



Title	オーエスキー病ウイルス前初期蛋白の構造と機能
Author(s)	田原口, 智士
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第3914号
Issue Date	1996-03-25
DOI	10.11501/3112038
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51333
Type	theses (doctoral)
File Information	000000297230.pdf



[Instructions for use](#)

オーエスキー病ウイルス前初期蛋白の
構造と機能

田原口 智士

オーエスキー病ウイルス前初期蛋白の 構造と機能

田原口 智士

目 次

I. 緒 言	1
II. 材料および方法	
1. 細胞およびウイルス	7
2. ウイルスの精製	7
3. ウイルスDNAの抽出	8
4. 遺伝子クローニングに用いたプラスミド、細菌および培地	8
5. オーエスキー病ウイルス(ADV)遺伝子のクローニング	9
6. プラスミドDNAの調製	9
7. プラスミドの構築	
1) ADV前初期(IE)遺伝子のサブクローニング	10
2) 欠失IE遺伝子の作出	10
8. ウェスタンブロット	
1) COS-1細胞へのプラスミドDNAの導入	12
2) 細胞抽出液の調製	12
3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	17
4) ニトロセルロース膜への転写	17
9. IEおよび欠失IE遺伝子の無細胞系での転写および翻訳	
1) 鋳型DNAの調節	17
2) <i>in vitro</i> での転写	17
3) <i>in vitro</i> での翻訳	18

10. クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイ	
1) リポータープラスミドおよびエフェクタープラスミド	19
2) Vero細胞へのプラスミドDNAの導入	21
3) 細胞抽出液の調製	21
4) CATの定量	22
11. 間接蛍光抗体法	22
III. 結 果	
1. ADV IE遺伝子のサブクローニング	24
2. 欠失IE遺伝子の作出	24
3. IEおよび欠失IE遺伝子の発現	24
4. IE180および欠失IE180変異体のtkおよびgX遺伝子プロモーターに 対する転写活性化作用の解析	26
5. IE180および欠失IE180変異体のADV IE遺伝子プロモーターに 対する転写抑制作用の解析	30
6. E180の核への局在に關与する部位の決定	33
IV. 考 察	39
V. 要 約	47
謝 辞	50
文 献	51
英文抄録	60

I. 緒 言

オースキー病ウイルス(ADV)は、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペス亜科、ワリセロウイルス属の一員である(Roizman, 1995)。ADVは、豚、牛、綿羊、山羊、犬、猫、ミンク、キツネおよびウサギに自然感染する。マウス、ラット、モルモット、ハト、スズメおよびニワトリに実験感染が成立する(Wittmann, 1989)。豚はADVに対する感受性が最も高い動物で、幼若個体は重篤な神経症状を呈する。肥育豚では、軽い呼吸器症状を示し、感染を耐過した豚では増体重の低下がみられる。成豚では、感染が成立しても発病することは少なく、発病しても症状は軽い。このように耐過した豚や無症状キャリアがウイルスを排泄し、汚染を拡大する。また、妊娠豚が感染すると高率に死流産が発生する。豚以外の動物がADVに感染すると、ほとんどの場合、掻痒を主徴とする神経症状を示し、急性経過で死亡する。従って本ウイルス感染による家畜の経済損失と伴侶動物の被害が各国で問題となっている(Klugeら, 1992; Kit, 1994; Wittmann, 1989)。

本病を防除するためには、抗体陽性豚の摘発淘汰が有効とされてきた。すなわち、感染豚群の早期発見と、徹底的な淘汰によってはじめて本病の防除が成功する。しかし、ADVが侵入した後、濃厚汚染が進んだ地域ではその実施が困難になる。我国では、摘発淘汰による防疫対策の時機を失ったため、本病が常在化しつつある。現在、本病の治療法はなく、専らワクチンによる予防が図られている。これまでADVワクチンとして不活化ワクチン、培

養細胞継代弱毒生ワクチンおよび遺伝子欠損弱毒生ワクチンが開発された。これらのワクチンは発症を阻止するが感染を防御できない(van Oirschotら, 1990; Wittmann, 1989)。このため、豚群に ADV の存続を許す結果となっている。従って、本病に対して新たな防除戦略を開発し、展開する必要に迫られている。

Intracellular immunization 法は Baltimore(1988)によって提唱されたウイルスの複製阻止の原理に基づく遺伝子治療法である。著者はオーエスキー病に対する新たな防除戦略として本法に着目した。Intracellular immunization 法をオーエスキー病に応用するためには、まず ADV 遺伝子の発現調節機構を明らかにして、ADV の増殖を抑制する因子を決定する必要がある。

ADV のゲノムは分子量 91×10^6 ダルトンの線状二本鎖 DNA で、UL 領域(long unique region)、US 領域(short unique region)および US 領域を挟む 1 対の倒置反復領域から成る(図 1)(Ben-Poratら, 1979)。ADV のゲノムは約 80 種の蛋白をコードしている。ヘルペスウイルスの遺伝子発現はカスケード様式によって制御される。感染後の発現時期により遺伝子は、1) 最初に発現される前初期(IE)遺伝子群、2) IE 遺伝子産物による調節を受け次に発現される初期(E)遺伝子群、さらに、3) IE および E 遺伝子産物による調節を受ける後期(L)遺伝子群の 3 群に分けられる(Honess and Roizman, 1975)。つまり、IE 遺伝子の転写や翻訳が抑制された場合、E 群および L 群遺伝子の転写も抑制され、結果的にウイルス粒子形成が阻害される。従って、最も初期に発現する IE 遺伝子の発現調節機構と IE 遺伝子産物の遺伝子発現調節に関与する機能を明らかにする必要がある。

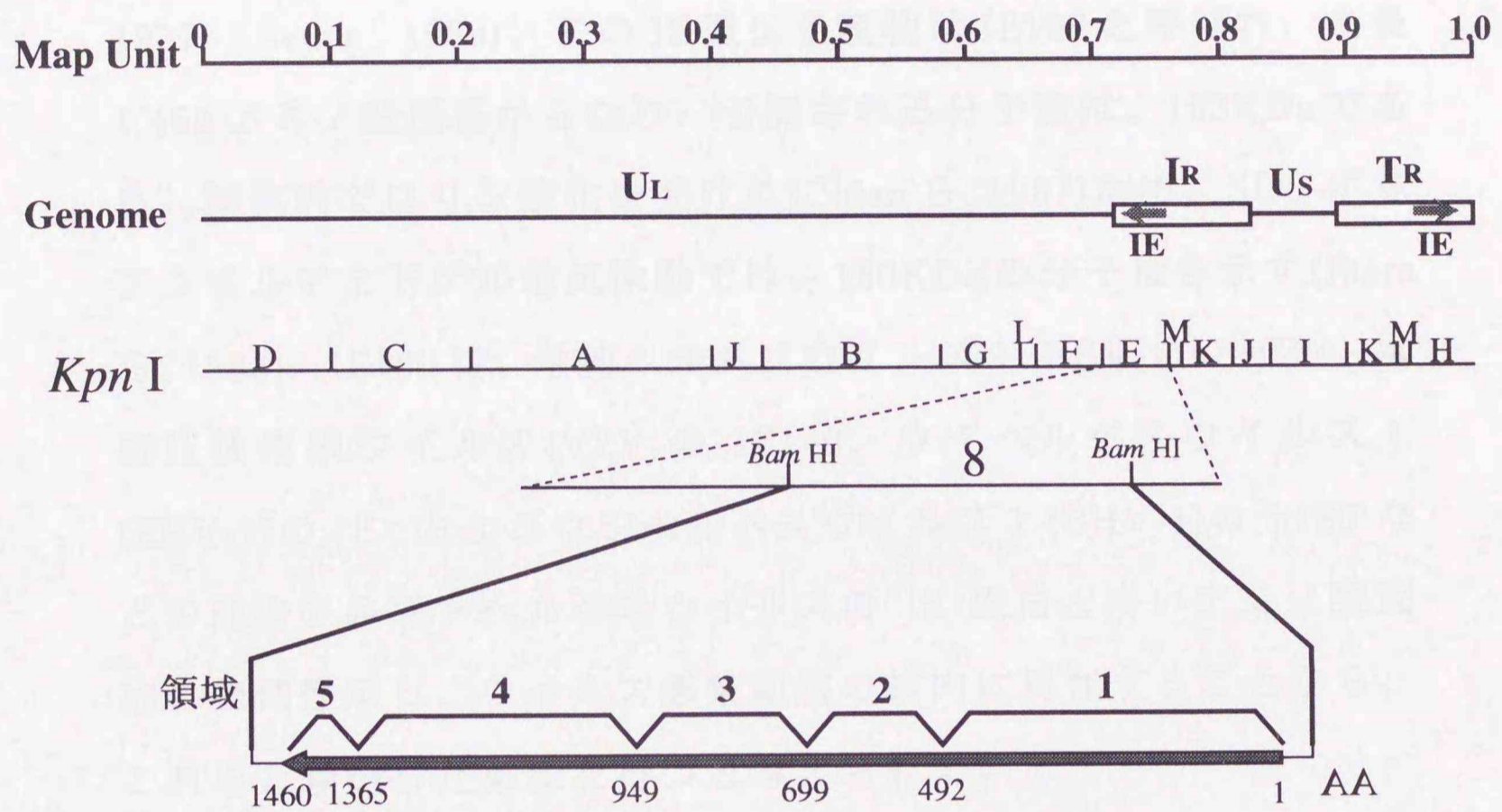


図1. ADVゲノムとIE180の模式図

ADVゲノムとその制限酵素*Kpn*I切断地図。■は、IE180のORFを表す。領域はCheung(1989)に従い、ADV IE180とHSV-1 ICP4との相同性から導き出した。

ADV の IE 遺伝子は、現在 1 つだけが確認されている (Ihara ら, 1983)。それは、倒置反復配列内に存在する (図 1) (Campbell and Preston, 1987; Cheung, 1988)。IE 遺伝子からの転写産物はスプライシングを受けない約 5.6kb の mRNA である (Campbell and Preston, 1987; Cheung, 1988)。この IE 遺伝子産物は IE180 と呼ばれ、全長 1,460 アミノ酸残基からなり、予測される分子量は、153KDa である。細胞内ではリン酸化を受ける (Chlan ら, 1987) ため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、180KDa の分子量を示す (Ihara ら, 1983)。IE180 は、単純ヘルペスウイルス 1 (HSV-1) の ICP4、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の IE140、ウマヘルペスウイルス 1 (EHV-1) の IE1 およびウシヘルペスウイルス 1 (BHV-1) の p180 などの他のアルファヘルペスウイルスの IE 蛋白と高いアミノ酸配列の相同性を示し、ウイルス感染細胞の核内に局在することから、これらと類似した機能を持つと考えられている。

IE180 の機能として、1) ADV の E 群や L 群遺伝子およびヒト β グロビンやアデノウイルスなどの異種の遺伝子の転写活性化 (Feldman ら, 1982; Green ら, 1983; Thali ら, 1990)、2) IE 遺伝子の転写抑制 (Ihara ら, 1983)、および 3) アルファヘルペスウイルス IE 遺伝子の転写開始部位の近傍に存在する特定の塩基配列 (ATCGTCNNNNYCGRC; R はプリン、Y はピリミジン、N は不定) (Wu and Wilcox, 1991)、一本鎖 DNA (Chlan ら, 1987) およびクラス II プロモーター (Cromlish ら, 1989) への結合性、が明らかにされている。

IE180 の構造は、HSV-1 や VZV の IE 蛋白とのアミノ酸配列の相同性から 5 つの領域 (図 1) に分けられ、2 および 4 の領域は相互に高い相同性を示す (Cheung, 1989)。領域 2 は DNA の結合に必要な領域である (Wu and Wilcox, 1991)。また、アミノ (N) 末端の 34 酸性アミノ酸残基が遺伝子の転写活性化に必要である (Martin ら, 1990)。しかし、転写調節に必要な領域および核への移行に必要な部位はわかっていない。高分子蛋白の場合、分子中の核移行シグナルが核膜の受容体に結合し、エネルギー依存的に核内に移行するものと考えられている。また低分子蛋白の場合、核移行シグナルが無くても、細胞質から拡散によって核膜を通過し、核内の構成成分と結合し核に留まると予測されている (Breeuwer and Goldfarb, 1990; Dingwall and Laskey, 1986; Moreland ら, 1985)。核への移行機序がよく研究されている SV40 T 抗原の核移行シグナルの最小単位は PKKKRKV である。このように、蛋白の核移行シグナルは、リジンや アルギニンのような塩基性アミノ酸に富んだクラスターから成り立っている (Kalderon ら, 1984a; 1984b; Richardson ら, 1986)。HSV-1 の ICP4 も同様に塩基性アミノ酸から成るクラスター (RKRK) が 727~730 番目に存在し、これが核移行シグナルと考えられている (DeLuca and Schaffer, 1988; Mullen ら, 1994; Paterson and Everett, 1988)。ADV の IE180 分子上にも、これらとよく似た塩基性アミノ酸に富んだクラスター (RRKRR) が 464~468 番目と 930~934 番目に存在する (Cheung, 1989)。しかし、IE180 ではどちらのクラスターが核への移行に関与しているのか判っていない。

本研究ではまず、ADV 遺伝子の発現において最も重要と考えられる IE180 の構造と機能を解明するために、一連の欠失 IE 遺伝子を作成した。次にこれらを用いて IE180 の転写調節に関わる領域を決定した。

II. 材料および方法

1. 細胞およびウイルス

ブタ腎由来 CPK 細胞および ADV YS-81 株は、農林水産省 家畜衛生試験場の清水実嗣博士から分与された。また、アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞および COS-1 細胞はラッシュ大学の M. Peeples 博士および K.C. Gupta 博士からそれぞれ分与された。

CPK 細胞の培養には、イーグルの最少必須培地 (MEM; 日水製薬) に仔ウシ血清を 10% 加え、Vero 細胞には、RPMI1640 培地 (日水製薬) にウシ胎子血清を 5% 加えたものを使用した。COS-1 細胞には、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; ギブコ-BRL 社) にウシ胎子血清を 10% 加え使用した。それぞれの細胞は 5%CO₂ 下 37°C で培養した。Vero 細胞および COS-1 細胞へのプラスミド DNA 導入の際には、Opti-MEM 培地 (ギブコ-BRL 社) およびウシ胎子血清を 10% 含む DMEM を使用した。すべての培地にペニシリン G カリウムを 100 単位/ml、硫酸ストレプトマイシンを 0.1mg/ml、Opti-MEM を除く培地にゲンタマイシンを 40μg/ml となるように加えた。

ADV は、CPK 単層培養細胞に接種し吸着させた後、血清を含まない培地で培養し増殖させた。

2. ウイルスの精製

ADV YS-81 株を CPK 細胞に感染させ、細胞変性効果を確認後、培養上清を 55,000×g で 90 分間遠心した。沈渣を 0.08% アジ化ナ

トリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; pH7.4) に一夜浸漬した。その浮遊液を 0~50% ショ糖による密度勾配に重層し、70,000×g で 2 時間遠心した。遠心後形成されたウイルスバンドを回収し、PBS で希釈後 200,000×g で 90 分間遠心した。沈渣を PBS に再浮遊し、精製ウイルスとした。

3. ウイルス遺伝子 DNA の抽出

ウイルス遺伝子 DNA の抽出は、Pellicer らの方法(1978)に従って行った。すなわち、精製ウイルスを 0.1M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl (pH7.5) に浮遊し、これにリボヌクラーゼ A (RNase A ; シグマ社) を 40µg/ml となるように加え 37℃ で 30 分間反応させた。次にプロテイナーゼ K (ベーリンガー・マンハイム社) を 250µg/ml となるように加え 37℃ で 60 分間反応させた。その後、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を 0.5% となるように加え 37℃ で 2 時間反応させた。この反応液をフェノール溶液 (フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25:24:1) で 2~3 回処理し、クロロホルム溶液 (クロロホルム : イソアミルアルコール = 24:1) 処理を行った。水層に DNA を抽出しエタノール沈殿法により DNA を回収した。この DNA を、1mMEDTA、10mM Tris-HCl ; pH8.0 に溶解した。

4. 遺伝子クローニングに用いたプラスミド、細菌および培地

プラスミドベクターとして pGEM-4Z (プロメガ社)、pUC18 (ベーリンガー・マンハイム社)、pUC19 (ベーリンガー・マンハイム社)、pCAT-Basic (プロメガ社) および pcDNA1/Neo (インビ

トロゲン社) を用い、宿主細菌として *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 JM109 株(プロメガ社)、HB101 株(プロメガ社) および MC1061/P3 株(インビトロゲン社) を用いた。

E. coli の培養には、2×YT 液体培地または M9 合成培地およびこれらに 1.5% Agar を加えた寒天平板培地を用いた。また、必要に応じて以下の試薬を加えて用いた。アンピシリンナトリウムを 50 μ g/ml、塩酸テトラサイクリンを 7.5 μ g/ml、硫酸カナマイシンを 40 μ g/ml、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドール- β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) を 0.004% およびイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を 0.2mM である。

