mM

フェリシアン化カリウム, 5 mM フェロシアン化カリウム, 2 mM 塩化マグネシウム, 1 mg/ml X-Galからなる染色用PBSで, 37°Cで1時間から24時間反応させた。青変した細胞をlacZ遺伝子発現陽性細胞とした。

**$\beta$ -gal活性の測定:** IE180遺伝子プロモーターの活性を測定するため, 変異株感染細胞で発現した $\beta$ -galの量をMillerの方法(47)に準じて定量した。35 mmのシャーレに培養した細胞にlacZ遺伝子を発現する変異株を多重感染度(moi)0.1ブランク形成単位(PFU)で接種し, 経時的に $\beta$ -galの活性を測定した。細胞をPBSで2回洗浄し, 1 mlのPBSを加えてラバーポリスマンを用い浮遊液とした後, 1.5 mlのエッペンドルフチューブに移した。7,000 rpmで2分間遠心し, ベレットを100  $\mu$ lのPBSで浮遊させ, 凍結融解を3回繰り返した。15,000 rpmで5分間遠心し, 上清 3  $\mu$ lを4.5 M  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む0.1 M 塩化マグネシウム溶液 3  $\mu$ l, 0.1 M リン酸ナトリウム(pH 7.5) 228  $\mu$ l, o-ニトロフェニール  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(Sigma社)溶液(4 mg/ml) 66  $\mu$ lからなる反応液と混合した。37°Cで30分間反応した後, 1 M 炭酸ナトリウム溶液を500  $\mu$ l添加することにより, 反応を停止した。反応液は分光光度計を用い420 nmの波長でOD値を測定した。 $\beta$ -gal活性は反応によって産生されるo-ニトロフェニール量に基づき精製 $\beta$ -gal (和光純薬社)の標準曲線から求めた。420 nmのOD値 0.0045をo-ニトロフェニール 1  $\mu$ mol/ml当量とした。

**IE180遺伝子発現BVの作出:** IE180遺伝子発現BVの作出は, AcNPV DNAとpAcPIE180プラスミドとの相同組換えによって行った。Lipofectinトランスフェクトキット(Bethesda Research Laboratories社)を用い, 35 mmのシャーレに培養したSF21AE細胞に10 ngのAcNPV DNAと1.0  $\mu$ gのpAcPIE180プラスミドを同時にトランスフェクトした。28°Cで3日間培養後, 産生ウイルスを回収した。透明ブランクを形成したポリヒドリン陰性ウイルスをIE180発現BVの候補とし, ブランク純化を3回行った。ついで, 感染細胞のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)解析を行い, IE180の発現が確認できたウイルスを選抜した。

**免疫ブロット解析:** 免疫ブロット解析には, ECL Westernブロッティングキット(Amersham社)を用いた。細胞を0.1% SDS溶液によって可溶化し, 4%から20%のグラディエ



ントゲルを用いたSDS-PAGEによりタンパク質を分画した。分画タンパク質をセミドライブロッティング装置を用いてゲルからイモビロントランスファー膜(Millipore社)に転写し、キットに添付されたマニュアルに従って反応を行った。

**異種間細胞融合：**昆虫細胞で発現したIE180の機能を検討するため、異種間細胞融合法を開発した。SF21AE細胞にIE180遺伝子発現BVをmoi 5.0 PFUで接種し、28℃で20時間培養後、ラバーポリスマンによって細胞を剥がしPBSで2回洗浄した。一方、Vero細胞にIE180遺伝子欠損PrVをmoi 5.0 PFUで接種し、37℃で1時間培養後、トリプシン消化で細胞を回収しPBSで2回洗浄した。洗浄したIE180遺伝子発現BV感染SF21AE細胞( $4.0 \times 10^8$ )とIE180遺伝子欠損PrV感染Vero細胞( $2.0 \times 10^8$ )を混和し、FCS未添加DMEMで洗浄した。ついで、混合細胞に50% ポリエチレングリコール4000を2 mlを添加し、2分間穏やかに融合を行った。融合細胞をFCS未添加DMEMで3回洗浄し、10 mlの10% FCS添加DMEMを加えた。37℃で16時間培養した後、培養液を回収し、増殖したウイルスの力価をVero細胞とIE180遺伝子発現Vero細胞を用い測定した。細胞はPrV抗原を検出するため、MAb MA37を用いた免疫蛍光抗体法(IFA)に供した。

## 成 績

**41℃におけるtsG1株とIndiana S株の増殖：**温度感受性変異株tsG1株を指示ウイルスとしてIE180遺伝子発現細胞を作出するためには、親細胞株にはtsG1株の非許容温度において野生株のIndiana S株の増殖を支持するがtsG1株の増殖を支持しない細胞が適している。そこで、PK-15細胞とVero細胞の41℃と32℃における両ウイルス株に対する感受性を調べた。その結果、どちらの細胞も41℃の非許容温度ではtsG1株の増殖を許さなかった。また、PK-15細胞は41℃でIndiana S株の増殖を支持したが、Vero細胞は41℃でtsG1株のみならずIndiana S株の複製も許さなかった(データ未掲載)。したがって、tsG1株を用いたIE180遺伝子発現細胞の作出には、PK-15細胞を親細胞として用いることが適当と考えられた。

**pIEとpSV2neoによるIE180発現細胞の作出：**IE180遺伝子欠損PrVを作出し増殖させるためには、IE180遺伝子を発現する細胞が必要である。そこで、pIEプラスミドとpSV2neoプラスミド、親細胞としてPK-15細胞を用い、IE180発現細胞の作出を試みた。G418耐性細胞

13クローンのうち、41°Cの非許容温度でtsG1株の増殖を最もよく相補するクローンを選別し、P180細胞と名付けた。P180細胞は非許容温度の41°Cにおいても、32°Cと同様にtsG1株の増殖を支持した(図25)。このことはP180細胞がtsG1株を相補するに十分な機能的IE180を産生していることを示している。P180細胞にIE180遺伝子が何分子組み込まれたかを調べるため、PrV *Bam*HI 8断片から調製した1.8 kbの*Nco*I断片をプローブとして細胞DNAのサザンプロット解析を行った。その結果、P180細胞は*Bam*HI 8断片当量としておよそ3コピーを含んでいた(データ未掲載)。

IE180遺伝子欠損PrVの予備作出：IE180遺伝子の代わりにlacZ遺伝子をもった欠損-挿入変異株を作出するため、PrV DNAと*Hind*III消化によって線形化したpIEpGalAプラスミドをP180細胞と同時にトランスフェクトした。独立した1,000個の青変ブラックから得たクローンについて、P180細胞とPK-15細胞における増殖性を調べた。その結果、AY64と名付けた1クローンのみがPK-15細胞で増殖できず、IE180遺伝子の欠損変異株であることが示唆された。しかし、P180細胞を用いて、AY64の高力価で純粋なストックを産生することは困難であった。60 mmのシャーレに培養したP180細胞に $10^4$  PFU(低moi)のAY64を感染させた場合、増殖した変異ウイルスの最も高い感染力価は $10^5$  PFU/mlに過ぎなかった。一方、 $10^8$  PFU(高moi)のAY64をP180細胞に接種した場合、親細胞であるPK-15細胞でも増殖可能なウイルスを生じ、その力価は $10^7$  PFU/mlに達した(図26)。このことはP180細胞で増殖したAY64ストックは、少なくとも $10^{-8}$ の頻度で野外株様のウイルスを含んでいることを示している。そこで、野外株様ウイルスを含まない純粋かつ高力価のAY64ストックを得ることを目的に、AY64を指示ウイルスとして新しいIE180遺伝子発現細胞の作出を試みた。

pRMIE180neoによるIE180発現細胞の作出：PK-15細胞とVero細胞にpRMIE180neoプラスミドをトランスフェクトし、G418によってネオマイシン耐性細胞を選択した。ついで、PK-15細胞とVero細胞から各々選択した96のG418耐性細胞にAY64を低moiで接種し、ウイルス産生を調べた。その結果、細胞によって相補の程度に差が見られたが、すべてのG418耐性細胞がAY64の増殖を支持し、感染細胞にはlacZ遺伝子の発現が認められた。AY64の増殖を最もよく支持した細胞を選択し、PK-15細胞由来のものをPIA3細胞、Vero細胞由来のものをV4V細胞と名付けた。これらの細胞DNAのサザンプロット解析の結果から、IE180遺伝子はPIA3細胞には1コピーが、V4V細胞にはおよそ3コピーが組み込まれていることが明ら

かになった(図27)。V4V細胞とPIA3細胞で増殖させたAY64の感染力値はP180細胞で増殖させた場合よりも高く、それぞれ約 $10^8$ と $10^9$  PFU/mlであった。また、V4V細胞とPIA3細胞で増殖させたウイルスストックには、親細胞で増殖できるような野外株様ウイルスは含まれていなかった。

V4V細胞は安定であったが、PIA3細胞は時に増殖性が劣化し、シャーレから割られる細胞がみられた。増殖性の悪くなったPIA3細胞の電子顕微鏡観察では、細胞表面に多数のレトロウイルス様粒子がみられた(データ未掲載)。V4V細胞はPIA3細胞より安定で、高力値のウイルスを産生したことから、以下の実験にはV4V細胞を用いた。

V4V細胞を用いたIE180遺伝子欠損PrVの作出：親ウイルスのDNAとHindIII消化により線形化したpIEgalIプラスミドをV4V細胞に同時にトランスフェクトした。その結果、約500ブラックが形成され、その内の20ブラックが青変した。他よりも青変度の強い2つのブラックからウイルスを回収し、V4V細胞でブラック純化したものをAY321-22とAY321-33と名付けた。両ウイルスともV4V細胞ではよく増殖したが、親細胞のVero細胞では増殖しなかった。AY321-22とAY321-33がIE180遺伝子の欠損-挿入変異株であることを確認するため、両ウイルスから精製したDNAのRE解析とサザンプロット解析を行った。その結果、両変異株ともIE180遺伝子を含むBamHI 8断片の両コピーが欠損し、かわりに3.8 kbpのlacZ遺伝子を有していた(図28)。AY321-22とAY321-33のDNA切断型は基本的には同じであったが、AY321-33にはBamHI 5断片の長さに変化がみられた。両変異株ともV4V細胞での継代に対し安定しており、青変ブラック形成能に変化は認められなかった(図29)。また、RE解析でもlacZ遺伝子に継代による変化は認められなかった。

ついで、lacZ遺伝子を欠損したIE180欠損変異株を作出するため、V4V細胞にAY64の精製DNAとpd1B8プラスミドを同時にトランスフェクトし、X-Galで染色した後、白色ブラックを選択した。白色ブラックの出現頻度は約2%であった。感染細胞から抽出した細胞DNAのRE解析は、AY64のゲノムから3.8 kbpのlacZ遺伝子のみが除去された構造を示し(データ未掲載)、白色ブラックからの分離ウイルスが期待通りのゲノム構造を有していることが確認された。白色ブラックからの1分離株をAY1030と名付け、以下の実験に用いた。

IE180遺伝子欠損PrVの性状：AY64, AY1030あるいはその親ウイルスのIndiana S株をそれぞれVero細胞とV4V細胞にmoi 0.01 PFUで感染させた。細胞相と液相のウイルスサンブ

ルを感染後72時間まで経時的に回収し、V4V細胞を用いてウイルス力価を測定した。その結果、Vero細胞では欠損変異株の増殖は見られなかった。V4V細胞では、欠損変異株の産生ウイルスは感染後7時間目の細胞相に初めて検出され、力価は徐々に上昇し感染後48時間目に $10^{6.5}$  PFU/mlの最高力価に達した(図30)。液相のウイルスの産生は細胞相に比べて遅れたが、得られた最高力価にはほとんど差がなかった。V4V細胞におけるAY1030とIndiana S株の増殖曲線はAY64の増殖曲線と類似していた。

AY64によって細胞内に導入したIE180遺伝子プロモーターが機能を調べるため、AY64を接種したVero細胞とV4V細胞における $\beta$ -galの発現量を経時的に調べた(図31)。その結果、AY64はVero細胞において増殖しないにもかかわらず、感染直後から $\beta$ -galを産生し、その産生量は感染後24時間まで徐々に増加した。V4V細胞における $\beta$ -galの発現はウイルス増殖よりも先行し、感染後6時間で最高レベルに達した。AY1030を接種したVero細胞とV4V細胞では、 $\beta$ -galの活性は認められなかった。

**IE180遺伝子組換えBVの作出：**IE180遺伝子組換えBVを作出するため、AcNPV DNAとpAcIE180プラスミドをLipofectinによってSF21AE細胞に導入した。透明ブラーク選抜により産生ウイルスからポリヒドリン未発現ウイルスを選択した。その内の1クローンをrAcIE180と名付け、感染細胞のSDS-PAGE解析によりIE180の発現を調べた。rAcIE180が感染したSF21AE細胞ではポリヒドリンは産生されず、代わりに細胞質内に多量の180 kDaタンパク質が認められたことから(図32)、rAcIE180はIE180遺伝子発現BVと考えられた。

**IE180遺伝子組換えBVの性状：**rAcIE180感染SF21AE細胞で産生されたIE180がPrV感染PK-15細胞で産生されるIE180と免疫学的に同じか否かを調べるため、抗IE180ペプチド抗体を用いた免疫プロット解析とIFAを行った。免疫プロット解析では、抗IE180ペプチド抗体は、PrV感染PK-15細胞で発現した180 kDaタンパク質と同様に、rAcIE180感染により発現した180 kDaタンパク質と特異的に反応した(図33)。IFAでは、抗IE180ペプチド抗体はPrV感染PK-15細胞とrAcIE180感染SF21AE細胞の双方に特異的に反応したが、抗原の細胞内分布に相違が観察された。PrV感染細胞で産生されるIE180が核内に局在しているのに対し、rAcIE180感染細胞で産生されるIE180は主として細胞質に認められた(図34)。

**BV産生IE180によるIE180遺伝子欠損PrVの増殖相補試験：**IE180発現BVによって発現する

IE180タンパク質の機能を検討するため、IE180遺伝子欠損ウイルスAY64の増殖相補試験を行った。PrVは昆虫細胞に感染せず、またBVは哺乳動物細胞に感染しない。したがって、rAcIE180感染SF21AE細胞におけるAY64の増殖試験、またAY64感染哺乳動物細胞におけるrAcIE180の感染試験は不可能である。そこで、rAcIE180によって昆虫細胞内で産生されたIE180をAY64感染哺乳動物細胞に導入するため、ポリエチレングリコールによる細胞融合を行った。その結果、AY64感染Vero細胞とrAcIE180感染SF21AE細胞との融合細胞では、V4V細胞のみで増殖するウイルスが1 mlあたり $10^{4.8}$  PFU検出された(表9)。一方、AY64感染Vero細胞とAcNPV感染SF21AE細胞との融合細胞では、V4V細胞およびVero細胞で増殖できるウイルスは産生されなかった。また、融合操作の適否を確認するため、融合細胞の $\beta$ -gal活性とPrVの後期タンパク質であるgIIIの発現をIFAによって調べた。その結果、融合細胞には $\beta$ -gal活性とgIIIの発現が一致して認められ(図35)、細胞融合に問題のないことが示された。

#### 考 察

HSVのIE遺伝子発現細胞の作出に使われた方法(16)に準じ、温度感受性変異ウイルスtsG1株を用いIE180遺伝子発現細胞の作出を行った。tsG1株はウサギ腎臓細胞において41°Cの非許容温度に感受性を有することが示されている(28)。そこで、まず非許容温度でのPK-15細胞とVero細胞におけるtsG1株と野外ウイルスの増殖性を調べた。PK-15細胞では、41°Cに対する両ウイルスの感受性は明らかに異なっていた。しかし、Vero細胞では、両ウイルスとも41°Cで増殖しなかった。そこで、IE180遺伝子発現細胞を作出するための親細胞としてPK-15細胞を選んだ。pSV2neoプラスミドとIE180遺伝子を含むpIEプラスミドの両方を有するPK-15トランスフォーマントは、41°Cの非許容温度でtsG1株の増殖を相補した。そのうち最も強い相補活性を示したP180細胞を用い、IE180遺伝子欠損変異株の作出を行った。野外株のDNAとpIEPgalaプラスミドとを同時にトランスフェクトしたP180細胞からAY64と名付けたIE180遺伝子欠損変異株が得られたが、変異株のウイルスストックの力価は低く、また常に少なくとも $10^{-8}$ の頻度で野外株様のウイルスを含んでいた。HSVの場合、IE欠損変異株のウイルスストック中の野外株様ウイルスの出現は、変異株の作出に使用したトランスフォーマントに組み込まれたIE遺伝子に複製開始点が含まれることに依存する(16)。DeLucaらによる研究では、複製開始点を含むICP4遺伝子の長い領域を導入したVero

細胞をIE欠損変異株の作出に用いた場合、野外株様ウイルスが1から5%の高い頻度で出現した(16)。一方、複製開始点を含まないICP4遺伝子を有するトランスフォーマントでは、野外株様ウイルスはほとんど生ぜず、純粋な変異株を得ている(16)。本実験では、IE180発現PK-15細胞を作出するためにpIEプラスミドを用いたが、そのインサートであるPrV DNAのS<sub>α</sub>I消化15 kbp断片(28,75)には複製開始点のコンセンサス配列(5'-CGTTCGCAC-3') (2,31)は含まれていない。しかし、HSVの場合とは異なり、P180細胞ではAY64の高力価で純粋なストックは得られなかった。その理由の一つとして、pIEプラスミドに含まれるIE180遺伝子の自己制御配列などのIE180遺伝子以外の配列、あるいは細胞に組み込まれたIE180遺伝子と変異株のゲノムとの間の長い相同配列の影響が考えられる。また、IE180の過剰発現は細胞の高分子合成を抑制することが報告されていることから(28)、P180細胞におけるAY64の増殖が低かったのはP180細胞が過度のIE180を発現していることに起因するかもしれない。しかし、tsG1株は非許容温度でさえもP180細胞でよく増殖するという事実から、その可能性は少ないと考えられる。

P180細胞でAY64の純粋で高力価のストックが産生できなかったことから、ラウス肉腫ウイルスとマウス乳腺腫ウイルスのLTRの制御下で働き、共通配列を含まないIE180遺伝子を有するpRMIE180neoを構築した。pRMIE180neoプラスミドを導入したPK-15細胞とVero細胞から選抜したPIA3細胞とV4V細胞は、AY64の増殖をよく相補した。PIA3細胞とV4V細胞における変異株の増殖の様子は野外株と同様であった。このことはこれらの細胞が、ウイルスの増殖に適当な量のIE180を発現し、ウイルスの増殖を抑制するほど過剰産生しないことを示唆する。これらの細胞で増殖させたAY64の感染価は、PIA3細胞でおよそ10<sup>8</sup> PFU/ml、V4V細胞でおよそ10<sup>8</sup> PFU/mlに達した。また、これらのウイルスは親細胞にブランクを形成せず、野外株様のウイルスを含まないものと考えられる。

IE180遺伝子発現細胞の内V4V細胞は安定であったが、PIA3細胞は実験期間中時折活力が低下した。このようなPIA3細胞の電子顕微鏡観察では、細胞表面に多数のレトロウイルス様粒子が存在することが示された。豚由来細胞には内在性レトロウイルスが感染していることから(35)、PIA3細胞で発現したIE180が親細胞のPK-15細胞に内在するレトロウイルス遺伝子をトランスに活性化した可能性が示唆される。PIA3細胞の活力の低下は、内在性レトロウイルスの活性化に起因することが考えられる。HSVのICP4遺伝子とICP0遺伝子の両方を培養細胞に導入すると、レトロウイルス様粒子の産生が増強されることが報告されており(53)、上記の考えを支持する。以上のことから、以後の実験にはレトロウイルス様粒

子が観察されないVero細胞由来のV4V細胞を用いることにした。V4V細胞は欠損変異株AY64の増殖を相補するが、最初にIE180遺伝子欠損変異株の作出に用いたP180細胞で見られたように作出時に野外株様ウィルスの増殖がともなう可能性がある。そこで、V4V細胞を用い再びIE180遺伝子欠損変異株の作出を行ったところ、高頻度で純粋な欠損変異株を得ることができた。これはV4V細胞が十分な量の機能的なIE180を産生する証拠であり、P180で生じたような問題は起こらないことを示している。

本研究で作出したIE180遺伝子欠損変異株は、PrVの感染と複製機構におけるIE遺伝子の機能解析に有用と考えられる。特に変異株は潜伏感染関連転写物のコード領域(11,57)と重複しているIE180遺伝子を欠落していることから、ヘルペスウイルス感染の最も重要な課題である潜伏感染の成立機構と関連因子解明の有用な実験材料として期待される。

多量のIE180を発現する系として、BVを用いたrAcIE180を構築した。rAcIE180は、昆虫細胞に分子量180 kDaのタンパク質を産生した。このタンパク質は抗IE180ペプチド抗体と特異的に反応したことから、PrVのIE180と同じと考えられる。しかし、その機能については不明であった。そこで、rAcIE180によって昆虫細胞に発現したIE180の機能を検討するため、細胞融合により昆虫細胞のIE180を哺乳動物細胞に導入するという新しい実験手法を開発した。その結果、AY64感染Vero細胞とrAcIE180感染SF21AE細胞を融合すると、AY64の感染性ウイルスが産生されることが明らかとなった。この事実は、rAcIE180によって発現するIE180がIE180遺伝子欠損ウイルスの増殖を相補する機能を有することを示すものであろう。外来遺伝子発現系としてのBVの最大の利点は、その発現量の多いことである。rAcIE180も多量のIE180を発現するものと期待され、IE180の構造や生化学的性状の解析、また抗体作作用の抗原として有用と考えられる。

IE180欠損変異株AY64はIE180遺伝子プロモーターは温存し、その活性化のマーカー遺伝子としてlacZ遺伝子を有している。AY64によってVero細胞とV4V細胞に移入されたIE180遺伝子プロモーターの活性をlacZ遺伝子産物である $\beta$ -galの産生量として調べた。Vero細胞で感染直後から $\beta$ -galが検出される事実は、IE180遺伝子プロモーターが非許容細胞においてもその機能を発揮できることを示している。このことは、AY64が外来遺伝子発現の新しいベクターウイルスとして応用できることを示唆する。AY64のIE180遺伝子プロモーター制御下に外来遺伝子を連結することにより、種々の細胞や動物で発現することが期待される。ベクターウイルスとしてのAY64の利点は多いが、その一つはPrVの細胞および個体レベルの宿主細胞域が広範囲であることから、神経細胞を含め様々な細胞や動物で遺伝子

発現が期待されることである。また、AY64はIE180遺伝子発現細胞やIE180の機能を代替する因子を有する細胞以外の細胞では病原性を示さないことから、安全性に優れていると考えられる。さらに、IE180遺伝子が反復配列に存在することから、AY64ゲノム1分子に外来遺伝子2コピーの挿入が可能で効果的な発現が期待できる。このように、AY64は新しい遺伝子発現ベクターとして多くの利点を有しているため、今後の発展が期待される。

## 要 約

PrVのIE180の機能解析を行うため、米学分離株のIndiana S株を親ウイルスとして、IE180遺伝子欠損変異株とIE180遺伝子を発現する組換えBVを作出した。まず、欠損変異株の作出に用いるため、PK-15細胞あるいはVero細胞に野外株のIE180遺伝子をトランスフェクトし、IE180遺伝子を発現する細胞を作出した。ついで、これらのIE180発現細胞を用い、IE180遺伝子プロモーター下にIE180遺伝子のコード領域と大腸菌のlacZ遺伝子のコード領域を置換した欠損変異株(AY64)を作出した。さらに、AY64株からlacZ遺伝子も除去した欠損変異株(AY1030)を作出した。これらの欠損変異株は親細胞では増殖できず、IE180発現細胞でのみ増殖が可能であった。AY64のlacZ遺伝子はIE180遺伝子プロモーター制御下で機能し、IE180発現細胞ばかりでなく親細胞でも $\beta$ -galを産生した。AY64感染親細胞は感染直後から $\beta$ -galを発現したが、PrVに関連するタンパク質の産生はなかった。一方、組換えBVは感染昆虫細胞にPrVのIE180と同じ分子量のタンパク質を大量に発現した。抗IE180ペプチド抗体を用いた免疫プロット法とIFAで、発現タンパク質がIE180であることを確認した。さらに、この発現IE180タンパク質の機能を検討するため、AY64の増殖相補試験を行った。昆虫細胞で発現したIE180を細胞融合法によってAY64感染Vero細胞に導入したところ、融合細胞において欠損変異株の増殖が認められ、組換えBVによって発現したIE180がトランスアクティベーターとしての機能を有することが明らかとなった。以上のことから、本研究で作出したIE180遺伝子欠損変異株と同遺伝子発現BVは、PrVの感染増殖機構の解析、IE180の機能と生化学的性状の検討に有用と考えられた。また、外来遺伝子を発現する新しいベクターウイルスとしてのIE180遺伝子欠損変異株の有用性を考察した。