5. ADV 遺伝子のクローニング

ADV 遺伝子 DNA を *Kpn*I または *Bam*HI で切断し、DNA 断片をプラスミドベクター pGEM-4Z または pUC19 に T4DNA リガーゼを用いて挿入した。この組み換えプラスミドを、*E. coli* K12 JM109 株に導入し、形質転換した菌を選択した。各々のコロニーを培養して得られた菌体からプラスミドを抽出し、*Kpn*I または *Bam*HI で切断後 0.8% アガロースゲル電気泳動で挿入 DNA 断片を確認した。

6. プラスミド DNA の調製

プラスミド DNA は、Haltiner らの方法 (1985) に従い調製した。組み換えプラスミドを導入した菌を、M9 合成培地 10ml に 100 μ l の 20% カザミノ酸 および 10 μ l のアンピシリンナトリウム (50mg/ml) を加えた培地で、波長 600nm での吸光度が 0.5~1.0

に達するまで 37℃ で振盪培養した。その後、50 μ l のクロラムフェニコール (34mg/ml) を加え、37℃ で一夜培養した。この菌を 4℃ で 7,000 \times g、5 分間遠心して回収した。回収した菌を、50mg/ml のリゾチーム 50 μ l を含む 750 μ l の STET 溶液 (50mM EDTA, 5% Triton-X100, 8% ショ糖, 50mM Tris-HCl; pH8.0) に溶解し、沸騰水中で 40 秒間加熱処理後、4℃ で 12,000 \times g、15 分間遠心した。上清をフェノール溶液およびクロロホルム溶液で処理し DNA を水層に抽出し、2-プロパノールで DNA を沈殿させ回収した。この DNA を 20 μ g の RNaseA を含む滅菌蒸留水 150 μ l に溶解し、37℃ で 30 分間 RNA を消化した。その後、再びフェノール溶液およびクロロホルム溶液処理により水層に DNA を抽出し、エタノール沈殿法により DNA を回収した。この DNA を 1mg/ml になるように滅菌蒸留水に溶解した。

7. プラスミドの構築

1) ADV IE 遺伝子のサブクローニング

クローニングの過程を図 2 に示した。ADV 遺伝子 DNA からクローニングした *Kpn*I 断片のうち、IE 遺伝子を含む *Kpn*I-E 断片を有する組み換えプラスミドを *Bam*HI で切断し、得られた *Bam*HI-8 断片をプラスミドベクター pGEM-4Z (pG/IE) および真核生物発現ベクター pcDNA1/Neo のサイトメガロウイルス IE 遺伝子プロモーターの下流に挿入した (pc/IE)。

2) 欠失 IE 遺伝子の作出

欠失 IE 遺伝子の作出には、pG/IE および pc/IE を用いた。3'末端

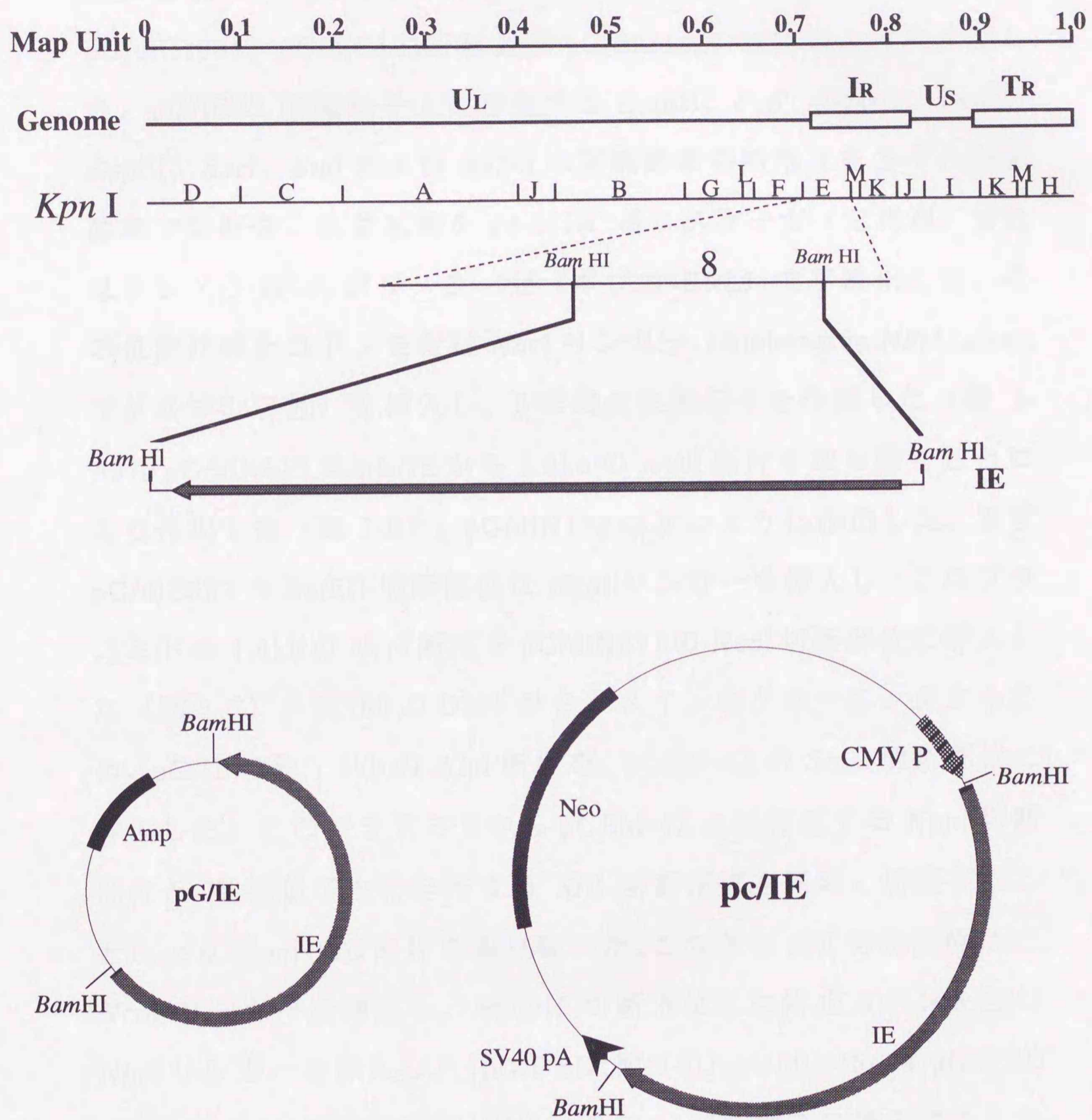


図2. IE180遺伝子のクローニング

*Kpn*I E断片内のIE180遺伝子を含む*Bam*HI 8断片をpGEM4ZおよびpcDNA1/Neoの*Bam*HI切断部位に組み込んだ。pcDNA1/Neoは真核細胞で発現するようにサイトメガロウイルスのプロモーター (◀◀◀) およびSV40のポリAシグナル (◀) を持っている。

欠失遺伝子の pG/d1C132、pG/d1C333、pG/d1C629、pG/d1C900、pG/d1C1081、pG/d1C1230 および pG/d1C1437 は次のように作出した。pG/IE の IE 遺伝子上に存在する *BstEII*、*PstI*、*DraIII*、*BssHII*、*BspEI*、*SacI*、*StuI* および *BatXI* の制限酵素切断部位を各々の制限酵素で切断後、粘着末端を T4 DNA ポリメラーゼ（宝酒造）またはクレノウ DNA ポリメラーゼ（ギブコ-BRL）で平滑化した。その位置に終止コドンを含む *NheI* リンカー（Amber stop *NheI* linker; ファルマシア社）を挿入し、3'末端欠失遺伝子を作成した（図 3-A）。pG/d1N617 は pG/IE から 1.8kb の *NcoI* 断片を取り除くことにより作成した（図 3-B）。pG/d1N132 は次のように作成した。まず pG/d1C629 の *BstEII* 切断部位に *NcoI* リンカーを挿入し、このプラスミドの 1.4kb の *NcoI* 断片を pG/d1N617 の *NcoI* 切断部位に挿入した（図 3-C）。IE180 の DNA 結合ドメインをクローニングするため、pG/IE の約 1.1kb の *AluI* 断片を、pGEM-4Z の *SmaI* 切断部位に挿入した。このプラスミドから pGEM-4Z 上に存在する *KpnI* 切断部位と IE 遺伝子上に存在する *SfiI* 切断部位を同時に切断することにより *KpnI-SfiI* 断片を取り除いた。このあと *SfiI* 切断部位には、*NcoI* リンカーを挿入し、*BamHI* 切断部位には終止コドンを含む *NheI* リンカーを挿入した（pG/DBD; 図 3-D）。pG/d1N454 は pG/DBD の 0.5kb の *NcoI* 断片を pG/d1N617 の *NcoI* 切断部位に挿入することにより作成した（図 3-E）。pG/d1N454-C1081 は次のように作成した。pG/d1N454 の 0.6kb の *SaII-DraIII* 断片を pG/d1C1081 の *SaII-DraIII* 断片を除いた部位に挿入した（図 3-F）。pG/IE Δ 333-575 は pG/IE を *PstI* で切断し約 0.7kb の *PstI* 断片を取り除いた後、再結合することにより作成した（図 3-G）。pG/IE Δ 900-950 は次の

ように二段階の操作で作出した。pG/dlC900 の *Bss*HII 切断部位に *Eco*RI リンカー(pG/dlC900-BE)を、pG/IE の *Bsp*EI 切断部位にも *Eco*RI リンカーを挿入した(pG/IE-BE)。次に、pG/IE-BE の 1.6kb の *Eco*RI 断片を pG/dlC900-BE の *Eco*RI 切断部位に挿入した(図 3-H)。pG/IE Δ 333-575&900-950 は、pG/IE Δ 333-575 の *Nco*I 断片を pG/IE Δ 900-950 の本来の *Nco*I 断片を除いた部位に挿入し作出した(図 3-I)。すべての欠失 IE 遺伝子を、真核細胞で発現できるように pcDNAI/Neo に挿入した。

8. ウェスタンブロット

1) COS-1 細胞へのプラスミド DNA の導入

6 穴プレートの各穴において培養面の約 40~50%を覆うまで COS-1 細胞を培養した。マイクロチューブ内で 5μg のプラスミド DNA を含む溶液に、Opti-MEM を加えて全量を 100μl とした。ポリスチレンチューブに Lipofectin 試薬(ギブコ-BRL 社) 5μl と Opti-MEM 95μl を加え 100μl とした。このチューブに DNA 溶液 100μl を加え、軽く混和し室温に 15 分間静置後、0.8ml の Opti-MEM を加え、全量を 1ml とした。細胞を Opti-MEM で 2 回洗浄後、静置しておいた DNA-Lipofectin 溶液を細胞に滴下した。5%CO₂ 下、37℃に 24 時間静置後、DMEM 培地 2ml と置換し、さらに一夜培養した。

2) 細胞抽出液の調製

DNA 導入 48 時間後に細胞を PBS で洗浄し、ピペティングで剥離してマイクロチューブに回収した。これを 30 秒間の超音波処

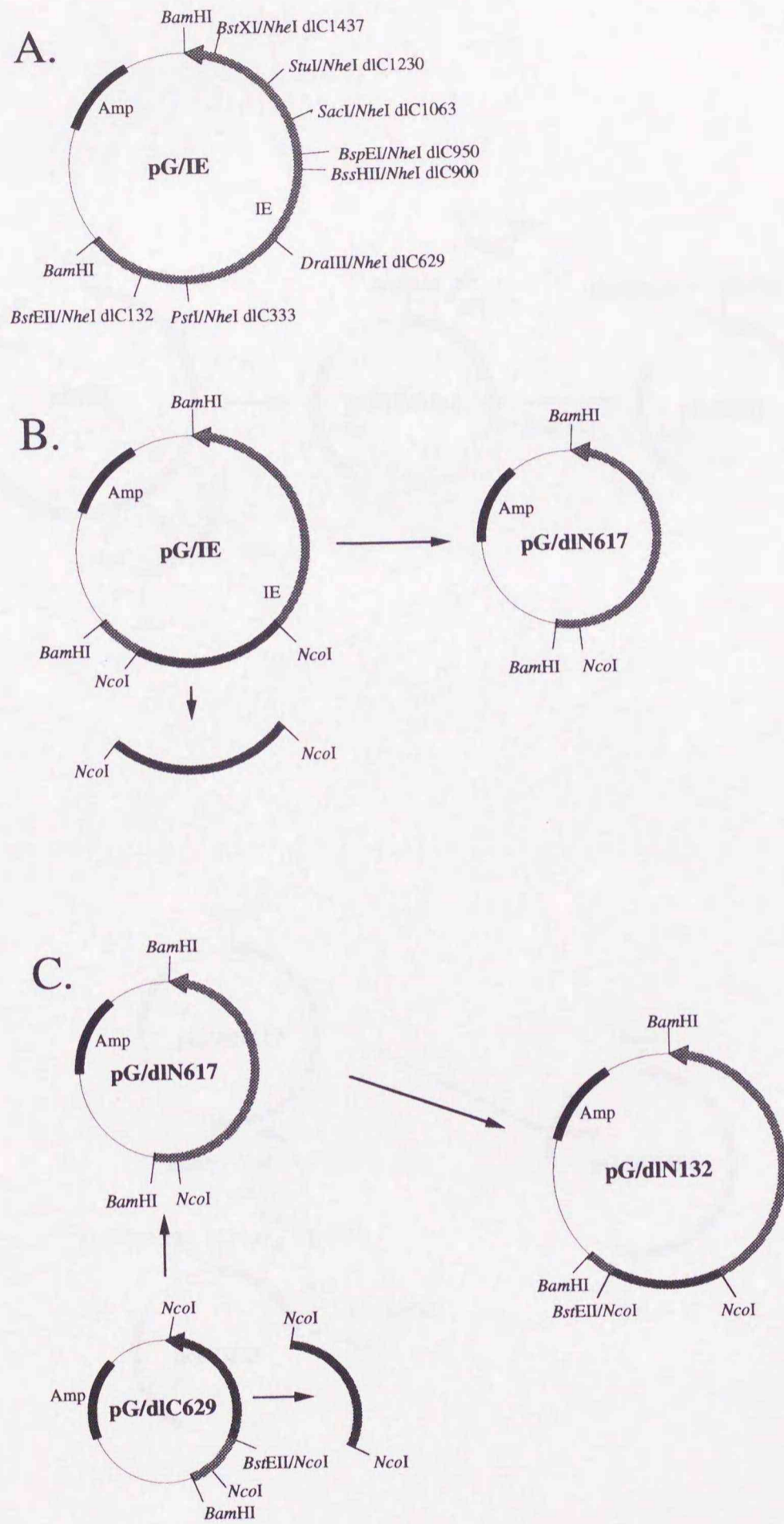
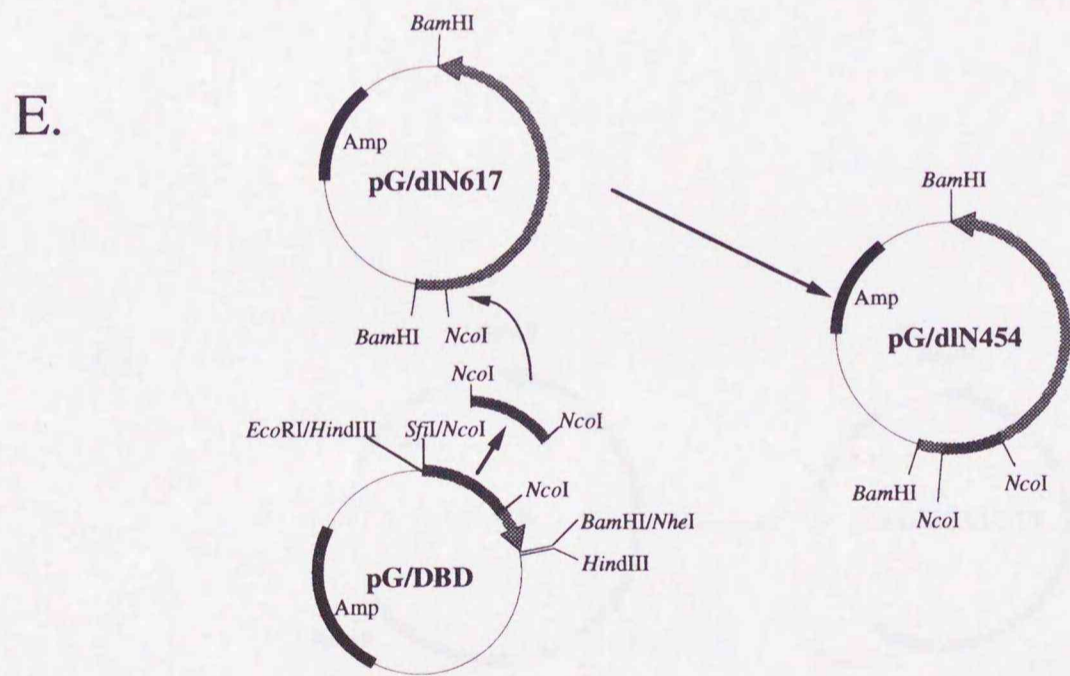
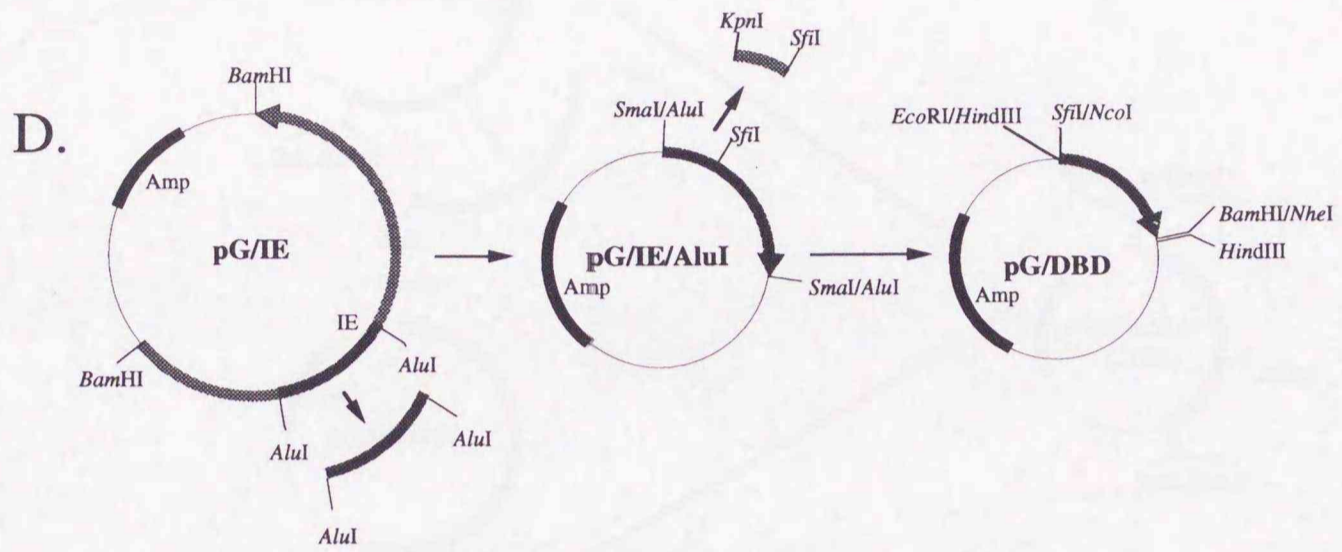
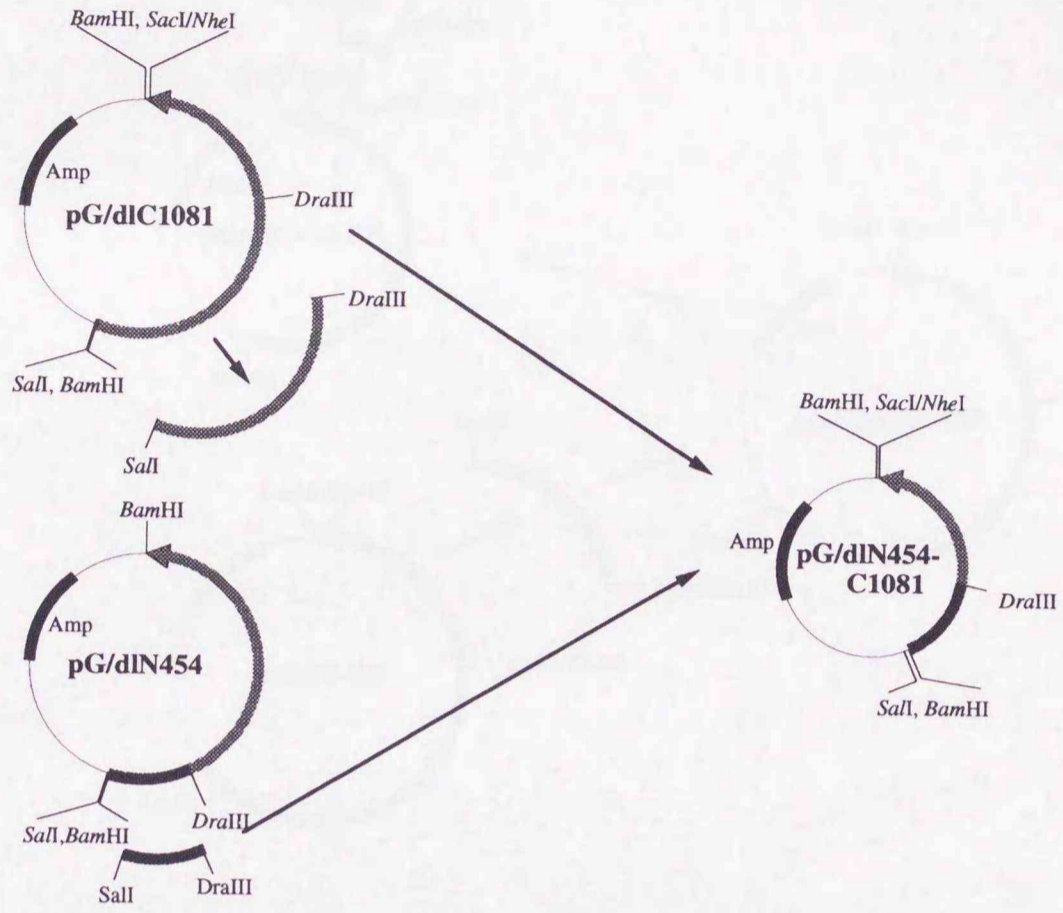