## 総括

オーエスキー病はヘルペスウイルスによって起こるブタの伝染病で、新生豚感染すると急性脳炎を起こして高率に死亡する。しかし、加齢に伴い無症状傾向が強くなり、成豚では軽症あるいは不顕性感染に終わることが多い。しかし、妊娠豚では死産産を起こすため、養豚に大きな経済的損害を与えている。また、成豚に限らず致死感染から逃れた豚では潜伏感染が成立し、ストレスなどの要因によって潜伏ウイルスの再活性化（再発）が起こる。再活性化ウイルスは新しい感染源となることから、潜伏感染と再発がオーエスキー病を含めヘルペスウイルス感染症の最大の問題となっている。

オーエスキー病の原因ウイルスはブタヘルペスウイルス-1であるが、宿主であるブタ以外の動物の感染では播種や神経症状を呈するため、仮性狂犬病ウイルス（pseudorabies virus; PrV）とも呼ばれる。PrVのゲノムは分子量約 $95 \times 10^6$ ダルトンの線状二本鎖DNA（約150 kbp）で約70種の遺伝子がコードされると考えられ、そのうち約40種の塩基配列が決定されている。ウイルス遺伝子はカスケード様式に基づいて発現され、転写時期により前初期（immediate-early; IE,  $\alpha$ ）遺伝子群、初期遺伝子（early; E,  $\beta$ ）群、後期（late; L,  $\gamma$ ）遺伝子群の3群に分けられる。ヘルペスウイルス感染症の最大の問題である潜伏感染と再発機構を明らかにするためには、ウイルスの感染・増殖機構、特に各遺伝子の構造と機能を詳細に検討する必要がある。そこで、本研究ではIE遺伝子群のIE180遺伝子とL遺伝子群の糖タンパク質遺伝子に焦点をあて、それらの分子生物学的検討を行った。

まず、分子生物学的手法による機能解析の際に問題となるウイルスゲノムの多様性に関与する予備知見を得るため、第1章では日本で分離されたPrV株DNAの制限酵素切断長解析を行った。1987年から1990年の間に分離した148株のPrV由来DNAを制限酵素BamHIとKpnIで切断し、その切断型を日本国内で1981年に最初に分離された山形S-81株、米国由来のIndiana S株とtsG1株、タイ国由来のNK株と比較した。その結果、最近分離されたウイルス株のDNAは基本的に同一の切断型を示し、山形S-81株およびNK株と同様にBamHIの切断型タイプIIに分類された。一方、米国由来の2株はタイプIであった。これらの結果から、初発以来わが国で流行しているPrVに顕著な変異の起こっていないことが示唆された。しかし、ゲノムの反復配列、反復配列とユニーク領域との接続部位および左末端には、切断点の獲得と消失、あるいは塩基配列の挿入と欠失に起因する変異が認められ、これらの

領域では小規模な変異の起こり易いことが明らかとなった。さらに、これらの変異は同一地域や農場で同時期に分離されたウイルス、疫学的に関連のある発生から分離されたウイルスの間で共通して認められる傾向にあり、ウイルスDNAの制限酵素による分析がオーエスキー病の疫学調査に有用であることを明らかにした。

ウイルスゲノムの物理的差異はウイルスタンパク質の抗原変異として反映されるとは限らず、抗原変異の解析には免疫学的方法が有効である。そこで、第2章ではPrV山形S-81株に対する中和活性陽性のモノクローナル抗体を作成し、主要な糖タンパク質であるgⅡとgⅢについて抗原の多様性を解析した。また、モノクローナル抗体の中和活性を利用して抗原変異株の作出を行い、抗原変異出現の可能性について検討した。まず、糖タンパク質gⅡに対するモノクローナル抗体3種とgⅢに対するモノクローナル抗体1種を用い、PrV 41株の抗原解析を行った。その結果、抗gⅡモノクローナル抗体のうちMA15は山形S-81株をはじめ日本の分離株すべてと反応したが、米国分離株のIndiana S株とは反応しなかった。他の2種類はすべてのウイルス株と反応したが、モノクローナル抗体MA11の中和作用は補体依存性、5A4は非依存性であった。さらに、変異原物質臭化デオキシリジンで処理した山形S-81株を各モノクローナル抗体で選択した結果、抗gⅡモノクローナル抗体の5A4と抗gⅢモノクローナル抗体のMA37の中和作用から回避するウイルスが得られた。以上の結果から、今まで報告されていなかったPrVの糖タンパク質gⅡにも、gⅢと同様に抗原変異の存在することが明らかとなった。

第1章および第2章で、PrVのゲノムと抗原タンパク質に変異のあることを明らかにした。第3章では、抗原タンパク質として重要と考えられる糖タンパク質gⅢについて、同遺伝子発現組換えベクターウイルスと欠損ウイルスとを作出し、同タンパク質の機能解析を行った。gⅢ遺伝子組換えの発現ベクターウイルスには、バキュロウイルスとワクチニアウイルスを用いた。組換えバキュロウイルスのgⅢ遺伝子はポリヒドリン遺伝子プロモーター制御下のポリヒドリン遺伝子領域に、組換えワクチニアウイルスのgⅢ遺伝子はp7.5初期後期プロモーター制御下の赤血球凝集素遺伝子領域に挿入した。組換えワクチニアウイルス感染哺乳動物細胞ではPrV感染によって発現するgⅢと同様の糖鎖をもったgⅢが検出されたが、組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞で発現したgⅢの糖鎖の付加は不十分であった。しかし、組換えバキュロウイルス感染細胞抽出液のマウスへの腹腔内接種、また組換えワクチニアウイルスのウサギへの皮内接種によって中和活性を有する抗gⅢ抗体が産生され、両組換えウイルスは抗原的に機能を持ったgⅢを発現することが示された。

組換えワクチニアウイルスを皮下接種したマウスは抗gIII抗体を産生しなかったが、接種マウス20匹の内4匹はPrVの致死攻撃に対して防御効果を示した。生存マウスは抗PrV抗体を産生した。ついで、gIII遺伝子欠損ウイルスを用いgIIIの機能解析を行った。親ウイルスはマウスの赤血球を凝集したが、gIII遺伝子欠損ウイルスに凝集活性は認められなかった。また、親ウイルス接種豚は中和抗体ばかりでなく赤血球凝集抑制抗体と抗gIII抗体を産生したが、gIII遺伝子欠損ウイルス接種豚は中和抗体は産生したものの赤血球凝集抑制抗体と抗gIII抗体は産生しなかった。gIII遺伝子を欠損することにより、PrVのマウスに対する病原性は減弱しなかった。さらに、組換えウイルス発現gIIIを抗原とし、抗gIII抗体に特異な固相酵素免疫測定法を開発した。野外ウイルス感染豚の血清を抗gIII抗体に特異な固相酵素免疫測定法で検査したところ、血清抗体の約50%が抗gIII抗体であった。以上のことから、PrVの糖タンパク質gIIIは免疫学的に重要なタンパク質であること、赤血球凝集活性を有する唯一のタンパク質であること、gIII遺伝子単独では病原性の発現に関与しないことを明らかにした。

第4章では、ウイルスの感染・増殖に重要な役割を果たすPrVの唯一のIE遺伝子、IE180遺伝子について欠損ウイルスと発現組換えベクターウイルスを作出し、同遺伝子の産物であるIE180の機能解析を行った。まず、欠損ウイルスの作出に用いるため、ブタ腎臓由来PK-15細胞あるいはサル腎臓由来Vero細胞に野外株のIE180遺伝子をトランスフェクトし、IE180遺伝子を発現する細胞を作出した。ついで、これらのIE180発現細胞を用い、IE180遺伝子プロモーター下にIE180遺伝子のコード領域と大腸菌のlacZ遺伝子のコード領域を置換した欠損変異株(AY64)を作出した。さらに、AY64株からlacZ遺伝子を除去した欠損変異株(AY1030)を作出した。これらの欠損変異株は親細胞では増殖できず、IE180発現細胞でのみ増殖が可能であった。AY64のlacZ遺伝子はIE180遺伝子プロモーター制御下で機能し、IE180発現細胞ばかりでなく親細胞でも $\beta$ -galを産生した。AY64感染親細胞は感染直後から $\beta$ -galを発現したが、PrVに関連するタンパク質の産生はなかった。ついで、パキユロウイルスを発現ベクターウイルスとし、IE180遺伝子組換えウイルスを作出した。組換えパキユロウイルスは感染昆虫細胞にPrVのIE180と同じ分子量のタンパク質を大量に発現した。抗IE180ペプチド抗体を用いた免疫プロット法と免疫蛍光抗体法で、発現タンパク質がIE180であることを確認した。さらに、この発現IE180タンパク質の機能を検討するため、AY64の増殖相補試験を行った。昆虫細胞で発現したIE180を細胞融合法によってAY64感染Vero細胞に導入したところ、融合細胞において欠損変異株の増殖が認められた。

以上のことから、IE180遺伝子はウイルスの増殖に必須であること、組換えパキローウイルスによって発現したIE180がトランスアクティベーターとしての機能を有することが明らかとなり、作出したIE180遺伝子欠損ウイルスと同遺伝子発現パキローウイルスは、PrV感染・増殖機構の解析、IE180の機能と生化学的性状の検討に有用と考えられた。また、IE180遺伝子欠損ウイルスが外来遺伝子を発現できる新しいベクターウイルスとしての有用性を考察した。

本研究ではPrVの遺伝子がコードする多種類のタンパク質のうち、ウイルス粒子の構造タンパク質(L遺伝子産物)で免疫誘導物質として重要と考えられる糖タンパク質gIII、PrVの感染で最初に転写・翻訳されウイルスの増殖に大きな役割を果たすIE180 (IE遺伝子産物)について機能解析を行った。ヘルペスウイルス感染症では潜伏感染の成立と維持、再発機構の究明が最大の課題となっており、それらの解明には各遺伝子の機能の検討とともに増殖カスケードにおける相互作用を明らかにする必要がある。本研究の成果はPrVを含めたヘルペスウイルスの感染・増殖機構の解明に役立つことが期待される。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、ご校閲とご指導を戴きました東京大学見上彪教授ならびに農林水産省家畜衛生試験場清水実嗣博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の共同研究者としてご援助戴いた同試験場犬丸茂樹博士ならびに今田忠男博士に深く感謝いたします。

## 文 献

1. Aujeszky, A. 1902. Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. Zentralbl. Bakteriol. [Orig]. 32:353-357.
2. Baumann, R.P., Yalamanchili, V.R.R., and O'Callaghan, D.J. 1989. Functional mapping and DNA sequence of an equine herpesvirus 1 origin of replication. J. Virol. 63:1275-1283.
3. Ben-Porat, T., Deatly, A.M., Easterday, B.C., Galloway, D., Kaplan, A.S., and McGregor, S. 1984. Latency of pseudorabies virus. pp.365-383. In: Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine (Wittmann, G., Gaskell, R.M., and Rziha, H.-J. eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston/The Hague/Dordrecht/Lancaster.
4. Ben-Porat, T., DeMarchi, J.M., Lomniczi, B., and Kaplan, A.S. 1986. Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. Virology 154:325-334.
5. Ben-Porat, T., Hoffmann, P., Brown, L., Feldman, L., and Blankenship, M.L. 1982. Partial characterization of temperature-sensitive mutants of pseudorabies virus. Virology 122:251-267.
6. Ben-Porat, T. and Kaplan, A.S. 1981. Organization and replication of pseudorabies virus DNA. In: Herpesvirus DNA (Becker, Y ed.), Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London.
7. Ben-Porat, T., Rixon, F.J., and Blankenship, M.L. 1979. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. Virology 95:285-295.
8. Campbell, M.E.M. and Preston, C.M. 1987. DNA sequences which regulate the expression of the pseudorabies virus major immediate early gene. Virology 157:307-316.
9. Cheung, A.K. 1988. Fine mapping of the immediate-early gene of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. J. Virol. 62:4763-4766.
10. Cheung, A.K. 1989. DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early

- gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res.* 17:4637-4646.
11. Cheung, A.K. 1991. Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus. *J. Virol.* 65:5260-5271.
  12. Davison, M.-J., Preston, V.G., and McGeoch, D.J. 1984. Determination of the sequence alteration in the DNA of the herpes simplex virus type 1 temperature-sensitive mutant tsK. *J. Gen. Virol.* 65:859-883.
  13. Davison, A.J. and Scott, J.E., 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.*, 67:1759-1861.
  14. de Wind, N., Wagenaar, F., Pol, J., Kimmann, T., and Berns, A. 1992. The pseudorabies virus homolog of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation. *J. Virol.* 66:7096-7103.
  15. DeLuca, N.A., Courtney, M.A., and Schaffer, P.A. 1984. Temperature-sensitive mutants in herpes simplex virus type 1 ICP4 permissive for early gene expression. *J. Virol.* 52:767-776.
  16. DeLuca, N.A., McCarthy, A.M., and Schaffer, P.A. 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol.* 56:558-570.
  17. Dixon, R.A.F. and Schaffer, P.A. 1980. Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175. *J. Virol.* 36:189-203.
  18. Everett, R.D. 1991. Construction and characterization of herpes simplex type 1 viruses without introns in immediate early gene 1. *J. Gen. Virol.* 72:851-859.
  19. Feldman, L.T., Demarchi, J.M., Ben-Porat, T., and Kaplan, A.S. 1982. Control of abundance of immediate-early mRNA in herpesvirus (pseudorabies)-infected cells. *Virology* 116:250-283.
  20. Feldman, L.T., Rixon, F.J., Jean, J.H., Ben-Porat, T., and Kaplan, A.S. 1979. Transcription of the genome of pseudorabies (a herpesvirus) is strictly controlled. *Virology* 97:316-327.
  21. Fukusho, A., Shimizu, M., Kubo, M., Nanba, K., Shimizu, Y., Konno, S., Suzuki, K.,

- and Otani, T. 1981. The first outbreak of Aujeszky's disease in swine in Japan. II. Virus isolation. Bulletin of the National Institute of Animal Health 82:5-11 (in Japanese).
22. Gelman, I.H. and Silverstein, S. 1987. Dissection of immediate-early gene promoters from herpes simplex virus: Sequences that respond to the virus transcriptional activator. J.Virol. 61:3167-3172.
  23. Gustafson, D.P. 1975. Pseudorabies virus, pp.391-410. In: Diseases of Swine (Dunne, H.W. and Leman, A.D. eds.), The Iowa State University Press, Ames.
  24. Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K.O., and Kaplan, A.S. 1984. Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. J.Virol. 52:583-590.
  25. Herrmann, S.-C., Heppner, B., and Ludwig, H. 1984. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. pp.387-401. In: Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine (Wittmann, G., Gaskell, R.W., and Rziha, H.-J. eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston/The Hague/ Dordrecht/Lancaster.
  26. Holland, T.C., Marlin, S.D., Levine, M., and Glorioso, J. 1983. Antigenic variant of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. J.Virol. 45:672-682.
  27. Hung, S.-L., Srinivasan, S., Friedman, H.M., Eisenberg, R.J. and Cohen, G.H. 1982. Structural basis of C3b binding by glycoprotein C of herpes simplex virus. J.Virol. 66:4013-4027.
  28. Ihara, S., Feldman, L., Watanabe, S., and Ben-Porat, T. 1983. Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. Virology 131:437-454.
  29. Inaba, Y., Tetsu, N., Toriyoshi, H., Yukawa, M., Yoshiki, K., Hirahara, T and Izumida, A. 1990. Appearance of slow-reacting, complement-requiring hemagglutination-inhibiting antibody in swine infected with pseudorabies virus. Arch.Virol. 113:115-124.
  30. Klupp, B.G., Baumeister, J., Karger, A., Visser, N., and Mettenleiter, T.C. 1994.



- Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. *J.Virol.* 68:3868-3878.
31. Klupp, B.G., Kern, H., and Mettenleiter, T.C. 1992. The virulence-determining genomic *Bam*HI fragment 4 of pseudorabies virus contains genes corresponding to the UL15 (Partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication. *Virology* 191:900-908.
  32. Klupp, B.G. and Mettenleiter, T.C. 1991. Sequence and expression of the glycoprotein gH gene of pseudorabies virus. *Virology* 182:732-741.
  33. Kit, S. 1985. U.S. Patent Application no. 4514497.
  34. Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. 1990. The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector. *Virology* 174:418-429.
  35. Lieber, M.M., Sherr, C.J., Benveniste, R.E., and Todaro, G.J. 1975. Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virology* 66:816-819.
  36. Lomniczi, B., Gielkens, A., Csobai, I., and Ben-Porat, T. 1987. Evolution of pseudorabies virus containing genomes with an invertible long component after repeated passage in chicken embryo fibroblasts. *J.Virol.* 61:1772-1780.
  37. Matsuda, A., Okada, N., Katayama, S., Okabe, T. and Sasaki, N. 1991. Characterization of protective viral glycoprotein for pseudorabies virus infection. *J.Vet.Med.Sci.*, 53:737-741.
  38. Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A., and Bishop, D.H.L. 1987. Baculovirus expression vector: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J.Gen.Virol.* 68:1233-1250.
  39. Mavromara-Nazos, P., Ackermann, M., and Roizman, B. 1986. Construction and properties of a viable herpes simplex virus recombinant lacking coding sequences of the  $\alpha$ 47 gene. *J.Virol.* 60:807-812.
  40. McCarthy, A.M., McMahan, L., and Schaffer, P.A. 1989. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered pattern of transcription and are DNA deficient. *J.Virol.* 63:18-27.
  41. McGeoch, D.J., Dolan, A., Donald, S., and Brauer, D.H.K. 1986. Complete DNA

- sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 14:1727-1745.
42. Mengeling, W.L., Paul, P.S., Pirtle, E.C., and Wathen, W.W. 1983. Restriction endonuclease analysis of the pseudorabies (Aujeszky's disease) virus before and after serial passage in vivo and in vitro. *Arch. Virol.* 78:213-220.
  43. Mettenleiter, T.C. 1994. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: State of the art, August 1993. *Acta Veterinaria Hungarica* 42:153-177.
  44. Mettenleiter, T.C., Lukacs, N., Thiel, H.-J., Schreurs, C., and Rziha, H.-J. 1986. Location of the structural gene of pseudorabies virus glycoprotein complex gII. *Virology* 152:66-75.
  45. Mettenleiter, T.C., Schreurs, C., Zuckermann, F., Ben-Porat, T. and Kaplan, A.S. 1988. Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J. Virol.* 62:2712-2717.
  46. Mettenleiter, T.C., Zsak, L., Zuckermann, F., Sugg, N., Kern, H. and Ben-Porat, T. 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparin-like substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J. Virol.* 64:278-286.
  47. Miller, J.H. (ed). 1972. "Experiments in Molecular Genetics", p.352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  48. Morrison, H.G., Bauer, S.P., Lange, J.V., Esposito, J.J., McCormick, J.B. and Auperin, D.D. 1989. Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus. *Virology* 171:179-188.
  49. Nishimori, T., Imada, T., Sakurai, M., Kitabayashi, T., Kawamura, H., and Nakajima, H. 1987. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease viruses isolated in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:365-367.
  50. O'Hare, P. and Hayward, G.S. 1985. Three trans-acting regulatory proteins modulate immediate-early gene expression in a pathway involving positive and negative feedback regulation. *J. Virol.* 56:723-733.
  51. Paterson, T. and Everett, R.D. 1988. Mutational dissection of the HSV-1 immediate-early protein  $\gamma$ 175 involved in transcriptional transactivation

- and repression. *Virology* 166:186-196.
52. Paul, P.S., Mengeling, W.L., and Pirtle, E.C. 1982. Differentiation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 73:193-198.
  53. Perron, H., Suh, M., Lalande, B., Gratacap, B., Laurent, A., Stoeber, P., and Seigneurin, J.M. 1993. Herpes simplex virus ICPO and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with multiple sclerosis. *J. Gen. Virol.* 74:65-72.
  54. Petrovskis, E., Timmins, J.G., Armentrout, M.A., Marchioli, C.C., Yancy, R.J., and Post, L.E. 1986. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J. Virol.* 59:216-223.
  55. Petrovskis, E., Timmins, J.G., and Post, L.E. 1986. Use of  $\lambda$ gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. *J. Virol.* 60:185-193.
  56. Post, L.E. and Roizman, B. 1981. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes:  $\alpha$  gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25:227-232.
  57. Priola, S.A. and Stevens, J.G. 1991. The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. *Virology* 182:852-856.
  58. Rea, T.J., Timmins, J.G., Long, G.W., and Post, L.E. 1985. Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J. Virol.* 54:21-29.
  59. Robbins, A.K., Dorney, D.J., Wathen, M.W., Whealy, M.E., Gold, C., Watson, R.J., Holland, L.E., Weed, S.D., Levine, M., Glorioso, J.C., and Enquist, L.W. 1987. The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. *J. Virol.* 61:2691-2701.
  60. Robbins, A.K., Watson, R.J., Whealy, M.E., Hays, W.W., and Enquist, L.W. 1986. Characterization of a pseudorabies virus glycoprotein gene with homology to

- herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein C. *J.Virol.*58:339-347.
61. Robbins,A.K., Whealy,M.E., Watson,R.J., and Enquist,L.W. 1986. The pseudorabies virus gene encoding glycoprotein gIII is not essential for growth in tissue culture. *J.Virol.*59:635-645.
  62. Roizman,B. and Jenkins,F.J. 1985. Genetic engineering of novel genomes of large DNA virus. *Science* 229:1208-1214.
  63. Sacks,W.R., Greene,C.C., Aschman,D.P., and Schaffer,P.A. 1985. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J.Virol.*55:796-805.
  64. Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. 1989. *Molecular cloning; A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  65. Sanes,J.R., Rubenstein,J.L.R., and Nicolas,J.F. 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.*5:3133-3142.
  66. Schreurs,C., Mettenleiter,T.C., Zuckermann,F., Sugg,N. and Ben-Porat,T. 1988. Glycoprotein gIII of pseudorabies is multifunctional. *J.Virol.*62:2251-2257.
  67. Schroder,C.H., DeZazzo,J., Knopf,K.W., Kaerner,H.C., Levine,M., and Glorioso,J. 1985. A herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion in the polypeptide-coding sequences of the ICP4 gene. *J.Gen.Virol.*66:1589-1593.
  68. Shida,H., 1986. Nucleotide sequence of the vaccinia virus hemagglutinin gene. *Virology*,150:451-462.
  69. Smith,C.A. and Schaffer,P.A. 1987. Mutants defective in herpes simplex virus type 2 ICP4: Isolation and preliminary characterization. *J.Virol.*61:1092-1097.
  70. Southern,P.J. and Berg,P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early promoter. *J.Mol.Appl.Genet.*1:327-341.
  71. Stow,N.D. and Stow,E.C. 1986. Isolation and characterization of a herpes

- simplex virus type 1 mutant containing a deletion within the gene encoding the immediate early polypeptide Vmw110. *J.Gen.Virol.*67:2571-2585.
72. Tetsu,N., Inaba,Y., Yukawa,M., Yoshiki,K., Hirahara,T., Furuya,Y., Ito,S., Yonemochi,A. and Ishikawa,H.1989. Hemagglutination with pseudorabies virus. *Arch.Virol.*106:321-326.
73. Trybala,E., Svennerholm,B., Bergstrom,T., Olofsson,S., Jeansson,S. and Goodmann,J.L. 1993. Herpes simplex virus type-1 induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate. *J.Virol.*67:1278-1285.
74. van Zijl,M., van der Gulden,H., de Wind,N., Gielkens,A., and Berns,A. 1990. Identification of two genes in the unique short region of pseudorabies virus: comparison with herpes simplex virus and varicella-zoster virus. *J.Gen.Virol.*71:1747-1755.
75. Vlcek,C., Kozmik,Z., Paces,V., Schirm,S., and Schwyzer,M. 1990. Pseudorabies virus immediate-early gene overlaps with an oppositely oriented open reading frame: Characterization of their promoter and enhancer regions. *Virology* 179:365-377.
76. Vlcek,C., Paces,V., and Schwyzer,M. 1988. Nucleotide sequence of the pseudorabies virus immediate early gene, encoding a strong transactivator protein. *Virus Genes* 2:335-346.
77. Wathen,M.W., and Wathen,L.M.K. 1986. Characterization and mapping of a nonessential pseudorabies virus glycoprotein. *J.Virol.*58:173-178.
78. Whealy,M.E., Robbins,A.K., and Enquist,L.W. 1990. The export pathway of the pseudorabies virus gB homolog gII involves oligomer formation in the endoplasmic reticulum and protease processing in the Golgi apparatus. *J.Virol.*64:1946-1955.
79. Yamada S., Imada,T., Watanabe,W., Honda,Y., Nakajima-Iijima,S., Shimizu,Y., and Sekikawa,K. 1991. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of pseudorabies virus. *Virology* 185:56-66.
80. Zhang,G. and Leader,D.P. 1990. The structure of the pseudorabies virus

genome at the end of the inverted repeat sequences proximal to the junction with the short unique region. J.Gen.Virol.71:2433-2441.

81. Zhang,G., Stevens,R., and Leader,D.P. 1990. The protein kinase encoded in the short unique region of pseudorabies virus: description of the gene and identification of its product in virions and in infected cells. J.Gen.Virol.71:1757-1765.
82. Zuckermann,F.A., Zsak,L., Mettenleiter,T.C. and Ben-Porat,T., 1990. Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. J.Virol.64:802-812.

表

表1. PrV 山形S-81株に対する抗gⅡおよび抗gⅢ特異モノクローナル抗体の  
間接蛍光抗体法(IFA)と中和試験

MAb	認識蛋白質	アイソタイプ	抗体価		
			IFA <sup>a</sup>	NT(C-) <sup>b</sup>	NT(C+) <sup>b</sup>
5A4	gⅡ	IgG3	40,960	900	1,800
MA11	gⅡ	IgG1	20,480	< 10	1,000
MA15	gⅡ	IgG1	10,240	< 10	64
MA37	gⅢ	IgG2a	10,240	< 10	750

a 免疫蛍光抗体法

b NT(C-)と NT(C+)はそれぞれ補体非依存性と補体依存性中和試験を示す。



表2. 種々の分離株に対する抗gⅡおよび抗gⅢ特異モノクローナル抗体の反応性

ウイルス株	モノクローナル抗体							
	5A4		MA11		MA15		MA37	
	IFA <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>	IFA	NT	IFA	NT	IFA	NT
Indiana S	10,240 <sup>c</sup>	1,370	10,240	840	<10	<10	10,240	190
山形-S81	40,960	1,800	20,480	1,000	10,240	64	10,240	750
日本分離株39株	>10,240	>100	>10,240	>100	>10,240	>50	>10,240	>100

a 免疫蛍光抗体法

b 補体依存性中和試験

c 抗体価

表3. 変異原物質(臭化デオキシウリジン)による抗原変異ウイルスの誘導

ウイルス株	モノクローナル抗体							
	5A4		MA11		MA15		MA37	
	IFA <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>	IFA	NT	IFA	NT	IFA	NT
山形-S81	40,960 <sup>c</sup>	1,800	20,480	1,000	10,240	64	10,240	750
YmrG2-3	<10	<10	10,240	440	10,240	30	2,560	223
YmrG3-1	10,240	820	10,240	330	10,240	23	<10	<10

YmrG2-3とYmrG3-1はそれぞれMAb 5A4とMAb MA37存在下で選択した変異原物質誘導ウイルス

a 免疫蛍光抗体法

b 補体依存性中和試験

c 抗体価

表4. マウスに対する山形S-81株とgIII遺伝子欠損ウイルスの病原性

ウイルス株	接種経路	接種ウイルス量 (PFU/匹)					PFU/LD <sub>50</sub>
		10 <sup>5.0</sup>	10 <sup>4.0</sup>	10 <sup>3.0</sup>	10 <sup>2.0</sup>	10 <sup>1.0</sup>	
山形S-81	i.n.	5/5(3.0) <sup>a</sup>	5/5(3.4)	3/5(4.0)	0/5	0/5	10 <sup>2.9</sup>
	s.c.	3/5(3.0)	1/5(3.0)	0/5	0/5	NT	≧10 <sup>4.7</sup>
Yd1G3-1	i.n.	NT	5/5(3.0)	4/5(3.3)	1/5(5.0)	0/5	10 <sup>2.6</sup>
	s.c.	5/5(3.2)	5/5(3.8)	5/5(4.8)	1/5(4.0)	NT	≦10 <sup>2.9</sup>

<sup>a</sup> 死亡数/接種数、括弧内の数字は死亡までの平均日数、NT:未試験

表5. III遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)感染細胞  
抽出物免疫マウス血清の中和活性

抗 原	マウスNo.	中和抗体価	
		C(-)*	C(+) <sup>b</sup>
AcPRG3感染	1	32 <sup>c</sup>	128
細胞抽出物	2	64	256
	3	64	128
AcNPV感染	1	< 2	< 2
細胞抽出物	2	< 2	< 2
	3	< 2	< 2

a C(-)は補体非依存性中和試験

b C(+)<sup>b</sup>は補体依存性中和試験

c 抗体価

表6. gⅢ遺伝子組換えワクチニアウイルス(rVV-gⅢ)接種ウサギにおける抗体価の推移

ウサギNo.	試験	接種後日数					
		0	3	7	14	21	28
1	ELISA	0.003 <sup>a</sup>	0.001	0.043	0.127	0.267	0.407
	IFA <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	-	-	+	+	+
	NT	<2	<2	<2	16	32	16
2	ELISA	0.001	0.002	0.024	0.183	0.270	0.300
	IFA	-	-	-	+	+	+
	NT	<2	<2	<2	16	16	16

a 波長405 nmによるOD値

b 抗原はアセトン固定したPrV感染PK-15細胞

c 1:10に希釈した抗体の陽性反応(+)と陰性反応(-)

表7. gIII遺伝子組換えワクチニアウイルス(rVV-gIII)接種マウスの免疫反応

免疫原	防御率 (生存数/攻撃数)	抗PrV抗体			
		攻撃前 <sup>a</sup>		攻撃後	
		IFA <sup>b</sup>	NT <sup>c</sup>	IFA	NT
rVV-gIII	4/20	- <sup>d</sup>	<2 <sup>e</sup>	+	16-32
VV(LC16m0)	0/20	-	<2	•	•
培養液	0/20	-	<2	•	•

a rVV-gIIIの追加免疫後

b 免疫蛍光抗体法

c 補体依存性中和試験

d 1:10に希釈した抗PrV抗体に対する陽性反応(+)と陰性反応(-)

e 抗体価

表8. 山形S-81株とgⅢ遺伝子欠損ウイルス(YdIG3)免疫豚血清の抗体活性

免疫血清	ブタNo.	血清学的試験		
		NT <sup>a</sup>	HI <sup>b</sup>	IFA <sup>c</sup>
山形S-81	1	32 <sup>d</sup>	40	+*
	2	256	80	+
YdIG3-1	1	128	<10	-
	2	128	<10	-

a 補体依存性中和試験

b 赤血球凝集抑制試験

c gⅢ遺伝子組換えワクチニアウイルス感染細胞を抗原として  
抗gⅢ抗体特異的な免疫蛍光抗体法

d 抗体価

e 1:20に希釈血清の反応(+;陽性,-;陰性)

表9. IE180遺伝子組換えバキュロウイルス(rAcIE180)感染SF21AE細胞とIE180遺伝子欠損  
 オーエスキー病ウイルス(AY64)感染Vero細胞の融合による増殖相補試験

AY64感染Vero細胞との融合細胞	ウイルス力価	
	V4V細胞*	Vero細胞
AcNPV感染SF21AE細胞	<0.7 <sup>a</sup>	<0.7
rAcIE180感染SF21AE細胞	4.9	<0.7
SF21AE細胞	<0.7	<0.7
V4V細胞	3.5	<0.7

a PrV IE180発現Vero細胞

b log<sub>10</sub> PFU/ml



☒

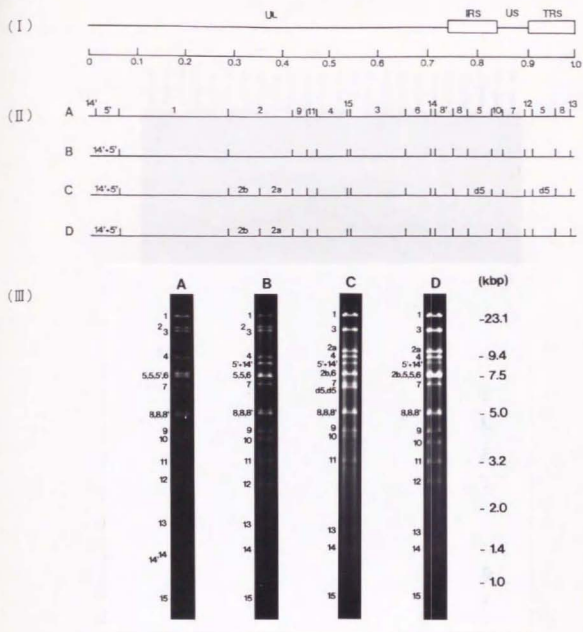


図1. 制限酵素 *Bam*HI によって切断したオーエスキー病ウイルスゲノムの物理地図と制限酵素切断型

上段(I)はマップユニットを付したオーエスキー病ウイルスゲノムの模式図を示す。PrVゲノムはUL(unique long)領域とUS(unique short)領域およびUS領域を挟み込む倒置反復配列(inverted repeat sequence; IRS)と末端反復配列(terminal repeat sequence; TRS)からなる。中段(II)と下段(III)はそれぞれtsG1株(A), Indiana S株(B), NK株(C), 山形S-81株(D)ゲノムの *Bam*HI制限酵素による物理地図と切断型を示す。DNA断片に付された数字はtsG1株(3)の報告に準じた。

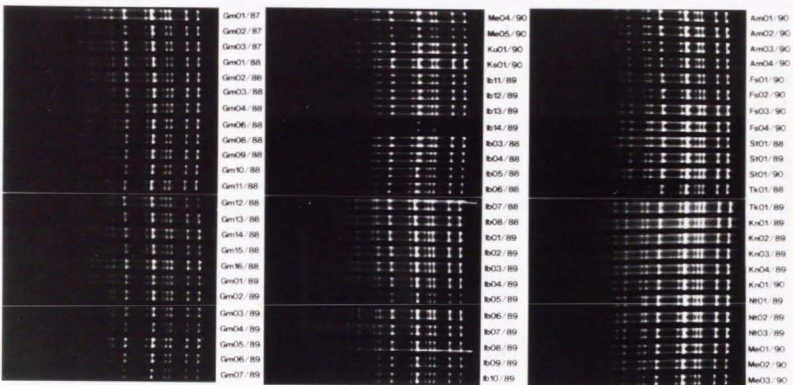


図2. 1987年から1990年に日本で分離されたオースキー種ウイルスのBsalI切断型



図2. 1987年から1990年に日本で分離されたオーエスキー病ウイルスのBornaI切断型(続き)

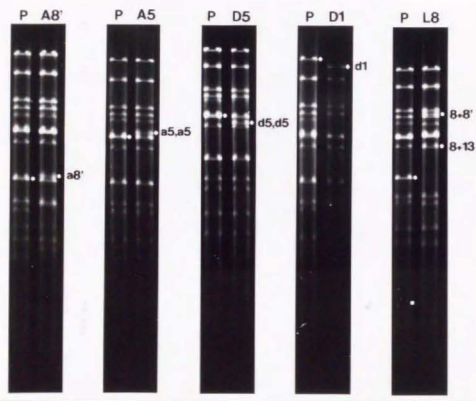


図3. 最近分離されたオーエスキー病ウイルス148株の*Bam*HI切断型にみられた変異

P. A8', A5, D5, D1, L8は変異のサブタイプを示し、各々126(85%), 7(4.7%), 4(2.7%), 8(5.4%), 1(0.7%), 2(1.4%)の分離株が分類された。

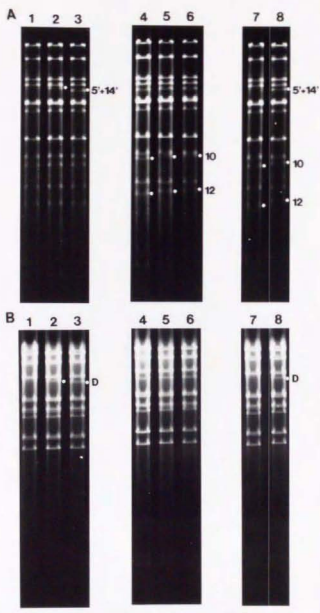


図4. 同時期、同地域で分離されたウイルスにみられた *Bam*HI(A)および *Kpn*I(B) 切断型の変異

ウイルス1から3、4から6、7と8はそれぞれ同時期、同地域で分離された。*Bam*HI 5'+14'断片と *Kpn*I D断片との変異は関連したが(レーン1から3、7と8)、*Bam*HI 10断片と12断片に関連する *Kpn*I切断型の変異は検出されなかった(レーン4から6)。レーンの右側に付した数字と点は変異の認められたDNA断片を示す。