図3-A~I. 欠失IE180変異体発現プラスミドの作出過程

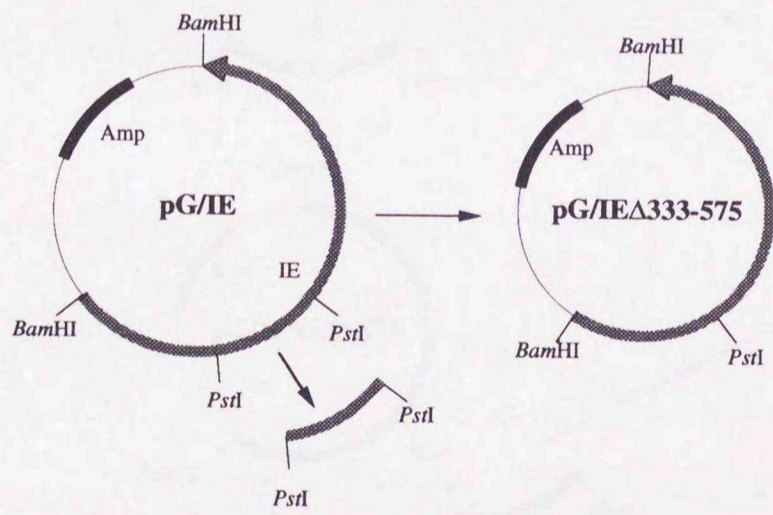
A. C末端欠失IE180変異体、B. dIN617、C. dIN132、D. DBD、E. dIN454、
F. dIN454-C1081、G. IE Δ 333-575、H. IE Δ 900-950、I. IE Δ 333-575&900-950



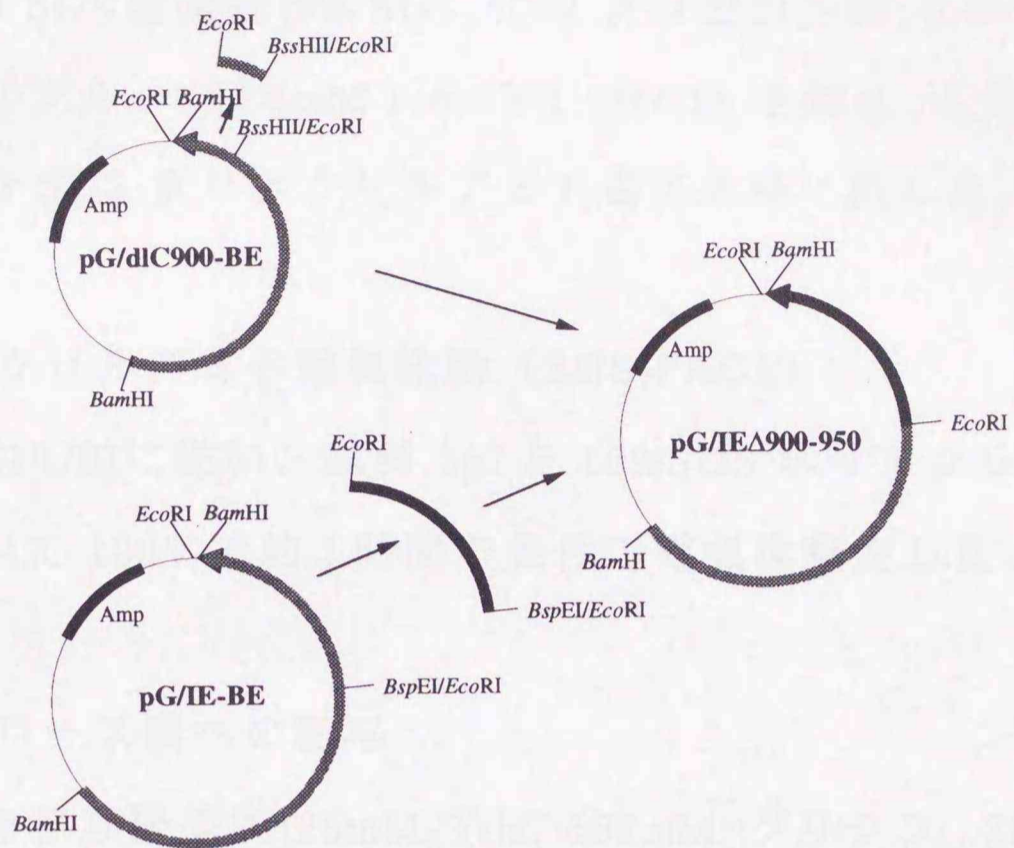
F.



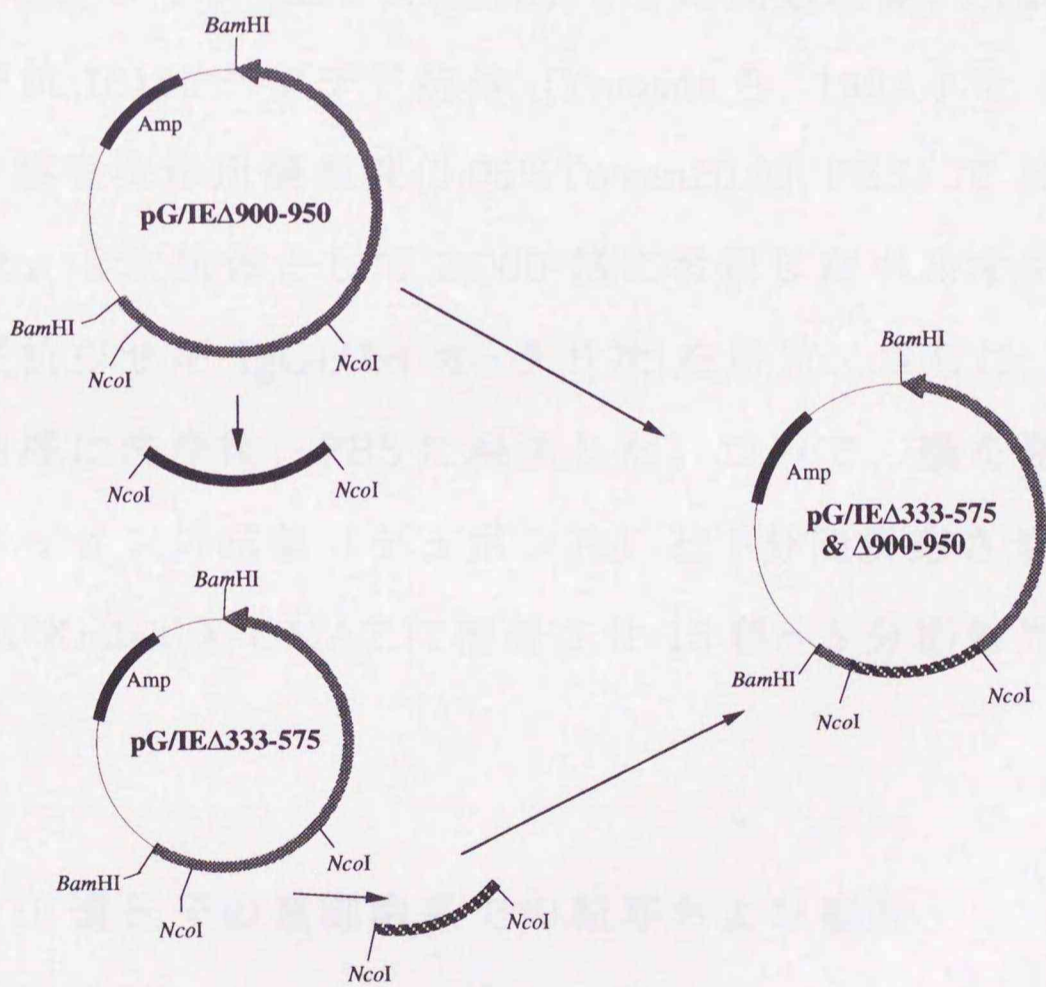
G.



H.



I.



理により細胞を破碎し、4℃で 12,000×g、5 分間遠心した。この上清に 2×試料用 SDS 緩衝液(4% SDS, 50% グリセロール, 0.005% ブロムフェノールブルー, 12.5mM Tris-HCl; pH7.5) を加え、5 分間煮沸した。これを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。

3) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemili の方法(1970)に従い、試料 5μl を 10%SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて 100V で約 1 時間の条件で電気泳動をした。

4) ニトロセルロース膜への転写

泳動後のゲルを転写緩衝液(25mM Tris, 192mM グリシン, 20% メタノール) で平衡後、100V で 1 時間ニトロセルロース膜に転写した。転写した膜をブロック・エース(雪印) で 1 時間処理後、5,000 倍希釈したウサギ抗 IE180 ペプチド抗体 (Yamada ら, 1994) と 1 時間反応させた。膜を洗浄用緩衝液(0.05%Tween20 加 PBS) で 15 分間 4 回洗浄した。2 次抗体として 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG(バイオ・ラド社)を用い、さらに 1 時間反応した。同様に洗浄後、PBS に浸漬した。ついで、膜を発色基質溶液のルネッサンス試薬 (デュポン社) と 1 分間反応させ、膜を X 線フィルム Kodak X-OMAT に密着させ 15 秒~5 分間露光させ、現像した。

9. IE および欠失 IE 遺伝子の無細胞系での転写および翻訳

1) 鋳型 DNA の調製

IE 遺伝子および欠失 IE 遺伝子を挿入した pGEM-4Z 5μg を

EcoRI で切断した。これをフェノールおよびクロロホルム溶液で処理後、エタノールで DNA を沈澱した。この DNA 断片を 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、鋳型 DNA とした。

2) *in vitro* での転写

10mM ジチオスレイトール (DTT)、1mM ATP、CTP、UTP、0.05mM GTP、16 μ g の CAP 構造類似体 [m7G(5')ppp(5'')G] (NEB 社)、20 単位の RNasin (東洋紡) を含む転写用緩衝液 (40mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 5mM NaCl, 2mM Spermidine, 20mM DTT; pH7.5) に 1 μ g の鋳型 DNA および 1 単位の T7RNA ポリメラーゼ (ギブコ-BRL 社) を加え、全量を 20 μ l とした。37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、2 μ l の 10mM GTP を加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。反応後、25 μ g の tRNA を加え、滅菌蒸留水で全量を 50 μ l とし、フェノールおよびクロロホルム溶液処理をした。RNA を含む水層を 3 倍量のエタノールで沈澱させた。

3) *in vitro* での翻訳

メチオニンを除く 100 μ M アミノ酸溶液、250mM 酢酸カリウム溶液、10mM 酢酸マグネシウム溶液、Met ³⁵S label (10 μ Ci/ μ l, ARC 社) および滅菌蒸留水を各々 1 μ l ずつ加え、さらに 2 μ l の RNA 溶液およびウサギ網状赤血球溶解液 (プロメガ社) を加えて、30 $^{\circ}$ C で 90 分間反応させた。反応後、10 μ l の 2 \times 試料用 SDS 緩衝液を加え、5 分間煮沸し SDS-PAGE に供した。

試料 5 μ l を 10%SDS アクリルアミドゲルを用いて 20mA, 約 3 時間の条件で電気泳動をした。ゲルを 20%メタノール-10%酢酸溶液で固定し、ゲルドライヤーで乾燥させた。乾燥させたゲルを X 線フィルム Kodak X-OMAT (コダック社) に対して、一夜あるい