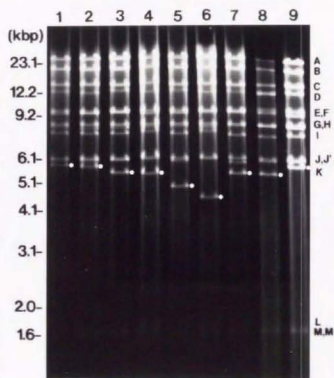


図5. *Bam*HI 5断片に関連した*Kpn*I断片の長さの変異

レーン1;lb06/88,レーン2;Ch04/88,レーン3;Ch06/88,レーン4;Ch05/88,  
 レーン5;Tc09/89,レーン6;NK株,7;山形S-81株,8;Indiana S株,9;tsG1株。右側のアルファ  
 ベットは図6に示した物理地図に基づいた*Kpn*I消化断片を示す。

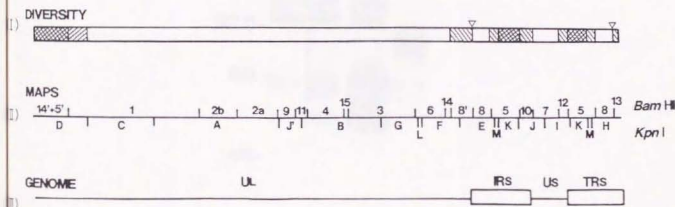


図6. 日本分離株のゲノムに生じた変異領域

上段(I)は*Bam*HI消化断片あるいは*Kpn*I消化断片の変異に関係する領域(斜線部;長さの変化、▽;切断点の消失)、中段(II)は日本のプロトタイプの山形S-81株の*Bam*HIおよび*Kpn*Iの物理地図、下段(III)はゲノムの模式図を示す。



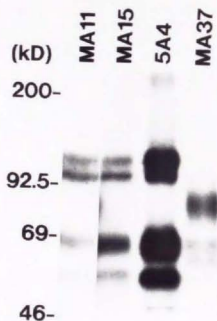


図7. モノクローナル抗体によって免疫沈降したオーエスキー病ウイルスの糖タンパク質  
 オーエスキー病ウイルス山形S-81株感染細胞を $[^{14}\text{C}]$ -グルコサミンによって標識し、放  
 射性免疫沈降法用バッファーで可溶化後、MA11, MA15, 5A4, MA37で沈降させた。左側の数字  
 は分子量マーカーを示す。

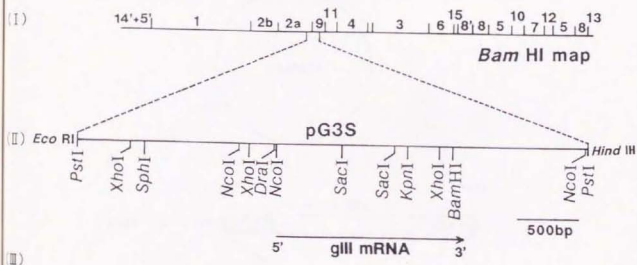


図8. オーエスキー病ウイルス山形S-81株gIII遺伝子領域の物理地図

上段(I)は山形S-81株ゲノムのBamHI物理地図を、また中段(II)はpG3SプラスミドにクローニングしたgIII遺伝子領域の物理地図を示す。下段(III)はgIII遺伝子の転写領域で、5'は転写開始側、3'は転写終了側である。

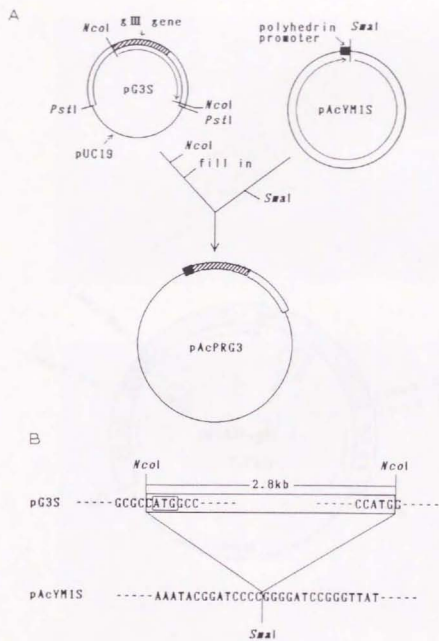


図9. gIII遺伝子組換えバキュロウイルス作出のためのトランスファーベクター  
pAcPRG3の構築

pAcYMISプラスミドにgIII遺伝子を結合してpAcPRG3を構築(A)し、その接合部の塩基配列を(B)に示した。

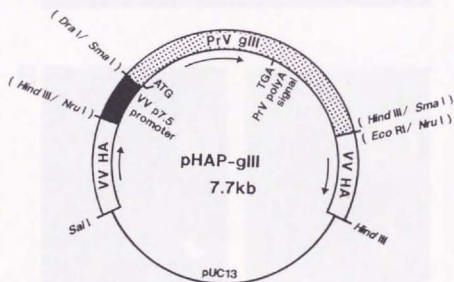


図10. gIII遺伝子組換えワクチニアウイルス作出のためのトランスファーベクター  
pHAP-gIIIの構築

黒く塗りつぶした部分はgIII遺伝子を制御するワクチニアウイルスp7.5遺伝子初期-後期  
プロモーターを、また白い部分はワクチニアウイルス赤血球凝集(HA)遺伝子を示す。

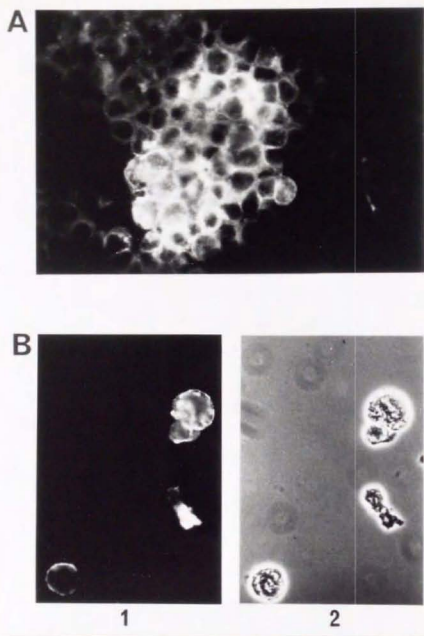


図11.  $\text{gIII}$ 遺伝子組換えパキウイルス(AcPRG3)感染SF21AE細胞の抗 $\text{gIII}$ モノクローナル抗体(MA37)による免疫蛍光抗体法

アセトン固定標本の蛍光顕微鏡写真(A)では感染部位に一致してフォーカス状に蛍光が認められる。未固定標本における蛍光顕微鏡写真(Bの1)は同視野の明視野顕微鏡写真(Bの2)との比較で明らかかなように細胞表面に蛍光が認められる。

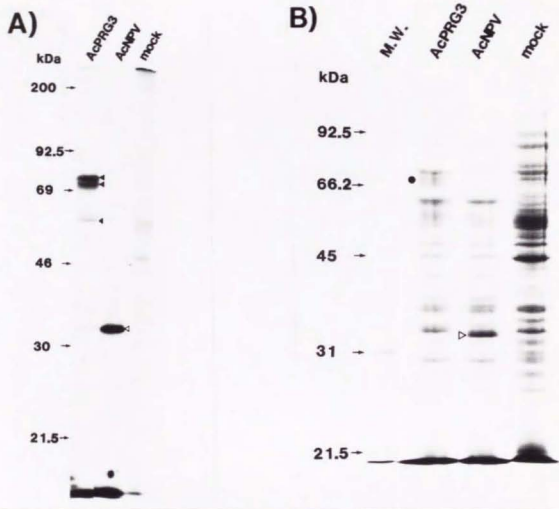


図12. gIII遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)のタンパク質合成1

[<sup>3</sup>H]-ロイシン標識したAcPRG3, 親バキュロウイルスのAcNPV, モック感染SF21AE細胞のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後のフルオログラム(A)とクマシー・ブリリアント・ブルー染色標本(B)。AcPRG3感染細胞ではポリヒドリンタンパク質(△)は検出されず、新たに産生されたタンパク質(Aの▲, Bの●)が認められる。

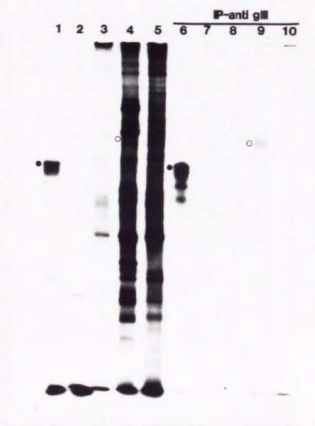


図13. gIII遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)のタンパク質合成2

[<sup>3</sup>H]-ロイシン標識したAcPRG3(レーン1,6), 親バキュロウイルスのAcNPV(レーン2,7), モック(レーン3,8)感染SF21AE細胞およびオーエスキー病ウイルス感染(レーン4,9)と非感染(レーン5,10)PK-15細胞のフルオログラム。レーン1から5は感染細胞抽出液を直接、またレーン6から10は抗gIIIモノクローナル抗体(MA37)による免疫沈降分画を泳動した。

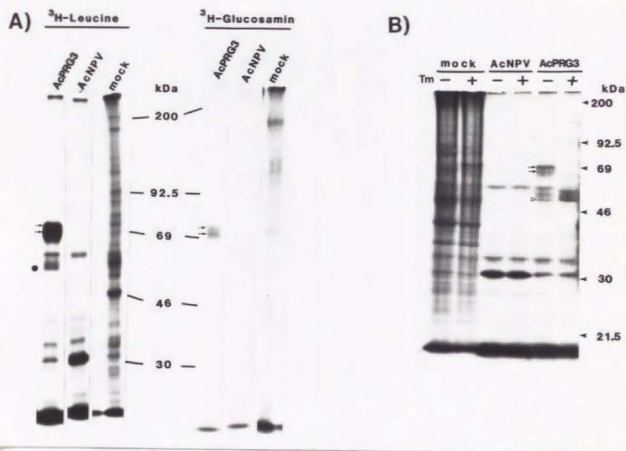


図14. gIII遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)感染昆虫細胞におけるgIIIの糖鎖付加  
 AcPRG3, 親バキュロウイルスのAcNPV, モック感染SF21AE細胞を $^3\text{H}$ グルコサミンおよび $^3\text{H}$ ロイシンによって標識したタンパク質のフルオログラム(A)と糖鎖付加抑制剤ツカマイシン処理(+ )および未処理(- ) $^3\text{H}$ ロイシン標識タンパク質のフルオログラム(B)。矢印( $\rightarrow$ )は72 kDaと87 kDaの糖鎖付加された合成gIIIタンパク質を示す(AおよびB)。糖鎖非付加gIII前駆タンパク質は55 kDaタンパク質として認められる(Aの●およびBの $\Delta$ )。



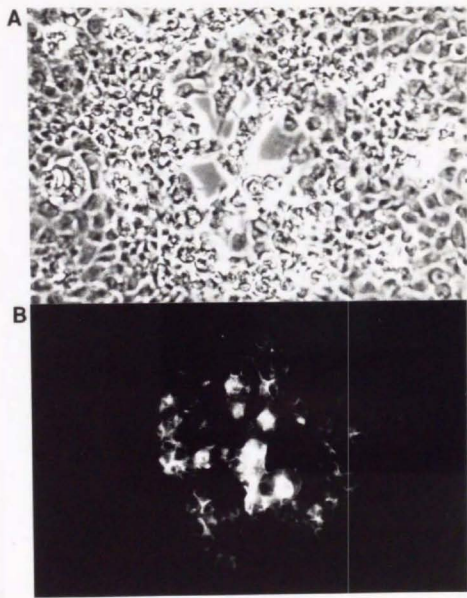


図15. 抗gIIIモノクローナル抗体(MA37)を用いたgIII遺伝子組換えワクチニアウイルス  
(rVV-gIII)感染RK-13細胞の免疫蛍光抗体法

rVV-gIII感染細胞の明視野顕微鏡像(A)とその蛍光抗体染色像(B)で、細胞変性効果が認められる部分に特異蛍光が認められる。

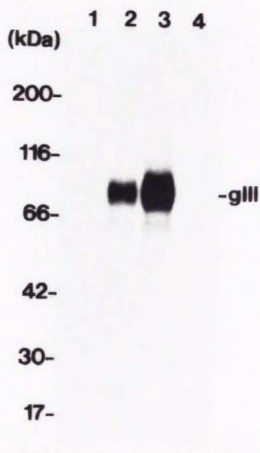


図16. 抗gIIIモノクローナル抗体(MA37)を用いたgIII遺伝子組換えワクチニアウイルス (rVV-gIII)感染細胞の放射性免疫沈降法

[ $^{14}\text{C}$ ]-グルコサミンによって標識した親ワクチニアウイルスのLC16m0株(レーン1), rVV-gIII(レーン2), オーエスキー病ウイルス山形S-81株(レーン3), モック(レーン4)感染RX-13細胞をモノクローナル抗体(MA37)を用い免疫沈降した。rVV-gIII(レーン2)とオーエスキー病ウイルス(レーン3)感染細胞では同分子量のバンドが認められる。

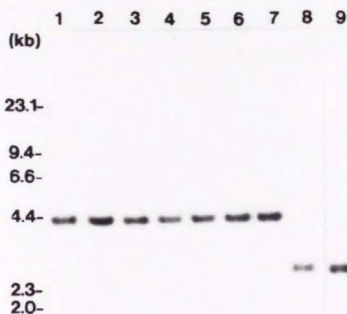


図17. gIII遺伝子のサザンブロット解析

6株の日本分離オーエスキー病ウイルス(レーン1から6)、山形S-81株(レーン7)、gIII遺伝子欠損オーエスキー病ウイルスのYd1G3-1(レーン8)とYd1G3-2(レーン9)の感染PK-15細胞から調製したDNAを *Pst*I で消化した後、pG3SプラスミドのgIII遺伝子(4.3 kbp *Pst*I断片)をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。両欠損変異株とも2.7 kbpのバンドとして検出され、1.6 kbpの *Xho*I断片が欠失したことを示している。

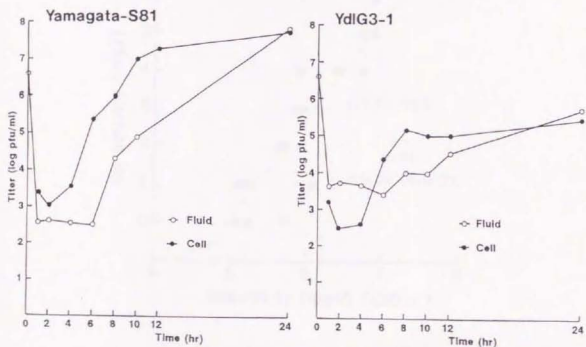


図18. gⅢ遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(Yd1G3-1)のPK-15細胞における増殖曲線  
親ウイルスの山形S-81株(左)とgⅢ遺伝子欠損ウイルスのYd1G3-1(右)を多重感染度1.0  
でPK-15細胞に接種し、液相と細胞相のウイルス力価を経時的に測定した。

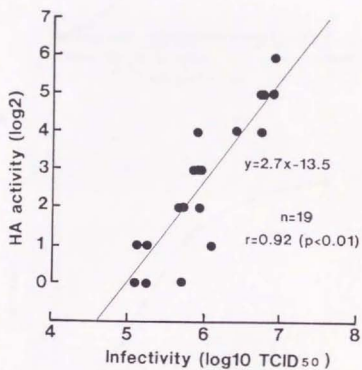


図19. オーエスキー病ウイルスの感染価とマウス赤血球凝集(HA)活性との相関

山形S-81株から調製した19のウイルスストックについて、HA活性(縦軸)と感染価(横軸)を調べた。HA活性と感染価との間には1%未満の危険率で正の相関関係が認められる( $n=19$ ,  $r=0.92$ ,  $y=2.7x-13.5$ )。

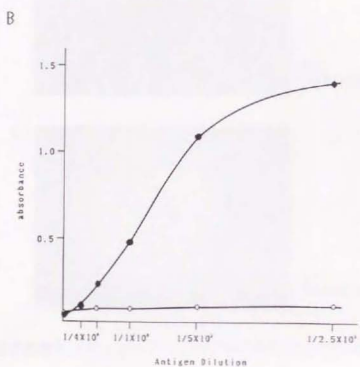
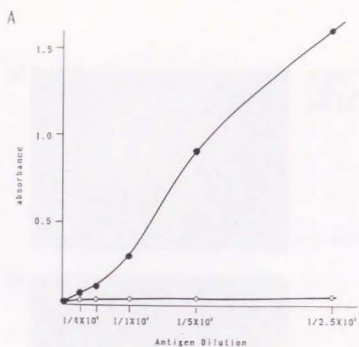


図20.  $\delta$ III遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)発現 $\delta$ IIIによる固相酵素免疫測定法

抗原としてAcPRG3感染細胞(●)あるいは現バキュロウイルスのAcNPV感染細胞抽出物(○)を、また抗体には1:500希釈のモノクローナル抗体MA37(A)あるいは1:100希釈のオースキー病ウイルス感染豚の血清(B)を用いた。横軸は抗原希釈倍数を、縦軸はOD値を示す。

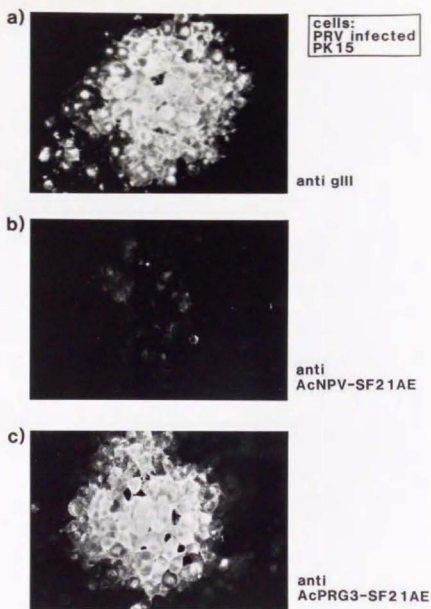


図21.  $\epsilon$ III遺伝子組換えバキュロウイルス(AcPRG3)発現 $\epsilon$ IIIの免疫血清を用いた免疫蛍光抗体法

アセトン固定したオーエスキー病ウイルス感染PK-15細胞を抗 $\epsilon$ IIIモノクローナル抗体MA37(a)、抗バキュロウイルスAcNPV感染SF21AE細胞免疫マウス血清(b)、抗AcPRG3感染SF21AE細胞免疫マウス血清(c)で反応させ、二次抗体にはFITC標識抗マウス免疫グロブリンG抗体を用いた。抗AcPRG3感染SF21AE細胞免疫血清(c)は抗 $\epsilon$ IIIモノクローナル抗体MA37(a)と同様の反応を示している。

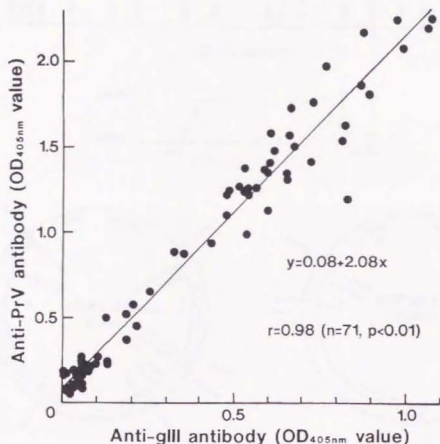


図22. 組換えワクチニアウイルス発現 $\delta$ IIIとオーエスキー病ウイルスを抗原とした固相酵素免疫測定法

71検体のオーエスキー病ウイルス感染豚血清を組換えワクチニアウイルス発現 $\delta$ IIIおよび全オーエスキー病ウイルスを抗原とする固相酵素免疫測定法によって調べた。両抗原に対するOD値の間に1%未満の危険率で正の相関関係が認められる( $n=71$ ,  $r=0.98$ ,  $y=2.08x+0.08$ )。



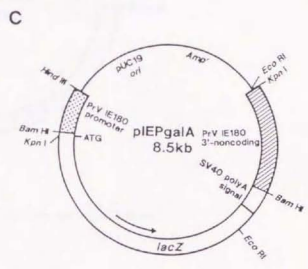
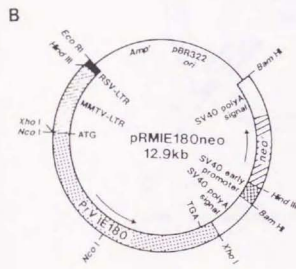
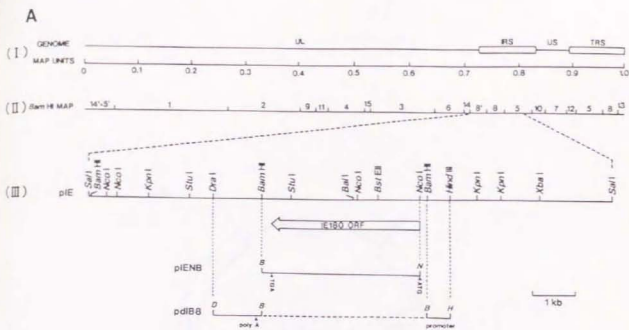


図23. オーエスキー病ウイルスIndiana S株のIE180遺伝子領域の構造と使用したプラスミドベクターの構築

Aはオーエスキー病ウイルスIE180遺伝子の物理地図と転写地図を示す。上段(I)はマップユニットを付したゲノムの構造、また中段(II)はIndiana S株ゲノムのBamHI物理地図を示す。下段(III)にはpIEプラスミドの物理地図とIE180遺伝子の転写領域(矢印のボックス)とpiENBおよびpdIB8プラスミドの構造を示した。BとCはそれぞれIE180遺伝子発現細胞作出のためのpRMIE180neoプラスミドとIE180遺伝子と大腸菌lacZ遺伝子の読み取り枠(ORF)とを置換するためのpiEPgalAプラスミドの遺伝子地図である。

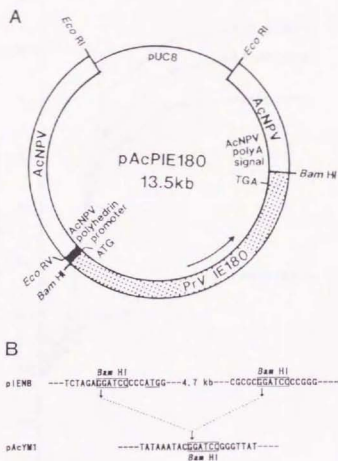


図24. IE180遺伝子発現組換えバキュロウイルスの作出に用いたpAcPIE180  
 プラスミドの構造

pAcPIE180プラスミドは、*Bam*HIの消化によりpIENBプラスミドから得た4.7 kbpのIE180遺伝子読み取り枠(ORF)をpAcYM1トランスフェクターの*Bam*HI切断部位に挿入することによって構築した(A)。BはIE180遺伝子ORFとpAcYM1との接続部の塩基配列で、ボックスと下線はそれぞれ*Bam*HI切断部位とIE180遺伝子ORFの翻訳開始部位を示す。

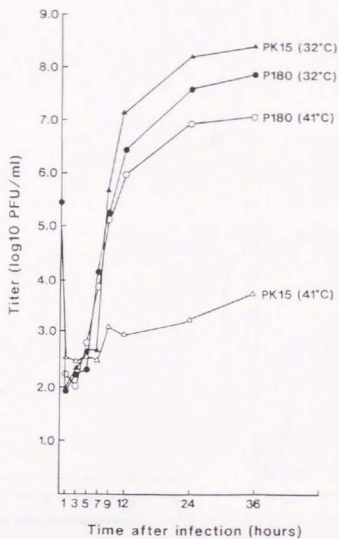
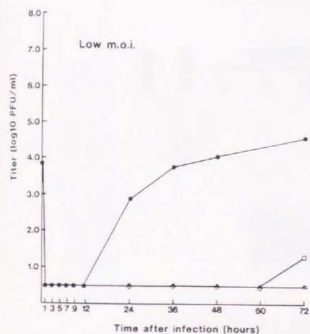