は 2~3 日間露光し現像した。

10. クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイ

1) リポータープラスミドおよびエフェクタープラスミド

ADV の IE 遺伝子のプロモーターを CAT 遺伝子上流にもつ pRW7CAT (Vlcek ら、1990)、ADV のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子のプロモーターを CAT 遺伝子上流にもつ ptk_s/CAT および ADV の糖蛋白質の 1 つである gX 遺伝子のプロモーターを CAT 遺伝子上流に持つ pgX/CAT をリポータープラスミドとして用いた。pRW7CAT はチューリッヒ大学の M.Schwyzler 博士から分与された。

ptk_s/CAT は、次のように作出した。ADV *Bam*HI-9 断片内に存在する tk 遺伝子のプロモーター領域を含む *Sph*I-*Bam*HI 断片を pUC18 に挿入した (pUC18/tkP)。次にこのプラスミドの *Eco*RI 切断部位を平滑化した後、*Hind*III リンカーを挿入し *Hind*III 切断部位を構築した。この tk 遺伝子プロモーターを含む 0.4kb の *Hind*III 断片を pCAT-Basic の CAT 遺伝子上流に挿入した (図 4)。

pgX/CAT は、ADV *Kpn*I-J 断片内に存在する gX 遺伝子のプロモーター領域を含む *Sal*I-*Bam*HI 断片を、まず pGEM-4Z に挿入し (pG/gXP)、このプラスミドの *Sal*I-*Xba*I 断片を pCAT-Basic に挿入することにより作出した (図 4)。

エフェクタープラスミドとして IE180 を発現する pc/IE と欠失 IE180 変異体を発現するプラスミドならびに対照として pcDNAI/Neo を用いた。

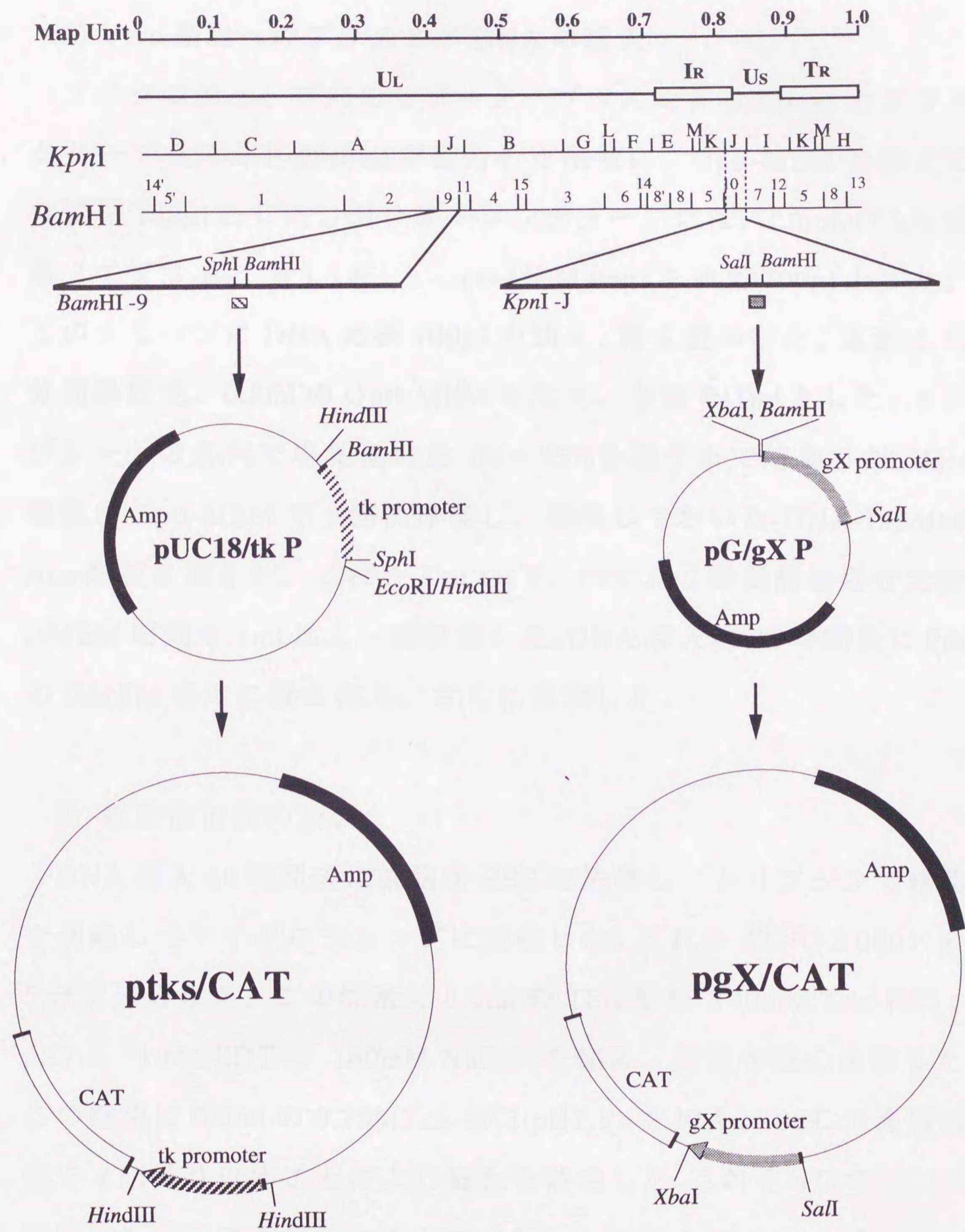


図4. リポータープラスミドの作出

上の図はADVのゲノムとその制限酵素BamHI およびKpnI 切断地図ならびにBamHI-9断片およびKpnI-J断片の拡大図を示す。下の図はptks/CATおよびpgX/CATの構築過程を示す。

2) Vero 細胞へのプラスミド DNA の導入

マイクロチューブ内でリポータープラスミド 0.5pmol とエフェクタープラスミド 25fmol を混合した溶液に、Opti-MEM を加えて全量を 100 μ l とした。ポリスチレンチューブには、Lipofect Ace 試薬（ギブコ-BRL 社）12 μ l と Opti-MEM 88 μ l を加え 100 μ l とした。このチューブに DNA 溶液 100 μ l を加え、軽く混和した。室温に 15 分間静置後、0.8ml の Opti-MEM を加え、全量を 1ml とした。6 穴プレートの各穴で培養面の約 80~85% を覆うまで培養した Vero 細胞を Opti-MEM で 2 回洗浄後し、静置しておいた DNA-Lipofect Ace 溶液を加えた。これを 5%CO₂ 下、37 $^{\circ}$ C に 7 時間静置させた後、DMEM 培地を 1ml 加え一夜培養した。DNA 導入約 24 時間後に 2ml の DMEM 培地に置き換え、さらに培養した。

3) 細胞抽出液の調製

DNA 導入 48 時間後に細胞を PBS で洗浄し、トリプシンで細胞を剥離してマイクロチューブに回収した。これを 4 $^{\circ}$ C で 2,000 \times g、5 分間遠心した。この沈渣に 0.5ml の TEN 溶液（40mM Tris-HCl；pH7.8, 1mM EDTA, 180mM NaCl）を加え、細胞を遠心洗浄した。この細胞に 0.3ml の 0.25M Tris-HCl(pH7.5) を加え、-80 $^{\circ}$ C で凍結融解を 4 回繰り返すことにより細胞を破壊した。これを 4 $^{\circ}$ C で 12,000 \times g、20 分間遠心し、この上清を新しいマイクロチューブに移して、細胞抽出液とした。この一部を採りプロテインアッセイ試薬（バイオ・ラド社）を用いて蛋白量を測定し、残りを CAT の定量に用いた。

4)CATの定量

CATの定量には、CAT-ELISA(ベーリンガー・マンハイム社)を使用した。抗CATヒツジ抗体が吸着したマイクロタイタープレートの各穴に300 μ lのサンプル緩衝液を加え、5分間静置した。各穴から緩衝液を除き、200 μ lの一定量のCATを含む標準溶液または細胞抽出液を加えた。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、300 μ lの洗浄用緩衝液で4回洗浄した。次に、200 μ lのジゴキシゲニン(DIG)標識抗CAT抗体を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、同様に洗浄し、200 μ lのペルオキシダーゼ標識抗DIG抗体を加えた。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、同様に洗浄し、200 μ lのペルオキシダーゼに対する基質溶液[2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアリン)-6'-スルホン酸]を加えた。室温で15~60分間反応させ、波長405nmで吸光度を測定した。標準試料の吸光度から検量線を作製し、試料の吸光度をもとに試料中のCAT量を定量した。

1.1. 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法は、Peeples(1988)の方法に従って行った。カバーガラス上に培養したCOS-1細胞に、pc/IEおよび欠失IE遺伝子を含むプラスミドをLipofectin試薬を用いて導入した。DNA導入48時間後にカバーガラスを取り出しPBSで洗浄し、3%パラホルムアルデヒドで室温45分間細胞を固定した。次に0.05%Triton-X100で細胞を室温で30分間処理した。カバーガラスをPBSで3回洗浄後、非特異反応を少なくするため、10%正常ヤギ血清に15分間浸した。1:100に希釈したウサギ抗IE180ペプチド抗体を加え、室

温で 30 分間反応させた。再び PBS で洗浄し、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（サザンバイオテクノロジー社）を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

III. 結 果

1. ADV IE 遺伝子のサブクローニング

ADV 遺伝子 DNA の *KpnI* 断片のクローニングで得られた ADV IE 遺伝子を含む *KpnI*-E 断片を含む組み替えプラスミドを IE 遺伝子のサブクローニングに用いた。これを *BamHI* で切断し、IE 遺伝子を含む *BamHI*-8 断片を pGEM-4Z および真核細胞発現ベクターである pcDNAI/Neo に挿入した (pc/IE)。得られた IE 遺伝子を含むプラスミドを図 2 示す。

2. 欠失 IE 遺伝子の作出

欠失 IE 遺伝子の作出には pG/IE および pc/IE を用いた。IE 遺伝子上に存在する制限酵素切断部位を利用し、5'末端欠失および 3'末端欠失遺伝子を作成した。5'末端欠失遺伝子には開始コドンを含む *NcoI* リンカーを、また 3'末端欠失遺伝子には終止コドンを含む *NheI* リンカーを挿入することにより作成した。すべての欠失 IE 遺伝子を真核細胞で発現出来るように、欠失 IE 遺伝子を pcDNAI/Neo にクローニングした。IE 遺伝子および作出した欠失 IE 遺伝子の模式図を示す (図 5)。

3. IE および欠失 IE 遺伝子の発現

作出した IE および欠失 IE 遺伝子が真核細胞において目的の蛋白を発現することを確認するために、IE および欠失 IE 遺伝子を含む pcDNAI/Neo を COS-1 細胞に導入し、細胞抽出液 10%ポリアク

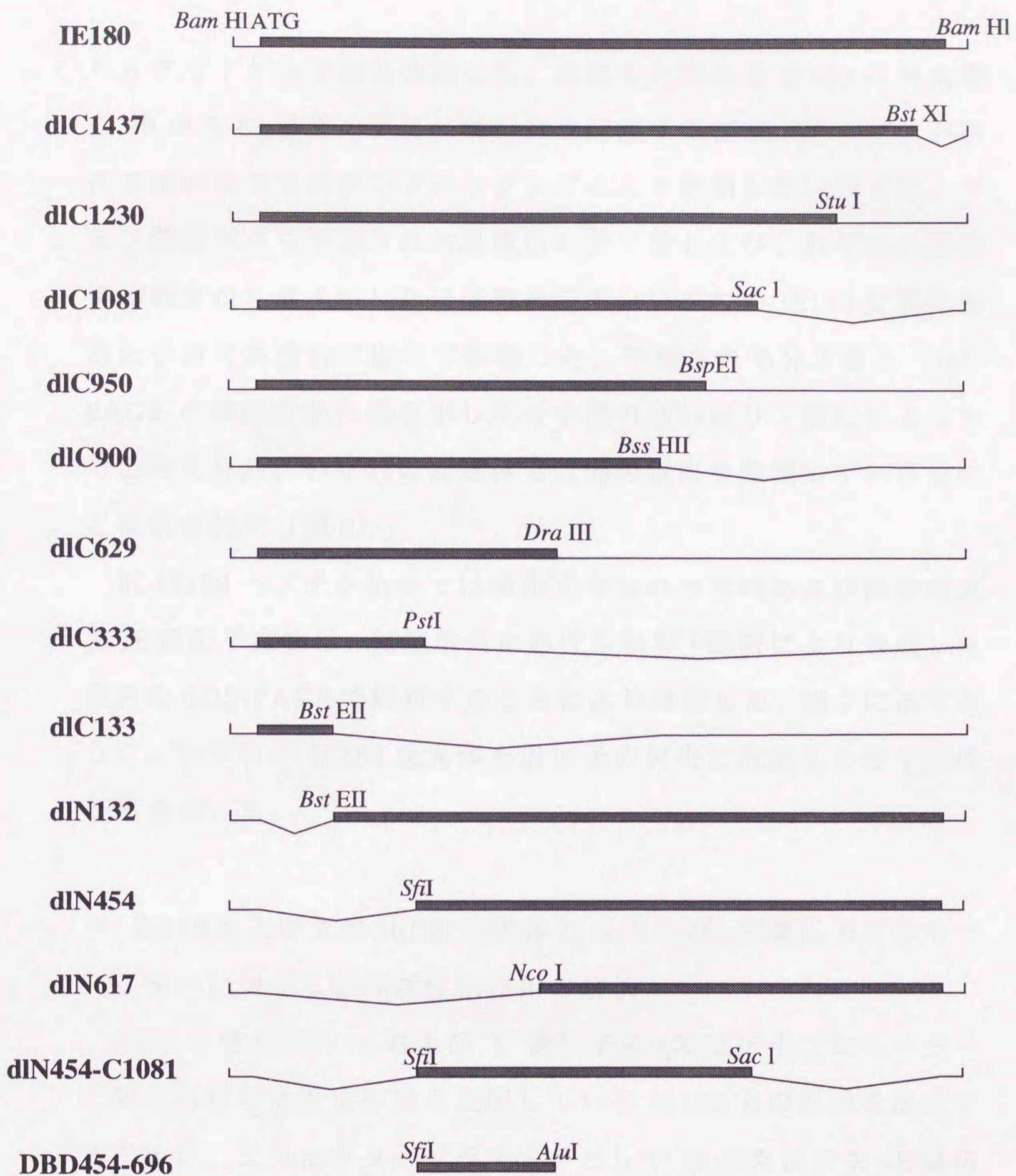


図5. IEおよび欠失IE遺伝子の模式図

■ は各遺伝子のORFを表す。直線は*Bam*HI-8断片のヌクレオチドを示す。V型の線はヌクレオチドの欠失を表わす。欠失IE遺伝子の作出に用いた制限酵素切断部位を図中に示しATGは開始コドンを示す。dINはアミノ末端の欠失を、dICはカルボキシル末端の欠失を表わす。また、数字はN末端を1とした時のアミノ酸残基数を示す。

リルアミドゲルで電気泳動した。泳動した蛋白を IE180 の N 末端の 49 から 68 番目のアミノ酸配列を認識する抗 IE180 ペプチド抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。表 1 に、アミノ酸配列から予想される各蛋白の分子量およびそれぞれの蛋白の移動度から導き出した分子量を示す。いずれの IE180 変異体も遺伝子の欠失度合に応じて移動した。予想される分子量と SDS-PAGE の移動度から導き出した分子量の違いはリン酸化によるものと考えられ、いずれの変異体も目的の蛋白を発現しているものと推察された (図 6)。

抗 IE180 ペプチド抗体では検出できない N 末端および両末端欠失 IE 遺伝子産物は、無細胞系における転写・翻訳により合成した蛋白を SDS-PAGE で解析することにより確認した。図 7 に示すように、いずれの IE180 変異体も遺伝子の欠失に対応する分子量の低下を示した。

4. IE180 および欠失 IE180 変異体の tk および gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用の解析

ADV E 遺伝子の tk および L 遺伝子の gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用を支配している IE180 上の領域を決定するために、エフェクタープラスミドとして IE または欠失 IE 遺伝子を含んだ pcDNAI/Neo、リポータープラスミドとして ptks/CAT または pgX/CAT を用いた。エフェクタープラスミドとリポータープラスミドを Vero 細胞に同時導入し、この細胞抽出液中の蛋白 1 μ g 当たりの CAT 量を定量して、IE および欠失 IE 遺伝子産物の tk および gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用の解析

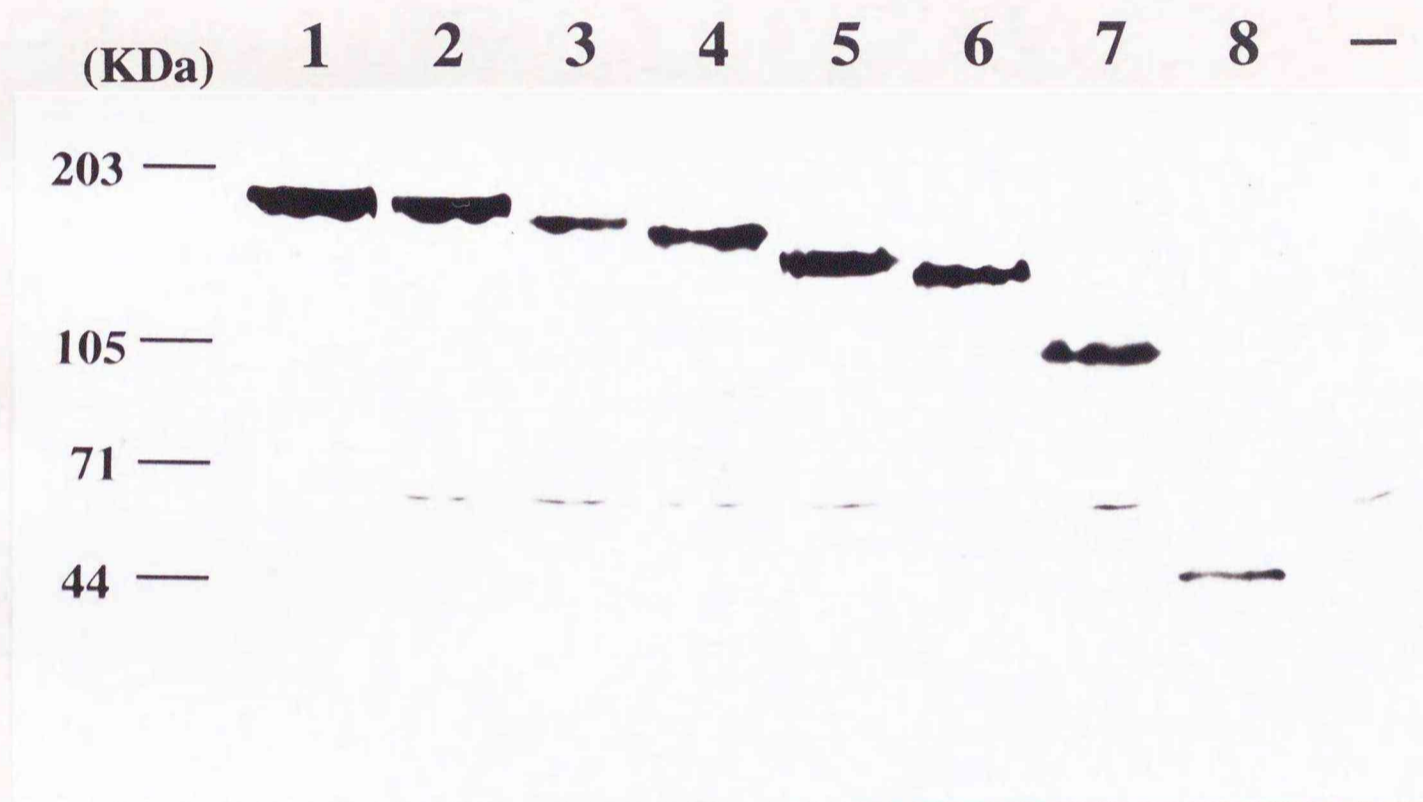


図6. IEおよびC末端欠失IE遺伝子産物のウエスタンブロット解析像

COS-1細胞にIEまたは3'末端欠失IE遺伝子を含むpcDNAI/Neoを導入した。左側に分子量マーカを示す。1: IE, 2: dlC1437, 3: dlC1230, 4: dlC1081, 5: dlC950, 6: dlC900, 7: dlC629, 8: dlC333

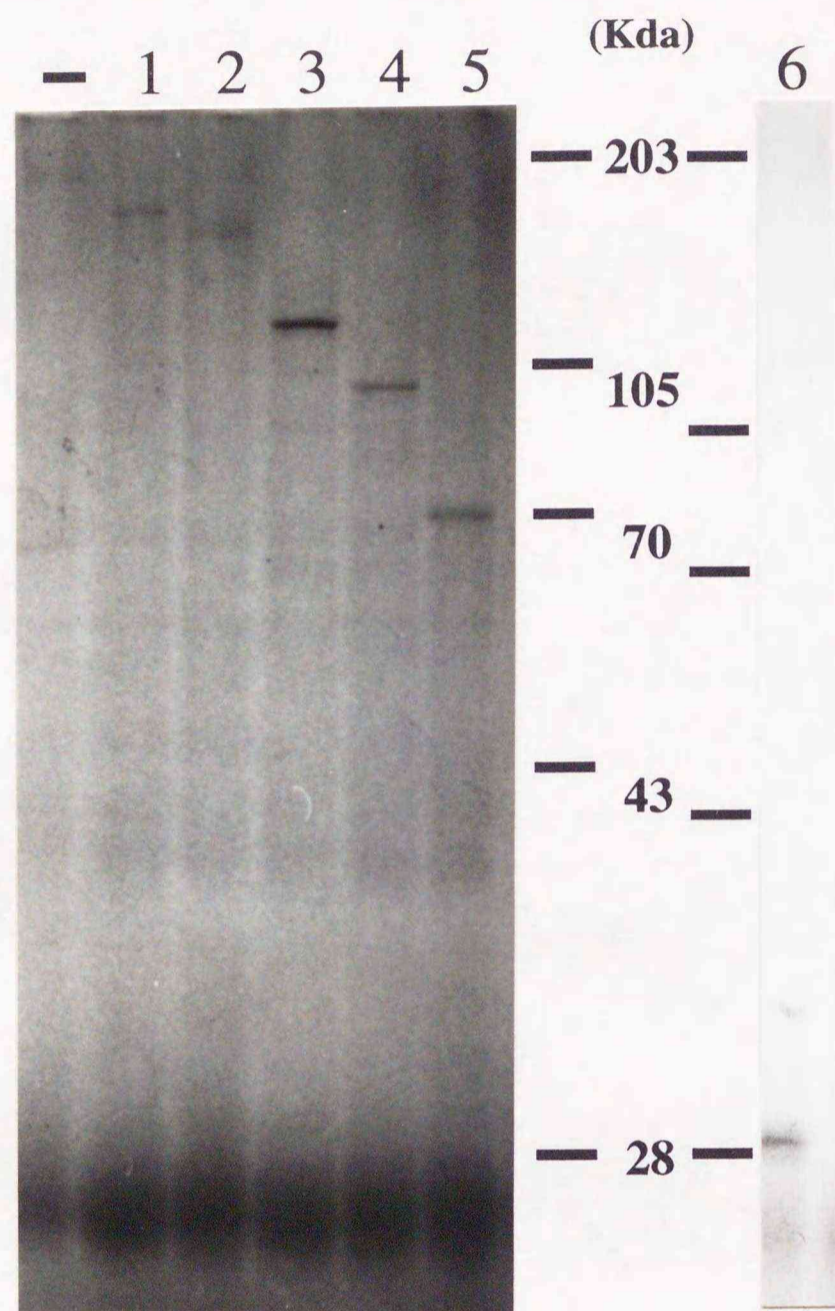


図7. 無細胞系で転写・翻訳されたIE および欠失IE遺伝子産物の SDS-PAGE像

無細胞系で転写・翻訳された蛋白を10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。左側に分子量マーカを示す。1: IE, 2: dIN132, 3: dIN454, 4: dIN617, 5: dIN454-C1081, 6: DBD

表 1. 欠失IE遺伝子産物の発現

C末端欠失IE180変異体の検出

	アミノ残基数	分子量 ¹⁾	
		予想 ²⁾	ウエスタンブロット ³⁾
IE180*	1460	153	180
dIC1437*	1437	150	176
dIC1230*	1230	128	162
dIC950*	950	96	141
dIC900*	900	93	131
dIC629*	629	66	103
dIC333	333	35	45
dIC133	133	13	ND ⁵⁾

N末端および両末端欠失IE180変異体の検出

	アミノ残基数	分子量 ¹⁾	
		予想 ²⁾	PAGE ⁴⁾
IE180	1460	153	189
dIN132	1328	139	177
dIN454	1006	107	134
dIN617	843	89	111
dIN454-C1081	629	66	74
DBD(454-696)	242	26	33

*はリン酸化を受けていると考えられる欠失IE180を示す。

1) キロダルトン。

2) アミノ酸配列から導き出した分子量。

3) ウエスタンブロットで検出し、移動度より導き出した分子量。

4) 無細胞系で合成し、SDS-PAGEの移動度より導き出した分子量。

5) NDは検出できなかったことを示す。

を行った。

図8および9に示すように、dIC1437、dIC1230 および dIC1081では tk および gX 遺伝子プロモーターの転写を活性化した。しかし、IE180 のカルボキシル(C)末端を 560 アミノ酸残基を欠失した dIC900 ではいずれのプロモーターに対しても転写活性化作用を示さなかった。また、さらに C 末端を欠失した変異体も転写活性は示さなかった。従って、C 末端欠失 IE180 変異体を用いた解析において 900 から 1,081 までのアミノ酸配列に転写活性化に必要な部位が存在することが示唆される。一方、N 末端を欠失した IE180 では調べたエフェクターはすべて、転写活性化を示さなかった。この結果は、N 末端の 132 アミノ酸残基に転写活性に重要な部位が存在することを示唆している。しかし、N 末端の 1 から 133 アミノ酸残基を発現する dIC133 は、tk および gX 遺伝子プロモーターを活性化しなかった。

5. IE180 および欠失 IE180 変異体の ADV IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用の解析

IE180 は IE 遺伝子プロモーターに抑制的に作用する。その活性部位を決定するために、エフェクタープラスミドとして IE または欠失 IE 遺伝子を含んだ pcDNAI/Neo、リポータープラスミドとして CAT 遺伝子上流に IE 遺伝子プロモーターを含む pRW7CAT を Vero 細胞に同時導入して、CAT 量を定量し、IE および欠失 IE 遺伝子産物の IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用の解析を行った。エフェクタープラスミドの対照として pcDNAI/Neo を用いた。

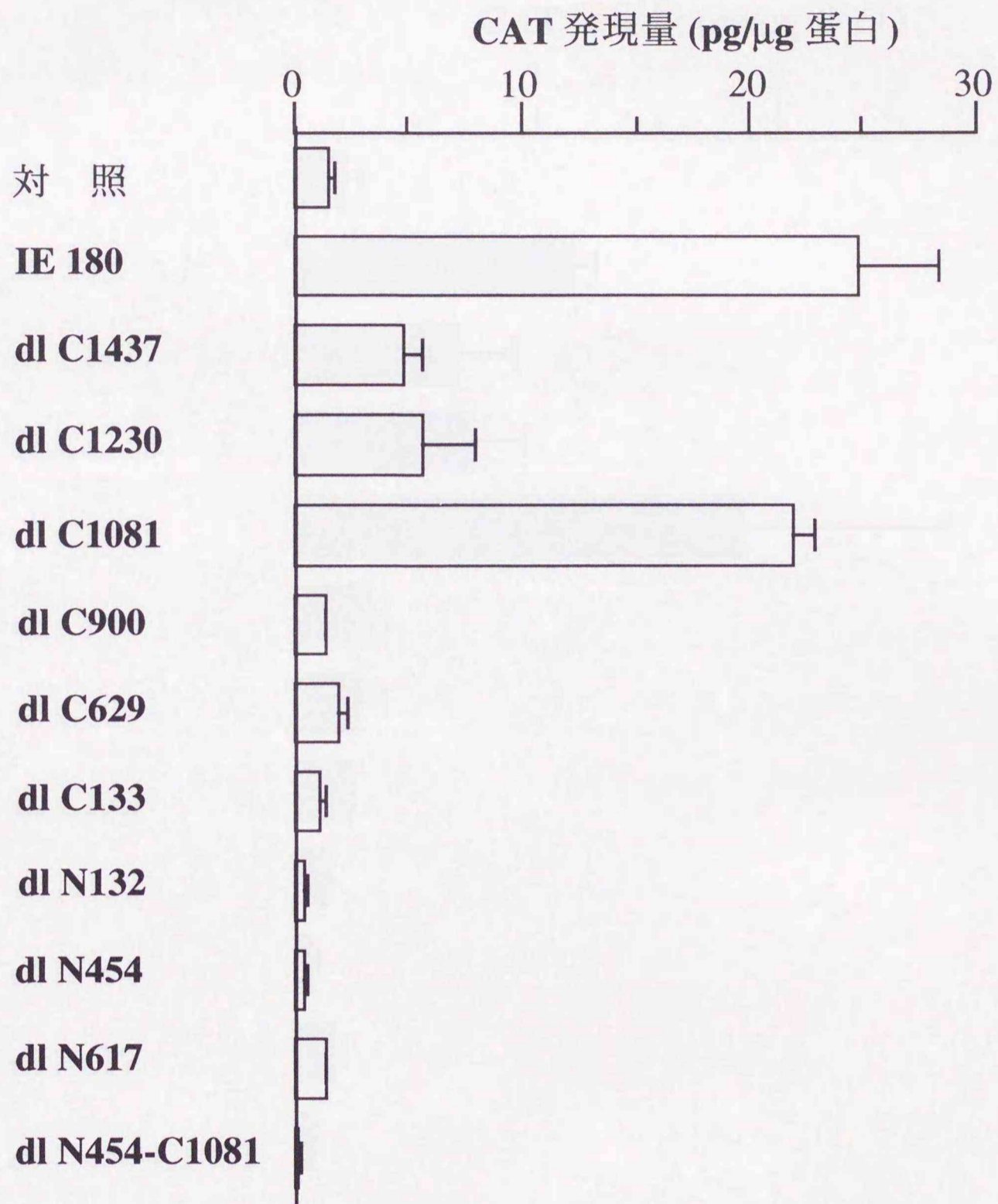


図 8. IE180および欠失IE180変異体のtk遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用

ptks/CATをリポータープラスミドとし、IE180および欠失IE180変異体を発現するプラスミドをVero細胞に導入し、細胞抽出液中の蛋白1μg当たりのCAT量を測定した。数字は各3回の実験により得られた値の平均値を示す。

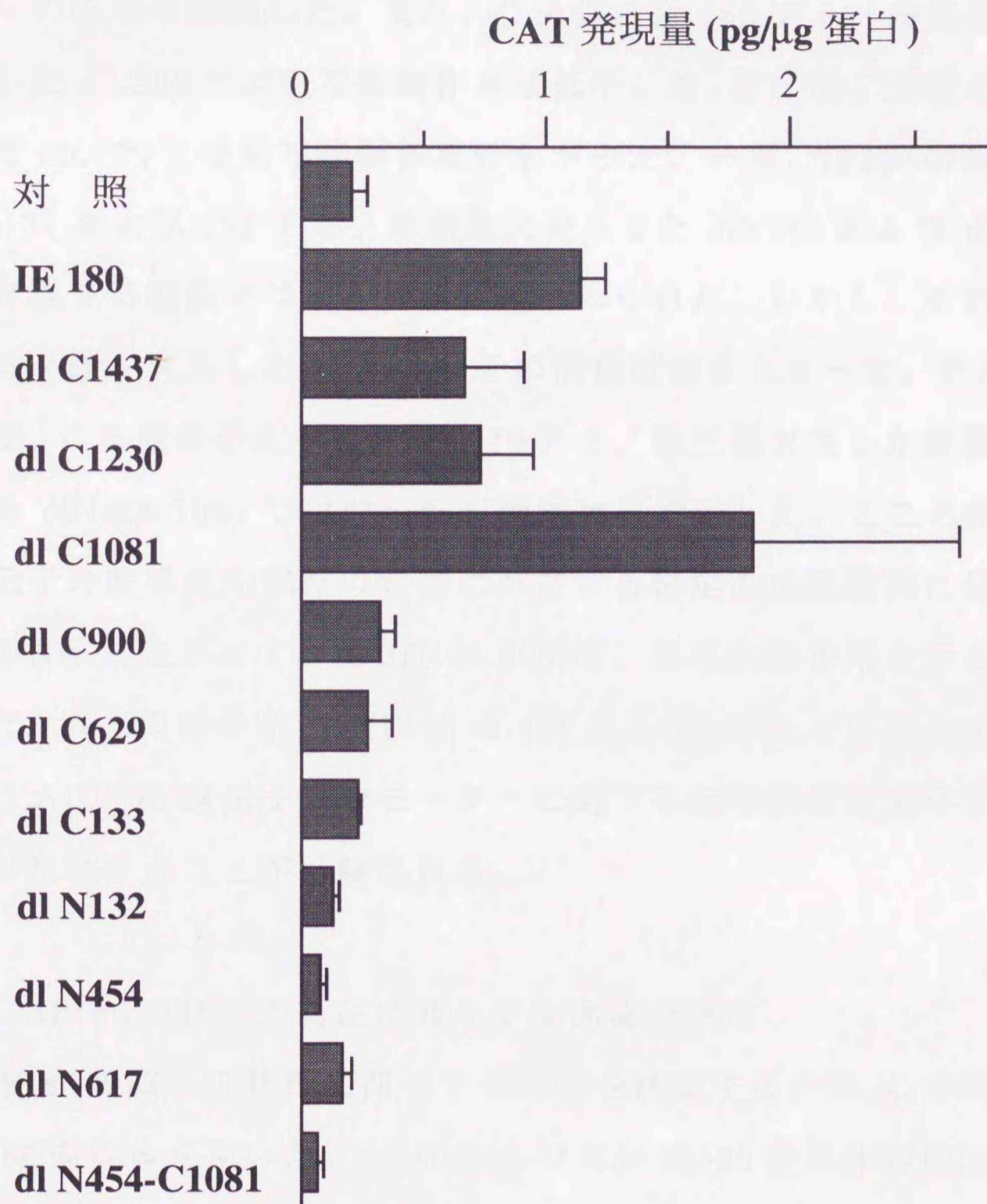


図9. IE180および欠失IE180変異体のgX遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用

pgX/CATをリポータープラスミドとし、IE180および欠失IE180変異体を発現するプラスミドをVero細胞に導入し、細胞抽出液中の蛋白1μg当たりのCAT量を測定した。数字は各3回の実験により得られた値の平均値を示す。

図 10 に示すように、IE180 の C 末端を欠失した dIC1437、dIC1230 および dIC1081 を発現する細胞では、IE 遺伝子プロモーターの転写を抑制した。また、C 末端の計 560 アミノ酸残基を欠失した dIC900 では転写抑制作用は低下した。さらに C 末端を欠失した dIC629 では転写抑制作用はなかった。一方、IE180 の N 末端を 132 および 453 アミノ酸残基欠失させた dIN132 および dIC454 を発現する細胞では転写抑制作用がみられた。しかし、それ以上アミノ酸を欠失した dIN617 はその活性は示さなかった。また、N 末端、C 末端をそれぞれ 453、379 アミノ酸残基欠失した変異体である dIN454-1081 では強い転写抑制効果を示した。ところが、IE 遺伝子の転写開始部位の前後に存在する特定の塩基配列に結合する DNA 結合ドメイン(DBD454-696)は、転写抑制作用を示さなかった。以上の結果から、IE180 の 454 から 1,081 までのアミノ酸配列に ADV IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制に関与する領域が存在することが示唆される。

6. IE180 の核への局在に関与する部位の決定

IE180 の核への移行に関与する部位を決定するため、C 末端欠失 IE180 変異体を用いた。IE180 および欠失 IE180 変異体の細胞での局在は、IE または欠失 IE 遺伝子を含む pcDNAI/Neo を COS-1 細胞に導入後、間接蛍光抗体法により解析した (図 11)。IE 遺伝子を導入した細胞は、IE180 を発現して単独で核に局在した。C 末端を徐々に欠失させていった IE180 変異体を用いた場合、C 末端の 510 アミノ酸残基を欠失した dIC950 までは核に局在した。しかし、C 末端の 560 アミノ酸残基を欠失した dIC900 は核に局在しなかつ

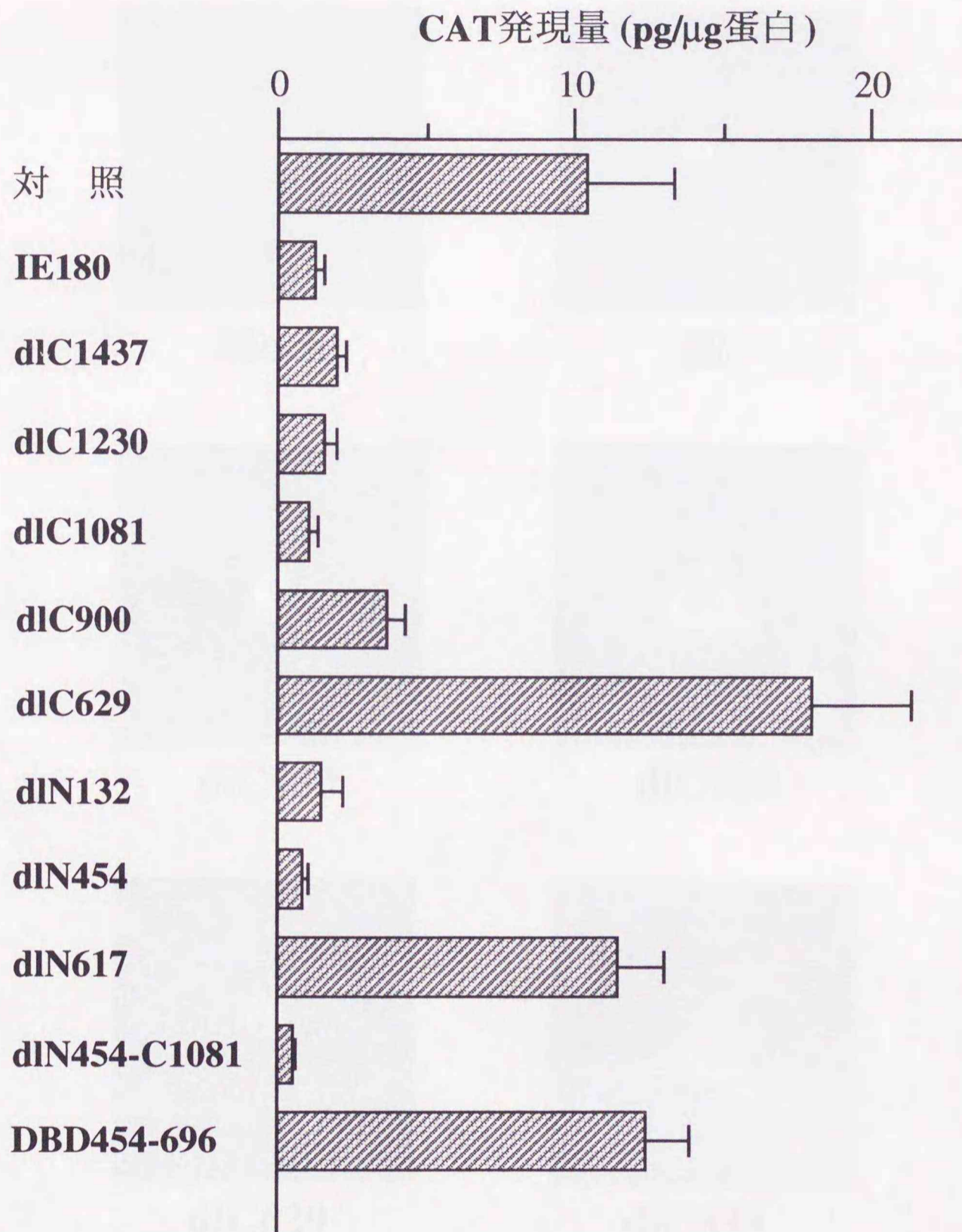
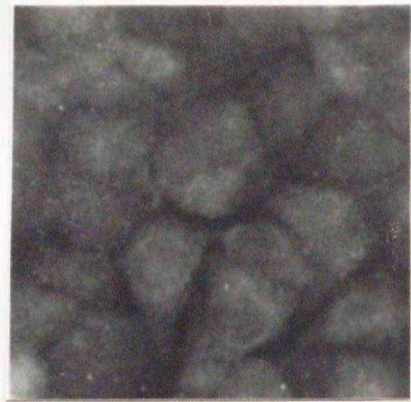
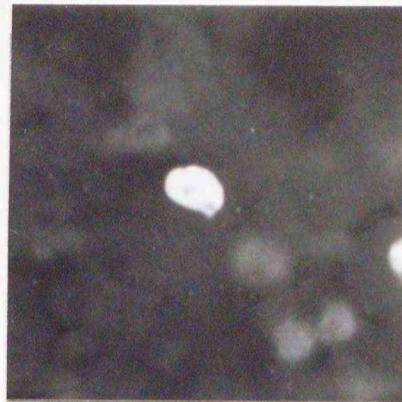


図10. IE180および欠失IE180変異体のIE遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用

pRW7CATをリポータープラスミドとし、IE180および欠失IE180変異体を発現するプラスミドをVero細胞に導入し、細胞抽出液中の蛋白1μg当たりのCAT量を測定した。数字は各3回の実験により得られた値の平均値を示す。



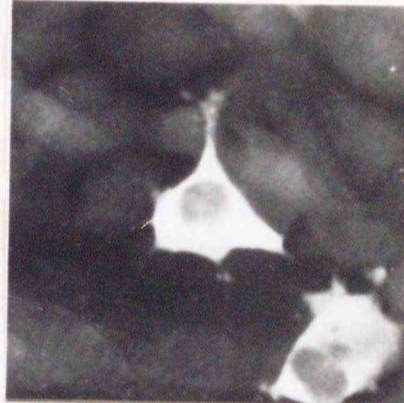
Mock



IE



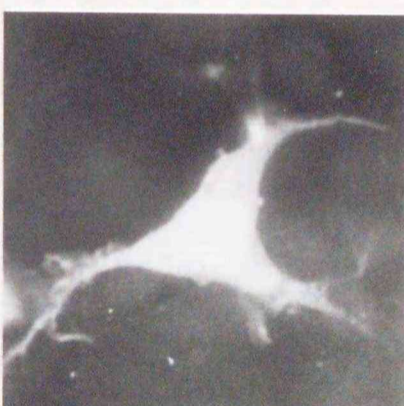
dIC950



dIC900



dIC629



dIC333

図1 1. IE180および欠失IE180変異体の細胞内局在性

IEおよび欠失IE遺伝子を含むpcDNA1/Neoを各々COS-1細胞に導入し、抗IE180ペプチド抗体を用い蛍光抗体染色法により発現した蛋白を検出した。

た。この結果は IE180 の 900 から 950 までのアミノ酸配列に核への移行に必要な部位があることを示唆している。ところが、さらにアミノ酸残基を欠失した dIC629 は核に局在し、dIC333 は核および細胞質に存在した。これらの結果は 333 から 629 番目のアミノ酸配列も核への移行に関与する可能性を示している。

C 末端を欠失した IE180 変異体の解析によって、333~629 と 900~950 までのアミノ酸配列の 2 つの部位が核への移行に重要であることが示された。この 2 つの部位はいずれも、核への移行に関与すると考えられる塩基性アミノ酸クラスター RRKRR を含んでいた。そこで完全長の IE180 ではどちらの部位が核への移行に重要であるかを調べるため、各々の部位を欠失した IE180 変異体を作成した (図 12-A)。図 12-B に示すように、作成した欠失 IE 遺伝子はいずれも目的の蛋白を作っていると考えられた。また、図 13-C に示すように、333 から 575 番目までのアミノ酸配列を欠失した蛋白は主に核に存在した。一方、900 から 950 番目までのアミノ酸配列を欠失した IE Δ 900-950 は大部分が細胞質に存在した。これらの結果は IE180 の 900 から 950 までのアミノ酸配列に本来の核への移行を担う部位があることを示している。しかし、333~575 番目および 900~950 番目の核移行シグナルと考えられる部位を含む両方のアミノ酸配列を欠失した IE Δ 333-575&900-950 は、主に核内に検出した。以上の結果をまとめ表 2 に示す。

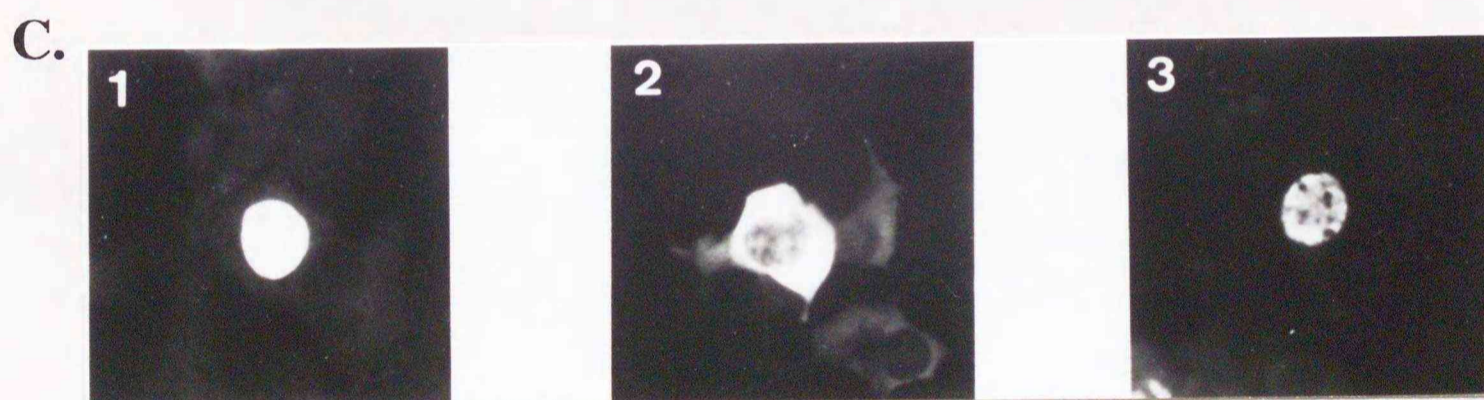
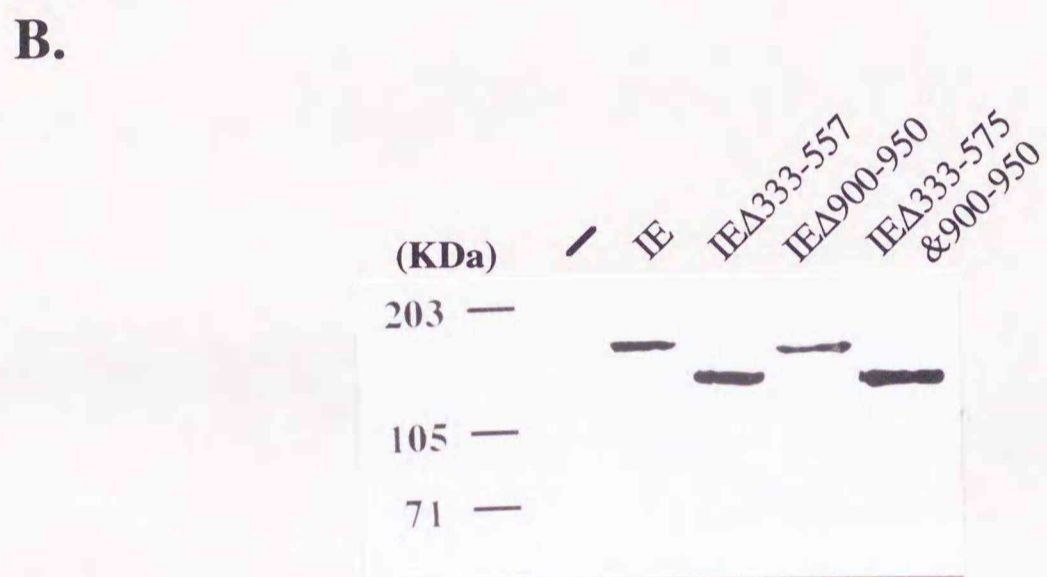
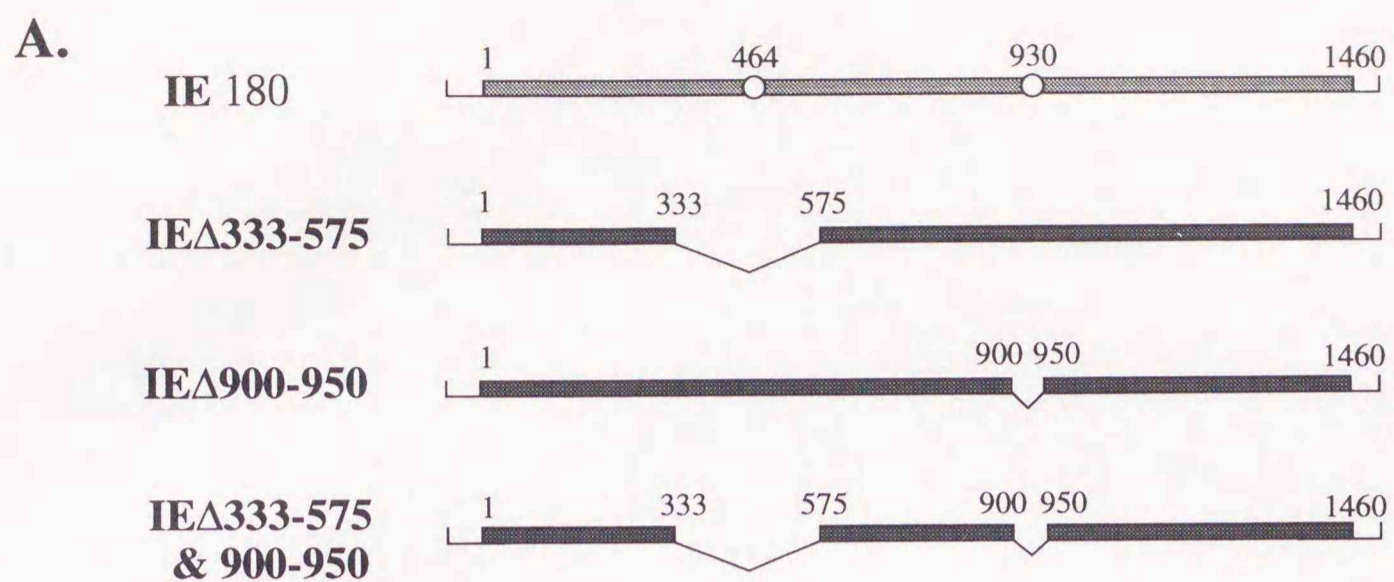


図 1 2. 核局在化シグナルを欠失したIE180変異体の発現

Aは核局在化シグナル欠失IE180変異体の模式図。数字はアミノ酸残基数、○はRRKRRの位置をそれぞれ示す。Bは欠失IE180変異体のウエスタンブロット解析像。分子量マーカーを左側に示す。Cは欠失IE180変異体の細胞内局在性。1: IEΔ333-575, 2: IEΔ900-950, 3: IEΔ333-575 & 900-950

表 2. IE180変異体の細胞内局在

	細胞内局在 ¹⁾
IE180	核
dIC1437	核
dIC1230	核
dIC1081	核
dIC950	核
dIC900	細胞質
dIC629	主に細胞質
dIC333	核および細胞質
IEΔ333-575	核
IEΔ900-950	主に核
IEΔ333-575 &900-950	核

1) COS-1で発現したIE180およびその変異体の細胞内局在。

IV. 考 察

ADV の IE180 は、前期および後期の ADV 遺伝子の転写を活性化し、IE 遺伝子の転写は抑制するという多機能な蛋白で、ウイルスの増殖に必須である (Ihara ら, 1983; Rakusanova ら, 1971)。本研究では、IE180 の構造と機能を解明し、新しい ADV の感染防御法を開発することを目的として、IE180 の機能ドメインを決定した。IE180 は、HSV-1 の ICP4 と VZV の IE140 のアミノ酸配列との相同性から、5つの領域に分けられる (Cheung, 1989)。領域 1 は ICP4 との相同性が低い部分であるが、IE180 の 390 番目からのセリンに富んだ部位が保存されている。このセリンに富んだ部位は VZV の IE140 にも認められる。領域 2 は保存性が高く、相同率が 50% 以上ある。領域 3 は ICP4 との相同性は低いが、ICP4 の 727 番目からの RKRK、IE180 の 930 番目からの RRKRR の塩基性アミノ酸クラスターに相同性がある。領域 4 は比較的相同性が高く、領域 5 は相同性が低い。

本研究で得られた成績から ADV IE180 は以下のような機能ドメインに区分された (図 13)。tk および gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用には、IE180 の 1,460 アミノ酸残基中 1~1,081 の領域が必要であった。この領域には、N 末端の酸性アミノ酸クラスターから成る転写活性化部位を含む領域 1、DNA 結合ドメインから成る領域 2 (Wu and Wilcox, 1991) および核移行シグナルを含む領域 3 から成っていた。C 末端から 560 アミノ酸残基を欠失した dIC900 は転写活性化作用を示さず、核にも局在しな

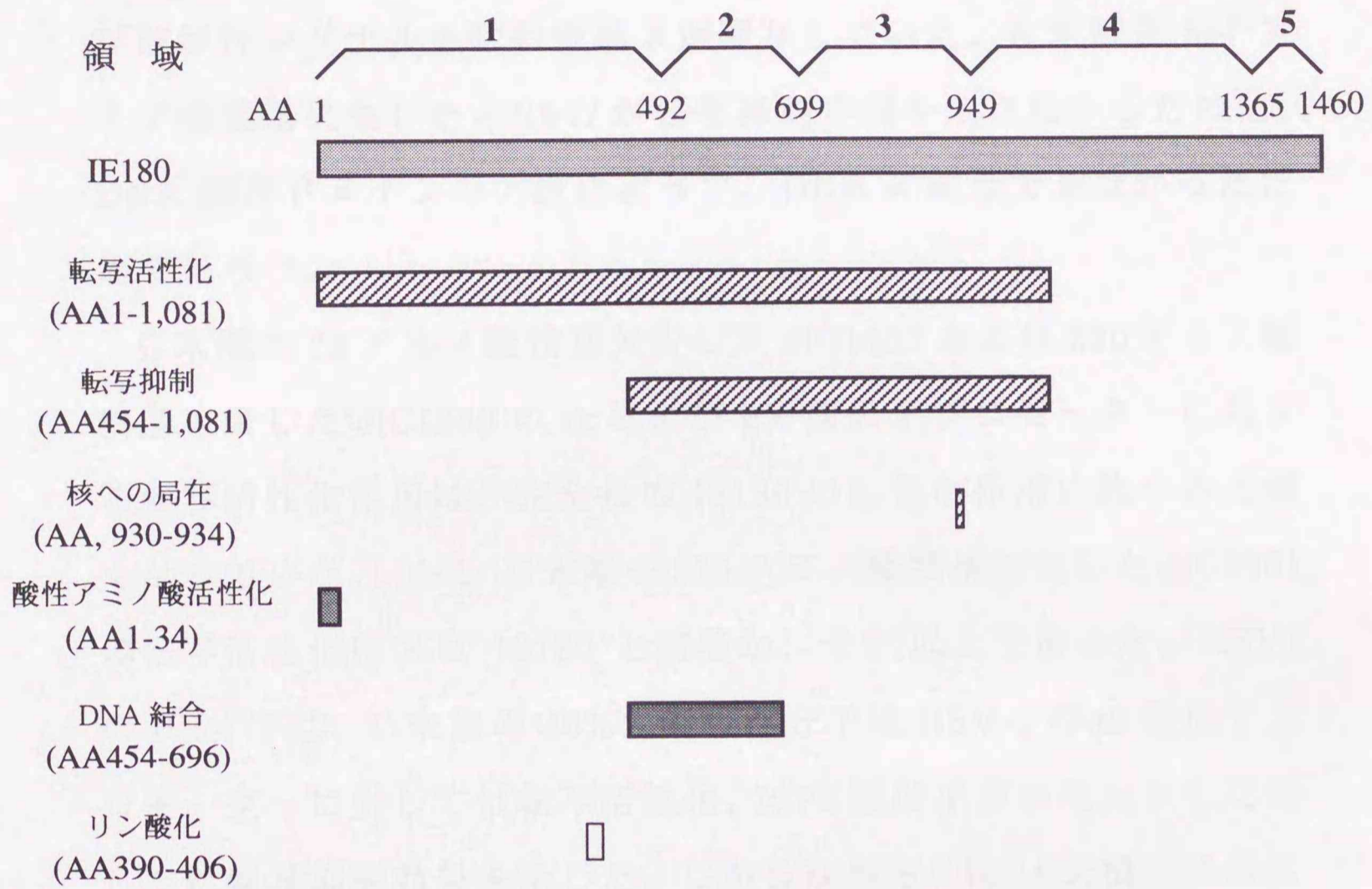


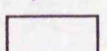


図13. ADV IE180の機能ドメイン

HSV-1のICP4との相同性より5つの領域に分けられる(Cheung; 1989)。  で示す領域は今回の実験で導いた機能ドメインである。  で示される領域は、Martinら(1990)とWu and Wilcox(1991)によって提唱されたIE180の機能ドメインである。  で示される領域は予測されているドメインを示す。

った。IE180 が転写調節因子としての機能を発揮するためには核に局在する必要がある。dIC900 は核に移行できなかったために、その機能を発揮できなかったと考えられる。IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制には、DNA 結合ドメインから成る領域 2 および核移行シグナルを含む領域 3 が関与していた。N 末端を 617 アミノ酸残基欠失した dIN617 が転写抑制作用を示さなかったのは、DNA 結合ドメインの欠損によって、DNA に結合できなかったためであろう。

C 末端を 23 アミノ酸残基欠失した dIC1437 および 230 アミノ酸残基欠失した dIC1230 の tk および gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用は、完全長の IE180 の活性化作用に比べると弱くなっていた。しかし、C 末端を 379 アミノ酸残基欠失した dIC1081 の転写活性化作用は IE180 と同等か、それ以上であった。HSV1 の ICP4 では、C 末端の 40% 欠失した分子は HSV-1 の tk 遺伝子プロモーターに対しては転写活性化、ICP4 遺伝子プロモーターに対しては転写抑制効果を示した。しかしながら、ICP4 欠損ウイルスを用いた相補性試験では、この C 末端欠失 ICP4 の相補活性は完全な ICP4 の 100 分の 1 以下であった (DeLuca and Schaffer, 1987)。したがって、ICP4 の C 末端 40% の領域はウイルス DNA の合成および後期遺伝子の発現を司る機能があると考えられている。本研究では領域 5 を欠失した dIC1437 ならびに領域 4 および 5 を欠失した dIC1230 の転写活性化作用が低かった。しかし、さらに C 末端を欠失した dIC1081 は IE180 と同等かそれ以上の活性化作用を示した。これらの成績は IE180 の領域 4 および 5 になんらかの転写調節因子と相互作用をする部位があることを示しているのかも

知れない。

IE180 の N 末端 131 アミノ酸残基を欠失した変異体である dIN132 は tk および gX 遺伝子プロモーターに対し転写活性化作用を示さなかった。この結果は N 末端の 131 アミノ酸配列に転写活性化に関わる重要な部位が含まれることを示す。また、酵母菌の転写調節因子 GAL4 と IE180 の融合蛋白を用いた実験で、N 末端の 34 酸性アミノ酸配列に転写活性化部位が存在することを示した報告 (Martin ら, 1990) と一致する。領域 1 は転写活性化に関与する 34 酸性アミノ酸配列を含む。VZV の IE140 および EHV-1 の IE1 においても N 末端に酸性アミノ酸残基から成る転写活性化部位が存在する (Cohen ら, 1993; Perera ら, 1993; Smith ら, 1994)。また、Schwyzer ら (1993) は BHV-1 の p180 も N 末端に転写活性化部位を持つことを示唆している。しかし、HSV-1 では N 末端の 90 アミノ酸残基を欠失した ICP4 変異体を持つウイルスでも通常の増殖を示すことから、この部位は IE 蛋白の機能には必要ないと考えられる (DeLuca and Schaffer, 1987; 1988)。HSV-1 の VP16 は酸性アミノ酸に富む転写活性化部位を持つ転写調節因子である。VP16 は C 末端の 78 酸性アミノ酸配列に転写活性化に与る部位が存在する。VP16 の C 末端 78 酸性アミノ酸部位を欠失した変異体は転写活性化能を失い、逆に本来の VP16 の転写活性化作用を阻害する (Triezenberg ら, 1988)。同様に、酸性アミノ酸転写活性化部位を欠失した dIN132 は転写活性化作用は示さなかったが、IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用を示した。IE180 の領域 1 に存在し、HSV-1 の ICP4 および VZV の P140 でもよく保存されているセリンに富んだ部位は、ICP4 ではリン酸化の標的部位である

(DeLuca and Schaffer, 1988)。ICP4 の領域 1 に存在するこの高セリン部位が、転写活性化に重要であるとする報告がある (DeLuca and Schaffer, 1988; Shepard ら, 1989)。一方、dIN132 は HSV-1 の ICP4 と同じように高セリン部位を含んでいるにもかかわらず、転写活性化作用を示さなかった。この結果は、IE180 の転写活性化作用に高セリン部位が必要ではないことを示唆する。しかし、転写調節因子はリン酸化することによって、細胞質から核への移行の変化、DNA 結合能の変化および高次構造の変化が誘導され、活性化される (Hunter and Karin, 1992)。IE180 の領域 1 に存在する高セリン部位もリン酸化されていると予想されることから、この部位には何らかの未知の機能があるかも知れない。

欠失 IE180 変異体を用いた研究から、IE180 の 900~950 のアミノ酸配列が核への移行に重要であることが示された。この配列には核移行シグナルと予想される塩基性アミノ酸配列 (RRKRR) を含んでいる (Cheung, 1989)。IE180 は同じ配列を 464 番目にも含んでいる。今回の C 末端欠失 IE180 変異体を用いた研究において、dIC900 および dIC629 はいずれも 464 番目からの RRKRR クラスターを含むにも関わらず、dIC900 は細胞質に存在し、dIC629 は核に存在した。この違いはこれらの蛋白の立体構造によるものと考えられる。核移行シグナルはしばしばポリペプチドの末端に存在して (Gharakhanian ら, 1987; Laemmli ら, 1970; Moreland ら, 1985; Silver ら, 1984) 蛋白分子の表面に露出し、その機能を果たすとされている (Roberts ら, 1987)。したがって、dIC629 では C 末端の 830 アミノ酸残基を欠失することにより、464~468 のアミノ酸配列に存在する塩基性アミノ酸クラスターが表面に露出した結果、その

機能が発揮されたものと考えられる。今回の研究で用いた最小の変異体である d1C333 は細胞質および核内に検出された。このポリペプチドは塩基性の核移行シグナルを持たないので、拡散により核に入ったのかも知れない。

930~934 のアミノ酸配列の核移行シグナルを含む部位を欠失した IE Δ 900-950 では、その一部が細胞質に留まった。この成績は IE180 分子上に核への移行に関与する他の部位があることを示しているのかも知れない。今回の研究から 930 番目からの塩基性アミノ酸クラスターが、IE180 を核へ移行するために重要であることがわかった。一方、464 番目からの塩基性アミノ酸クラスターは核への移行に関与するが、930 番目からのシグナルほどの強い活性は持っていないと考えられる。

今回の研究において IE 遺伝子プロモーターに対して強い転写抑制作用を持つ欠失 IE180 変異体(d1N454-C1081)を作出した。この蛋白は DNA 結合ドメインおよび核移行シグナルを含む領域から成り立っている。DNA 結合ドメインを欠失した変異体(d1N617)は転写調節作用を示さなかった。ヘルペスウイルスの IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用には、IE 蛋白と転写開始部位の近傍に存在する特定の塩基配列との結合が重要である(Faber and Wilcox, 1988; Muller, 1987; Paterson and Everett, 1990; Roberts ら, 1985; Shepard ら, 1989)。そのため、IE180 分子上の DNA 結合ドメインが、転写調節に最も重要と考えられる。Wu and Wilcox(1992)は、*E. coli* のトリプトファンを合成する酵素の一つである *trpE* と IE180 の DNA 結合ドメインの融合蛋白が、ICP4 遺伝子プロモーターの転写開始部位の特定の領域に結合することを示した。ICP4 の

DNA 結合ドメインは ICP4 が 2 量体を形成するために必要で (Everett ら, 1991)、また DNA を曲げる (Bending) 能力がある (Everett ら, 1992) ことが知られている。IE180 の DNA 結合ドメインにも同じ働きがあると考えられるが、DNA 結合ドメイン (DBD454-C696) だけでは、IE 遺伝子プロモーターに対する転写抑制作用を確認できなかった (図 10)。転写抑制効果を示すには DNA 結合ドメインおよびその C 末端側に存在する核移行シグナルを含む 385 アミノ酸残基が必要である。DNA 結合ドメインには、その N 末端に核移行シグナル (RRKRR) が存在するが、今回用いた抗 IE180 ペプチド抗体は DNA 結合ドメインを認識しないため、細胞内の局在を確認できなかった。このため、DNA 結合ドメインの C 末端側に存在する 385 アミノ酸残基に含まれる核移行シグナル以外の機能については不明である。

HSV-1 の ICP4 が ICP4 遺伝子プロモーターの転写活性を抑制するためには以下の条件が必要である。1) ICP4 がアルファヘルペスウイルスの IE 遺伝子転写開始部位の近傍に存在する特定の塩基配列 (ATCGTCNNNNYCGRC) への結合、2) ICP4 結合領域と TATA ボックスとの距離と向きとの適性 (Kuddus ら, 1995)、3) DNA 結合ドメインによる DNA Bending (Everett ら, 1992)、4) ICP4 の TATA 結合蛋白 (TBP) および転写基本因子である TFIID との相互作用による DNA とのより強い結合 (Smith ら, 1993)、5) ICP4 と細胞の転写調節因子との ICP4 遺伝子プロモーターの共占有。以上の条件が満たされた結果として細胞の転写調節因子である Sp1 や USF の転写活性作用が阻害され、ICP4 遺伝子の転写が抑制されると考えられている。(Gu ら, 1993; Rivera ら, 1994)。IE180 について

は TEIID や TFIIB の転写基本因子と相互作用を持つことが報告されている (Abmayr ら, 1988)。しかし、Bending 能や他の転写調節因子との相互作用についての詳しい報告はない。

HSV-1 では、ICP4 遺伝子プロモーターの転写を抑制する欠失 ICP4 変異体が構築されている (Spepard ら, 1990)。この変異体は X25 と呼ばれ、DNA 結合能および 2 量体形成能を有し、転写活性化能を欠損させたものである。この X25 を応用した intracellular immunization の報告 (Spepard ら, 1990; Smith and DeLuca, 1992) がすでになされている。すなわち X25 を発現する細胞およびトランスジェニックマウスは、HSV-1 の感染に対し抵抗性を示した。

本研究で得られた成績に基づいて、現在、IE180 の転写抑制効果を示す最小の変異体である dIN454-C1081 を細胞およびマウス受精卵に導入し、ウイルスの複製阻止の原理に基づく遺伝子治療法である intracellular immunization が、オーエスキー病の新たな防除法として有効であるかを検討している。

V. 要 約

オーエスキー病ウイルス(ADV)が感染した細胞において最初に発現する前初期(IE)遺伝子産物である分子量 180,000 ダルトンの蛋白を IE180 と呼ぶ。IE180 は ADV の前期および後期遺伝子プロモーターに作用して転写を活性化する一方、IE 遺伝子の転写を抑制する。この様に相反するそれぞれの機能ドメインを明らかにするために、一連の欠失 IE 遺伝子を作成した。それぞれの欠失遺伝子の発現産物が前期チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子、後期 gX 遺伝子および IE 遺伝子のプロモーターに及ぼす影響をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現系を用いて解析した。また、IE180 が転写調節因子として機能を発揮するためには核に局在する必要がある。これらの欠失 IE 遺伝子を導入した細胞を蛍光抗体法によって解析し、IE180 の核への移行に関与する部位を検索した。

IE180 のアミノ(N)末端の 132 アミノ酸残基を欠失した変異体は、tk および gX 遺伝子プロモーターに対する転写活性化作用を欠いていた。カルボキシル(C)末端 379 アミノ酸残基を欠失させた変異体は IE180 と同様の転写活性化作用を示した。C 末端側の 560 アミノ酸残基を欠失させた変異体には転写活性化作用を認めなかった。以上の成績から、転写増強作用に与る領域が IE180 の 1,460 アミノ酸残基の内、1 から 1,081 番のアミノ酸配列内に存在することが判った。

IE180 の C 末端側 379 アミノ酸残基を欠く変異体は、IE180 と同

様に IE 遺伝子の転写を抑制した。C 末端側の 560 アミノ酸残基を欠く変異体は、IE 遺伝子の転写を抑制しなかった。IE180 の N 末端側の 453 アミノ酸残基を欠く変異体は IE180 よりさらに強い転写抑制作用を示した。N 末端側の 617 アミノ酸残基を欠失させた変異体は転写抑制作用を失った。また、C 末端および N 末端双方から各々 379 および 453 のアミノ酸残基を欠失させた変異体は強い転写抑制作用を示した。以上の成績は、IE180 の 454 から 1,081 アミノ酸配列内に IE 遺伝子の転写を抑制する領域が存在することを示す。

IE180 の核への移行は塩基性アミノ酸から成る核移行シグナルによるものと考えられる。IE180 分子には 464~468 番と 930~934 番に塩基性アミノ酸クラスター(RRKRR)が存在する。IE180 の C 末端側の 510 アミノ酸残基を欠く変異体は IE180 と同様、核に局在したが、C 末端側から 560 アミノ酸配列を欠く変異体は、核に局在しなかった。この変異体は 930~934 番の核移行シグナルを欠く。しかし、この変異体から C 末端側をさらに 271 アミノ酸残基、計 831 アミノ酸を欠失させた変異体は核内に検出された。一方、C 末端側の 1,157 アミノ酸残基を欠く変異体は核と細胞質の両方に検出された。この変異体は 464 番からの RRKRR 配列を欠く。次に、各々の RRKRR 配列を含む部位を欠失させた変異体を作成した。IE180 の 333 から 575 番のアミノ酸配列を欠失させた変異体は核に局在した。一方、C 末端側の 900 から 950 番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体は細胞質に留まった。従って、IE180 の 900 から 950 番目までのアミノ酸配列内に核への移行に関与する部位が存在すると考えられる。IE180 の C 末端側 560 アミノ酸残

基を欠失させた変異体が転写調節作用を示さなかった理由は、この変異体が核に局在しなかったためであろう。

以上の成績から、IE180の転写活性化作用には、IE180のN末端に存在する34酸性アミノ酸部位、454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルが必要であること、およびIE遺伝子の転写抑制作用にはIE180の454～696番目のDNA結合ドメインおよび930～934番目の核移行シグナルが必要であることが判った。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、4年間にわたり終始懇切丁寧な御指導ならびに御助言を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座微生物教室 喜田 宏教授、岡崎 克則助教授、伊藤 壽啓助手、北海道大学免疫科学研究所 附属動物実験施設 小野 悦郎助教授ならびに清水悠紀臣名誉教授に深謝いたします。

また本論文作製にあたり、貴重な御助言ならびに有益な御示唆を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室 橋本 信夫教授に深謝いたします。

本実験に使用したプラスミド pRW7CAT を分与していただきましたチューリッヒ大学 M. Schwyzer 博士に深謝いたします。COS-1 細胞を分与していただきましたラッシュ大学 K.G.Gupta 博士に深謝いたします。Vero 細胞を分与していただきましたラッシュ大学 M. Peeples 博士に深謝いたします。ウサギ抗 IE180 ペプチド抗体を分与していただきました農林水産省家畜衛生試験場 山田俊治博士に深謝いたします。CPK 細胞ならびに ADV YS-81 株を分与していただきました農林水産省家畜衛生試験場 清水実嗣博士に深謝いたします。

さまざまな面で御協力頂いたイスラム-モハメド-アリムル様、井上洋子様、迫田義博様、清水礼子様から心から感謝します。また、本研究の遂行にあたり多方面にわたり御協力くださいました講座員各位に感謝します。

最後に大学院進学を賛成し、支援してくれた両親に心から感謝します。

文 献

1. Abmayr, S. M., Workman, J. L. and Roeder, R. G. (1988): The pseudorabies immediate early protein stimulates in vitro transcription by facilitating TFIID: promoter interactions. *Genes Dev.*, 2, 542-553
2. Baltimore, D. (1988): Intracellular immunization. *Nature*, 335, 395-396
3. Ben-Porat, T., Rixon, F. J. and Blankenship, M. L. (1979): Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. *Virology*, 95, 285-294
4. Breeuwer, M. and Goldfarb, D. S. (1990): Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic protein. *Cell*, 60, 999-1008
5. Campbell, M. E. and Preston, C. M. (1987): DNA sequences which regulate the expression of the pseudorabies virus major immediate early gene. *Virology*, 157, 307-316
6. Cheung, A. K. (1988): Fine mapping of the immediate-early gene of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. *J. Virol.*, 62, 4763-4766
7. Cheung, A. K. (1989): DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res.*, 17, 4637-4646

8. Chlan, C. A., Coulter, C. and Feldman, L. T. (1987): Binding of the pseudorabies virus immediate-early protein to single-stranded DNA. *J. Virol.*, 61, 1855-1860
9. Cohen, J. I., Heffel, D. and Seidel, K. (1993): The transcriptional activation domain of varicella-zoster virus open reading frame 62 protein is not conserved with its herpes simplex virus homolog. *J. Virol.*, 67, 4246-4251
10. Cromlish, W. A., Abmayr, S. M., Workman, J. L., Horikoshi, M. and Roeder, R. G. (1989): Transcriptionally active immediate-early protein of pseudorabies virus binds to specific sites on class II gene promoters. *J. Virol.*, 63, 1869-1876
11. DeLuca, N. A. and Schaffer, P. A. (1987): Activities of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP4 genes specifying nonsense peptides. *Nucleic Acids Res.*, 15, 4491-4511
12. DeLuca, N. A. and Schaffer, P. A. (1988): Physical and functional domains of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein ICP4. *J. Virol.*, 62, 732-743
13. Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1986): Protein import into the nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2, 367-390
14. Everett, R. D., DiDonato, J., Elliott, M. and Muller, M. (1992): Herpes simplex virus type 1 polypeptide ICP4 bends DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1229-1233
15. Everett, R. D., Elliott, M., Hope, G. and Orr, A. (1991): Purifi-

- cation of the DNA binding domain of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw175 as a homodimer and extensive mutagenesis of its DNA recognition site. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4901-4908
16. Faber, S. W. and Wilcox, K. W. (1988): Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with sequences spanning the ICP4 gene transcription initiation site. *Nucleic Acids Res.*, 16, 555-570
 17. Feldman, L. T., Imperriale, M. J. and Nevin, J. R. (1982): Activation of early adenovirus transcription by the herpes virus immediate early gene: Evidence for a common cellular control factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 4952-4956
 18. Gharakhanian, E., Takahashi, J. and Kasamatsu, H. (1987): The carboxyl 35 amino acids of SV40 Vp3 are essential for its nuclear accumulation. *Virology*, 157, 440-448
 19. Green, M. R., Treisman, R. and Maniatis, T. (1983): Transcriptional activation of cloned human beta-globin genes by viral immediate-early gene products. *Cell*, 35, 137-148
 20. Gu, B., Rivera, G. R., Smith, C. A. and DeLuca, N. A. (1993): Herpes simplex virus infected cell polypeptide 4 preferentially represses Sp1-activated over basal transcription from its own promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 9528-9532
 21. Haltiner, M., Kenpe, T. and Tjian, R. (1985): A novel strategy for

- constructing clustered point mutations. *Nucleic Acids Res.*, 13, 1015-1025
22. Honess, R. W. and Roizman, B. (1975): Regulation of herpes simplex virus macromolecular synthesis: Sequential transmission of polypeptide synthesis requires functional polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 1276-1280
23. Hunter, T. and Karin, M. (1992): The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*, 70, 375-387
24. Ihara, S., Feldman, L., Watanabe, S. and Ben-Porat, T. (1983): Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. *Virology*, 131, 437-454
25. Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E. (1984a): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature.*, 311, 33-38
26. Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984b): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39, 499-509
27. Kit, S. (1994): Pseudorabies virus. In: *Encyclopedia of Virology*. Eds. Webster, R. G. and Granoff, A. Avon: The Bath Press, pp.1173-1179
28. Kluge, J. P., Beran, G. W., Hill, H. T. and Platt, K. B. (1992): Disease of Swine. In: *Pseudorabies (Aujeszky's Disease)* Eds. Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D'Allaire, S. and

Taylor, D. J. 7th.eds., Iowa U.S.A: Iowa State University Press,
pp.312-323

29. Kuddus, R., Gu, B. and DeLuca, N. A. (1995): Relationship between TATA-binding protein and herpes simplex virus type 1 ICP4 DNA-binding sites in complex formation and repression of transcription. *J. Virol.*, 69, 5568-5575
30. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
31. Martin, K. J., Lillie, J. W. and Green, M. R. (1990): Transcriptional activation by the pseudorabies virus immediate early protein. *Genes Dev.*, 4, 2376-2382
32. Moreland, R. B., Nam, H. G., Hereford, L. M. and Fried, H. M. (1985): Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 6561-6565
33. Mullen, M. A., Ciufu, D. M. and Hayward, G. S. (1994): Mapping of intracellular localization domains and evidence for colocalization interactions between the IE110 and IE175 nuclear transactivator proteins of herpes simplex virus. *J. Virol.*, 68, 3250-3266
34. Muller, M. T. (1987): Binding of the herpes simplex virus immediate-early gene product ICP4 to its own transcription start site. *J. Virol.*, 61, 858-865
35. Paterson, T. and Everett, R. D. (1988): Mutational dissection of the HSV-1 immediate-early protein Vmw175 involved in transcriptional

- transactivation and repression. *Virology*, 166, 186-196
36. Paterson, T. and Everett, R. D. (1990): A prominent serine-rich region in Vmw175, the major transcriptional regulator protein of herpes simplex virus type 1, is not essential for virus growth in tissue culture. *J. Gen. Virol.*, 71, 1775-1783
 37. Peeples, M. E. (1988): Differential detergent treatment allows immunofluorescent localization of the Newcastle disease virus matrix protein within the nucleus of infected cells. *Virology*, 162, 255-259
 38. Pellicer, A., Wigler, M., Axel, R. and Silverstein, S. (1978): The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell.*, 14, 133-141
 39. Perera, L. P., Mosca, J. D., Ruyechan, W. T., Hayward, G. S., Straus, S. E. and Hay, J. (1993): A major transactivator of varicella-zoster virus, the immediate-early protein IE62, contains a potent N-terminal activation domain. *J. Virol.*, 67, 4474-4483
 40. Rakusanova, T., Ben-Porat, T., Himeno, M. and Kaplan, A. S. (1971): Early functions of the genome of herpesvirus I. Characterization of the RNA synthesized in cycloheximide treated, infected cells. *Virology*, 46, 877-889
 41. Richardson, W. D., Roberts, B. L. and Smith, A. E. (1986): Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell*, 44, 77-85
 42. Rivera, G. R., Imbalzano, A. N., Gu, B. and Deluca, N. A. (1994):

- The role of ICP4 repressor activity in temporal expression of the IE-3 and latency-associated transcript promoters during HSV-1 infection. *Virology*, 202, 550-564
43. Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1987): The effect of protein context on nuclear location signal function. *Cell*, 50, 465-475
 44. Roberts, C. R., Weir, A. C., Hay, J., Straus, S. E. and Ruyechan, W. T. (1985): DNA-binding proteins present in varicella zoster virus-infected cells. *J. Virol.*, 55, 45-53
 45. Roizman, B. (1995): Classification and nomenclature of viruses, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol. Suppl. No.10*, 114-127
 46. Schwyzer, M., Vlcek, C., Menekse, O., Fraefel, C. and Paces, V. (1993): Promoter, spliced leader, and coding sequence for BICP4, the largest of the immediate-early proteins of bovine herpesvirus 1. *Virology*, 197, 349-357
 47. Shepard, A. A., Imbalzano, A. N. and DeLuca, N. A. (1989): Separation of primary structural components conferring auto-regulation, transactivation, and DNA-binding properties to the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein ICP4. *J. Virol.*, 63, 3714-3728
 48. Shepard, A. A., Tolentino, P. and DeLuca NA.(1990) trans-dominant inhibition of herpes simplex virus transcriptional

- regulatory protein ICP4 by heterodimer formation. *J. Virol.*, 64, 3916-3926
49. Silver, P. A., Keegan, L. P. and Ptashine, M. (1984): Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 5951-5955
50. Smith, C. A., Bates, P., Rivergonzalez, R., Gu, B. H. and Deluca, N. A. (1993): ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type-1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J. Virol.*, 67, 4676-4687
51. Smith, C. A. and DeLuca, N. A. (1992): Transdominant inhibition of herpes simplex virus growth in transgenic mice. *Virology*, 191, 581-588
52. Smith, R. H., Zhao, Y. and O'Callaghan, D. J. (1994): The equine herpesvirus type 1 immediate-early gene product contains an acidic transcriptional activation domain. *Virology*, 202, 760-770
53. Thali, M., Rusconi, S. and Schaffner, W. (1990): Immediate early protein of pseudorabies virus is a general transactivator but stimulates only suboptimally utilized promoters. A clue to specificity? *J. Mol. Biol.*, 215, 301-311
54. Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. and McKnight, S. L. (1988): Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.*, 2, 718-729

55. van Oirschot, J. T., Houwer, D. J., Moormann, R. J. M. and Berns, A. J. M. (1990): Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.*, 23, 85-101
56. 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
57. Wittmann, G. (1989) Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In: Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Eds. Wittmann, G. and Rziha, H. J. Boston, Dordrecht and London: Kluwer Academic Publisher, pp. 230-325
58. Wu, C. L. and Wilcox, K. W. (1990): Codons 262 to 490 from the herpes simplex virus ICP4 gene are sufficient to encode a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 18, 531-538
59. Wu, C. L. and Wilcox, K. W. (1991): The conserved DNA-binding domains encoded by the herpes simplex virus type 1 ICP4, pseudorabies virus IE180, and varicella-zoster virus ORF62 genes recognize similar sites in the corresponding promoters. *J. Virol.*, 65, 1149-1159
60. Yamada, S. and Shimizu, M. (1994): Pseudorabies virus immediate-early regulatory protein IE180 expressed by recombinant baculovirus is functional. *Virology*, 202, 491-495

Mapping of Functional Domains of Aujeszky's Disease Virus Immediate-early Protein

Satoshi TAHARAGUCHI

The 180 kilodalton immediate-early protein (IE180) of Aujeszky's disease virus functions as a strong transactivator of several different promoters and also as a repressor of its own transcription. To map the functional domains of IE180, a series of truncated mutants were prepared. Their transcriptional regulatory activities were analyzed using the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) assay for trans-induction of a thymidine kinase promoter-CAT gene construct and a glycoprotein X promoter-CAT gene construct and negative regulation of an IE promoter-CAT gene construct. IE180 is localized predominantly in the nuclei of infected cells. To define the nuclear localization signals within IE180, cells transfected with each truncated mutant was analyzed by indirect immunofluorescence.

Analysis of mutants truncated from the carboxy-terminal end of the 1,460-amino acid polypeptide showed that a polypeptide possessing amino acids 1 to 1,081 retained significant functions of transactivation and autoregulation potential. On the other hand, removing amino acids 1 to 132

resulted in a complete loss of transactivation potential, indicating that the domain responsible for transactivation is located in the amino-terminal end of IE180. Additional amino-terminal truncation up to amino acid 453 did not affect the autoregulation activity, indicating that the region between amino acids 454 and 1081 has autoregulation potential.

Indirect immunofluorescence analysis of the truncated mutants showed that two regions including a short sequence of basic amino acid residues (RRKRR) were associated with the nuclear localization of IE180. To assess which region substantially functions as the signal for nuclear localization of IE180 molecule, two deletion mutants lacking each region were constructed. A mutant lacking amino acids 333 to 575 was detected in the nuclei of the transfected cells, whereas the other mutant lacking amino acids 900 to 950 was detected mainly in the cytoplasm. These results suggest that the region of amino acids 900 to 950 is responsible for nuclear localization of IE180.