図25. オーエスキー病ウイルス温度感受性変異株tsG1株のP180細胞による相補  
 tsG1株を多重感染度0.1でPK-15細胞とP180細胞に接種し、32℃(許容温度)と41℃(非許容温度)で培養した。ウイルス力価の測定はPK-15細胞を用い32℃で行った。

A



B

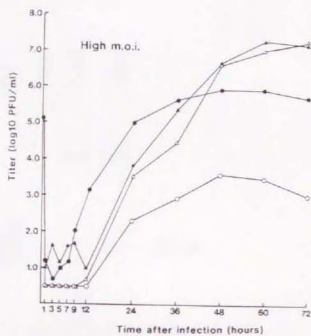


図26. P180細胞を用いて作出したIE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AY64)の増殖曲線

AY64をPK-15細胞(△と▲)とP180細胞(○と●)に低多重感染度(A)と高多重感染度(B)で接種し、37℃で培養した。経時的に培養液を採取し、液相のウイルス力価をPK-15細胞(△と○)あるいはP180細胞(▲と●)を用いて37℃で測定した。

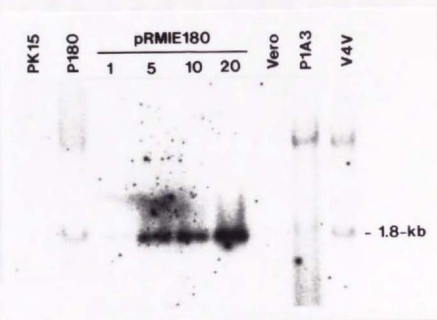


図27. IE180遺伝子をプローブとするP180, P1A3, V4V細胞DNAのサザンブロット解析

PK-15, P180, Vero, P1A3, V4V細胞から抽出したDNAとpRMIE180neoプラスミドのNcoI消化断片をpIENBプラスミドから調製した1.8 kbpのNcoI断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。数字はpRMIE180neo消化によって可視化された $3 \times 10^8$  bpの細胞DNA当たりのウイルスDNAのコピー数を示す。

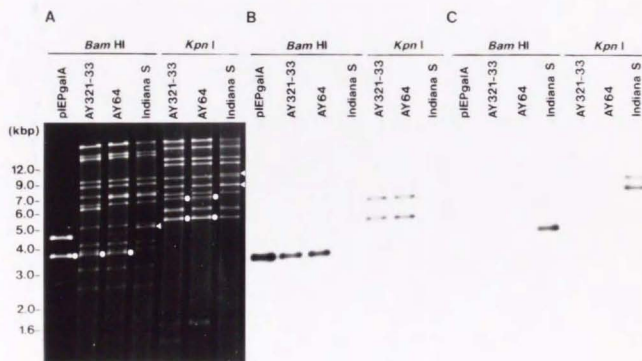


図28. I180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AY321-33,AY64)と親ウイルスの Indiana S株のゲノム解析

AY321-33,AY64,Indiana S株のDNAとpIEPgalaプラスミドを*Bam*HIあるいは*Kpn*Iによって消化し、0.6% アガロースゲルで電気泳動を行い臭化エチジウムで染色した(A)。分画されたDNA断片をブロッティング膜に転写し、<sup>32</sup>P標識したlacZ遺伝子(B)あるいはI180遺伝子(C)をプローブとしハイブリダイゼーションを行った。Aの▲と●で示されたバンドはそれぞれlacZ遺伝子とI180遺伝子を含むDNA断片を示す。

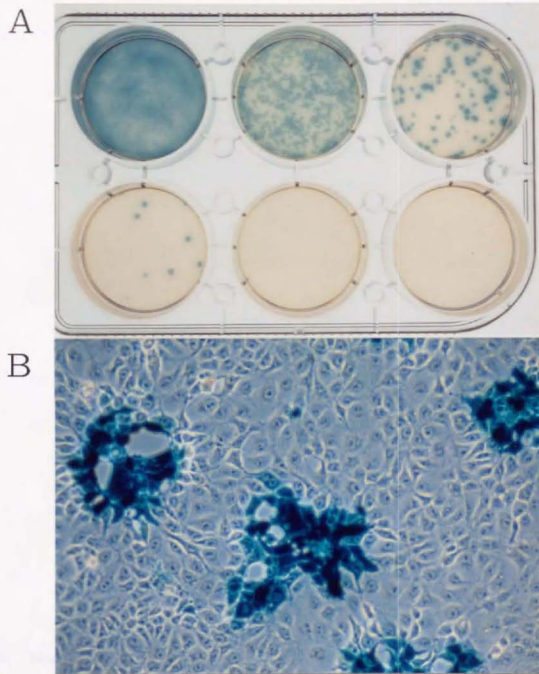


図29. X-Galで染色したIE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AY64)のプラーク

10倍希釈系列のウイルスをV4V細胞に接種し、形成されたプラークを200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-Galを含む0.6% アガロースで重層し染色した(A)。BはAY64感染V4V細胞を2% フォルムアルデヒドと0.2% グルタルアルデヒドの混合液によって固定し、1  $\text{mg}/\text{ml}$  X-Galで染色した標本の顕微鏡写真。

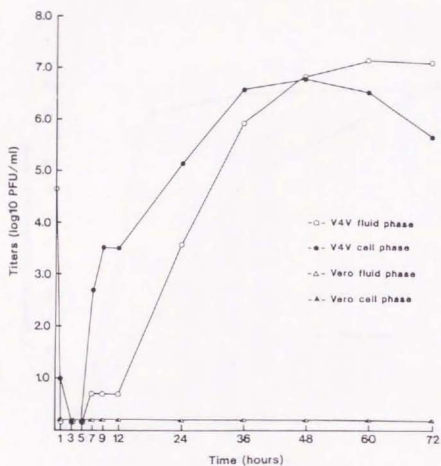


図30. Vero細胞とV4V細胞における1E180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AY64)の増殖曲線

AY64を多重感染度0.1でVero細胞(△と▲)とV4V細胞(○と●)に接種し、37℃で培養した。ウイルス材料を経時的に採取し、液相(○と△)と細胞相(●と▲)のウイルス力値をV4V細胞を用いて37℃で測定した。



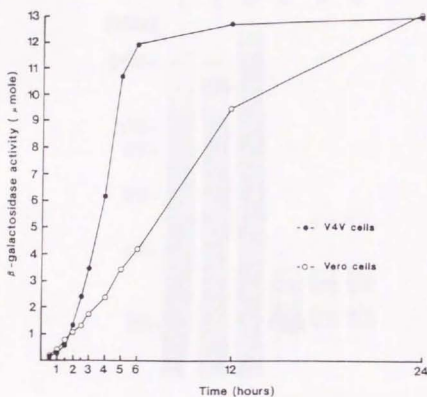


図31. IE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AV64)を感染VeroとV4V細胞における $\beta$ -galの発現

AV64を多重感染度0.1でVero細胞(O)とV4V細胞(●)に接種し、37℃で培養した。経時的に細胞試料を採取し、その抽出液の $\beta$ -gal活性を調べた。

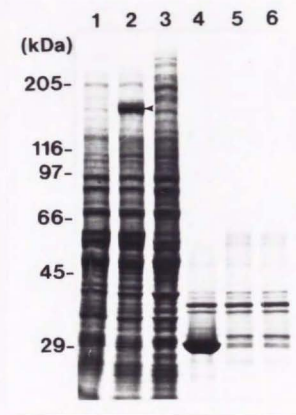


図32. IE180遺伝子組換えバキュロウイルス(rAcIE180)によって合成されたタンパク質

親バキュロウイルスのAcNPV(レーン1と4)あるいはrAcIE180(レーン2と5)、モック(レーン3と6)感染SF21AE細胞を細胞質(レーン1から3)と核(レーン4から6)に分画し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、ゲルをクマシー・ブリアント・ブルーで染色した。rAcIE180感染SF21AE細胞の細胞質分画に分子量180 kDaのタンパク質が認められる(レーン2, 矢印)。

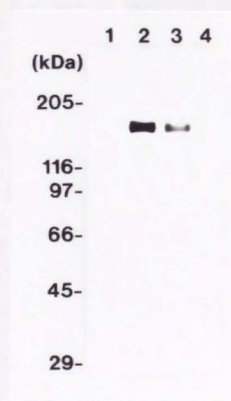


図33. IE180遺伝子組換えバキュロウイルス(rAcIE180)を感染させたSF21AE細胞の免疫プロット解析

親バキュロウイルスのAcNPV(レーン1)およびrAcIE180(レーン2)感染SF21AE細胞とサイクロヘキサミド処理したPrV感染PK-15細胞(レーン3)、対照のPK-15細胞(レーン4)から抽出した抗原液をSDS-PAGEで分画後、ブロッティング膜に転写し抗IE180ペプチド抗体と反応させた。

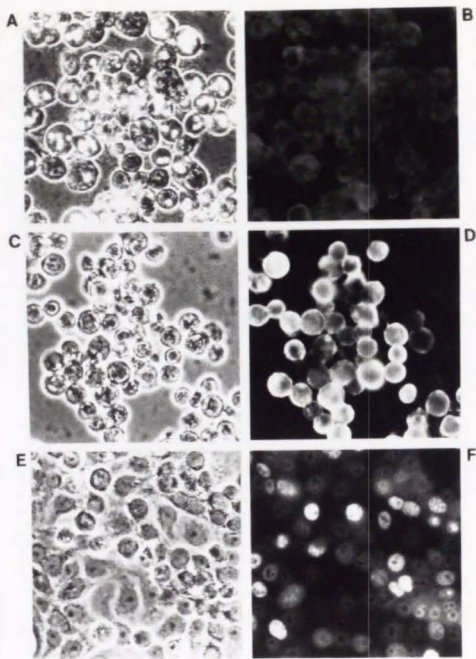
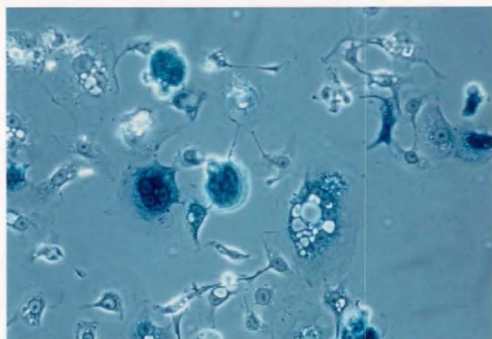


図34. 免疫蛍光抗体法によるIE180タンパク質の検出

親バキュロウイルスのAcNPV(AとB)あるいはIE180遺伝子組換えバキュロウイルスのrAcIE180(CとD)をSF21AE細胞に接種し、28℃で48時間培養した。また、オーエスキー病ウイルスをPK-15細胞に感染させ、サイクロヘキサミドで処理した(EとF)。細胞をアセトンで固定し、ウサギ抗IE180ペプチド抗体を用いて免疫蛍光抗体法を行った。左側の写真(A, C, E)と右側の写真(B, D, F)はそれぞれ位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真を示す。rAcIE180感染SF21AE細胞では細胞質に、またPrV感染PK-15細胞では核内に特異蛍光が認められる。

A



B

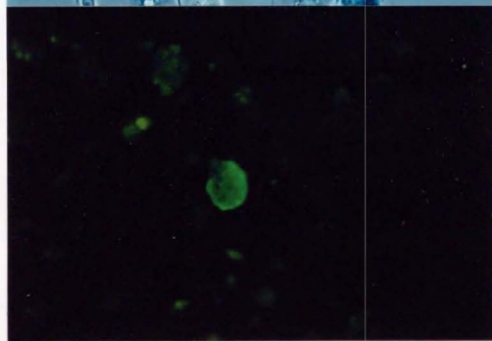


図35. 融合細胞のX-Gal染色と免疫蛍光抗体法

IE180遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス(AY64)感染Vero細胞とIE180遺伝子組換えバキュロウイルス(rAcIE180)感染SF21AE細胞を融合し、X-Gal染色(A)と抗gIIIモノクローナル抗体(MA37)を用いた免疫蛍光抗体法を行った(B)。融合細胞は円形化型の細胞変性効果を示し(A, 矢印)、同細胞は $\beta$ -gal(A)とオーエスキー病ウイルス抗原(B)とも陽性であった。





**Kodak Color Control Patches**

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

**Kodak Gray Scale**

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak