



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マレック病ウイルスの主要抗原の遺伝子同定と組換えファウルポックスウイルスを利用した遺伝子産物の解析
Author(s)	吉田, 栄人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	乙第4695号
Issue Date	1995-03-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3101593
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50193
Type	doctoral thesis
File Information	000000285155.pdf



マレック病ウイルスの主要抗原の遺伝子同定と組換え
ファウルポックスウイルスを利用した遺伝子産物の解析

吉 田 栄 人

①

マレック病ウイルスの主要抗原の遺伝子同定と組換え
エファウルポックスウイルスを利用した遺伝子産物
の解析

吉田 栄人

目次

第1部 序論	
第1章 研究の背景	1
第2章 研究の目的と論文構成	3
第2部 組換えFPVの概念と構築方法	
序論	6
第1章 組換えFPV insertion vector	7
第2章 組換えFPVの構築	7
参考文献	8
Figures	10
第3部 本論	
第1章 MDV-2, -3のglycoprotein B (gB) 遺伝子の同定 およびこれらの遺伝子の組換えFPVでの発現	
要旨	13
序論	14
材料と方法	14
結果	
1-1 gB-2, -3遺伝子の同定	18
1-2 gB-2, -3遺伝子の予想されるアミノ酸配列の解析	19
1-3 組換えFPVでのgB-2, -3遺伝子の発現	20
1-4 gB-1 complexとgB-3 complexの糖鎖の解析	21
考察	22
参考文献	24
Table and Figures	27
第2章 MDV gB-1のproteolytic cleavage siteの同定 および特異性	
要旨	39
序論	39
材料と方法	42
結果	
2-1 予想される開裂部位へのsite-directed mutagenesis	43
2-2 Mutant gB-1の免疫沈降	44
2-3 gB433Aの開裂のkinetics	44
2-4 uncleaved gBの感染細胞の膜表面への輸送	44
考察	45

参考文献	46
Figures	48
第3章 中和抗体1AN86のエピトープマッピングおよび組換えFPVのワクチン効果	
要旨	53
序論	53
材料と方法	54
結果	
3-1 gB-1/gB-2キメラ遺伝子の構築	55
3-2 gB-1/gB-2キメラタンパクの免疫沈降	55
3-3 感染防御実験	56
考察	56
参考文献	58
Table and Figures	59
第4章 MDV-1 gL遺伝子の同定および組換えFPVでの発現	
要旨	62
序論	62
材料と方法	63
結果	
4-1 MDV gene clusterの同定	65
4-2 MDV感染細胞でのgL遺伝子の発現	65
4-3 組換えFPVでのgL遺伝子の発現	66
4-4 native gLとrecombinant gLの細胞内輸送	67
考察	68
参考文献	70
Figures	72
第4部 総括	
結論	84
今後の展望	85
謝辞	87

注釈

- MDV : マレック病ウイルス (Marek's disease virus)
- HVT : 七面鳥ヘルペスウイルス (herpesvirus of turkey)
- HSV : 単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus)
- EBV : エプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus)
- HCMV : 唾液腺ウイルス (human cytomegalovirus)
- PRV : オーエスキー病ウイルス (pseudorabies virus)
- VZV : 水痘・帯状ウイルス (varicella-zoster virus)
- FPV : 鶏痘ウイルス (fowlpox virus)
- gB : glycoprotein B
- gL : glycoprotein L
- gH : glycoprotein H
- gH : PRVのgB homolog
- gH : VZVのgB homolog
- CEF : ニワトリ胚繊維芽細胞 (chicken embryo fibroblast)
- DEF : アヒル胚繊維芽細胞 (duck embryo fibroblast)
- ORF : オープンリーディングフレーム (open reading frame)
- moi : 感染多重度 (multiplicity of infection)

第1部 序論

第1章 研究の背景

マレック病 (MD) はMarek's disease virus (MDV)の感染に起因するニワトリの伝染性悪性リンパ腫である。本病は神経、生殖器、各種の内臓、眼および皮膚に病変が出現する。神経が侵された場合、ニワトリは片側性あるいは両側性の進行性の神経麻痺をおこし、最終的には完全に麻痺する。内臓に腫瘍が出現した場合には、内臓の機能障害および慢性消耗性の栄養不良がおこる。本病は他の病気と異なり、孵化後早い時期に感染するがきわめて慢性的に経過し、発症する時期は遅い。中、大雛期あるいは産卵期から発症する例が多い。病勢は進行性の経過をたどり消瘦、各種の機能低下あるいは運動障害、栄養障害をおこし、ほとんどの例では回復できずに死亡する。自然感染の門戸は上部気道および眼結膜などと考えられる。MDVは感染したニワトリの体内各部位に存在する。また血液および腫瘍形成部位に大量のMDVが認められる。しかしこれらの部位に存在するウイルスはいずれも細胞の中に存在しており、細胞が死滅するとウイルスも死滅する。このため血液および腫瘍部位などに存在するウイルスが直接、ニワトリに自然感染を起こすことはない。一方、羽包上皮細胞で増殖したMDVは細胞随伴性でないために細胞が死滅しても生存している。このためニワトリから抜け落ちた羽軸根部、あるいは羽包上皮細胞で増殖し、フケとして脱落したウイルスは、飼育環境に長い間生存しており、このウイルスが自然界における本病の感染源となる。

MDVはヘルペスウイルス科に属し3つの血清型に分類される。血清型1 (MDV-1)は腫瘍原性が強くMDの病因ウイルスである。血清型2 (MDV-2)は腫瘍原性を欠く。血清型3 (MDV-3)はherpesvirus of turkey (HVT)として知られており、MDV-2と同様に腫瘍原性を欠く。モノクローナル抗体を用いた免疫学的研究によりこれら3つの血清型ウイルスには血清型共通の抗原が存在することが明らかになった (van Zaane *et al.*, 1982; Silva and Lee, 1984)。共通の抗原を有し、病原性を示さないMDV-2とMDV-3はMDV-1に対する混合2価生ワクチンとして現在世界的に広く使用されている。このワクチン株は、細胞随伴性が強く、細胞が死滅するとウイルスも死滅する。ウイ

ルスの死滅を最小限に抑えるためには細胞の生存を考慮せねばならず、凍結型のワクチンとして製造されている。凍結型ワクチンでは細胞を破壊しないようにDMSOが加えられ、液体窒素で凍結保存がなされている。そのため取り扱い是不便である。このMDワクチンは、初生雛の時期に1回接種することによって終生免疫が得られる。このことはMDワクチン株が体内で増殖して持続感染を起こし、このことにより野外強毒ウイルスによって引き起こされるMD病変形成を阻止することができる。しかしながら完全には感染を阻止できないためワクチン株と野外ウイルスの重感染が生じ、感染ニワトリからはウイルスの排泄が常時行われる。このため環境からMDVを完全には除去できない。以上のような現状より、取り扱いが容易で100%感染防御するワクチンの開発が望まれている。

当初、MDVはTリンパ球を標的細胞とするため、病理学的見地よりEpstein-Barr virus (EBV) 等と同類の γ -ヘルペスウイルスに分類された。しかし近年、一部の塩基配列、gene arrangement等の解析によりMDVゲノム構造は、両端にterminal repeat (TR)、内部にunique long segment (U_L)とunique short segment (U_S)の間のinternal repeat (IR)が存在することが明らかとなり、単純ヘルペスウイルス(HSV: herpes simplex virus)と近縁の α -ヘルペスウイルスであることが示唆された(Buckmaster *et al.*, 1988)。MDVは細胞随伴性が他のヘルペスウイルスに比べ強く、このため*in vitro*の系では感染性を有する細胞遊離性のウイルスピリオンを単離、精製し、抗原タンパクを同定することは困難である。遺伝子工学の応用は、ウイルスのDNAレベルでの解析を可能にし、MDV-1のガン化に関与すると考えられる遺伝子(Cui *et al.*, 1991)、あるいはHSV-1との相同性の比較によりいくつかの主要なenvelope glycoprotein遺伝子が同定された(Coussens and Velicer, 1988; Ross *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993)。

現在の課題は、同定されたウイルス遺伝子にコードされた抗原タンパクの機能および生理活性を解明することであり、またそのための適切なベクター系の開発である。外来遺伝子を細胞に導入し発現させるために、ウイルスをベクターとして用いる方法がある。この方法は、プラスミドのトランスフェクション法よりも一般に効率が高く、用いるウイルス固有の性質に基づいた導入ができる。また、大型DNAウイルスの場合には、外来遺伝子を挿入しても依然として感染性を保持させておくことが可能であり、親ウイルスと同様の取り扱いができる。さらに、細胞への導入にとどまらず個体へ導入することにより、目的とする遺伝子産物の性質や個体の反応

を調べることができる。MDV遺伝子産物の解析にはニワトリ由来の細胞に感染するウイルスが必要であるが、この点でファウルポックスウイルス (FPV: fowlpox virus) は最適である。FPVはワクチニアウイルスと同属のポックスウイルスで鶏痘の病因ウイルスである。全長300kbにも及ぶ二重鎖DNAゲノムを持つ巨大ウイルスであり、その弱毒株は長らく鶏痘ワクチンとして利用されてきた。FPVゲノムにはウイルス増殖にとって非必須領域が複数存在していることが *lacZ* 遺伝子をレポーターとした細胞内組換え実験により明らかになった(Ogawa *et al.*, 1990)。同定した非必須領域を外来抗原遺伝子の挿入部位として利用することで、本来の抗原タンパクの形状に近いかたちで発現することが可能となり、家禽のウイルス性疾病の組換えFPV発現システムの開発につながった。

第2章 研究の目的と論文構成

MDVの分子生物学的な解明は他のヘルペスウイルスに比べて著しく遅れている。その最も大きな理由は、MDVを培養細胞に感染させると、ウイルスは増殖するが、子ウイルスは細胞内にとどまり、培養上澄には放出されない点にある。従って、MDVウイルスビリオンを大量に調製するのが困難であるばかりでなく、高い感染多重度(moi: multiplicity of infection)で感染を行う一段増殖(one-step growth)の実験も不可能で、遺伝子発現の時間的推移を調べるのが困難であった。近年、遺伝子工学の応用により、ようやくウイルスのDNAレベルでの解析が可能になり、ウイルスのゲノム構造やHSV-1との相同性の比較によりいくつかの主要なenvelope glycoprotein 遺伝子が同定された(Coussens and Velicer, 1988; Ross *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993)。しかし、それら遺伝子産物の機能については、まだ十分な解明はなされていないのが現状である。

本研究の目的は、MDVの分子レベルでの解析を行い、MDVの感染防御に関与する抗原タンパクを同定することである。本論では、特にMDV major envelope glycoprotein であるglycoprotein B(gB)およびウイルス増殖に必須タンパクと予想されるglycoprotein L(gL)の機能・生理活性、さらに感染防御効果を組換えファウルポックスウイルス (FPV: fowlpox virus)発現システムを利用して解析を行った。gBは、すでに多くのヘ

ヘルペスウイルスで同定されており、糖タンパクとしてはヘルペスウイルス間で最も良く保存されている。HSV-1の研究より、gBはウイルスの宿主細胞への侵入、cell-to-cell fusionの機能を有していることが明らかになっている。さらに、ウイルス増殖に対する中和活性を有する抗gBモノクローナル抗体が得られており、宿主の感染防御に関与する免疫応答のターゲットであることが示唆されている。gLは、1992年HutchinsonらのグループによりHSV-1の10番目の糖タンパクとして同定された。gLは、UL領域の最初のORFであるUL1遺伝子にコードされており、ウイルス増殖に必須タンパクである。HSV-1 gLはcell-to-cell fusionに関与しており、その生理活性を示すためにはもう1つの糖タンパクであるgHとcomplexを形成し、正確なコンフォメーションをとることが不可欠である。

本研究で利用した組換えFPV発現システムは、主に家禽のウイルス性疾病の解析を目的として開発され、MDVの遺伝子産物の解析および感染防御に関しても有意義な知見を得ることが期待できる。

本研究論文は、第1部 序論、第2部 組換えFPVの概念と構築、第3部 本論、第4部 総括より構成されている。このうち第3部 本論は、次の4つの章より成っている。

第1章では、MDVワクチン株であるMDV-2, -3のglycoprotein B (gB)遺伝子(gB-2, gB-3)のクローニングを行い、その全DNA塩基配列を決定した。その結果、gB-2, -3遺伝子の予想されるアミノ酸配列は、すでに同定されているMDV-1 gB(gB-1)(L. N. Ross et al., 1989)のそれと比較するとgB-1/gB-2(83%), gB-1/gB-3(82%), gB-2/gB-3(76%)の相同性であり、また3つのgB間では72%の相同性があった。組換えFPVを利用してgB遺伝子産物の発現解析を行った。

第2章では、MDV gB-1のproteolytic cleavage siteの同定およびその特異性について解析を行った。MDV gB-1は、前駆体gp100が細胞内輸送の途中で2つのポリペプチド、gp60とgp49に開裂する。大部分のヘルペスウイルスgBも同様に2つのポリペプチドに開裂し、その予想される開裂部位には共通のアミノ酸配列(Arg-X-Arg-Arg)が存在している。MDV gB-1の開裂部位とその特異性を解明するために予想される開裂部位(Arg-Leu-Arg-Arg)に存在する3つのアルギニン残基をそれぞれアラニン残基に置換し、組換えFPVを使ってそのmutant gB-1の発現を解析した。

第3章では、中和モノクローナル抗体 1AN86 のエピトープマッピングおよび組換えFPVの感染防御効果について解析を行った。MDV gB-1に対する中和モノクローナ

ル抗体1AN86は、gB-1と同様にgB-3も認識するが、gB-2とは反応しない。gB-1/gB-2キメラ遺伝子を発現する組換えFPVを構築して、1AN86が認識する中和エピトープを解析した。

第4章では、MDV-1のゲノムDNAの*Bam*HI-D断片のDNA塩基配列の解析を行い、HSV-1の glycoprotein L(gL), uracil-DNA glycosylase, nuclear localizing phosphoproteinをコードしているUL1, UL2, UL3遺伝子と相同性のある3つのopen reading frame(ORF), MDV-1 gL, UL2, UL3 ORFを同定した。同定した3つの遺伝子のうちgL遺伝子についてMDV-1感染細胞での発現を確認した。gL遺伝子を発現する組換えFPVを構築し、MDV-1感染細胞で発現しているgLとの糖鎖修飾等の相違を調べた。

第2部 組換えFPVの概念と構築方法

序 論

本論で述べるMDV抗原遺伝子の発現およびそれら遺伝子産物の*in vivo*での免疫原性についての解析は、遺伝子工学を応用した組換えFPVを用いて行われた。FPVは、ポックスウイルスのアビポックスウイルスに属し、ニワトリの鶏痘の病因ウイルスである。ニワトリ発育卵のしょう尿膜上に接種するとポックを形成し、*in vitro*では、鶏繊維芽細胞を円形化する細胞変性効果を示す。鶏痘の病状は、皮膚に発疹（ポック）、丘疹、びらん、出血、痂皮およびその脱落、さらに羽包上皮細胞の細胞質内に封入体を形成するものと、口腔喉頭あるいは気管などの粘膜にジフテリー性の病変を示す2つの型に分類される。本病による死亡率は50～60%と推定されているが、呼吸器系が侵された場合には死亡率が上昇する。産卵鶏では産卵率の低下、ときには産卵の停止がある。防疫には、弱毒化FPV生ワクチンの接種が行われている。

FPVと同属であるポックスウイルスのワクチニアウイルスは、早くからウイルスベクターとして研究されてきた。1987年には、野生キツネの狂犬病に対する組換えワクチニアウイルスワクチンの野外試験がヨーロッパを中心に行われ、その後野生キツネの狂犬病の発生がほとんど見られなくなったことが報告されている。しかし、その一方でワクチニアウイルスの広い宿主域が問題視されている。つまり人から動物へ、あるいは動物から人へと感染が起こるために生態系の破壊が懸念されており、実用化には至っていない。FPVは、その宿主が鳥類に限定されているため自然界に及ぼす影響は極めて低く、さらに組換えFPVはワクチン株を親株としているため安全性および取り扱いについては周知である。

遺伝子工学は、生化学、生物学、免疫学等の広い分野で活用され、多くの科学的真理が解明されてきた。最近では、ヒトの遺伝病、ガン、エイズの治療に大きな期待が寄せられている。組換えFPV技術もまたニワトリのウイルス疾病の分子生物学的解明を可能にし、さらにワクチン化への第一歩を踏み出している。本論で述べる

組換えFPVについて以下にその概念および構築方法を解説する。

第1章 組換えFPV insertion vector

組換えFPV insertion vector は外来遺伝子の挿入用ベクターで、pUC18をベースとして、FPV DNA, 外来遺伝子の発現用プロモーター, multiple cloning site, *lacZ* 遺伝子とそのプロモーターより成る(Fig. 1)。FPV ゲノムよりクローニングした約 2 kb の DNA断片を相同組換え領域として使用している。このDNA断片は、FPV ゲノムの末端部より約 80 kb の位置に存在し、外来遺伝子の発現用プロモーター, multiple cloning site, *lacZ* 遺伝子とそのプロモーターは、このDNA断片中の *EcoRV* site に挿入されている。*EcoRV* siteは、19.7 kDa ポリペプチドをコードした open reading frame (ORF) 上に存在しているが、この遺伝子の発現はウイルスの増殖にとって非必須であることが確認されている。外来遺伝子の発現用プロモーターは、ワクチニアウイルスのプロモーターを最適化した強力な合成プロモーターを用いた (Davison *et al.*, 1989a, 1989b)。このプロモーターは、感染初期、後期発現のための2つの要素より成り、FPVでも同様に機能する。初期プロモーターは、ウイルス感染後、約15時間までの転写を促進し、その配列は14 bp のAに富むcritical 領域を含む。後期プロモーターは、20 bpのTクラスター、そして最もよく保存されている転写開始配列 TAAATより成る。外来遺伝子は、*Bam*HI site から *Sa*II site までの multiple cloning site に挿入することができる。*Sa*II site の下流には、potential poxvirus early transcription terminator (Rohrmann *et al.*, 1986)である TTTTTAT配列 が位置している。*lacZ* 遺伝子は β -ガラクトシターゼをコードしており、組換えFPVを単離するためのマーカー遺伝子として機能する。この *lacZ* 遺伝子のプロモーター P17 はFPV由来の初期プロモーターで、その配列はGTTGAAAAAATAATATAである。

第2章 組換えFPVの構築

Fig. 1 に示した insertion vector の multiple cloning site に外来遺伝子を挿入し、組換え

FPV構築のためのtransfer vectorを構築する。このtransfer vectorをwild type FPV感染細胞にトランスフェクションする。従来、トランスフェクションの方法としてリン酸カルシウム法が用いられてきたが、エレクトロポレーション法を用いることにより、組換え効率は10倍以上に高められた。細胞質内では、感染したFPVのゲノムDNAとtransfer vectorが存在する。FPVのDNA複製が生じる過程で、transfer vector中のFPV DNA断片とそれに相同なウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、間に挿入されている外来遺伝子および*lacZ*遺伝子がウイルスゲノム内に挿入される。以後、通常のウイルス増殖過程を経由して組換えウイルスが形成される (Fig. 2)。FPVは感染後、約6日でプラークを形成する。この際、 β -ガラクトシターゼの基質であるBluo-galを含むアガー培地をプレートに重層する。組換えFPVは、*lacZ*遺伝子にコードされた β -ガラクトシターゼが発現し、Bluo-galを分解して青色プラークを形成する (Fig. 3)。組換えFPVは、この青色プラークをピックアップして単離、純化できる。

文 献

- BUCKMASTER, A. E., SCOTT, S. D., SANDERSON, M. J., BOURSNEILL, M. E. G., ROSS, L. J. N., and BINNS, M. M. (1988). Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. *J. Gen. Virol.* 69, 2033-2042.
- CUI, Z., LEE, L. F., LIU, J., and KUNG, H. (1991). Structure analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. *J. Virol.* 65, 6509-6515.
- COUSSENS, P. M. and VELICER, L. F. (1988). Structure and complete nucleotide sequence of the Marek's disease herpesvirus gp57-65. *J. Virol.* 62, 2373-2379.
- DAVISON, A. J. and MOSS, B. (1989a). Structure of vaccinia virus early promoters. *J. Mol. Biol.* 210, 749-769.
- DAVISON, A. J. and MOSS, B. (1989b). Structure of vaccinia virus late promoters. *J. Mol. Biol.* 210, 771-784.
- OGAWA, R., YANAGIDA, N., SAEKI, S., SAITO, S., OHKAWA, S., GOTOH, H., KODAMA, K., KAMOGAWA, K., SAWAGUCHI, K., and IRITANI, Y. (1990). Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. *Vaccine* 8, 486-490.
- ROHRMANN, G., YUEN, L., and MOSS, B. (1986). Transcription of vaccinia virus early genes by enzymes isolated from vaccinia virions terminates downstream of a regulatory sequence. *Cell* 46,

1029-1035.

- ROSS, L. J. N., SANDERSON, M., SCOTT, S. D., BINNS, M. M., DOEL, T., and MILNE, B. (1989). Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804.
- SCOTT, S. D., SMITH, G. D., ROSS, N. L. J., and BINNS, M. M. (1993). Identification and sequence analysis of the homologues of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein H in Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. *J. Gen. Virol.* 74, 1185-1190.
- SILVA, R. F. and LEE, L. F. (1984). Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus or turkey herpesvirus. *Virology* 136, 307-320.
- VAN ZAANE, D., BRINKHOF, J. M. A., WESTENBRINK, F., and GIELKENS, A. L. J. (1982). Molecular-biological characterization of Marek's disease virus I. Identification of virus-specific polypeptides in infected cells. *Virology* 121, 116-132.

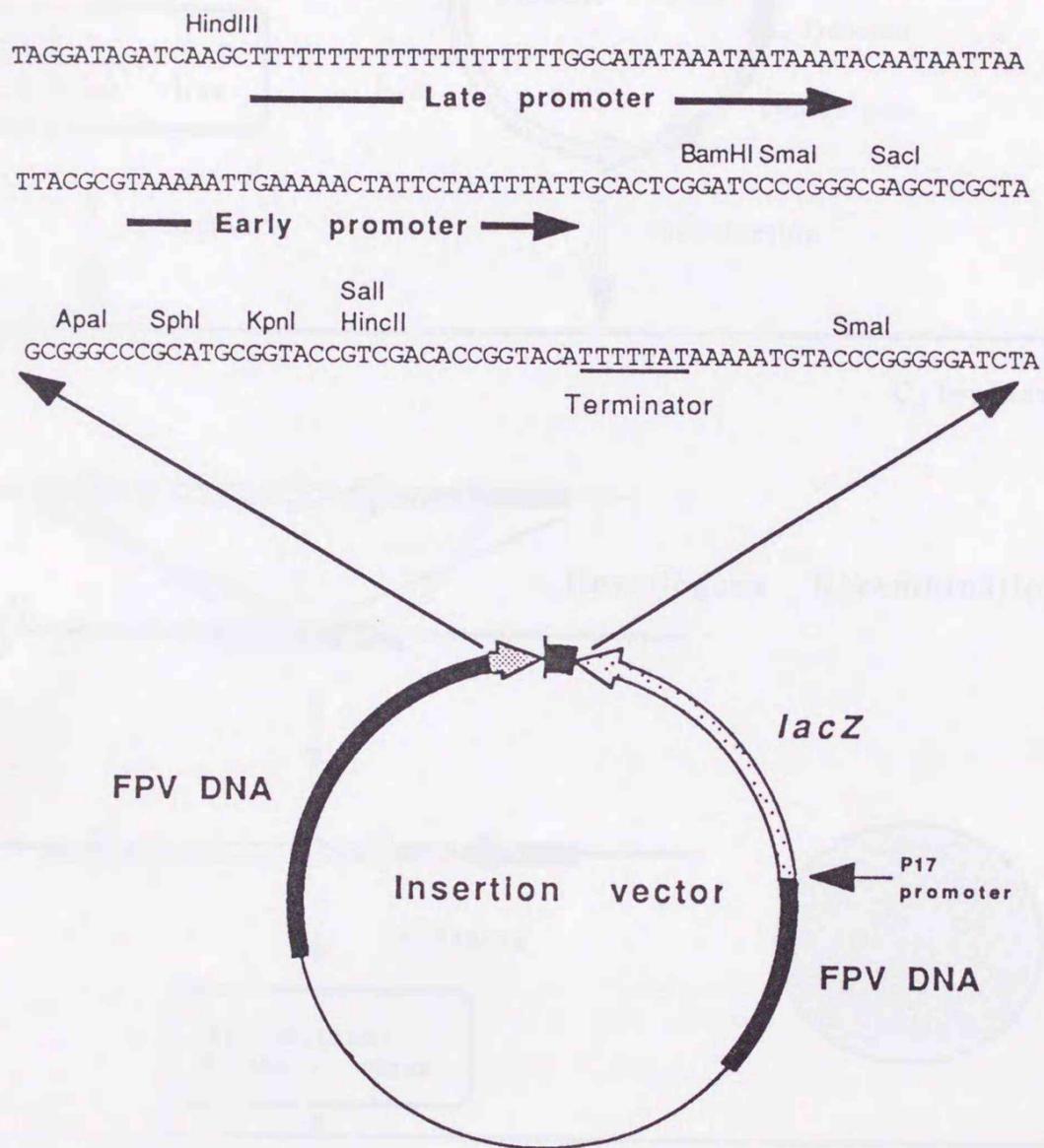


Fig. 1: Features of insertion vector. The insertion vector comprises fowlpox virus DNA, *lacZ* gene, synthetic strong late/early poxvirus promoter (Davison *et al.*, 1989a, 1989b), and multiple cloning site for insertion of a foreign gene.

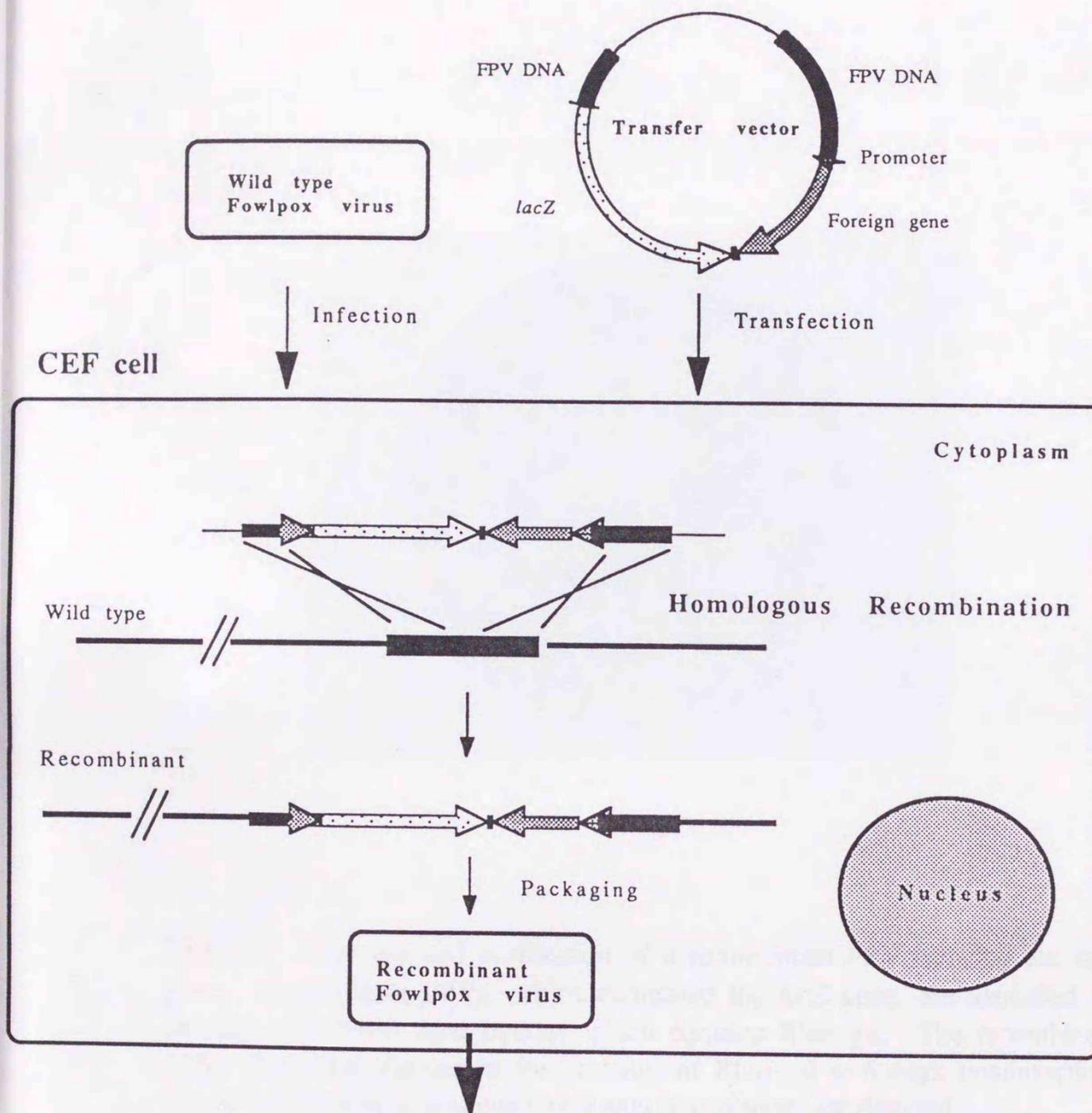


Fig. 2: Schematic representation of the generation of recombinant fowlpox virus. A plasmid containing a foreign gene under control of a synthetic promoter and *lacZ* gene as a selection marker, and flanked by fowlpox virus DNA is introduced by transfection into fowlpox virus infected cells. The foreign gene and *lacZ* gene are inserted into the virus genome by homologous recombination and the resulting recombinant DNA genome is packed to form live recombinant fowlpox virus.

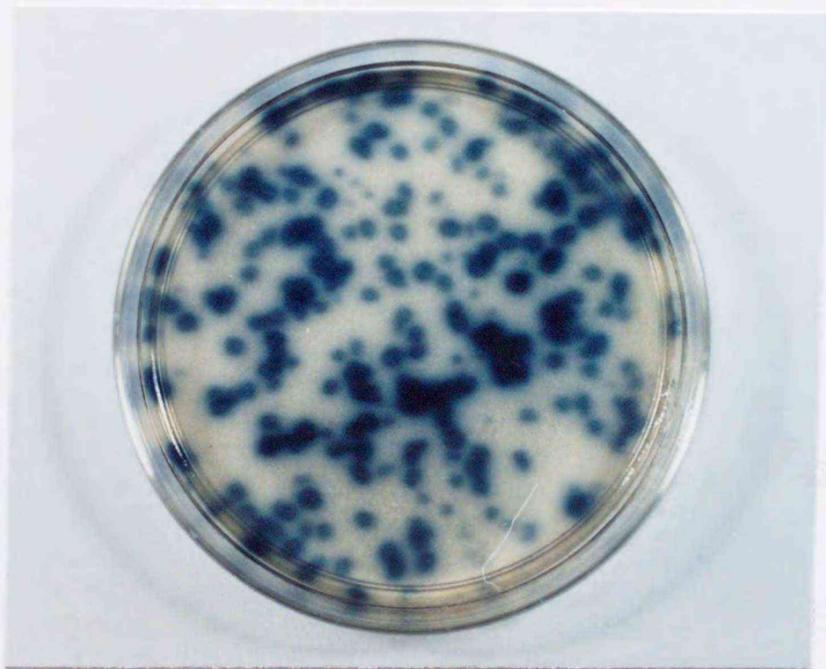


Fig. 3: Selection and purification of a recombinant FPV carrying the *lacZ* gene. Recombinant FPVs, which expressed the *lacZ* gene, are identified by staining with Bacto Agar overlay which contains Blu-gal. The recombinant FPVs form blue plaques in the presence of Blu-gal at 6 days postinfection. Plaque purification is continued until only blue plaques are detected.

第3部 本論

第1章 MDV-2, -3 の glycoprotein B (gB) 遺伝子の同定 およびこれらの遺伝子の組換えFPV での発現

要旨

マレック病ウイルス(MDV)はヘルペスウイルス科に属し3つの血清型に分類される。血清型1 (MDV-1)は腫瘍原性が強くマレック病である悪性リンパ腫の病因ウイルスである。血清型2 (MDV-2)は腫瘍原性を欠く。血清型3 (MDV-3)はherpesvirus of turkey (HVT)として知られており、MDV-2と同様に腫瘍原性を欠く。病原性を示さないMDV-2, -3はMDV-1に対する混合2価生ワクチンとして現在使用されている。本章では、MDV-2, -3のワクチン株ウイルスのglycoprotein B (gB)遺伝子(gB-2, gB-3)のクローニングを行い、その全DNA塩基配列を決定した。gB-2, -3遺伝子の予想されるアミノ酸配列をMDV-1 gB(gB-1)(L. N. Ross *et al.*, 1989)のそれと比較すると3つのgB間で72%の相同性があり、共通の特徴として10ヶ所のシステイン残基、potential N-linked glycosylation siteの8ヶ所が保存されていた。gB-1は、前駆体gp100が、細胞内輸送の途中でgp60とgp49に開裂する。予想される開裂部位には3つのアルギニン残基が存在しているが、gB-2, -3にも全く同じ部位にこの共通配列が存在していた。これらの結果より3つのgBは、非常に類似したコンフォメーションをとっていると予想された。さらに3つのgB遺伝子をそれぞれ組換えFPVに挿入し、発現の解析を行った。組換えFPVで発現した3つのgB遺伝子産物は、ともにauthenticであった。gB-1とgB-3はアミノ酸配列より予想される分子量はほぼ同一であるにもかかわらず、MDV感染細胞で発現したgB-1とgB-3には分子量の相違があった。この相違は、gB-1とgB-3間の糖鎖修飾の程度の違いであることがEndoglycosidaseを使った解析で明らかになった。

序論

glycoprotein B (gB) はヘルペスウイルスの糖タンパクとしてHSV-1 で最初に同定され、ウイルスの宿主細胞への侵入 (Haffey and Spear, 1980; Cai *et al.*, 1988)、cell to cell fusion (Bzik *et al.*, 1984) に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらにウイルス増殖に対する中和活性を有する抗 gB モノクローナル抗体が得られ、宿主の感染防御に関与する免疫応答のターゲットであることが示唆された (Glorioso *et al.*, 1984)。遺伝子工学を応用して構築された組換え gB-ワクチニアウイルスは動物実験において中和抗体を誘導し、HSV-1 に対する感染防御に成功した (Blacklaws *et al.*, 1990)。他のヘルペスウイルスの研究でも gB homolog が次々と同定され、コンピューター解析により、gB はすべてのヘルペスウイルス間で最もよく保存されている糖タンパクであることが示された。それゆえ、ヘルペスウイルスの感染防御に関する研究は gB を中心に進められ、human cytomegalovirus (HCMV), pseudorabies virus (PRV) 等のいくつかのウイルスの gB でも HSV-1 gB と同様に中和抗体を誘導できるという結果が得られている (Cranage *et al.*, 1986; Ben-Porat *et al.*, 1986)。

MDV gB-1 は、最初 Churchill (1969) らによって B antigen として同定され、1989 年、Ross らのグループにより DNA 塩基配列が決定されると B antigen と gB homolog (gB-1) が同一タンパクであることが明らかになった。1992 年、Nazerian らは gB-1 の免疫原性を検討するために gB-1 遺伝子を FPV に挿入した組換え FPV を構築し、病原体に対して隔離された環境下で飼育されたニワトリ (SPF chicken: specific pathogen free chicken) に接種後、強毒 MDV-1 株で攻撃実験を行った。その結果、100% の感染防御に成功し、gB-1 の免疫原性のみならず組換え gB-FPV のワクチンとしての有効性が明らかになった。

本章では、MDV ワクチンとして使用されている MDV-2, MDV-3 の glycoprotein B (gB) 遺伝子 (gB-2, gB-3) を同定し、gB-1 遺伝子との相同性比較を行うとともに組換え FPV を用いてそれら遺伝子の発現の解析を行った。

材料と方法

細胞とウィルス

MDV-1 (血清型1) GA株はduck embryo fibroblast (DEF) cellで増殖、継代した。MDV-2 (血清型2) SB-1株、MDV-3 (血清型3) FC126株はchicken embryo fibroblast (CEF) cellで増殖、継代した。組換えFPVの構築はワクチン株であるUSDA株 (Nazerian *et al.*, 1989)を親株として使用し、得られた一連の組換えFPVはCEF cellで増殖、継代した。DEF cell及び CEF cellは4% calf serumを含むLeibovitz-McCoy medium (GIBCO Laboratories)で培養した。

サザンハイブリダイゼーション

MDV-2 SB-1株感染細胞をトリプシン処理によりプレートから回収した。PBSで2回洗浄後、proteinase K (150 μ g/ml Proteinase K, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% 2-mercaptoethanol)により消化し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりMDV-2 ゲノムDNAを得た。MDV-3 *Bam*HI-D断片はコスミドクローン (Dr. Nonoyamaより分与)より単離された。これらのDNAは各種制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動で分離し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。プローブのラベリングはrandom priming system (Prime-It™; Stratagene) と [α -³²P]-dCTPを用いて行われた。ハイブリダイゼーションは6X SSC, 0.5% SDS, 100 μ g/ml salmon DNA 存在下、65°Cで20時間加熱し行った。フィルターの洗いは1X SSC/0.1% SDS, 0.2X SSC/0.1% SDS でそれぞれ2回ずつ65°C、30分間行った。

DNA塩基配列分析

gB-2, gB-3遺伝子を含むDNA断片を、適当な制限酵素で切断しpUC18にサブクローニングした。DNA塩基配列決定には、TAQuence DNA sequence kit (United States Biochemical Corp.)と [³⁵S]-dATPを使用した。

得られたDNA塩基配列のデータは、ウィスコンシン大学 Genetics Computer Group (GCG)のGAPとPILEUP program (Devereux *et al.*, 1984)によってalignmentされた。

gB-2 遺伝子の大腸菌での発現及び抗gB-2抗体の取得

gB-2 遺伝子が大腸菌で発現させるための発現用ベクターとしてpATH vector

(Koerner *et al.*, 1991)を用いた。pATH vector は *trpE* プロモーター下流に *trpE* 遺伝子がコードされており外来遺伝子を3'末端部に挿入することができる。*trpE* fusion proteinの発現は、3-indoleacrylic acid (IAA)の添加により誘導される。発現したタンパクは inclusion body として容易に精製できる。gB-2 遺伝子を中央部 1,121 bp *EcoRV*-*Bam*HI, 中央部 621 bp *Eco*RI, C末 495 bp *Sac*I-*Bam*HI の3つの断片に分割し、それぞれ上記のpATH vector に挿入した。構築したプラスミド pATH-gB2M1, pATH-gB2M2, pATH-gB2C は、大腸菌RR1株に形質転換し、3種類の *trpE* fusion proteinの *trpE*-gB2M1, *trpE*-gB2M2 および *trpE*-gB2C の発現をSDS-PAGEにより確認した。部分的に精製した *trpE* fusion protein 約200 μ gをそれぞれウサギに免疫し、抗血清を得た。

gB-2, gB-3 遺伝子 transfer vector の構築

gB-2遺伝子にPCRを用いてスタートコドンATGの上流に *Bam*HI site を導入し、さらに potential poxvirus early transcription terminatorである TTTTCT配列を TCTTTCT配列に変更した。使用したプライマーのDNA塩基配列は5'-CCGGGGATCCCGTAATG AACCATTTTCAGTG-3' (*Bam*HI siteとATGはアンダーラインで示す)、5'-CGACCG CCGGTGGGCAGAGAGAAAGAATGAGGACT-3' (termination signalの除去のためAをGに置換)である。PCRにより得られたDNA断片はDNA塩基配列を確認した後、gB-2 ORFとして再構築し、insertion vector pNZ1729R (Yanagida *et al.*, 1990)に挿入した。構築したtransfer vector をpNZ29RMDgB-2と名づけた。

gB-3遺伝子も同様にしてPCRを用いてスタートコドンATGの上流に *Bam*HI siteを導入し、さらに potential poxvirus early transcription terminatorである TTTTAT配列を TCTTTAT配列に変更した。使用したプライマーのDNA塩基配列は5'-CCGGGGATCC AATCATGCCTATGACTCCTACAATGAAGTACTTTAATCGGTCTTTATTTATCTTTCTC ACCCCA-3' (*Bam*HI siteとATGはアンダーラインで示す。termination signalの除去のためTをCに置換)、5'-TTCATTCTCGTCCCTGTCGT-3'である。PCRにより得られたDNA断片はDNA塩基配列を確認した後、gB-3 ORFとして再構築し、insertion vector pNZ1729Rに挿入した。構築したtransfer vector をpNZ29RMDgB-3と名づけた。

gB-2, gB-3 遺伝子組換えFPV の構築

FPV USDA株をCEF monolayer (10^7 cells)に multiplicity of infection (moi) 0.1で感染させ、血清不含培地で5時間培養した。感染細胞をトリプシン処理し、0.7mlのSaline G buffer (0.14M NaCl, 5mM KCl, 1.1mM Na_2HPO_4 , 1.5mM KH_2PO_4 , 0.5mM MgCl_2 , 0.011% glucose) に懸濁した。この細胞懸濁液に transfer vectorの pNZ29RMDgB-2あるいは pNZ29RMDgB-3を 10 μg 加え、Cell-Porator apparatus (GIBCO/BRL)で 300V (750V/cm), 330 μF の条件下でエレクトロポレーションを行った。transfected cellを3日間培養し、ウイルスシードとして組換えFPVの選択に使用した。組換えFPVはマーカー遺伝子として *lacZ* 遺伝子を含んでおり、 β -ガラクトシダーゼを発現して、基質である Bluo-galを分解し、青色プラークを形成する。ウイルスシードをCEF cellに感染させ、プレートにBluo-galを含むBacto-agarを重層して6日後、青色プラークをピックアップした。得られた組換えFPVをそれぞれrecFPV-gB2, recFPV-gB3 と名づけた。

免疫沈降及びウェスタンブロッティング

免疫沈降実験のために組換えFPV感染細胞、MDV感染細胞を 50 $\mu\text{Ci/ml}$ の ^{35}S メチオニンで6時間ラベルした。培養上澄を除き、phosphate-buffer saline (PBS)で洗浄後、lysis buffer (25mM Tris-HCl[pH 7.5], 150mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate) でcell lysateを調製した。このcell lysateはバックグラウンドを低減するためにあらかじめ normal mouse ascites fluid-protein A-Sepharose CL4Bで吸着処理した。そしてRapp (1992) らの方法に従ってモノクローナル抗体 1AN86 (Silva and Lee, 1984) を用いた免疫沈降実験を行った。サンプルは2X Laemmli buffer存在下、5分間煮沸後、SDS-PAGEにより解析した。

ウェスタンブロッティングのために組換えFPV感染細胞、MDV感染細胞をLaemmli buffer存在下、10分間煮沸した。サンプルはSDS-PAGEで泳動後、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。タンパクの検出は1次抗体として抗 *trpE*-gB2M2血清と抗 *trpE*-gB2C血清の混合血清を、2次抗体はalkaline phosphatase-conjugate goat anti-rabbit IgG (Promega) を用いた。

Endoglycosidase treatment

モノクローナル抗体 1AN86 により免疫沈降したgB-1, gB-3をEndo H, PNGase F, O-

glycosidaseでそれぞれ処理した。反応条件はBoehringer-Mannheim社のプロトコールに従った。反応の際、すべてのサンプルにはプロテアーゼによる分解を避けるため1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えた。

結果

1-1 : gB-2, -3 遺伝子の同定

gB-2 遺伝子を含むDNA断片は、MDV-2 SB-1株感染細胞より抽出したウイルスゲノムDNAを各種制限酵素で切断後、gB-1遺伝子の一部である1.6 kb *Xba*I-*Bam*HI断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより6 kb *Eco*RI断片と4 kb *Pst*I断片として得ることができた。これらのDNA断片をpUC18にクローニングし、DNA塩基配列を決定した。gB-3遺伝子を含むDNA断片は、MDV-1とMDV-3間のgene arrangementの相同性を考慮して、gB-3遺伝子が存在すると予想されるMDV-3ゲノムDNAライブラリーの*Bam*HI-D断片(25 kb)より、6.8 kb *Pst*I断片と2.4 kb *Bgl*II-*Kpn*I断片として得ることができた。クローニングは、gB-2遺伝子と同様にgB-1遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより行った。これらのDNA断片をpUC18にクローニングし、DNA塩基配列を決定した。gB-2遺伝子のゲノム上での位置は、MDV-2ゲノムDNAの*Bam*HI制限酵素地図(Ono *et al.*, 1992)と比較することにより*Bam*HI DNA断片のうちW₁-N断片に存在していることが確認できた。またこの部位は、gB-1, gB-3 遺伝子のgene locusと一致した(Fig. 4)。

Fig. 5はgB-1, gB-2, gB-3 遺伝子のalignmentを示している。gB-2 ORFは、2,595 bpより成り、865 アミノ酸をコードしている。potential promoter elementとして開始コドン(ATG)の上流約250 bpにはTATA box、さらにその上流約30 bpにはCAT boxが存在している。また別のputative cis-regulatory elementであるpromoter-specific transcription factor Sp1のGC-rich potential binding siteが、-136bp~-120 bp (GGCTCCCGCGGCTGCGG)に存在していた。終止コドン(TAG)の下流約20 bpにはpotential polyadenylation signal, AATAAA (Proudfoot and Brownlee, 1976)が存在している。同様にgB-3 ORFは、2,592 bpより成り、864 アミノ酸をコードしている。potential

promoter element として開始コドン (ATG) の上流約270 bp には TATA box、その上流約30 bp にはATTG 配列が存在している。このATTG 配列はヘルペスウイルスの一種であるPRVのgII (gB homolog)でCAT box として機能することが示唆されている (Robbins *et al.*, 1987)。Sp1 binding site がTATA box の下流140 bp に存在していた。終止コドン (TAG) の下流には3つのpotential polyadenylation signal AATAAA 配列が存在している。このうち 29 bp 下流に存在する AATAAA 配列がgB-1, gB-2遺伝子のpotential polyadenylation signal と相関する位置に存在している。このようにFig. 5 のアンダーラインで示したpotential promoter element は3つのgB遺伝子間で非常によく保存されていた。

1 - 2 : gB-2, -3 遺伝子の予想されるアミノ酸配列の解析

gB-2, gB-3 および gB-1 ORF より予想されるアミノ酸配列を、ウイスコンシン大 Genetics Computer Group (GCG) の GAP と PILEUP program (Devereux *et al.*, 1984) によってalignment した (Fig. 6)。これら3つのタンパクに共通する1次構造は、i) signal sequence 以外に存在する10ヶのシステイン残基は完全に保存されていた。このことは、3つのgB タンパクの3次構造が、類似していることを示唆している。ii) 8つのpotential N-linked glycosylation site (Asn-X-Ser/Thr) は保存されていた。iii) gB-1 precursor (gp100) はgp60とgp49の2つのポリペプチドに開裂するが、この予想される開裂部位に存在する3つのアルギニン残基は、gB-2, gB-3 の全く同じ部位に保存されていた。このことは、gB-2, gB-3 はgB-1 と同様に前駆体として翻訳後、この予想される開裂部位で切断され、感染細胞の膜表面に2つのサブユニット(gp60, gp49) を構成すると推測される。gB-1の開裂部位については、第2章で詳しく論じる。

hydropathy 解析によりこれら3つのgB はともにsignal sequence, external hydrophilic surface domain, hydrophobic membrane-spanning domain, cytoplasmic domain より構成されていた (Fig. 7)。Table 1 は3つのgB の各領域における相同性を示す。gB-1/gB-2, gB-1/gB-3, gB-2/gB-3 間のoverall amino acid identity はそれぞれ83%, 82%, 76% であり、72% のアミノ酸が3つのgB間で保存されていた。このうちtransmembrane domain (gB-1; Asp⁶⁸³-Tyr⁷⁵², gB-2; Asp⁶⁸⁴-Trp⁷⁵⁴, gB-3; Asp⁶⁸³-Tyr⁷⁵²) が最も相同性が高く (90%)、

hydropathic profile (Fig. 7) によるとこの領域は、membrane を3回貫通し membrane anchor として機能していると予測される。同様なことがHSV-1 gB でも示唆されている (Pellett *et al.*, 1985)。

1-3: 組換えFPVでのgB-2, gB-3遺伝子の発現

gB-2に対する抗血清を得るために、gB-2遺伝子の3つの領域 (226aa-601aa, 336aa-544aa, 436aa-601aa) をpATH vector に挿入した。それぞれのプラスミドで、大腸菌 RR1株を形質転換した。SDS-PAGE により3種類の *trpE* fusion protein, *trpE*-gB2M1, *trpE*-gB2M2, *trpE*-gB2Cの発現を確認した (Fig. 8)。部分的に精製した *trpE* fusion protein 約200 μ gをウサギに4週間隔で3回免疫し、*trpE*-gB2M2, *trpE*-gB2Cに対する抗血清を得ることができた。しかし、*trpE*-gB2M1は大腸菌で十分量の発現をしていたにもかかわらず、高力価の抗血清を得ることができなかつたため本実験では使用しなかつた。

gB-2, gB-3遺伝子を挿入した組換えFPV recFPV-gB2, recFPV-gB3をそれぞれ構築し (Fig. 9)、MDV感染細胞と組換えFPV感染細胞で発現しているgB-2, gB-3遺伝子産物の発現解析を行った。組換えFPV感染細胞で発現しているgB-2遺伝子産物は、3つのポリペプチドより成り、MDV-2感染細胞で発現しているgB-2 complex (gp100-2, gp60-2, gp49-2)と同一分子量であることが抗*trpE*-gB抗体 (抗*trpE*-gB2M2と抗*trpE*-gB2Cの混合抗血清) を用いたウェスタンブローディングで確認された (Fig. 10, lane 4 and 7)。

gB-3の検出にはgB-1に対するモノクローナル抗体1AN86を使用した。このモノクローナル抗体は、gB-1 complexと同様にgB-3 complexも認識することができる (Silva and Lee, 1984)。1AN86を用いた免疫沈降実験により組換えFPV感染細胞とMDV感染細胞で発現しているgB-3遺伝子産物を比較した。Fig. 11に示すようにgB-3 complexはMDV-3感染細胞 (lane 5), recFPV-gB3感染細胞 (lane 8)、ともに3つのポリペプチド (gp100, gp60, gp49)より成り、同一分子量であった。gB-1とgB-2は、アミノ酸レベルで83%の相同性があるにもかかわらず、モノクローナル抗体1AN86はgB-2 complexとは反応しなかつた。このモノクローナル抗体の認識エピトープの解析は第3章で詳しく論じる。

1-4: gB-1 complex と gB-3 complex の糖鎖の解析

gB-3 complexのうちgp100-3, gp49-3の分子量はgB-1 complexのそれらよりわずかに大きく、gp60-3はgp60-1より小さい(Fig. 11, lane 3 and 5)。アミノ酸配列より予想されるgp60-1, gp60-3の分子量はそれぞれ47.5kDa, 47.7kDa、gp49-1, gp49-3はともに48.0kDaでgB-1, gB-3 complexの2つのタンパクは、計算上ほぼ同一分子量を有している。それゆえFig. 11のSDS-PAGEで観察された分子量の相違はタンパクの修飾、特に糖鎖付加が影響していると考えられた。

糖タンパクの糖鎖には主にO-linked carbohydrate と N-linked carbohydrateの2種類がある。前者はセリンまたはスレオニン残基に糖鎖の付加が起こる。このO-linked glycosylationを調べるためにO-glycosidaseを使用した。gp60-1とgp60-3ではO-glycosidase処理により同程度の分子量の減少が見られた(Fig. 12, lane 2 and 6)。O-glycosidaseにはシアリダーゼ活性がわずかに混入しているため、タンパクに結合したシアル酸に対しても活性を示す。この可能性を排除するため、前もってシアル酸を特異的に除去する酵素neuraminidaseでgB-1, gB-3 complexを処理したが分子量に変化はなかった。この結果より、gp60-1とgp60-3にはO-linked carbohydrateが付加されていることが明らかになった。しかし、gB-1 complexとgB-3 complexの間の分子量の相違には関与していなかった。また前述したようにO-linked glycosylationはセリンまたはスレオニン残基に修飾が起こるが、周辺のアミノ酸配列のconsensus sequenceは明らかではなく、むしろタンパクのコンフォメーションが影響していると考えられる。このためgp60のO-linked glycosylationの部位を特定することはできなかった。一方、後者のN-linked glycosylationはAsn-X-Ser/Thr配列中のアスパラギン残基に糖鎖の付加が起こる。gB-1, gB-3 complexのN-linked carbohydrateの修飾を調べるためにEndo HあるいはPNGase Fで処理した。Endo Hで処理すると、gB-1, gB-3 complexの3つのポリペプチドはいずれもその分子量は減少した(Fig. 12, lane 3 and 7)。詳細にこの分子量変化を観察するとgp100-3, gp49-3は、gp100-1, gp49-1よりそれぞれ大きく分子量が減少したが、gp60-3はgp60-1よりも小さな分子量変化であった。またPNGase Fで処理するとgp60-1, gp60-3はEndo H処理よりもさらに分子量が減少したが、gp49-1, gp49-3の分子量変化はEndo H処理と同程度であった(Fig. 12, lane 4 and 8)。

考察

本章ではMDV-2およびMDV-3のgB (gB-2, gB-3) 遺伝子の同定、DNA塩基配列の決定を行い、さらにこれら遺伝子を組換えFPVに挿入し発現解析を行った。gB-2遺伝子はMDV-2ゲノムDNA BamHI W₁-N断片上に、gB-3遺伝子はMDV-3ゲノムDNA BamHI B断片上に存在していた。これら遺伝子のゲノム上の位置は、gB-1遺伝子が存在するMDV-1ゲノムDNA BamHI K₃-I₃断片の位置と一致していた。

gBはヘルペスウイルス間で最もよく保存されている糖タンパクで、ウイルスの増殖に必須であることが示されている。血清型が異なる3種類のMDV gB遺伝子は、アミノ酸レベルで72%の相同性がある。最も高い相同領域はtransmembrane domain (90% identity) で、この領域はhydrophobicity profileより膜を3回貫通していることが予測された (Fig. 8)。最近、HSV-1 gBの予測される3回のtransmembrane domainのうち最もhydrophobicな領域が実際に膜アンカーとして機能していることが明らかにされた。さらにこの領域は細胞内輸送に関与していることが示唆された (Rasile *et al.*, 1993)。3つのgBの予想される細胞膜表面の領域にはすべてのシステイン残基と8カ所のpotential N-linked glycosylation siteが保存されておりコンフォメーションも非常によく類似していることが予測された。HSV-1 gB, PRV gIIは2量体として細胞膜表面で発現していることが確認されているが (Claesson-Welsh and Spear, 1986; Whealy *et al.*, 1990)、MDV gBの分子構造に関してはほとんど解明されていない。HSV-1 gB mutantの解析より cytoplasmic domain は細胞へのウイルスの侵入や細胞融合に関与している (Highlander *et al.*, 1989; Gage *et al.*, 1993)。MDVのgBでも cytoplasmic domain には相同性の高い領域が存在する。この領域はHSV-1 gB同様の機能を有している可能性がある。

MDV-2感染細胞でのgB-2遺伝子の発現を確認するために *trpE* 発現用ベクターを用いて大腸菌でgB-2遺伝子を発現し、これをウサギに免疫して2種類の抗gB-2血清を得た。この抗血清のうち抗 *trpE*-gB2Cは、gp49-2を認識するが、gp49-1, gp49-3とも反応した。抗 *trpE*-gB2M2抗体はgp60-2とのみ反応した。この理由として抗 *trpE*-gB2M2は、antigenicityの高いと予想されるgp60-2のC末 (Ser₄₂₃-Val₄₂₈) に対して強く反応するが、この領域は3つのgBで最も相同性の低い領域であるためにgB-2, gB-3と交差しなかったと考えられる。

gB-2, gB-3遺伝子をinsertion vectorに挿入し、transfer vectorを構築した。このtransfer vectorをFPV感染細胞にエレクトロポレーション法により導入し、組換えFPVを得た。これらのgB遺伝子の発現はワクチニアウィルスの最適化したsynthetic strong late/early promoter (Davison *et al.*, 1989a, 1989b)によりコントロールされている。構築した組換えFPVは、いずれもMDV感染細胞で発現しているauthenticなgB complexと同じ分子量であり、データは示さなかったが、感染細胞の膜表面で発現していることをフローサイトメトリーで確認した。これらの結果より組換えFPVで発現したgB-2, gB-3 complexは、正確に修飾され細胞内輸送されたと考えられる。

gB-1とgB-3はアミノ酸配列より予想される分子量ではほぼ同一であるにもかかわらず、MDV-1とMDV-3感染細胞で発現しているgB-1, gB-3は分子量が異なっていた。この原因を調べるためにendoglycosidaseを用いて糖鎖修飾を調べた。その結果次のようなことが明らかになった。i) gp60-1, gp60-3はO-linked carbohydrateの修飾を受けている。ii) gp49-1, gp49-3はともにhigh mannose型の糖鎖の修飾を受けているが、gp49-3はgp49-1よりもその程度は大きい。iii) glycosylated precursorであるgp100がgp60とgp49に開裂後、gp60のみがさらに修飾を受け一部のhigh mannose型のN-linked carbohydrateはcomplex型へと変化する。以上の結果よりgp49-3がgp49-1よりも分子量が大きい理由として、gp49-1とgp49-3のpotential N-linked glycosylation siteはそれぞれ1, 3カ所であり、この数に起因していると推察される。すなわちgp49-1, gp49-3に共通に存在するpotential N-linked glycosylation siteであるAsn₆₃₂-Leu₆₃₃-Thr₆₃₄は実際にhigh mannose型の糖鎖が結合し、分子量の差から考慮してgp49-3にはさらにもう1カ所high mannose型の糖鎖が結合していると考えられる。次にgp60-1がgp60-3よりも分子量が大きい理由として小胞体からゴルジ体へ輸送される過程でhigh mannose型からcomplex型に修飾される程度が異なっていると推察される。

ヘルペスウィルスの最近の研究では、gBは中和抗体を誘導する感染防御抗原であることが示された (McDermott *et al.*, 1989; Rapp *et al.*, 1992; Riviere *et al.*, 1992)。MDVでもgB-1遺伝子を挿入した組換えFPV, recFPV-gB1はSPFニワトリにワクチンとして接種したとき100%の感染防御に成功した(Nazerian *et al.*, 1992)。本章では、現在混合生ワクチンとして使用されているMDV-2 SB-1株, MDV-3 FC126株よりそれぞれgB遺伝子をクローニングし、組換えFPVを利用してこれら遺伝子の発現解析を行った。本章で示した組換えFPV recFPV-gB2, recFPV-gB3の感染防御効果については、第3章で

詳しく論じる。

文 献

- 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.
- BLACKLAWS, B. A., KRISHNA, S., MINSON, A. C., and NASH, A. A. (1990). Immunogenicity of herpes simplex virus type 1 glycoproteins expressed in vaccinia virus recombinants. *Virology* 177, 727-736.
- BZIK, D. J., FOX, B. A., DELUCA, N. A., and PERSON, S. (1984). Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* 137, 185-190.
- CAI, W., GU, B., and PERSON, S. (1988). Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J. Virol.* 62, 2596-2604.
- CHURCHILL, A. E., CHUBB, R. C., and BAXENDALE, W. (1969). The attenuation, with loss of antigenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J. Gen. Virol.* 4, 557-563.
- CLAESSON-WELSH, L. and SPEAR, P. G. (1986). Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Virol.* 60, 803-806.
- CRANAGE, M. P., KOUZARIDES, T., BANKIER, A. T., SATCHWELL, S., WESTON, K., TOMLINSON, P., BARRELL, B., HART, H., BELL, S. E., MINSON, A. C., and SMITH, G. L. (1986). Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J.* 5, 3057-3063.
- DAVISON, A. J. and MOSS, B. (1989a). Structure of vaccinia virus early promoters. *J. Mol. Biol.* 210, 749-769.
- DAVISON, A. J. and MOSS, B. (1989b). Structure of vaccinia virus late promoters. *J. Mol. Biol.* 210, 771-784.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., and SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- GAGE, P. J., LEVINE, M., and GLORIOSO, J. C. (1993). Syncytium-inducing mutations localize to two discrete regions within the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *J. Virol.* 67, 2191-2201.
- GLORIOSO, J., SCHRODER, C. H., KUNEL, G., SZCZESIUL, M., and LEVINE, M. (1984). Immunogenicity of herpes simplex virus glycoproteins gC and gB and their role in protective immunity. *J. Virol.* 50, 805-812.
- HAFHEY, M. and SPEAR, P. G. (1980). Alterations in glycoprotein gB specified by mutants and their partial revertants in herpes simplex virus type 1 and relationship to other mutant phenotypes. *J. Virol.* 35, 114-128.
- HIGHLANDER, S. L., DORNEY, D. J., GAGE, P. J., HOLLAND, T. C., CAI, W., PERSON, S., LEVINE, M., and GLORIOSO, J. C. (1989). Identification of mar mutations in herpes simplex

- virus type 1 glycoprotein B which alter antigenic structure and function in virus penetration. *J. Virol.* 63, 730-738.
- KOERNER, T. J., HILL, J. E., MYERS, A. E., and TZAGOLOFF, A. (1991). High-expressoin vectors with multiple cloning sites for construction of trpE fusion genes: pATH vectors. *Methods Enzymol.* 194, 477-490.
- KYTE, J., and DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- McDERMOTT, M. R., GRAHAM, F. L., HANKE, T., and JOHNSON, D. C. (1989). Protection of mice against lethal challenge with herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing HSV glycoprotein B. *Virology* 169, 244-247.
- NAZERIAN, K., DHAWALE, S., and PAYNE, W. S. (1989). Structural proteins of two different plaque-size phenotypes of fowlpox virus. *Avian Dis.* 33, 458-465.
- NAZERIAN, K., LEE, L. F., YANAGIDA, N., and OGAWA, R. (1992). Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. *J. Virol.* 66, 1409-1413.
- ONO, M., KATSURAGI-IWANAGA, R., KITAZAWA, T., KAMIYA, N., HORIMOTO, T., NIIKURA, M., KAI, C., HIRAI, K., and MIKAMI, T. (1992). The restriction endonuclease map of Marek's disease virus (MDV) serotype-2 and collinear relationship among three serotypes of MDV. *Virology* 191, 459-463.
- PELLETT, P. E., KOUSOULAS, K. G., PEREIRA, L., and ROIZMAN, B. (1985). Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants. *J. Virol.* 53, 243-253.
- PELLETT, P. E., JENKINS, F. J., ACKERMANN, M., SARMIENTO, M., and ROIZMAN, B. (1986). Transcription initiation sites and nucleotide sequence of a herpes simplex virus 1 gene conserved in Epstein-Barr virus genome and reported to affect the transport of viral glycoproteins. *J. Virol.* 60, 1134-1140.
- PROUDFOOT, N. J. and BROWNLEE, G. G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.
- RAPP, M., MESSERLE, M., BULER, B., TANNHEIMER, M., KEIL, G. M., and KOSZINOWSKI, U. H. (1992). Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* 66, 4399-4406.
- RASILE, L., GHOSH, K., RAVIPRAKASH, K., and GHOSH, H. P. (1993). Effects of deletions in the carboxy-terminal hydrophobic region of herpes simplex virus glycoprotein gB on intracellular transport and membrane anchoring. *J. Virol.* 67, 4856-4866.
- RIVIERE, M., TARTAGLIA, J., PERKUS, M. E., NORTON, E. K., BONGERMINO, C. M., LACOSTE, F., DURET, C., DESMETTRE, P., and PAOLETTI, E. (1992). Protection of mice and swine from Pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. *J. Virol.* 66, 3424-3434.
- 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.
- ROSS, L. J. N., SANDERSON, M., SCOTT, S. D., BINNS, M. M., DOEL, T., and MILNE, B. (1989). Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804.
- SILVA, R. F. and LEE, L. F. (1984). Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus or turkey herpesvirus. *Virology* 136, 307-320.
- 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.

YANAGIDA, N., SAEKI, S., OGAWA, R., SAITO, S., OHKAWA, S., GOTOH, H., KODAMA, K., KAMOGAWA, K., SAWAGUCHI, K., AND IRITANI, Y. (1990). Protective immunity against Newcastle disease virus induced by fowl poxvirus recombinants. In "Vaccines90: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of Aids" (F. Brown, R. M. Chanock, H. S. Ginsberg, and R. A. Lerner, Eds.), pp. 85-89. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

YOSHIDA, S., LEE, L. F., YANAGIDA, N., and NAZERIAN, K. (1994). The glycoprotein B genes of Marek's disease virus serotype 2 and 3: Identification and expression by recombinant fowlpox viruses. *Virology* 200, 484-493.

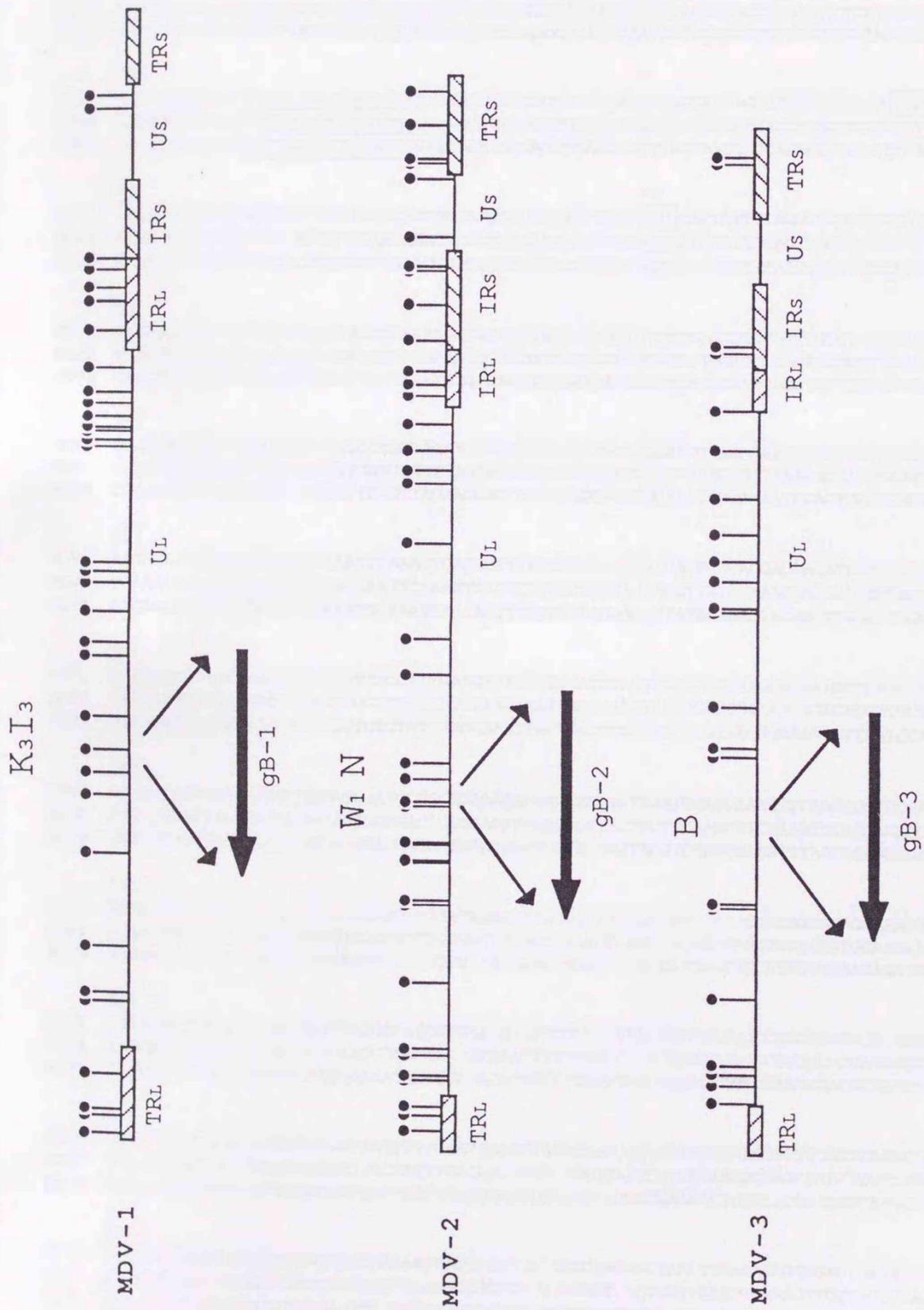


Fig. 4: Schematic diagram of the MDV genomes and *Bam*HI restriction enzyme maps. The genomes are organized into the unique long (UL), internal repeat (IR), unique short (US), and terminal repeat (TR) sequences. The arrows show the location of the gB genes of the three serotypes.

-350 -251

MDV1 TGTGGCGAATTGCACATCTGTCTGCCGACAGTTTGCAGATCAACAGCAATGGAGACTATGTATGGAAAAATGGAATATATATAACATATGAAACCGAAT
MDV2 TTCTTCCCGCTTCAGCTGCGGTGAATTCACCTGCGTGTGCAGATTGCTTGCCGCTCAATGTTAACGTGGAATACATATGGGAGGATGGAATATACGT
MDV3 TGTGGCGAATTGCAGGTGTCTGTGCCGATGGCTTACAGCTAACATTGGGGGGGAGTACATTGGGAGGATGGAGTATATCTGACATACGAGACCGATT

-250 -151

MDV1 ATCCACTTATAATGATTCTGGGGTCAGAATCAAGCACCTCAGAAACGCAAAATATGACTGCAATTATTGATACAGATGTTTTTTCGTTGCTTTATCTAT
MDV2 CACATATGAAACAGAATGCCCTCTCATAACGGTCTCCTGGTGGGAATCAGACAACGTGACCGTAATCCTTGATGCGGATGTTTTCTGCTGCTCTATTCC
MDV3 GTCCCTCTGTAGCACTTATCGGGTGTAGGGCTTATCTAACCCACAATCAATCCCCGACCGTCTCGTTGACACGGATGTTTTTCTGCTTTATTCTAT

-150 -51

MDV1 TTTGCAGTATATGGCCCCGTTACGGCAGATCAGGTGCGAGTAGAACAGATTACCAACAGCCACGCCCCATCTGACCCCGTCCAATATCTTGTGTCCCT
MDV2 ATTCTGCAGTACATGGCTCCCGCGGCTGCGGATCAGATACGTGCGGAACGAACAAACCATGACCACACCCCACTTGGCCAGTGGGATATCTTTCTGATCC
MDV3 TTTGCAGTTTATGGCTCCCGCTACGGCGGATCAGTTACGATCGGATCGGTTTAGTAATAGCCACACCACAATTGACCTAGTCAATATCGTTAGGACTT

-50 +1 50

MDV1 GCATTTTATCTCACACAATTTATGAACAGCATCATTAAAGATCATCTCACTATGCACATTTTAGGCGGAATTGCATTTTTTCTTATAGTTATCTATA
MDV2 GCGGCGGCCCTTCCACACTATCGATGAGACTCGTTAAGATCAACCCGTAATGAACCATTTCAGTGGGATCTCGTTCCACTTTTCATATCTGTGTTTTT
MDV3 TAGTATTTGATTCATACGGTCCGGTGAACTCATGCCATGACTCCTACATGAAGTACTTTAATCGGCTTTTATTTATTTTCTCACCCCAATCTTATC

51 150

MDV1 TGGTACGAATCATCTCCGAGTACCCAAAATGTGACATCAAGAGAAGTTGTTTCGAGCGTCCAGTTGCTGAGGAAGAGTCTACGTTTTATCTTTGTCCCT
MDV2 CTACTTCTTCGGCCGAGTCCGCGAGGGCCAAAACGTACCGTCCGCGGGAAGCAGTCTCGAGCGTACAGCTGCTGGAAGACGAGTCCCATTTTTTCTCTGC
MDV3 CATCGGACCTCAGAAATTAATTAACAAATGTGACAGCGCGAGAAATGTTTTCAGGCATACAGCTATCCGAAGACGAGACTACATTTTACGCTGCCCC

151 250

MDV1 CCACCAGTGGGTTCAACCGTATCCGCTCAGAACCGCCGCGAAAATGTCCGAACCTAGAAAAGCCACCGAGTGGGGTGAAGGAATCGCGATATTATTTA
MDV2 CCACCAGGCGGTTACGACCGTGGTCCGGTTAGAACCAGCGGAAAATGCCCGAACCGTAAAGGCCACCGAATGGGGAGAAGGAATGCTATACCTCT
MDV3 CCACCAGTGGGTTCAACCGTATCCGCTCAGAACCGCCGCGAAAATGTCCGAACCTAGAAAAGCCACCGAGTGGGGTGAAGGAATCGCGATATTATTTA

251 350

MDV1 AAGAGAATATCAGTCCATATAAAATTTAAAGTGCAGCTTTTATTATAAAAAATATCATTTCAGACGACGACATGGACGGGGACGACATATAGACAGATCACTAA
MDV2 TCAAAGAGAATATAAACCATACAAATTCAAAGTACGCTTTTATTATAAGAAGCTTATACAAACGACGACCTGGACCGGGACGACGTACAGACAAATCAC
MDV3 AAGAGAATATCAGTCCGATATAAAATTCAAAGTAACTTTTACTATAAGAAGCTTATACAAACTACGACGTGGACTGGGACGACGTACAGACAGATAACTAA

351 450

MDV1 TCGATATACAGATAGGACGCCCGTTTCCATTGAAGAGATCAGGATCTAATCGACGGCAAAGGAAGATGCTCATCTAAAGCAAGATACCTTAGAAACAAT
MDV2 CAACAGGTTTACAGATAGGACTCCCGTTTCCATCGAAGAAATACGGATGTAATCGACGCGAAAGGGAGATGTTCTCCAAAGCGCGATACCTGAGAAC
MDV3 CAGGTATACAGATAGAACCACCGTGTCTATCGACGAAATTAAGTTGATAGATGGTAAAGGGGAAATGTTTATCCAAAGCCCGGATCTTCCGGAACAAT

451 550

MDV1 GTATATGTTGAAGCGTTTGACAGGGATCGGGGAGAAAAACAAGTACTTCTAAAACCATCAAATTC AACACGCCCGAATCTAGGGCATGGCACACGACTA
MDV2 AATGTATACGTCGAGGCATACGACGGCGACGCGGAGAAAAACAGTACTTCTACAACCGTCAAATTC AACACGCCCGGAGTCCAAGGCGTGGCATACGA
MDV3 GTATACGTCGATGCATACGACAGGGACGAGAATGAAAAGCAGGTATTGCTACGTCCATCGAAATTTAGCACAGCCGAATCGCGGGCATGGCATACGACCA

551 650

MDV1 ATGAGACGTATACCGTGTGGGATCACCATGGATATATCGAACGGGAACCTCCGTCAATTGTATAGTAGAGGAAATGGATGCCCGCTCTGTGTTTTCCGTA
MDV2 CCAACGACACTTATACCGTATGGGGTCTCCCGTGGGTATATCGGACGGGGACGCTGTCAACGTCATAGTGAAGAAATGGATGCCAGGGCTGCATTGGG
MDV3 ACGAGACGTACACCGTGTGGGATCTCCATGGGTATATAGAACGGGCACGTCCTCAACTGCATAGTAGAAGAGATGGATGCCAGATCAGCATTTCATA

651 750

MDV1 TTCATATTTGCAATGGCCAAATGGCGACATCGGAACATATCTCCATTTTATGGTCTATCCCACAGAGGCTGCCGAGAACCCATGGGATATCCCAG
MDV2 ATACTCGTATTTTGAATGGCGAACGAGATATCGCAAATATGTCCTCCGTTTATGGCGTCCCGCCCGGAGGCCCGCCGAACCCATGGGCTATCCG
MDV3 CACGTACTTTGCAATGGCCAAATGGAGATATCGCAAACATGCTCCATTTTATGGAACAACCTCAACCGACCGCGCCGCGGAGCCCATGAGCTATCCGAA

751 850

MDV1 GATAATTTCAAACAAC TAGATAGCTATTTTCAATGGATTGGACAAGCGTCGAAAAGCAAGCCTTCCAGTCAAGCGTAACCTTCTCATCACATCACACT
MDV2 CTAGAACAATTTAGGCAGATAGACGGCTATTTCCCAATGGATCTGAGCAAGCGTCAAGAGCGAGCATACCCGTCAGCGTAACCTTCTCTGCTACTCCAC
MDV3 GACCGATTCAAGCAATTTGACAGCTATTTCCCATGGATTGGATACGCCCGAAAACCTGTCACGCCGTCAGCGCAATTTTCTCGTAACCAACATT

851 950

MDV1 TCACAGTTGGGTGGGACTGGGCTCCAAAAC TACTCGTGTATGTTCAATGACTAAGTGGAAAGAGGTGACTGAAATGTTGCGTGC AACAGTTAATGGGAG
MDV2 ATTTTACGGTTGGGTGGGACTGGGACGAAAGACCGCTCGTGTATGCTCGATGGTTAAATGGAAAGATGTTACTGAAATGTTGCGCGCAACGGTTAACGG
MDV3 TTACTGTTGGGTGGACATGGGCCCCAAAATCTCTCGGTATGCTCTATGGCAAAGTGGAAAGAGGTAACGGAAATGCTGCGTGTAGAGTGGGCAAGAA

951 1050
MDV1 ATACAGATTTATGGCCCGTGAACTTTCGGCAACGTTTATCAGTAATACGACTGAGTTTGATCCAAATCGCATCATATTAGGACAATGTATTAACCGCAG
MDV2 CAAGTATAGATTCATGGCCCGGAGCTATCGTCAACATTTATCAGCAATACCACGTAATTCGATCCGGATCGTATCAGGCTAGGTCAGTGCCTAAAGCGC
MDV3 ATTCCGTTTTATGGCCCGGAGTTGTCGGCAACTTTTATTAGCAATACAACAGAATTCACCCAGACCGTATCATACTAGGACAATGCGTTAAACGTGAT

1051 1150
MDV1 GCAGAAGCAGCAATCGAGCAGATATTTAGGACAAAATATAATGACAGTCACGTC AAGGTTGGACATGTACAATATTTCTTGGCTCTCGGGGGATTTATTG
MDV2 GACGCTGAAACAACAATCAAGCGCATATTCGCGCAAAAATATAACGACAGCCACGTC AAGGTCGGGAAGGTC AATATTTTTTGGCCCTCGGTGGATTTT
MDV3 GCCGAGGCTGAAATAGATAAAATATTTAAAAGGAAATATAATGATACACATGTC AAGATGGGCCACGTTCAATATTTTTTAACGCTAGGAGGGTTCGTG

1151 1250
MDV1 TAGCATATCAGCCTGTTCTATCCAAATCCCTGGCTCATATGTACCTCAGAGAATTGATGAGAGACAACAGGACCGATGAGATGCTCGACCTGGTAAACAA
MDV2 TTGTGGCGTATCAGCCCGTTATGTCGAAATCTCTGGCTCACATGTATCTAAGAGAACTGATGAGGGACAACAGGACAGACGAGCTGCTAGACCTAGTACA
MDV3 TGGCATACCAGCCCATTCTGTCAAATCACCTGGCTCACATGTACCTAAGAGAGTTGTTGGGGACAACCGAACAGATGAAATGTTAGATCTCGTTAATAA

1251 1350
MDV1 TAAGCATGCAATTTATAAGAAAAATGCTACCTCATGTGTCACGATTGCGGGCAGATATTCGAAATGCACCAAATAGAAAAATAACATTAGACGACACCACA
MDV2 TAATAAGCATGCTCTTTCCAATAAAACAAATGCTCTCTTGTCCCGTTTGGCGGAGAGCTCCGTAATGCGCCGAAGGAAAAAC TGGCGCTGAACGAAGGC
MDV3 TAAGCATGCCATTATTAGTAATAACGCTACATCAGTGTACGATTGCGCAGGGATCTACATCGCCCTCGTCCGGCAAGGCCATCTTGAATGACTCCGTA

1351 1450
MDV1 GCTATTAATCGACATCGCTCTGTTCAATTCGCCATGCTCCAATTTCTTTATGATCATATACAACCATATTAATGATATGTTTAGTAGGATTGCCACAG
MDV2 GCTACGATAAGATCTACTTCCGTCCTCAATTCGCCATGCTCCAATTTCTCTACGACCATATACAGACTCATATCAACGACATGTTTCAGCCGAATCGCCA
MDV3 ATTATAAGATCGACCGCTTCAGTTCAATTCGCCATGCTCCAATTTCTATATGACCACATACAAGCACACATTAACGAGATGTTTAGTAGAATCGCAACAG

1451 1550
MDV1 CTTGGTGC GAATTCAGAAATAGAGA ACTTGT TTTATGGCACGAAGGATAAAGATTAATCCTAGCGCTACAGCGAGTGCAACATTAGGAAGGAGAGTGGC
MDV2 CGGCCTGGTGC GAATTCAGAAATAAAGAACTGGCTTTATGGCAGGAAGGGATGAAATTAACCCGAGCGCCATCGCGAGCGCTACCTTAGGGAGACGCGT
MDV3 CCTGGTGTGAATTCAGAAATAAGGAATTAGTGTGTTGGCGGAAGCTATCAAAATAAACCCAGTGTAACTGCGAGTGCAACATTAGGAAAACGCGTTGG

1551 1650
MDV1 TGCAAAGATGTTGGGGATGTCGCTGCTGTATCGAGCTGCACTGCTATAGATGCGGAATCCGTCAC TTTGCAAATTCATGCGAGTTATCACATCCACT
MDV2 AGCGGCTAAAATGTTAGGGGATGTGACCGCGTGTCTACTTGTACTGGGATCGACCGGAATCCGTAACATTCAGAAATTCATGAGGGTCCGACGCTCT
MDV3 GGCCAAAATGTTGGGTGACGTAGCCGCGTATCATATGATGATGATTCAGATTCGTTACCTTACAAAATTCATGCGTGTGTCACCTCTACC

1651 1750
MDV1 AATACATGTTATAGCCGACCATTTGGTTCATTTTCATATGGAGAAAACCAAGGAAACATACAGGGACAACCTCGGTGAAAACAACGAGTTGCTTCCAACGC
MDV2 ACTAATATGTGCTACAGCCGCCCGCTGGTCTTGT TTTCTGATGGCGAGAACCAGGGGAGGATACAAGGCCAGCTCGCGGAAAATAACGAGCTACTCCAA
MDV3 AATACTTGTATAGCCGCCCTTTAGTGTATTTCTCTACGGGGACCAGACAAAATACAAGGACAGTTGGGGAAAACAATGAATTGATTCCAACCTC

1751 1850
MDV1 TAGAGGCTGTAGAGCCATGCTCGGCTAATCATCGTAGATATTTCTGTTTGGATCCGTTATGCTTTATTTGAAAACATAATTTTGTTAAGATGGTAGA
MDV2 CACTGGAGGCCGTAGAACC GTGTACGGCTAACAGCGGAGATATCTCTGTTTGGATCCGCATACGCTCTGTTTCGAAGACTATAACTTTGTTAAGATGGT
MDV3 TAGAGCCATAGAGCCATGTTCCGGCAATCATCGTAGATACTTCTTATTTGGAGATGGCTACCGTTCACGAAAATTATAACTTTGTTAAGATGGTAGA

1851 1950
MDV1 CGCTGCCGATATACAGATTGCTAGCACATTTGTCGAGCTTAATCTAACCTGCTAGAAAGATCGGGAAATTTGCTTTTACACAAAAGAAGAG
MDV2 AGAGGTTGCTGATATACAGACAGCCAGCACGTTTGTAGACCTGAAC TTAACACTGTTAGAAGACAGAGAAATTC TCTCTGTCGGTCTACACGAAAGAG
MDV3 TGCGGCAGATATCCAAC TGGCGAGTACGTTCTGTAAGATTAAATCTAACGCTTTTGGAAAGATCGGGAGATTC TCTCTCTTTCCGTATATACAAGGAAGAA

1951 2050
MDV1 TTGCGTGATGTTGGTGTATTGGATTATGCAGAAGTAGCTCGCCGCAATCAACTACATGAAC TTAATTTTATGACATAAACAAGTAATAGAAGTGGATA
MDV2 GAGTTGCGAGATGTCGGGGTATTGGACTATGCCGAGGTGGCTCGCCGCAACCAGTTGCACGAAC TAAAATTTTATGACATAAATAAAGTAATAGAAGTAG
MDV3 TTGCGTGACGTGGGGTATTAGATTATGCTGAAGTTGCTAGGCGCAATCAACTACATGAAT TAAAATTTTACGATATTAATAGAGTGTGAGGTAGACA

2051 2150
MDV1 CAAATTACGCTTTTATGAACGGTTTGGCCGAATGTTTAAACGGTATGGGTCAGGTAGGGCAAGCTATAGGCAAAGTTGTAGTAGGGGCTGCCGGTGAAT
MDV2 ATACAAATTACGCTTTTATGAACGGCTTGGCGGAATGTTTCAACGGTATGGGGCAAGTCGGTCAGGCCATAGGGAAGGTCGTTGTGGGTGCCCGCGGTGC
MDV3 CTAATTATGCTTTTATGAACGGACTGGCAGAATTGTTTAAACGGCATGGGCCAAGTGGGGCAGGCTATAGGGAAGTAGTAGTCCGGGCTGCAGGGGCCAT

2151 2250
MDV1 CGTATCTACCATATCTGGTGTCTCTGCTTTTATGTCGAAATCCCTTTGGGGCTTTGGCAATCGGTTTAAATCATTATAGCAGGACTCGTGGCTGCATTTTTA
MDV2 CGTGGTGGCTACCGTATCTGGAGTGTCCGCTTTTATGTC TAAACCGTTCCGAGCTTTAGCGGTAGGATTGATAATTATAGCAGGACTCGTGGCTGCGTTT
MDV3 TGTATCCACTGTATCGGGATTTCCGCAATTTATGTC TCAACCCGTTTGGCGCTCTAGCCATAGGCTTGATTGTCATCGCGGCATCATTGCGGCATTTTTT

2251 2350
MDV1 GCATATCGTTATGTAAACAAGCTTAAAAGCAATCCAATGAAAGCCCTTTATCCTATGACAACAGAAGTGCCTAAGGCACAGGCAACGCGTGAGTTGCATG
MDV2 CTAGCTTACTGGTACGTAAACAAGCTTAGAGGCAACCCGATGAAAGCCCTATATCCAGTGACGACGGAAGAGCTAAAGTCCCAGGCAACGCGGAGTTGC
MDV3 GCTTATCGTTATGTAAACAAGCTCAAAGCAACCCGATGAAAGCCCTTATATCCCATGACCACAGAGGAACCTAAAGATCAGGCAACACGGAAGCCGCATA

2351 2450
MDV1 GCGAGGAATCAGATGATTTGGAACGAACATCTATTGATGAAAGAAAATTAGAAGAAGCTAGAGAAATGATAAAAATATATGGCGTTAGTCTCCGCGGAAGA
MDV2 ACGGAGAAGAACCGGACTCGGAAAAGGCACCAATCGATAAAAAAAATACAGAAGGCTCGAGAAATGATAAAAATATATGGCGTTGGTGTCCGCAGAGGA
MDV3 CCGATGGATCTGACAGTGAATTGATGTCAATAGACGAGAGGAAGCTGGAAGCTGCTAGAGAAATGATAAAGTATATGGCGCTAGTATCTGCAGAAGAGCG

2451 2550
MDV1 ACGCCACGAGAAAAAAGTGGGAGAAAGAGGGGAGGCACTACCGCCGTTCTATCGGACCACCTGGCAAAAATGAGGATTAAAAATAGTAACCCATAATAT
MDV2 ACGCCACGAAAAATGATTTGCGCAAAAAAACAAGAGGCACCCTGCTATTCTTTCTAATCACCTAACAAAGCTGAGGCATAAAGTAGTGGCCAGCACTAC
MDV3 CCATCAAAAGAAATTGCGTAAGAAAAAGAGAGGAACAACCGCTATCTGTCCGACCATCTTTCAAACATGAGACTAATGAATGGACATCGCAAAATATGAT

2551 2650
MDV1 GATAAGTTACCTACTACATATTCAGACTCAGAAGATGATGCTGTCTAAGTGGGCACTATTATATTGAACTGAATAAAAACGCATAGAGCATGATATGGTT
MDV2 GATAGATTATCGCCTGTGTACTCTGATTCGGAGGACGATGCCGTTTAGCGGATGCTGTTCTCGATAAATAAAATTCACGTCGCCATACGATTATTTT
MDV3 AAATAAACGACACCGGATTCGAGACGGATGATGAAATTGATAGAGATGTTGATTCAGAAGACTAATAAAAACATTTTGGCTCTCAACGATTTATTA

2651 2750
MDV1 TACTCATTATTGCGAGATATAAAGCATATTCATACGATATATTGCGAACGTGATGCTAAAAACATAGCTCCCTGTATTATTGATGCGCCATCATTGTA
MDV2 ACTTTTATTGCTATTGCGGTCGCAAAATGTATAAACTTATACGTCGACATAGCGGATCCCTGCCATCATTAAAGCCATCATTGTTTAAATGAAAATAT
MDV3 GCGTTTATGTCCACAATAAACTGCTGGTACAGCTCTCTGACATTAACACACCCGCTTTTCAGCGATGGGTATCATGTGGCTAATAAAAACATCGCTGCC

2751 2800
MDV1 TTAATAAATACATCGACCGCGCATCACTGGTGGGTGTATACCAGCTAC
MDV2 CCGCGCTGCATGCTCGGCGGATGTACATTGGCGATCGTACTGGCGTTC
MDV3 TGAATCTCGTGCCGCCAAGCCAGCTATCGCGCTTGCCTCGACAGTATCT

Fig. 5: Alignment of the gB-1 gene (first row, Ross *et al.*, 1988), the gB-2 gene (second row) and the gB-3 gene (third row). Nucleotides are numbered with reference to the translation initiation codon ATG (designated +1). Predicted translation initiation and termination codons for the gB genes are boxed. The termination codons for the HSV ICP18.5 homolog genes are underlined. All other sequence features are bold-underlined (GC rich regions, CAT boxes, TATA boxes, and poly(A) signals).

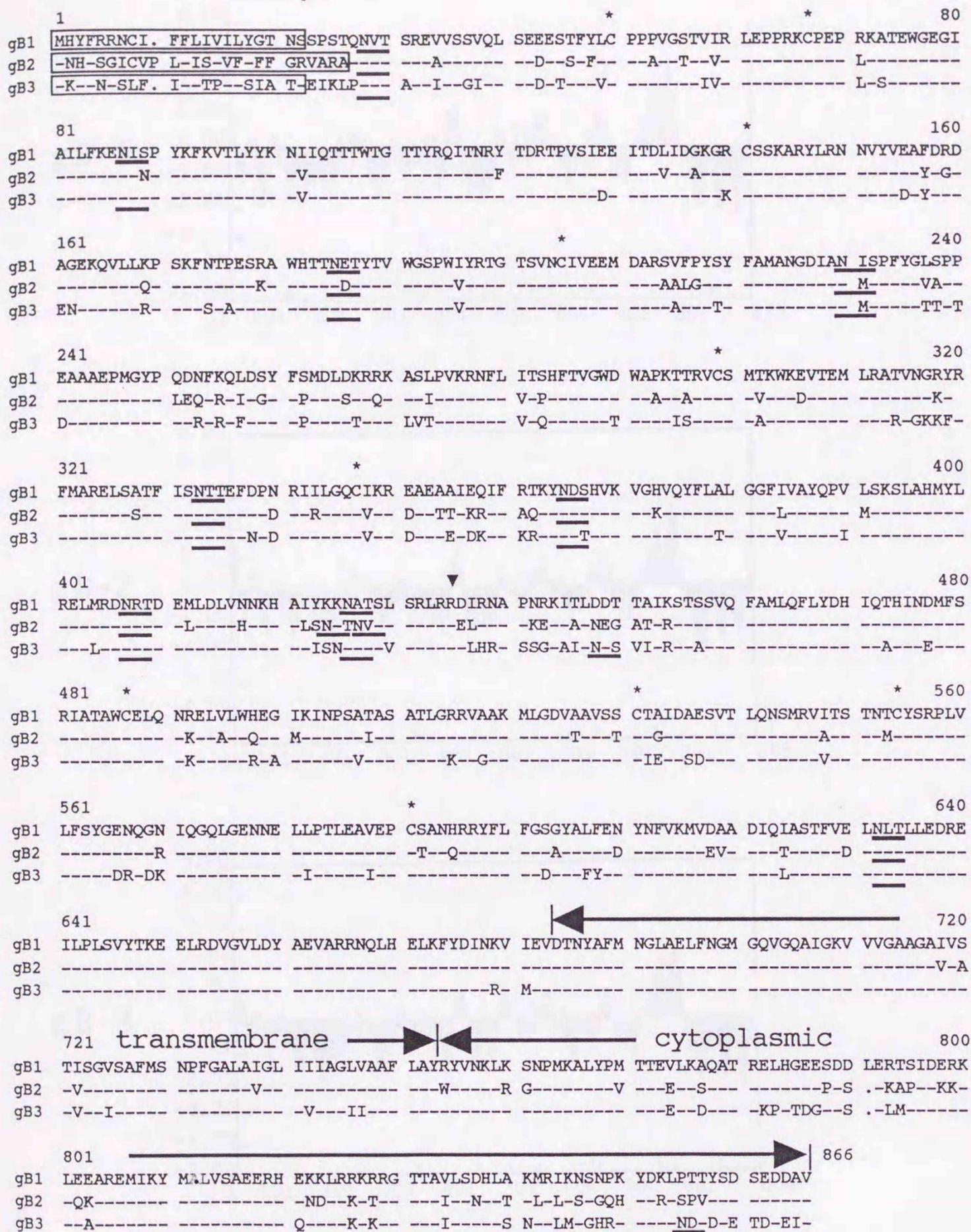


Fig. 6: Alignment of the predicted amino acid sequences of gB-1 (first row, Ross *et al.*, 1988), gB-2 (second row) and gB-3 (third row). The sequences are aligned for best fit relative to gB-1. Dashes indicate the presence of identical amino acids at corresponding positions in gB-1. Gaps are marked by dots. Predicted signal sequences are boxed. Potential N-linked glycosylation sites and cysteine residues located outside of the signal sequences are underlined and marked by asterisks, respectively. The predicted proteolytic cleavage site between gp60 and gp49 is indicated by an arrow head at position 435-436.

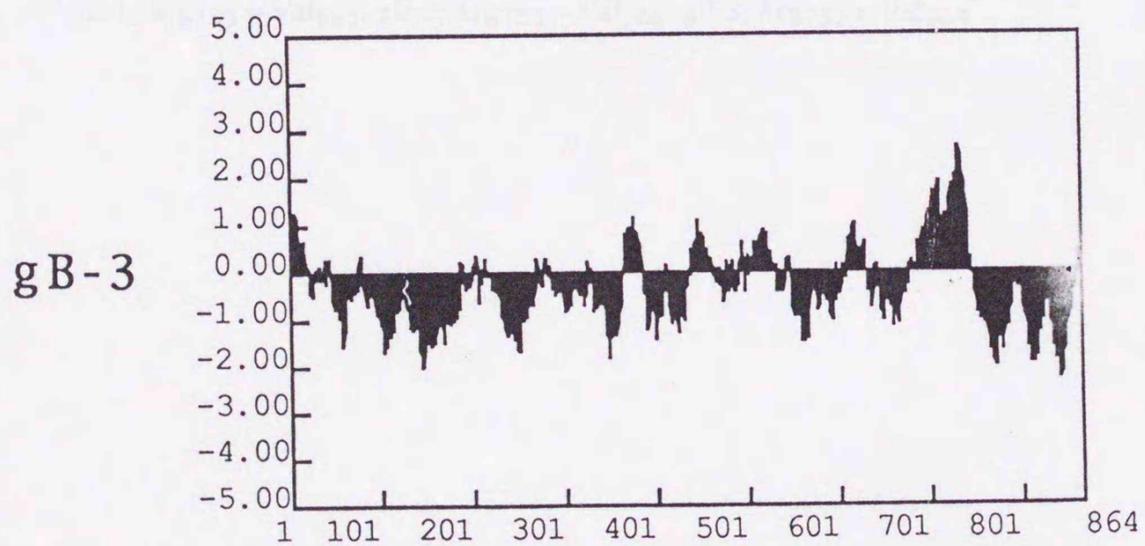
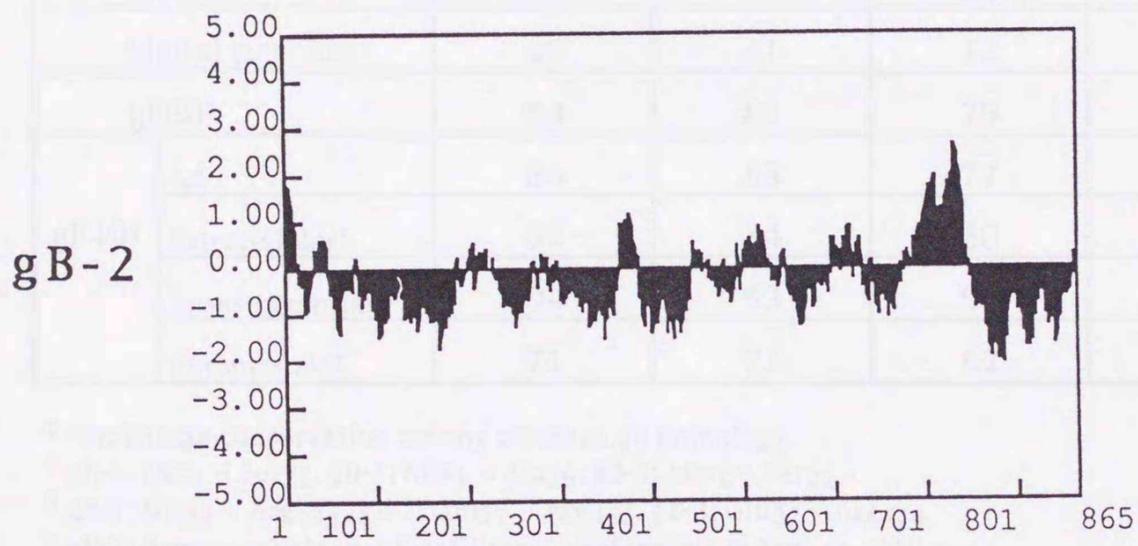
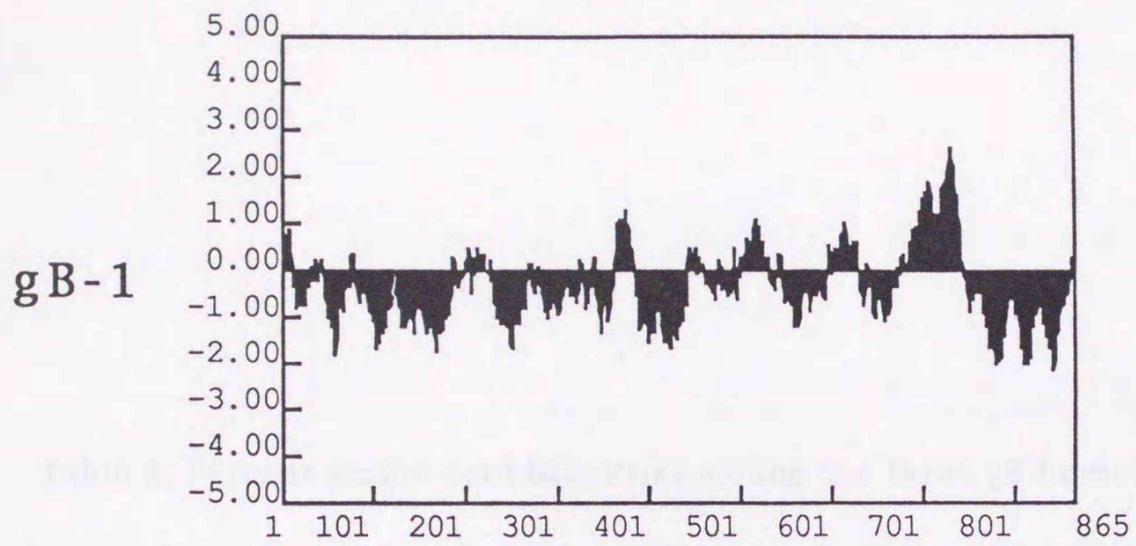


Fig. 7: Hydropathic analysis of the gB-1, gB-2, and gB-3 predicted amino acid sequences. The hydropathic profiles shown were determined by using the algorithm of Kyte and Doolittle (1984) with a moving window of 20 amino acids.

Table 1. Percent amino acid identities among the three gB homologs.

	gB-1/2	gB-1/3	gB-2/3	gB-1, 2, 3 ¹
Overall	83	82	76	72
Signal peptide ²	19	41	12	12
gP60 ³	84	82	79	74
gP49 ⁴	All	84	83	75
	Extracellular ⁵	87	84	79
	Transmembrane ⁶	94	93	90
	Cytoplasmic ⁷	71	72	62

¹ Percentage conservation among all three gB homologs.

² gB-1; Met₁ ~ Ser₂₁, gB-2; Met₁ ~ Ala₂₆, gB-3; Met₁ ~ Ser₂₁

³ gB-1; Ser₂₂ ~ Arg₄₃₄, gB-2; Gln₂₇ ~ Arg₄₃₅, gB-3; Glu₂₂ ~ Arg₄₃₄

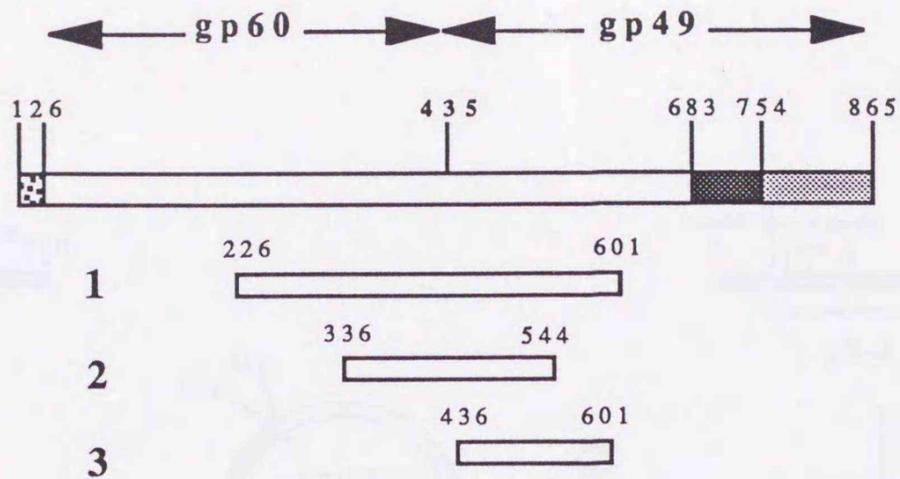
⁴ gB-1; Asp₄₃₅ ~ Val₈₆₅, gB-2; Glu₄₃₆ ~ Val₈₆₅, gB-3; Asp₄₃₅ ~ Val₈₆₄

⁵ gB-1; Asp₄₃₅ ~ Val₆₈₂, gB-2; Glu₄₃₆ ~ Val₆₈₃, gB-3; Asp₄₃₅ ~ Val₆₈₂

⁶ gB-1; Asp₆₈₃ ~ Tyr₇₅₂, gB-2; Asp₆₈₄ ~ Trp₇₅₄, gB-3; Asp₆₈₃ ~ Tyr₇₅₂

⁷ gB-1; Arg₇₅₃ ~ Val₈₆₅, gB-2; Arg₇₅₅ ~ Val₈₆₅, gB-3; Arg₇₅₃ ~ Val₈₆₄

A



B

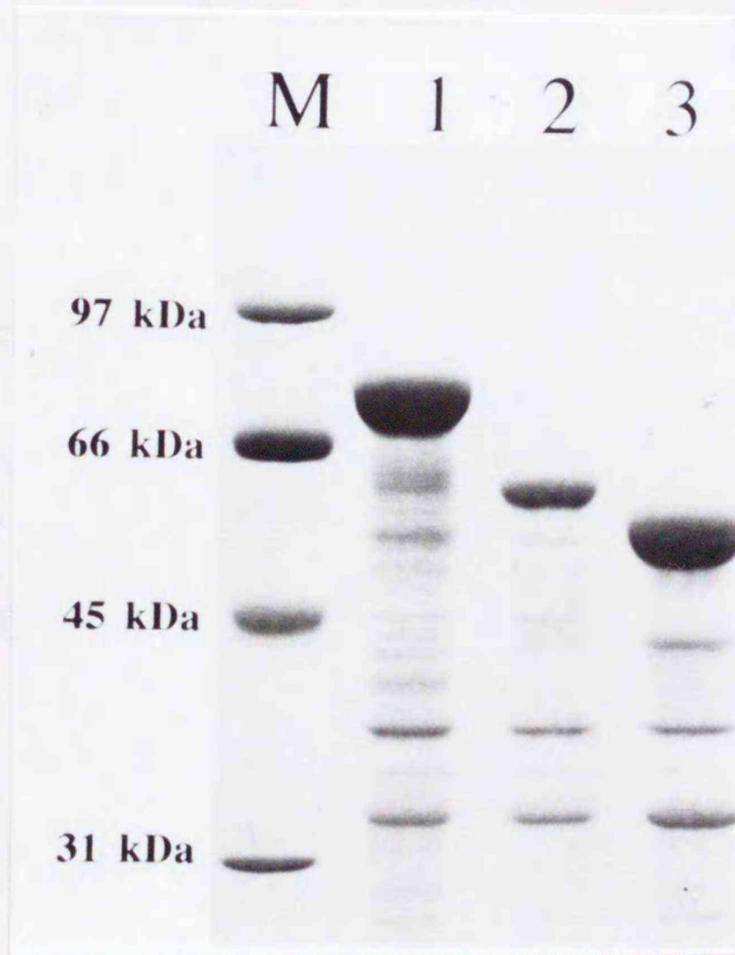


Fig. 8: Expression of *trpE*-gB2 fusion proteins from pATH vector constructs. (A) Location and size of DNA fragments of the gB-2 gene used to generate *trpE* fusion proteins. DNA fragment 1, 2, and 3 encode amino acids 228-601, 336-544, and 436-601, respectively. The resulting plasmids are designated pATH-gB2M1, pATH-gB2M2, and pATH-gB2C, respectively. (B) SDS-PAGE analysis of Coomassie blue-stained proteins from RR1 cells transformed with pATH-gB2M1 (lane 1), pATH-gB2M2 (lane 2), and pATH-gB2C (lane 3). Molecular weight standards (lane M) are indicated on the left.

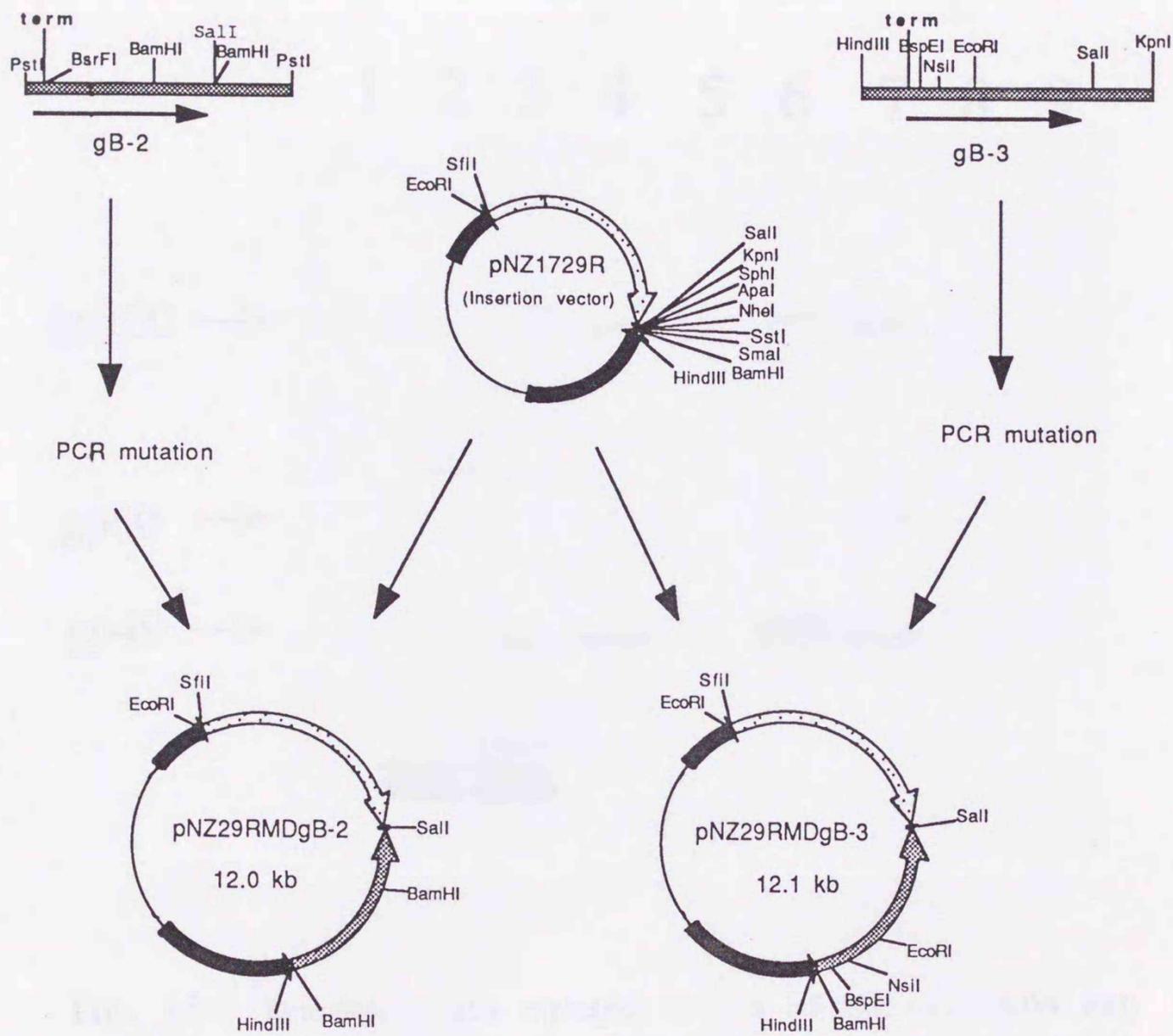


Fig. 9: Construction of transfer vectors containing the gB-2 or the gB-3 gene. The gB-2 and the gB-3 genes were modified by PCR to create *Bam*HI site in front of their ATG and change a potential poxvirus early transcription termination signal, TTTTTCT and TTTTAT, to TCTTTCT and TCTTTAT, respectively.

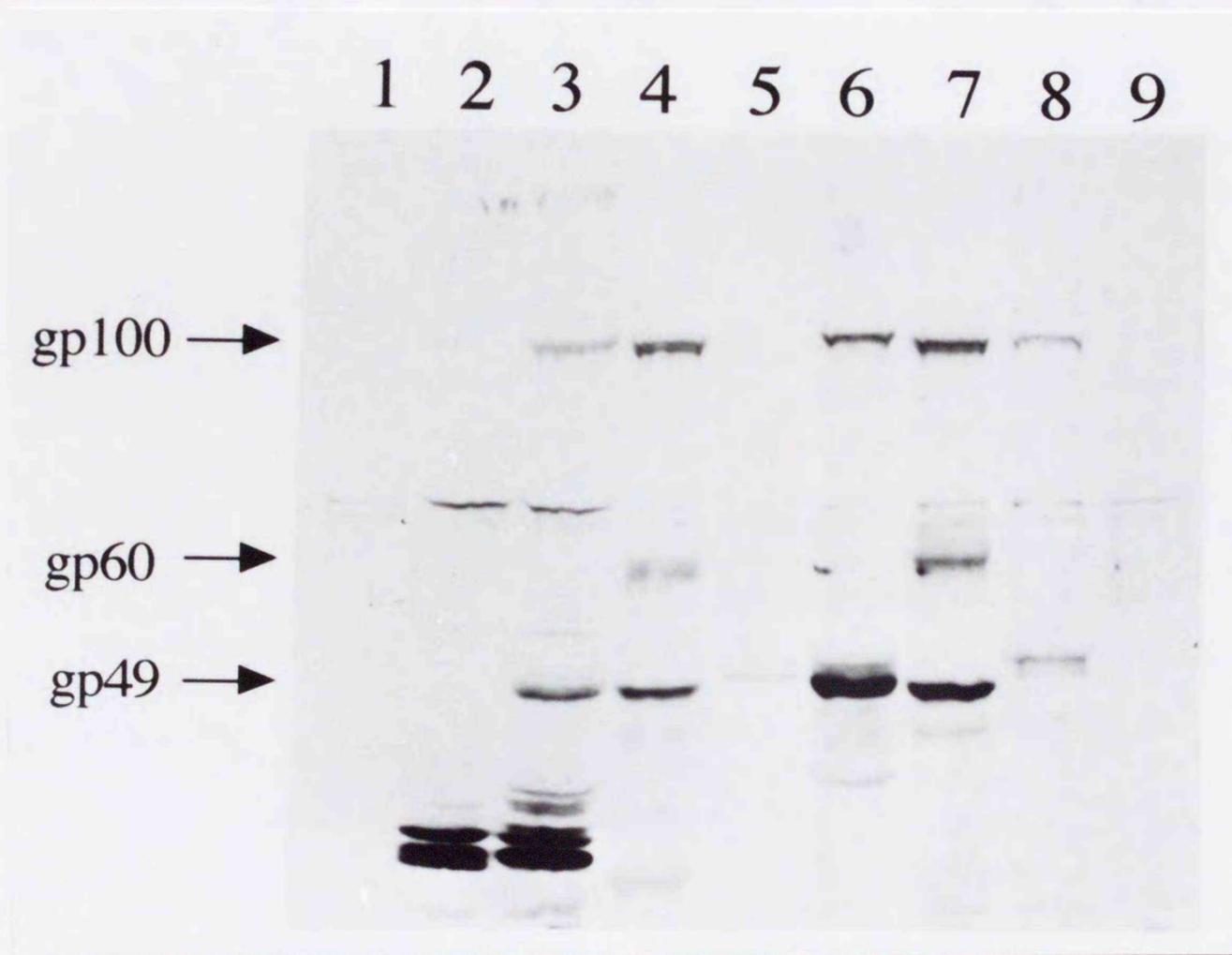


Fig. 10: Detection of gBs expressed in cells infected with MDVs and recombinant FPVs by Western blotting. Pooled polyclonal rabbit antisera against two *trpE*-gB2 fusion proteins was used. Lanes: 1, uninfected CEF cells; 2, uninfected DEF cells; 3, the GA strain of MDV-1; 4, the SB-1 strain of MDV-2; 5, the FC126 strain of MDV-3; 6, recFPV-gB1; 7, recFPV-gB2; 8, recFPV-gB3; 9, parent FPV.



Fig. 11: Immunoprecipitation analysis with anti-gB1 monoclonal antibody. Radioimmunoprecipitations from ^{35}S -labeled infected-cell lysates were performed using monoclonal antibody IAN86. Lanes: 1, uninfected CEF cells; 2, uninfected DEF cells; 3, the GA strain of MDV-1; 4, the SB-1 strain of MDV-2; 5, the FC126 strain of MDV-3; 6, recFPV-gB1; 7, recFPV-gB2; 8, recFPV-gB3; 9, parent FPV.

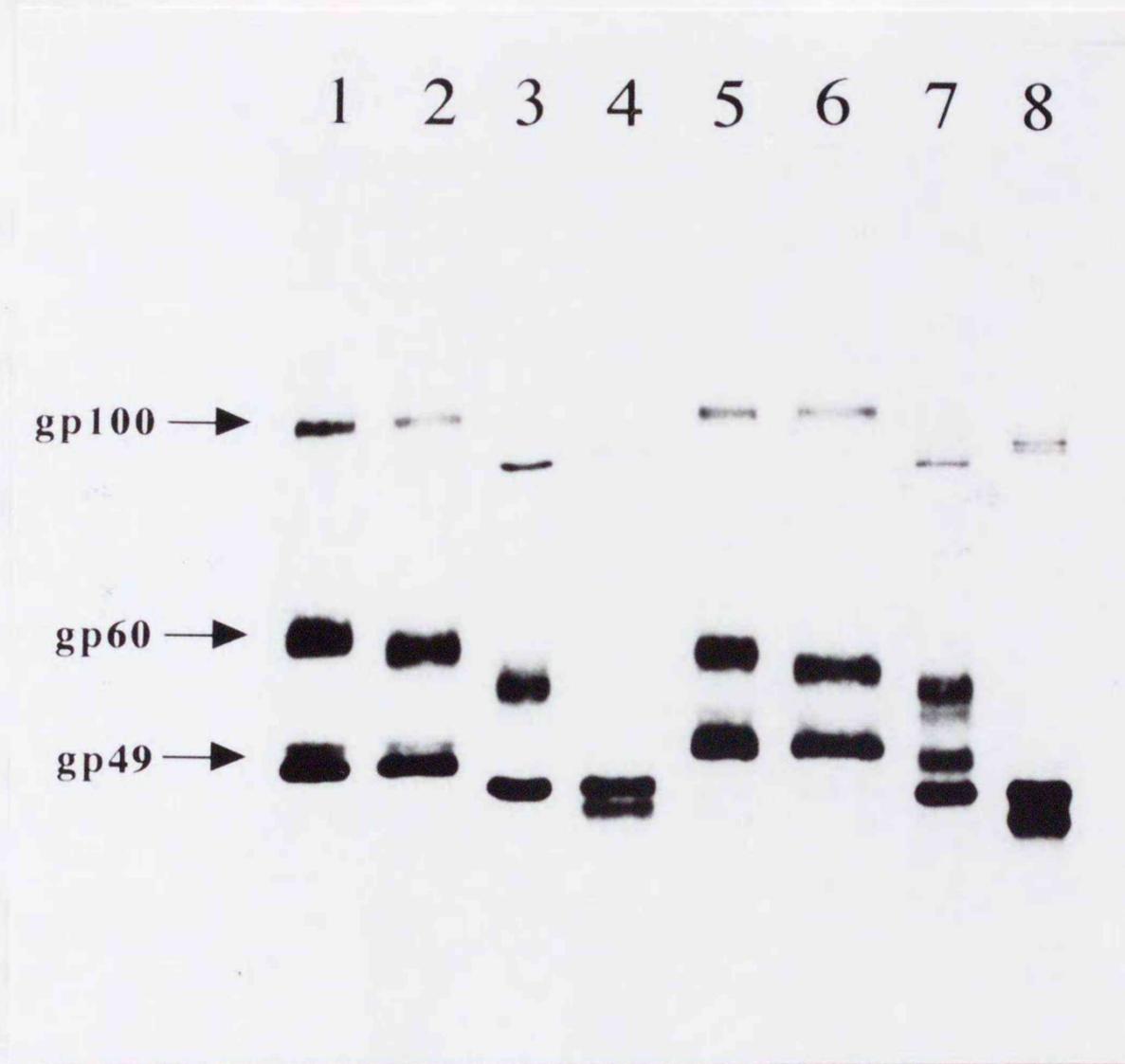


Fig. 12: Effects of endoglycosidases on gB-1 and gB-3 complexes. Cells infected with MDV-1 (lanes 1, 2, 3, and 4) or MDV-3 (lanes 5, 6, 7, and 8) were radiolabeled, lysed, and immunoprecipitated with monoclonal antibody 1AN86. Immunoprecipitated proteins were mock-digested (lanes 1 and 5), treated with neuraminidase followed by *O*-glycanase (lanes 2 and 6), treated with Endo H (lanes 3 and 7), or treated with PNGase F (lanes 4 and 8).

第2章 MDV gB-1のproteolytic cleavage siteの同定および特異性

要 旨

MDV gBは、前駆体gp100が細胞内輸送の途中で2つのポリペプチド, gp60とgp49に開裂する。大部分のヘルペスウイルスgBも同様に2つのポリペプチドに開裂する。その予想される開裂部位には共通のアミノ酸配列 (Arg-X-Arg-Arg) が存在している。MDV gB-1の開裂部位とその特異性を解明するために予想される開裂部位 (Arg-Leu-Arg-Arg)に存在する3つのアルギニン残基をそれぞれアラニン残基に置換し、組換えFPVを使ってそのmutant gB-1の発現を解析した。その結果、3つのアルギニン残基の置換はすべて開裂を阻害した。また、開裂しないgB-1は、細胞内輸送において小胞体あるいはゴルジ体にとどまることなく、wild type gB-1と同様に感染細胞膜表面に輸送された。すなわち、開裂部位に存在する3つのアルギニン残基は開裂に重要な役割を果たしているが、開裂は、gB-1の感染細胞膜表面への輸送には必須過程ではないことを示している。

序 論

大部分のヘルペスウイルスgBは前駆体として合成された後、2つのポリペプチドに開裂する。感染細胞の膜表面でこの2つのポリペプチドはジスルフィド結合によりオリゴマーを形成する。MDV gB-1は、gp100, gp60, gp49の3つのポリペプチドとして検出される。Chen (1990) らは、ツニカマイシン糖鎖付加阻害実験およびパルスチェイス実験により、gp100は前駆体であり細胞内輸送の過程で2つのサブユニット(gp60とgp49)に開裂することを明らかにした。第1章では開裂した2つのポリペプチドのうちN末半分はさらにO-linked carbohydrate, complex N-linked carbohydrateが付加されてgp60となることを明らかにした。Fig. 13にMDV gB-1のprocessing pathwayのモデルを

示す。

ヘルペスウイルスgBの予想されるアミノ酸配列にはconsensus sequence Arg-X-Arg-Argが存在し、この部位が開裂部位であると予想されている。特にvaricella-zoster virus (VZV) gpII (gB homolog)では、直接アミノ酸配列を決定して開裂部位が同定されている (Keller et al., 1986)。唯一の例外としてHuman cytomegalovirus (HCMV) Towne株のgBは開裂部位のposition -2の位置にリジン残基が存在している。このことはposition -2の部位は塩基性アミノ酸で置換できることを示唆している (Spaete et al., 1990)。第1章で示したようにMDV gB-1, gB-2, gB-3にもこの配列は保存されている。

本章では、MDV gB-1の開裂部位とその特異性を解明するために予想される開裂部位 (Arg-Leu-Arg-Arg)にアミノ酸置換を導入し、組換えFPVを用いてその発現の解析を行った。

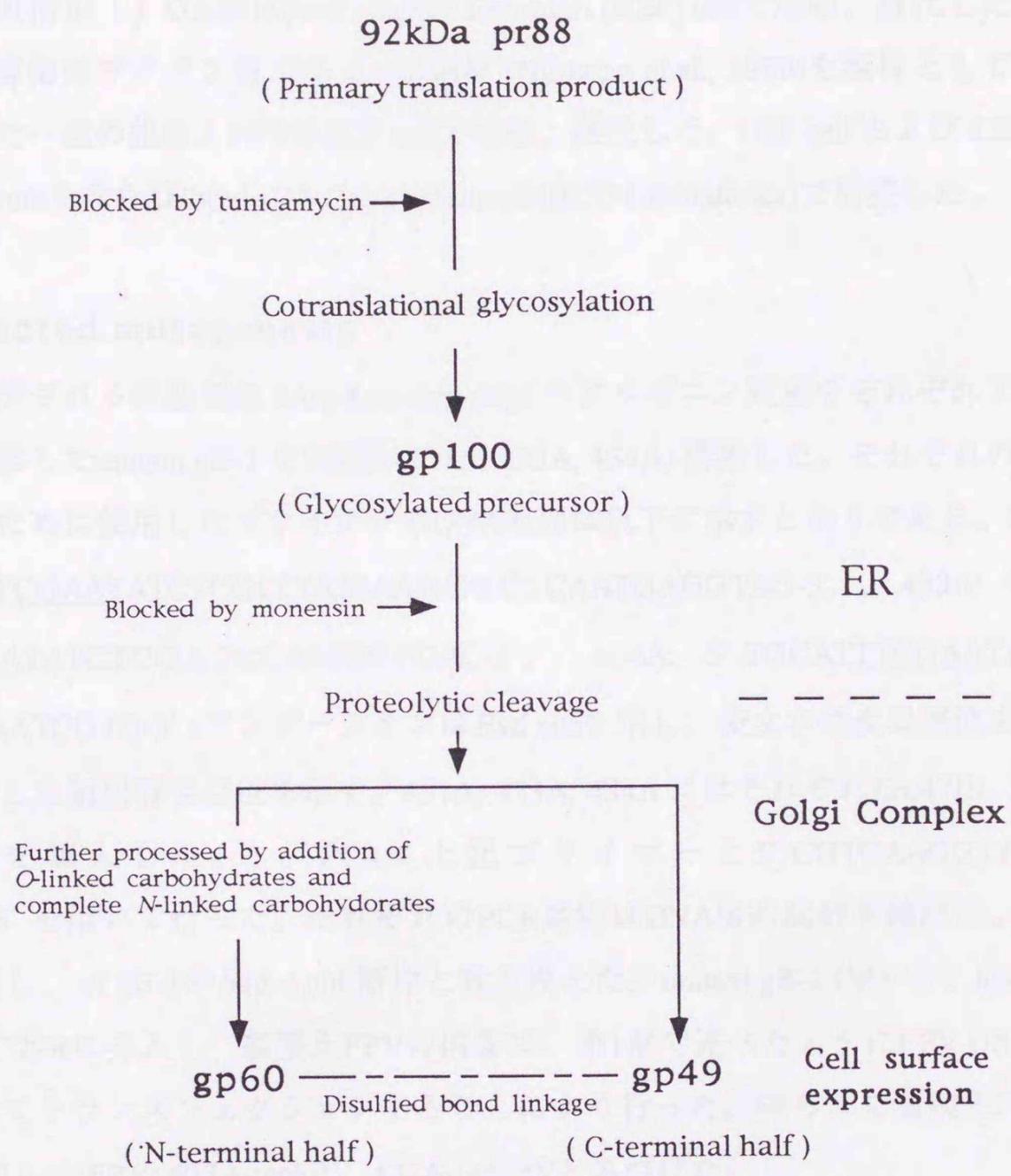


Fig. 13: MDV gB processing pathway and localization of the polypeptides of the two cleavage products, as proposed by Chen et al(1992).

材料と方法

細胞とウィルス

MDV-1 (血清型 1) GA株はduck embryo fibroblast (DEF) cellで増殖、継代した。組換えFPVの構築はワクチン株であるUSDA株 (Nazerian *et al.*, 1989)を親株として使用し、得られた一連の組換えFPVはCEF cellで増殖、継代した。DEF cell および CEF cell は4% calf serumを含むLeibovitz-McCoy medium (GIBCO Laboratories)で培養した。

Site-directed mutagenesis

gB-1の予想される開裂部位 (Arg-Leu-Arg-Arg) のアルギニン残基をそれぞれアラニン残基に置換したmutant gB-1 を3種類 (431A, 433A, 434A) 構築した。それぞれの変異を導入するために使用したプライマーのDNA配列は以下に示すとおりである。431A: 5'-TGCATTTTCGAATATCTCGCCGCAAAGCGCTCAATGAGGTAG-3'、433A: 5'-TGCATTTTCGAATATCTCGAGCCAATCGTGAC-3'、434A: 5'-TGCATTTTCGAATATCTGCGCGCAATCGTG-3' (アンダーラインはBstI siteを示し、袋文字は変異部位を含む新たに導入した制限酵素部位を示す。431A, 433A, 434A にはそれぞれEco47III, XhoI, BssHII site を導入した。)。PCRは上記プライマーと5'-CGTCAAGGTTGGACATGTAC-3'を用いて行った。それぞれのPCR産物はDNA塩基配列を確認後、BstI-SphIで切断し、wt gB-1のBstI-SphI断片と置き換えた。mutant gB-1 ORF を、insertion vector pNZ1729Rに挿入し、組換えFPVの構築は、第1章で述べたようにFPV USDA株を親株としてトランスフェクションすることにより行った。得られた組換えFPVをそれぞれ431A-recFPV, 433A-recFPV, 434A-recFPVと名づけた。

免疫沈降実験

第1章に述べた方法と同様の方法により行った。

パルスチェイス実験

recFPV-gB1, 433A-recFPV感染細胞を50 μ Ci/mlの 35 S]メチオニンで10分間パルスラベルした。培養上澄を除き、 35 S]メチオニンを含まない培地で0~360分間培養した。

各時間で感染細胞に lysis buffer (25mM Tris-HCl[pH 7.5], 150mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate) を加え、cell lysate を調製した。免疫沈降は、第1章で述べた方法と同様の方法で行った。

Flow cytometric analysis

MDV-1, recFPV-gB1, gB433A-recFPV 感染細胞をそれぞれ 0.02% EDTA を含む PBS で 10 分間処理した後、プレートから回収した。1 次抗体は、モノクローナル抗体 1AN86 を用いた。4 °C で 30 分間反応した後、細胞を PBS で 3 回懸濁した。2 次抗体は、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG を用いた。同様に 4 °C で 30 分間反応した後、細胞を PBS で 3 回懸濁した。細胞表面での抗原-抗体反応は、fluorescence-activated cell sorter (FACS) (FACStar Plus: Becton Dickinson) を用いて測定した。

結 果

2-1: 予想される開裂部位への site-directed mutagenesis

ヘルペスウイルス gB の予想される開裂部位を Fig. 14 に示した。開裂部位直前に存在する consensus sequence Arg-X-Arg-Arg は、MDV gB-1, gB-2, gB-3 でも共通に存在していた。MDV gB-1 の開裂に対する特異性を調べるために、予想される開裂部位 (Arg-Leu-Arg-Arg) のアルギニン残基をそれぞれアラニン残基に置換した mutant gB-1 を 3 種類構築した。position -4 のアルギニン残基をアラニン残基に置換した mutant gB-1 (Ala-Leu-Arg-Arg) を gB431A, position -2 のアルギニン残基をアラニン残基に置換した mutant gB-1 (Arg-Leu-Ala-Arg) を gB433A, position -1 のアルギニン残基をアラニン残基に置換した mutant gB-1 (Arg-Leu-Arg-Ala) を gB434A と名づけ、発現解析のために構築した組換え FPV をそれぞれ gB431A-recFPV, gB433A-recFPV, gB434A-recFPV と名づけた (Fig. 15)。

2-2: Mutant gB-1 の免疫沈降

予想されるgB-1の開裂部位に導入したアミノ酸置換が開裂に及ぼす影響を調べるために、組換えFPV gB431A-recFPV, gB433A-recFPV, gB434A-recFPV感染細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでラベルし、モノクローナル抗体1AN86で免疫沈降を行った。Fig. 16に示すようにgB433Aの開裂はほぼ完全に阻害された (lane 3)。しかし、長時間の感光により非常に微量のgp60とgp49が確認された。一方、gB431AとgB434Aの開裂は、wild type gB-1 (wt gB-1)と比較してそれぞれわずか24%, 4%であることが densitometry による定量分析で明らかになった (Fig. 16, lane 2 and 4)。

2-3: gB433Aの開裂の速度

gB433Aの開裂は非常に微量ながら検出された。この結果をさらに明らかにするとともにgB433Aとwt gB-1の開裂が生じる速さを比較するためにパルスチェイス実験を行った。wt gB-1はチェイス後、45分でgp49が検出され、開裂が時間とともに進んでいく様子が確認された (Fig. 17 A)。しかし、gB433Aはチェイス後、120分ようやくgp49が検出されるが、360分後でもその量はほとんど増加しなかった (Fig. 17 B)。大部分のwt gB-1は360分後には開裂したが微量のgp100はなお検出された。この結果はwt gB-1でも開裂の効率は100%ではないことを示している。同様の結果はMDV-1感染細胞でも確認された。

2-4: uncleaved gB-1 の感染細胞の膜表面への輸送

開裂が起こらないmutant gB-1 (gB433A)の感染細胞膜表面への輸送を調べるために、フローサイトメトリーを用いて感染細胞膜表面でのgB433Aの発現量の解析を行った。使用した抗体は、1AN86である。Fig. 18に示すようにMDV-1(A), recFPV-gB1 (B), gB433A-recFPV(C)感染細胞それぞれの膜表面でのwt gB-1とgB433Aの発現量には、大きな差は見られなかった。データは示さないが、同様の結果はgB431A,

gB434Aでも確認された。

考 察

gB-1の開裂部位の特異性を確かめるために予想される開裂部位の直前に存在するArg-Leu-Arg-Arg配列中の3つのアルギニン残基をアラニン残基に置換したmutant gB-1を構築した。アラニン残基は α -ヘリックス、 β -シート等のタンパクのコンフォメーションに影響を与えない中性アミノ酸で、アミノ酸置換の実験でしばしば用いられる。これらのmutant gB-1遺伝子は組換えFPVに導入され発現解析を行った。免疫沈降実験の結果、gB431A, gB433A, gB434Aの開裂はwt gB-1と比較してそれぞれ26%, 0%, 4%であり、これら3つのアルギニン残基はともに開裂に重要な役割を果たしていることが明かになった。特にposition -3のアルギニン残基の置換は、最もその影響を与えていた。組換えFPV感染細胞で発現したgB-1 complexはMDV-1感染細胞で発現したgB-1 complexと同様に開裂した。すなわちgB-1の開裂は細胞由来のプロテアーゼによるものと考えられる。2つの連続したアルギニン残基を活性部位にするプロテアーゼとしては、トリプシン様プロテアーゼが考えられるが、興味深いことにposition -4のアルギニン残基もこの細胞由来のプロテアーゼの認識に関与している。おそらくposition -4のアルギニン残基の置換は、開裂部位近傍のコンフォメーションを変化し、プロテアーゼが接近できなくなるためであると考えられる。

パルスチェイス実験の結果よりgB433Aの開裂は非常に微量ながら生じていることが明らかになった。しかし、その速度と効率は低レベルであった。このため開裂が生じると考えられる小胞体からゴルジ体への細胞内輸送の過程で蓄積され、開裂されないgB433Aは細胞膜表面には輸送されない可能性が考えられた。しかしフローサイトメトリーを用いた感染細胞膜表面での発現量解析では、gB433Aの発現量はwt gB-1の発現量とほとんど差はなかった。この結果は、gB-1の膜表面への輸送には開裂過程は必須ではないことを示している。PRV gII (gB homolog)はuncleaved dimerとcleaved dimerより成り、開裂しないgIIは感染細胞膜表面ばかりでなくウイルスビリオンにも取り込まれている (Whealy *et al.*, 1990)。MDV gB-1でも開裂していないgp100がチェイス後6時間でも観察される (Fig. 17) ことより、開裂効率は100%ではなく

uncleaved formが感染細胞膜表面に存在していることを示唆している。

文献

- CHEN, X. and VELICER, L. F. (1992). Expression of the Marek's disease virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein-B in Escherichia-coli and its identification as B-antigen. *J.Virol.* 66, 4390-4398.
- KELLER, P. M., DAVISON, A. J., LOWE, R. S., BENNET, C. D. and ELLIS, R. W. (1986). Identification and structure of the gene encoding gII, a major glycoprotein of varicella-zoster virus. *Virology* 152, 181-191.
- NAZERIAN, K., DHAWALE, S., and PAYNE, W. S. (1989). Structural proteins of two different plaque-size phenotypes of fowlpox virus. *Avian Dis.* 33, 458-465.
- OGAWA, R., YANAGIDA, N., SAEKI, S., SAITO, S., OHKAWA, S., GOTOH, H., KODAMA, K., KAMOGAWA, K., SAWAGUCHI, K. and IRITANI, Y. (1990). Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. *Vaccine* 8, 486-490.
- RIGGIO, M. P., CULLINANE, A. A. and ONIONS, D. E. (1989). Identification and nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of equine herpesvirus 4. *J. Virol.* 63, 1123-1133.
- 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.
- ROSS, L. J. N., SANDERSON, M., SCOTT, S. D., BINNS, M. M., DOEL, T. and MILNE, B. (1989). Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804.
- SPAETE, R. R., THAYER, R. M., PROBERT, W. S., MASIARZ, F. R., CHAMBERLAIN, S. H., RASMUSSEN, L., MERIGAN, T. C. and PACHL, C. (1988). Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. *Virology* 167, 207-225.
- SPAETE, R. R., SAXENA, A., SCOTT, P. I., SONG, G. J., PROBERT, W. S., BRITT, W. J., GIBSON, W., RASMUSSEN, L. and PACHL, C. (1990). Sequence requirements for proteolytic processing of glycoprotein-B of human cytomegalovirus strain Towne. *J. Virol.* 64, 2922-2931.
- 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.
- YANAGIDA, N., OGAWA, R., LI, Y., LEE, L. F. and NAZERIAN, K. (1992). Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the pp38 gene of Marek's disease virus. *J. Virol.* 66, 1402-1408.
- YOSHIDA, S., LEE, L. F., YANAGIDA, N. and NAZERIAN, K. (1994). The glycoprotein B gene of Marek's disease virus serotype 2 and 3: Identification and expression by recombinant fowlpox

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MDV-1
MDV-2
MDV-3
MDV-4
MDV-5
MDV-6
MDV-7
MDV-8
MDV-9
MDV-10
MDV-11
MDV-12
MDV-13
MDV-14
MDV-15
MDV-16
MDV-17
MDV-18
MDV-19
MDV-20
MDV-21
MDV-22
MDV-23
MDV-24
MDV-25
MDV-26
MDV-27
MDV-28
MDV-29
MDV-30
MDV-31
MDV-32
MDV-33
MDV-34
MDV-35
MDV-36
MDV-37
MDV-38
MDV-39
MDV-40
MDV-41
MDV-42
MDV-43
MDV-44
MDV-45
MDV-46
MDV-47
MDV-48
MDV-49
MDV-50

The MDV-1 proteinase gene was cloned into the pUC19 vector and sequenced. The amino acid sequence of the proteinase gene was determined from the cDNA sequence. The proteinase gene was found to be highly conserved among the MDV-1, MDV-2, MDV-3, MDV-4, MDV-5, MDV-6, MDV-7, MDV-8, MDV-9, MDV-10, MDV-11, MDV-12, MDV-13, MDV-14, MDV-15, MDV-16, MDV-17, MDV-18, MDV-19, MDV-20, MDV-21, MDV-22, MDV-23, MDV-24, MDV-25, MDV-26, MDV-27, MDV-28, MDV-29, MDV-30, MDV-31, MDV-32, MDV-33, MDV-34, MDV-35, MDV-36, MDV-37, MDV-38, MDV-39, MDV-40, MDV-41, MDV-42, MDV-43, MDV-44, MDV-45, MDV-46, MDV-47, MDV-48, MDV-49, and MDV-50 strains. The proteinase gene was found to be highly conserved among the MDV-1, MDV-2, MDV-3, MDV-4, MDV-5, MDV-6, MDV-7, MDV-8, MDV-9, MDV-10, MDV-11, MDV-12, MDV-13, MDV-14, MDV-15, MDV-16, MDV-17, MDV-18, MDV-19, MDV-20, MDV-21, MDV-22, MDV-23, MDV-24, MDV-25, MDV-26, MDV-27, MDV-28, MDV-29, MDV-30, MDV-31, MDV-32, MDV-33, MDV-34, MDV-35, MDV-36, MDV-37, MDV-38, MDV-39, MDV-40, MDV-41, MDV-42, MDV-43, MDV-44, MDV-45, MDV-46, MDV-47, MDV-48, MDV-49, and MDV-50 strains.

	-5	-4	-3	-2	-1	*					
VZV	T	R	S	R	R	*	S	V	P	V	E
HCMV(Towne)	N	R	T	K	R	*	S	T	D	G	N
EHV-4	N	R	T	R	R	*	S	P	G	P	I
PRV	R	R	A	R	R	*	S	P	G	P	A
MDV-1	S	R	L	R	R	*	D	I	R	N	A
MDV-2	S	R	L	R	R	*	E	L	R	N	A
MDV-3	S	R	L	R	R	*	D	L	H	R	A
Consensus		R	X	R	R	*					

Fig. 14: Predicted proteolytic cleavage sites of gB homologs among herpesviruses. Amino acid sequences of seven different herpesvirus gB proteins for five residues on either side of the predicted cleavage sites are shown. Predicted cleavage sites are indicated by asterisks. Numbers given represent the position relative to the point of cleavage. VZV: varicella-zoster virus gpII (Keller *et al.*, 1986), HCMV: human cytomegalovirus Towne strain gB (Spaete *et al.*, 1988), EHV-4: equine herpesvirus type-4 gB (Riggio *et al.*, 1989), PRV: pseudorabies virus gII (Robbins *et al.*, 1987), MDV-1: Marek's disease virus serotype-1 gB (Ross *et al.*, 1989), MDV-2: Marek's disease virus serotype-2 gB (Yoshida *et al.*, 1994), MDV-3: Marek's disease virus serotype-3 gB (Yoshida *et al.*, 1994).

		431	433	434	
wild type	gB-1	5'----TCA TTG TCA CGA TTG CGG CGA GAT ATT----3'			
		S	L	S	R L R R D I
		<i>Eco47III</i>			
gB431A		5'----TCA TTG AGC GCT TTG CGG CGA GAT ATT----3'			
		S	L	S	A L R R D I
		<i>XhoI</i>			
gB433A		5'----TCA TTG TCA CGA TTG GCT CGA GAT ATT----3'			
		S	L	S	R L A R D I
		<i>BssHII</i>			
gB434A		5'----TCA TTG TCA CGA TTG CGC GCA GAT ATT----3'			
		S	L	S	R L R A D I

Fig. 15: The nucleotide and amino acid sequences of the cleavage region in the wt gB-land the mutant gB-1s. nt and aa changes are indicated by boldface type. A series of primers, 5'-TGCATTTCGAATATCTCGCCGCAAAGCGCTCAATGAGGTAG-3', 5'-TGCATTTCGAATATCTCGAGCCAATCGTGAC-3', and 5'-TGCATTTCGAATATCTGCGCGCAATCGTG-3' (*Bst*BI sites are double-underlined, newly created restriction sites are underlined) were used to introduce the substitutions of arginine at position -4 (gB431A), at position -2 (gB433A), and at position -1 (gB434A), respectively. The PCR reactions were performed with each of these three primers and a primer, 5'-CGTCAAGGTTGGACATGTAC-3'. The PCR products (about 215 bp) were digested with *Sph*I and *Bst*BI, and then the corresponding region of the wt gB-1 gene in pNZ29RMDgB-S (Yanagida *et al.*, 1992) was replaced with them. After confirming the DNA sequences, the resulting transfer vectors were transfected into FPV-infected cells by electroporation to generate recombinant FPVs as described previously (Ogawa *et al.*, 1990; Yanagida *et al.*, 1992). These recombinant FPVs are designated gB431A-recFPV, gB433A-recFPV, and gB434A-recFPV.

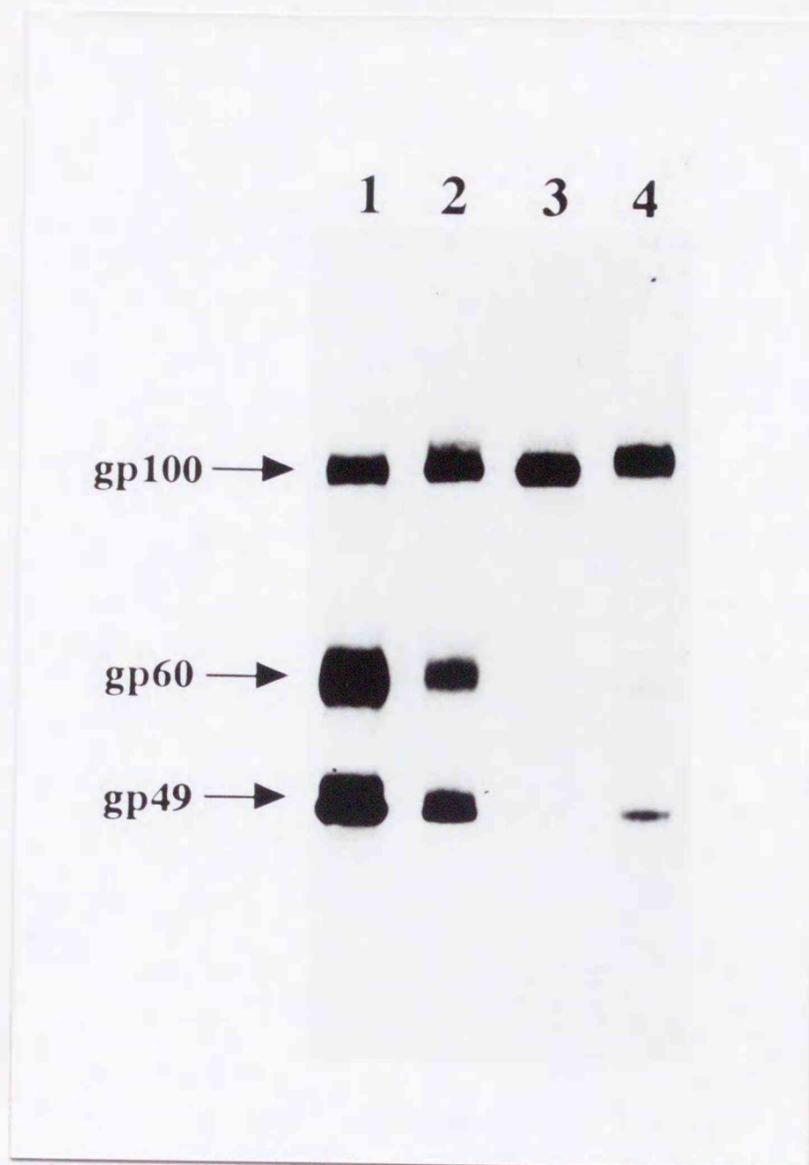


Fig. 16: Immunoprecipitation analysis of gB-1 cleavage mutants expressed by recombinant FPVs. CEF cells were infected with recFPV-gB1, gB431A-recFPV, gB433A-recFPV, or gB434A-recFPV, respectively (lane 1 to 4) at an moi of 5. At 24 hr postinfection the infected cells were labeled with [³⁵S]methionine. After 6 hr, cell lysates were prepared with lysis buffer and immunoprecipitation was performed using mAb, 1AN86.

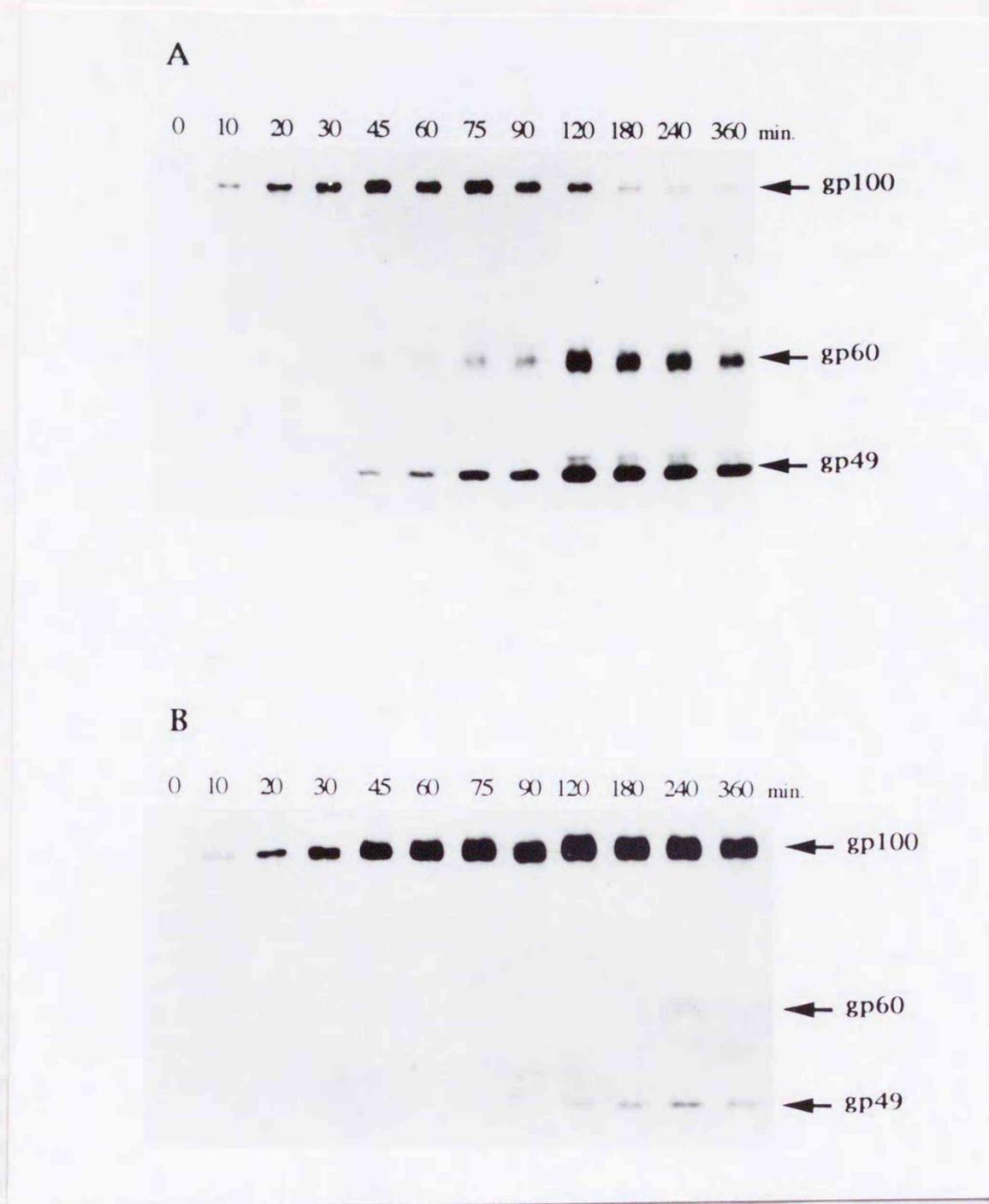


Fig. 17: Pulse-chase analysis of wt gB-1 and gB433A from recombinant FPV-infected cells. CEF cells were infected with recFPV-gB1 (A) or gB433A-recFPV (B) at an moi of 5. At 24 hr postinfection the infected cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine for 10 min and then the radioactive medium was removed. Subsequently, the cells were incubated in the presence of nonradioactive methionine. At the times indicated above each lane, the cells were harvested and lysed. Immunoprecipitation with mAb, 1AN86 were performed.

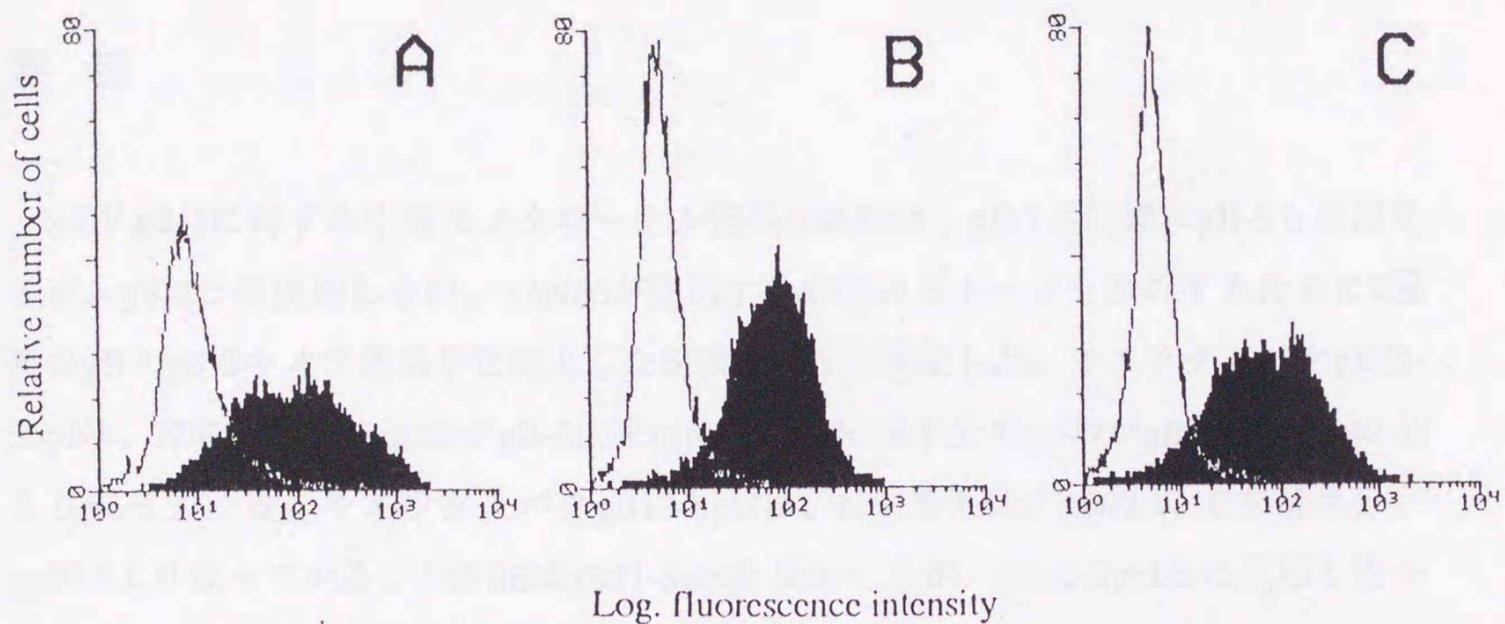


Fig. 18: Surface expression of gB proteins in MDV- or recombinant FPV-infected cells. DEF cells were infected with the GA strain of MDV serotype-1 (A). CEF cells were infected with gB-1-recFPV (B) or gB433A-recFPV (C) at an moi of 2. At 48 hr (MDV) or 24 hr (gB-1-recFPV and gB433A-recFPV) postinfection. These infected cells were removed from the plates by incubation for 10 min with 0.02% EDTA in PBS. Surface expression was analyzed in a fluorescence-activated cell sorter (FACS), using mAb 1AN86 (shaded peak). As a control antibody, Anti-FLAGTM M2 antibody directed to FLAG octapeptide (DYKDDDDK) was used (open peak). Median channel of cells stained are follows: MDV, 96.47; wt gB, 74.32; gB433A, 71.05.

第3章 中和モノクローナル抗体 1AN86 のエピトープマッピング および組換えFPVのワクチン効果

要 旨

MDV gB-1に対する中和モノクローナル抗体1AN86は、gB-1と同様にgB-3も認識するが、gB-2とは反応しない。1AN86が認識する中和エピトープを解析するために2種類のgB-1/gB-2キメラ遺伝子を挿入した組換えFPVを構築した。キメラタンパクgB21-ShpIは、N末端半分のgp60がgB-2由来(gp60-2)、C末端半分のgp49がgB-1由来(gp49-1)より成っている。キメラタンパクgB12-SphIは、N末端半分がgp60-1、C末端半分がgp49-2より成っている。1AN86はgB21-SphIと反応したが、gB12-SphIとは反応しなかった。この結果より1AN86が認識する中和エピトープは、gp49-1に存在していることが明らかになった。

*in vitro*においてgBの発現解析に用いた一連の組換えFPVについて、*in vivo*で感染防御効果を比較した。recFPV-gB1の感染防御率が90%であるのに対し、recFPV-gB2(55%)、recFPV-gB3(33%)の感染防御率は有意に低かった。一方、gB-2にgB-1の中和エピトープを導入したキメラgB21-SphIの感染防御率(80%)は、予想通りgB-1と同程度に高い感染防御率を示した。また開裂しないmutant gB-1である gB433Aもwt gB-1と同程度に高い感染防御率を示し、開裂の阻害は、gB-1の免疫原性に影響を与えないことが明らかになった。

序 論

ウイルスの異なった株間で抗原タンパクのエピトープ解析を行う際、キメラ遺伝子を構築し、その発現タンパクと中和抗体の反応性を調べることは、重要な知見を与える。Gritz (1990) らは、HIV envelope protein とHIV感染患者血清との反応性を調べるために、ワクチニアウイルスを使って2つの株のHIV env遺伝子のキメラ遺伝子を

ランダムに構築した。またLi(1992)らは、2株のインフルエンザウイルスよりキメラHA抗原を発現するインフルエンザウイルスを再構築し、マウスに接種した。得られた血清には2株のインフルエンザウイルスに対する中和活性を含んでいた。

gB-1に対するモノクローナル抗体1AN86は、ウイルス増殖に対して中和活性を示し、gB-1と同様にgB-3を認識する。しかし、アミノ酸配列が80%以上一致するgB-2は認識しない。本章では、1AN86が認識する中和エピトープを解析するためにgB-1/gB-2キメラ遺伝子を挿入した2種類の組換えFPVを構築し、エピトープマッピングを行った。さらにこれら2種類のキメラタンパクの免疫原性の比較およびgBの発現解析に用いた一連の組換えFPVについて、感染防御実験を行った。

材料と方法

細胞とウイルス

MDV-1 (血清型 1) GA株はduck embryo fibroblast (DEF) cellで増殖、継代した。組換えFPVの構築はワクチン株であるUSDA株 (Nazerian *et al.*, 1989) を親株として使用し、得られた一連の組換えFPVはCEF cellで増殖、継代した。DEF cell及び CEF cellは4% calf serumを含むLeibovitz-McCoy medium (GIBCO Laboratories) で培養した。

gB- 1/gB- 2キメラ遺伝子の構築

プラスミドpNZ29MDgB-2を *SphI-SaII* で切断し、gp49-2をコードした1,438 bp断片をプラスミドpNZ29MDgB-1の *SphI-SaII* site に挿入した。構築したプラスミドはN末端部にgp60-1、C末端部にgp49-2をコードしたキメラgB遺伝子を有しており、pNZgB12SphIと名づけた。またプラスミドpNZ29MDgB-1を *SphI-SaII* で切断し、gp49-1をコードした1,601 bp断片をプラスミドpNZ29MDgB-2の *SphI-SaII* site に挿入した。構築したプラスミドはN末端部にgp60-2、C末端部にgp49-1をコードしたキメラgB遺伝子を有しており、pNZgB21SphIと名づけた。組換えFPVの構築は、第1章で述べたようにFPV USDA株を親株としてpNZgB12SphI, pNZgB21SphIをそれぞれトランスフェクションすることにより行った。得られた組換えFPVをそれぞれgB12SphI-recFPV, gB21SphI-recFPVと名づけた。

免疫沈降

第1章に述べた方法と同様の方法により行った。

感染防御実験

MDVに対する移行抗体を保有していない1日齢ニワトリ (MD-susceptible cross of line 15Is and 7) を使用した。一連の組換えFPVの 10^4 PFUを、1日齢ニワトリの腹腔に接種した。接種12日後、強毒MDV-1 RB1B株の 10^3 PFUを腹腔にチャレンジした。チャレンジ8週後、剖検によりMDV lymphomaの症状の有無を調べた。

結果

3-1: gB-1/gB-2キメラ遺伝子の構築

gB-1に対する中和モノクローナル抗体, 1AN86のエピトープがgp60-1, gp49-1のどちらのポリペプチド内に存在しているかを同定するために、第2章で述べたgB-1の開裂部位を利用して2種類のgB-1/gB-2キメラ遺伝子を構築した。Fig. 19に示すように組換えFPVで発現したキメラタンパク, gB12-SphIはN末端部がgp60-1、C末端部がgp49-2より成る。一方、キメラタンパク, gB21-SphIはN末端部がgp60-2、C末端部がgp49-1より成る。

3-2: gB-1/gB-2キメラタンパクの免疫沈降

組換えFPV, gB12SphI-recFPV, gB21SphI-recFPVの感染細胞を、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンでラベルし、モノクローナル抗体1AN86で免疫沈降を行った。Fig. 20に示すように1AN86はキメラタンパクgB21-SphIと反応してgB complex (gp100, gp60-2, gp49-1)を沈降したが (lane 3)、他方のキメラタンパクgB12S-phIとは反応しなかった (lane 4)。なおデータは示さないが、キメラタンパクgB12-SphIの発現は、抗trpE-gB2C抗血清を用いたウェスタンブロッティングで確認した。

3-3: 感染防御実験

Table 2に一連の組換えFPVによる感染防御実験の結果を示した。まずgB-1, gB-2, gB-3の免疫原性を比較した。gB-1, gB-2, gB-3遺伝子の予想されるアミノ酸配列の相同性は70%以上である。それゆえ、gB-2, gB-3はgB-1の主要な感染防御に関与するエピトープを共有していると予測された。しかし、感染防御実験ではrecFPV-gB1が90%の感染防御をしたにもかかわらず、recFPV-gB2, recFPV-gB3でそれぞれ55%, 33%の感染防御で有意に低かった。

gB-1とgB-2の免疫原性の相違ををさらに詳細に調べるために、2種類のgB-1/gB-2キメラタンパクの免疫原性を比較した。gB21SphI-recFPVが90%の感染防御をしたのに対してgB12SphI-recFPVの感染防御(44%)は有意に低く、recFPV-gB2と同程度であった。gB21-SphIは中和抗体, 1AN86のエピトープを有するgp49-1を含んでおり、このgp49-1の領域が、感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

開裂しないgB-1を発現する組換えFPV, 433A-recFPVは、80%の感染防御率を示し、recFPV-gB1と差はなかった。この結果よりgB-1は開裂しなくとも感染細胞膜表面に効率よく輸送され、さらに感染防御に関与する主要なエピトープのコンフォメーションは保持されていることが確認された。

考 察

gB-1に対する中和モノクローナル抗体1AN86は、gB-1のC末端部の半分を占めるgp49を認識することがgB-1/gB-2キメラタンパクを用いた解析で明らかになった。さらにこの抗体は、感染細胞膜表面で発現しているgB-1 complexと反応することよりgp49-1のextracellular domain (Table 1) Asp₄₃₅-Val₆₈₂内に認識部位が存在していると推測される。

本章では、*in vitro*において発現解析を行った一連のgB組換えFPVについて、*in vivo*でのこれらの組換えFPVの感染防御効果を比較した。gB-1遺伝子はMDV-1 GA株からクローニングされたが、チャレンジウイルスであるMDV-1 RB1B株のgB-1遺伝子と全く同一配列であった。recFPV-gB1で免疫したニワトリは、同じgB-1を発現し

ているチャレンジウイルスに対し、感染防御に成功した。一方、gB-2, gB-3はgB-1とアミノ酸レベルで非常に類似しており、さらにすべてのシステイン残基の位置および開裂部位は、完全に一致していた。これらのことより、中和抗体に認識される感染細胞膜表面でのコンフォメーションも類似していると推測され、MDV-1チャレンジに対してgB-1と同様の高い感染防御効果が予想された。しかし、recFPV-gB-2, recFPV-gB-3の感染防御率はそれぞれ55%, 33%と有意に低かった。この結果は、gB-1特有の限定された領域に、感染防御に関与する主要エピトープが存在することを示している。gB-1/gB-2キメラタンパクの感染防御効果の比較は、この主要エピトープの解明に重要な知見を与えた。gB-2のgp49-2を中和抗体 1AN86のエピトープを有するgp49-1に置換したキメラタンパク(gB21-SphI)の感染防御率(80%)は、gB-1(90%)と同程度に高い値であった。つまり1AN86のエピトープが唯一の主要エピトープではないにしても、gp49-1にはgp49-2とは異なる感染防御に重要な役割を果たしている領域が存在していることを示している。現在MDV-1に対し、MDV-2とMDV-3の混合生ワクチンが使用され効果を上げている。それゆえ、recFPV-gB2とrecFPV-gB3の混合組換えFPVの相乗効果を調べることは興味深い。

開裂しないgB-1は、wt gB-1と同様に高い感染防御効果を示した。この結果よりgB-1は開裂しなくとも感染細胞膜表面に効率よく輸送され、さらに感染防御に関与する主要エピトープのコンフォメーションは保持されていることが確認された。PRVでは少量の開裂していないgII (gB homolog) が細胞膜表面およびウイルスピリオンにも存在していることが明らかになっている (Whealy *et al.*, 1990)。しかし、開裂の有無によるgIIの機能についてはまだ解明されていない。

ウイルスタンパクの開裂の解析は、Newcastle disease virus (NDV) のFタンパク (fusion protein) で研究が進んでいる。Fタンパクは前駆体F₀が細胞由来のプロテアーゼによりF₁とF₂に開裂する。開裂により生じたF₁のN末端部が融合活性を示し、ウイルスの宿主細胞への侵入、巨核細胞の形成をもたらす。一方、弱毒株のFタンパクは、開裂部位に変異が生じており開裂しない。この開裂の有無がNDVの毒性あるいはtissue tropismに影響していると考えられている (Toyoda *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 1989)。今後、NDVのようにMDVでも開裂しないgBを発現する変異ウイルスを得ることができれば、ヘルペスウイルスgBの開裂による生理学的意義の解明の糸口となり得るかもしれない。

文献

- GRITZ, L., DESTREE, A., CORMIER, N., DAY, E., STALLARD, V., CAIAZZO, T., and MAZZARA, G., PANICALI, D. (1990). Generation of hybrid genes and proteins by vaccinia virus-mediated recombination: Application to human immunodeficiency virus type 1 env. *J. Virol.* 64, 5948-5957.
- LI, S., SCHULMAN, J. L., MORAN, T., BONA, C., and PALESE, P. (1992). Influenza A virus transfectants with chimeric hemagglutinins containing epitopes from different subtype. *J. Virol.* 66, 399-404.
- NAGAI, Y., HAMAGUCHI, M. and TOYODA, T. (1989). Molecular virology of Newcastle disease virus. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 5, 16-64.
- NAZERIAN, K., DHAWALE, S., and PAYNE, W. S. (1989). Structure proteins of two different plaque-size phenotypes of fowlpox virus. *Avian Disease* 33, 458-465.
- NAZERIAN, K., LEE, L. F., YANAGIDA, N., and OGAWA, R. (1992). Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. *J. Virol.* 66, 1409-1413.
- ROSS, L. J. N., SANDERSON, M., SCOTT, S. D., BINNS, M. M., DOEL, T. and MILNE, B. (1989). Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804.
- TOYODA, T., SAKAGUCHI, T., IMAI, K., INOCENCIO, N.M., GOTOH, B., HAMAGUCHI, M. and NAGAI, Y. (1987). Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 158, 242-247.
- 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.
- YANAGIDA, N., OGAWA, R., LI, Y., LEE, L. F. and NAZERIAN, K. (1992). Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the pp38 gene of Marek's disease virus. *J. Virol.* 66, 1402-1408.
- YOSHIDA, S., LEE, L. F., YANAGIDA, N. and NAZERIAN, K. (1994). The glycoprotein B gene of Marek's disease virus serotype 2 and 3: Identification and expression by recombinant fowlpox viruses. *Virology* 200, 484-493.

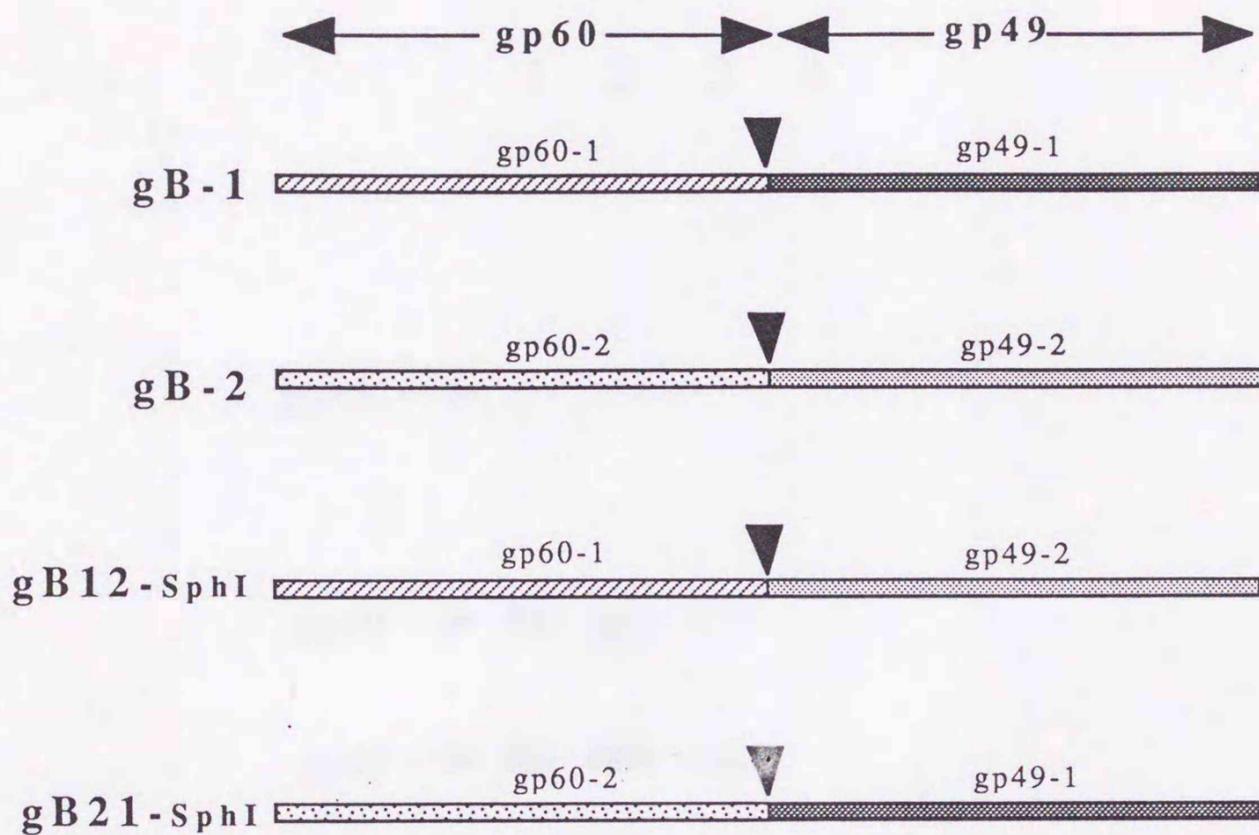


Fig. 19: The structure of the gB-1/gB-2 chimeric genes in recombinant FPVs. Plasmid pNZ29RMDgB-S was cleaved with *SphI* and *SalI* to obtain a 1,601 bp segment encoding gp49-1. This fragment was inserted into *SphI-SalI* sites of pNZ29MDgB-2 to replace the corresponding fragment of gB-2. The plasmid was designated pNZgB21SphI. Similarly, pNZ29RMDgB-2 was cleaved with *SphI* and *SalI* to obtain a 1,438 bp segment encoding gp49-2. This fragment was inserted into *SphI-SalI* sites of pNZ29MDgB-1 to replace the corresponding fragment of gB-1. The plasmid was designated pNZgB12SphI, and the resulting recombinant FPV were designated gB12SphI-recFPV and gB21SphI-recFPV, respectively. The predicted proteolytic cleavage sites between gp60 and gp49 are indicated by arrow heads

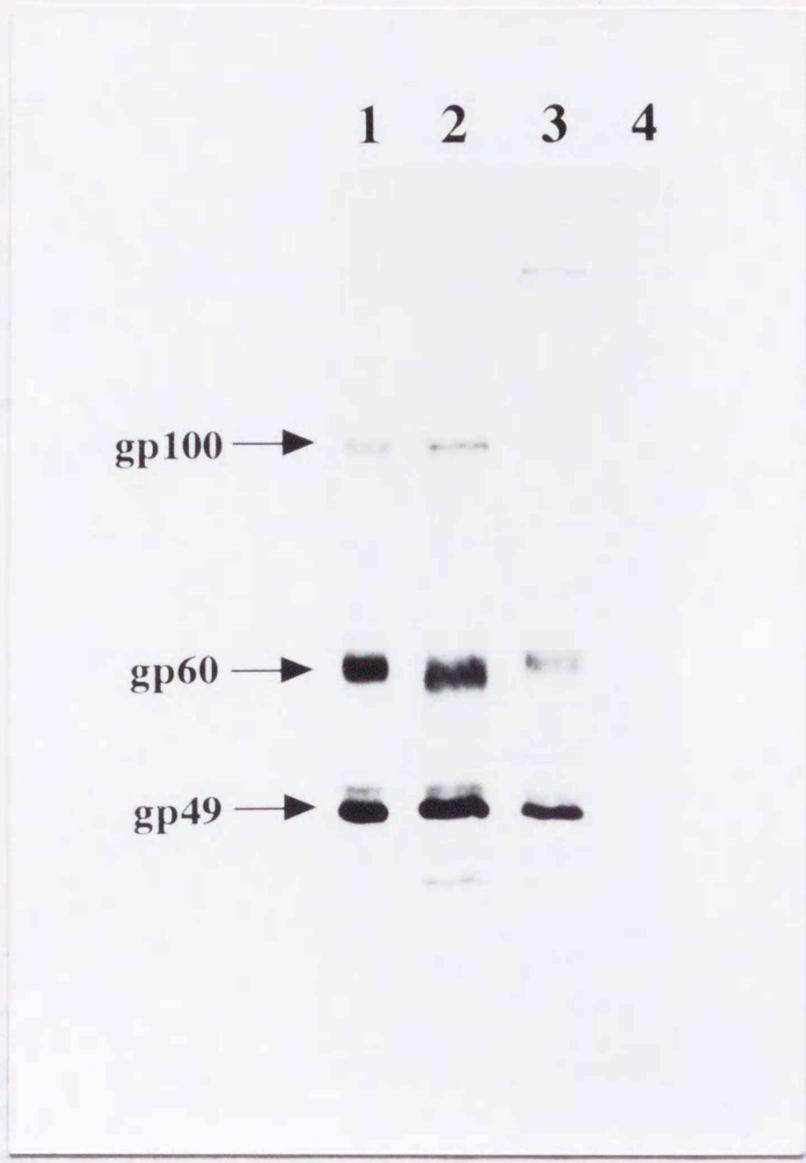


Fig. 20: Immunoprecipitation of serotype-1/2 chimeric gB with mAb 1AN86. Lanes; 1, MDV-1; 2, recFPV-gB1; 3, gB21SphI-recFPV; 4, gB12SphI-recFPV. Infected cells with recFPV or the GA strain of MDV serotype-1 were labeled with [³⁵S]methionine for 6 hr. Immunoprecipitation with mAb, 1AN86 was performed.

Table 2: Protection of chickens against challenge with the RB1B strain of MDV after vaccination with recombinant FPV expressing the gB gene from different serotypes of MDV^{a)}

Lot	Vaccine	MD ^{b)} /Total	Protection (%)
1	None	8/8	0
2	wild-type FPV	8/10	20
3	recFPV-gB1	1/10	90
4	recFPV-gB2	4/9	55
5	recFPV-gB3	6/9	33
6	gB12SphI-recFPV	5/9	44
7	gB21SphI-recFPV	1/10	90
8	gB433A-recFPV	2/10	80

a) One-day-old chickens were vaccinated intra-abdominally with 10^4 PFU of recombinant FPV. Twelve days later, chickens were challenged intra-abdominally with 10^3 PFU of the RB1B strain of MDV.

b) Number of chickens that died from MD lymphoma or had lymphoma at the end of the experiment.

第4章 MDV-1 gL 遺伝子の同定 及び 組換えFPV での発現

要 旨

MDV-1のゲノムDNAの *Bam*HI-D 断片のDNA塩基配列の解析を行い、HSV-1の glycoprotein L(gL), uracil-DNA glycosylase, nuclear localizing phosphoproteinをコードしている UL1, UL2, UL3 遺伝子と相同性のある3つの open reading frame(ORF), MDV-1 gL, UL2, UL3 ORFを同定した。同定した3つの遺伝子のうちgL遺伝子についてMDV-1感染細胞での発現を、抗gL抗体を用いた免疫沈降により確認した。MDV-1 gLは分子量25,000-Daの糖タンパクで、PNGase Fで糖鎖を除去すると分子量は、18,000-Daに減少した。この結果は、アミノ酸配列より予想されるシグナルペプチドの開裂部位、2ヶ所の *N*-linked glycosylation siteを考慮した分子量と一致した。gL遺伝子を挿入した組換えFPVを構築し、発現の解析を行った。組換えFPVで発現したgL遺伝子産物(recombinant gL)はnative gLと同じ分子量であったが、糖鎖修飾に明らかな相違が確認された。native gLは小胞体からゴルジ体、さらに細胞膜表面に輸送されるのに対し、recombinant gLは小胞体にとどまりゴルジ体での糖鎖修飾は受けなかった。この結果は、gLの正常な糖鎖修飾、細胞内輸送にはMDV-1の他のタンパクが関与していることを示唆している。

序 論

ウイルスに対する感染防御の研究は、感染細胞表面あるいはウイルスピリオンに存在する糖タンパクに関心が注がれている。このような糖タンパクは、ウイルスエンベロープを構成し、細胞への吸着、侵入などに重要な役割を果たしていると考えられている(Courtney *et al.*, 1984)。HSV-1では、gBにつづき11種類の糖タンパクが同定され、そのDNA塩基配列も決定されている。このうちgB, gC, gD, gHについては中和モノクローナル抗体が得られ、免疫応答のターゲットなりうることが明らか

になっている (Highlander *et al.*, 1988; Fuller and Spear, 1985; Highlander *et al.*, 1987; Fuller *et al.*, 1989)。一般にヘルペスウイルスはcell-to-cellでウイルスが移行するため、感染防御には液性免疫と細胞性免疫の両方が必要であると考えられている。これらの免疫応答を確かめるために組換えワクチニアウイルスを利用した*in vivo*での研究が精力的に行われてきた。HSV-1 gB, gC, gD遺伝子をそれぞれ発現する組換えワクチニアウイルスは、動物実験において感染防御に成功した(Cantin *et al.*, 1987; Weir *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1989; Blacklaws *et al.*, 1990)。一方、gHについては同じ系で発現しても感染細胞の小胞体にとどまり膜表面には輸送されなかった(Forrester *et al.*, 1991)。さらに中和モノクローナル抗体にも認識されず、*in vivo*においても感染防御を誘導できなかった(Browne *et al.*, 1993)。このため、gHのプロセッシングおよび細胞内輸送には他のウイルスタンパクの関与が示唆された。最近、Hutchinson (1992)らは、HSV-1感染細胞の膜表面でgHとcomplexを形成している糖タンパク、gLの存在を明らかにした。彼らはgLがgHの適切なfolding, processingに関与し、gH-gL complexを形成することにより感染細胞の膜表面に輸送されauthenticな発現をすることを証明した。MDV-1 gHについては、DNA塩基配列は決定されているものの(Scott *et al.*, 1993)、発現は確認されていない。

本章ではMDV-1 gL遺伝子の同定を行うためにHSV-1ゲノムとのcolinealityを考慮し、MDV-1ゲノムのterminal repeat近傍のDNA塩基配列を決定した。その結果、gL, UL2, UL3のgene clusterを同定した。さらにgL遺伝子については組換えFPVを構築してその発現解析を行った。

材料と方法

細胞とウイルス

MDV-1 (血清型1) GA株はduck embryo fibroblast (DEF) cellで増殖、継代した。組換えFPVの構築はワクチン株であるUSDA株(Nazerian *et al.*, 1989)を親株として使用し、得られた一連の組換えFPVはCEF cellで増殖、継代した。DEF cell及びCEF cellは4% calf serumを含むLeibovitz-McCoy medium (GIBCO Laboratories)で培養した。

DNA塩基配列分析

MDV-1 *Bam*HI D断片中の *Bg*III-*Pst*I 2, 462 bpのDNA塩基配列を、TAQuence DNA sequence kit (United States Biochemical Corp.)と [³⁵S]-dATPを使用して決定した。得られたDNA塩基配列のデータはウイスコンシン大学 Genetics Computer Group (GCG)のGAPとPILEUP program (Devereux *et al.*, 1984)によってalignmentした。

gL 遺伝子の大腸菌での発現及び抗gL抗体の取得

gL遺伝子の *Eco*RI-*Pst*I 260 bp断片を大腸菌発現用ベクターpATH10 (Koerner *et al.*, 1991)に挿入し、プラスミドpATH-UL1Bを構築した。大腸菌RR1株に形質転換し、SDS-PAGEにより *trpE*-gL fusion protein *trpE*-UL1Bの発現を確認した。部分的に精製した *trpE*-UL1B 約200µgをウサギに4週間隔で3回免疫した。

gL遺伝子 transfer vector の構築

gL遺伝子にPCRを用いてスタートコドンATGの上流に *Bam*HI siteを導入し、potential poxvirus early transcription terminatorであるTTTTAT配列をTTTTCAT配列に変えた。使用したプライマーのDNA配列は5'-CGGGGGATCCAGCATGAAAATT TATAGAGT-3' (*Bam*HI siteとATGはアンダーラインで示す)、5'-TGCAGTTGACC TTAATGAAAATGCCCGTGG-3' (termination signalの除去のためAをGに置換)である。PCRにより得られたDNA断片はDNA塩基配列を確認した後、gL ORFとして再構築し、insertion vector pNZ1729Rに挿入した。構築したプラスミドをpNZ29RMDgLと名づけた。組換えFPVの構築は、第1章で述べたようにFPV USDA株を親株としてpNZ29RMDgLをトランスフェクションすることにより行った。得られた組換えFPVをrecFPV-gLと名づけた。

免疫沈降

第1章に述べた方法と同様の方法により行った。但し、抗体は抗gL血清を使用した。また糖鎖の解析に使用したendoglycosylase処理はBoehringer-Mannheim社のプロトコールに従った。反応の際、すべてのサンプルにはプロテアーゼによる分解を避けるため1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を加えた。

結果

4-1: MDV-1 gene cluster の同定

MDV-1 *Bam*HI D 断片(約10 kb)はMDV-1 ゲノムの左端より10~20 kbに位置し、terminal repeat と unique long の一部を含んでいる (Fig. 21) (Fukuchi *et al.*, 1984)。MDV-1 gL 遺伝子が存在すると予想された *Bam*HI D 断片の右端約4分の1のDNA塩基配列を決定した (Fig. 22)。この領域にはアミノ酸100以上をコードする4つのORFが存在していた。このうち右方向の3つのORFはHSV-1 UL1, UL2, UL3の gene arrangement (McGeoch *et al.*, 1988)に一致していた。左方向のORFは142アミノ酸をコードしており右方向のORFとオーバーラップしていた。HSV-1のゲノムにはこのORFに対応する遺伝子は存在しておらず、またデータベースの検索でも有意に相同性のあるタンパクは報告されていなかった。このORFをORF142と名づけた。

右方向の3つのORFの予想されるアミノ酸配列を対応するHSV-1のUL1, UL2, UL3のアミノ酸配列と比較した。2番目、3番目のORFはHSV-1のUL2, UL3とそれぞれ43%, 49%の相同性があった (Fig. 23-2, 23-3)。HSV-1 UL2遺伝子はuracil-DNA glycosylaseを、UL3遺伝子はnuclear localizing phosphoproteinをコードしている。しかし、1番目のORFとHSV-1 UL1の間の相同性はわずか17%しかなかった (Fig. 23-1)。HSV-1 UL1遺伝子はglycoprotein L (gL) をコードしておりUL2遺伝子の上流に位置している。この2つの遺伝子は一部オーバーラップしている。MDV-1の1番目と2番目のORFの gene arrangementと一致していたので、1番目のORFは 'positional gL homolog' であると考えられた。同様なことがHCMV UL115 (Kaye *et al.*, 1992), EBV BKRF2 (Yaswen *et al.*, 1993)でも報告されている。さらにこのORFをMDV-1 gL遺伝子として確信するために3種類の α -ヘルペスウイルスのgLとの相同性を比較した。Fig. 24に示すようにMDV-1 gLのアミノ酸71番目から98番目は他のヘルペスウイルス gL と相同性の高い領域であった。28アミノ酸残基のうちシステイン残基を含む8残基が4種類のgLで保存されていた。

4-2: MDV-1 感染細胞でのgL遺伝子の発現

gLに対する抗血清を得るためにgL遺伝子の116番目から195番目のコドン

PATH vector (Koerner *et al.*, 1991) に挿入し、プラスミドpATH10-UL1Bを構築した。大腸菌RR1株に形質転換し、*trpE*-gL fusion proteinの発現をSDS-PAGEで確認した(Fig. 25, lane 2)。この*trpE*-gL fusion proteinは1.0% SDS存在下、65°Cで5分間加熱することにより非特異タンパクの混入を低減することができた(lane 3)。部分的に精製した*trpE*-gL fusion proteinをウサギに4週間隔で3回免疫し、得られた抗gL血清を、MDV-1感染細胞でのgL遺伝子の発現を調べるために用いた。MDV-1感染細胞には、抗gL血清と反応する分子量25,000-Daのポリペプチドが確認された(Fig. 26, lane 2)。このポリペプチドは非感染細胞(lane 1)には見られずMDV-1に特異的であった。MDV-1 gL 遺伝子は195アミノ酸をコードしているが、アミノ酸残基1-19番目まではhydrophobic signal sequenceであり、Lys₁₉-Thr₂₀の間でシグナルペプチドの開裂が生じることが von Heijne (1986) のcriteriaにより予測された。また40-42番目と77-79番目のアミノ酸残基にはpotential N-linked glycosylation site (Asn-X-Ser/Thr) が存在している。この2カ所に糖鎖が付加されているとすれば、分子量は約5,000-Da増加する(Klenk and Rott, 1980)。シグナルペプチドの開裂による分子量の低減と糖鎖付加による分子量の増加を考慮するとgLの分子量は24,400-Daと推測されるが、この分子量はFig. 26で見られる25,000-Da ポリペプチドとほぼ一致する。さらに抗gL血清はgLと同時に約115-kDaの高分子量のポリペプチドを特異的に共沈した(lane 2, arrow head)。cell lysateをlysis buffer存在下で10分間煮沸した後、抗gL血清で免疫沈降を行うとこの高分子量のポリペプチドは検出されなかった(lane 3)。この結果は、高分子量のポリペプチドはgLとcomplexを形成し、煮沸により解離することを示している。

4-3: 組換えFPVでのgL遺伝子の発現

gL遺伝子に存在するFPVでearly transcription terminatorとして機能する可能性のあるTTTTTAT配列をアミノ酸配列を変えないでTTTTCATに変更した。このgL遺伝子をinsertion vector, pNZ1729R に挿入し、transfer vector, pNZ29RMDgLを構築した(Fig. 27)。このtransfer vectorをトランスフェクションして組換えFPV, recFPV-gLを構築した。recFPV-gL感染細胞を[³⁵S]メチオニンでラベルし、抗gL血清を用いて免疫沈降実

験を行った。Fig. 28-Aで示すように抗gL血清と反応するgL遺伝子産物 (lane 4)はMDV-1感染細胞で発現しているgL (lane 3)と同じ分子量であった。組換えFPVに挿入したgL遺伝子は、強力な合成プロモーター下で発現しているためMDV-1感染細胞のgLと比べ約30倍の発現量であることがdensitometry解析で明らかになった (Fig. 28-B)。recFPV-gL感染細胞にはgLのほかに23,000-Daのマイナーバンドが検出された (Fig. 28-B lane 2)。MDV-1感染細胞では同様なバンドは長時間感光でも検出されなかった。このバンドは後述するendoglycosylaseで処理すると糖鎖が付加されていないgLと同じ分子量に変化した。おそらく組換えFPVでの高発現により不完全な糖鎖修飾が生じたためと考えられる。

4-4: native gL と recombinant gL の細胞内輸送

MDV-1感染細胞で発現しているgL (native gL) とrecFPV-gL感染細胞で発現しているgL (recombinant gL) のposttranslational modificationを調べるために、免疫沈降後、native gL, recombinant gLをendoglycosylaseでそれぞれ処理して糖鎖修飾を比較した。Fig. 29に示すようにEndo H処理後、native gLは部分的に低分子量へのシフトが見られたが、大部分は影響を受けなかった (lane 2)。この結果よりnative gLは2種類の異なるN-linked carbohydrate modificationを受けていると推測された。さらにこの推測を確かめるためにnative gLの細胞内輸送を調べた。パルスチェイス実験は感染細胞を短時間ラベルし、その後のチェイス時間によりタンパクの細胞内輸送の速度あるいは糖鎖修飾等を調べることができる。Fig. 30ではMDV-1感染細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで20分間パルスラベルした後、0~8時間チェイスした。各時間でのnative gLの糖鎖修飾を調べるために免疫沈降後、Endo H処理を行った。チェイス後0時間ではnative gLはEndo Hに感受性で低分子量へシフトした。その後チェイス時間が増すに従ってEndo H-sensitive formからresistant formへと変化した。Endo Hは小胞体で付加されるhigh-mannose型の糖鎖に対して活性を示すがゴルジ体で付加されるcomplex型の修飾には作用しない。native gLはcomplex型糖鎖に対して活性を示すPNGase Fで処理すると低分子量へとシフトした (Fig. 29 lane 3)。これらの結果よりnative gLは翻訳後、小胞体でhigh-mannose型の糖鎖付加が生じ、ゴルジ体から細胞膜表面への輸送の過程でさらに複雑なcomplex型の修飾を受けると考えられる。native gLの細胞膜表面での発現は

未固定のMDV-1感染細胞を用いたimmunofluorescence assayにより確認した。

一方、recombinant gLはnative gLとは異なりEndo Hに対して感受性であった。すなわちrecombinant gLは小胞体にとどまりゴルジ体でのcomplex型への糖鎖修飾は受けていないと考えられた。MDV-1感染細胞と同様にrecFPV-gL感染細胞の膜表面でgLの発現は見られたが、その発現量は少なかった。おそらく高発現したrecombinant gLの一部が小胞体にとどまることができず、特殊なpathwayで細胞膜表面へと輸送されたと考えられる。

Endo HとPNGase Fはともにhigh-mannose型の糖鎖に作用するがその開裂部位は異なっている。Endo Hは2つのN-アセチルグルコサミン残基の間のglycosidic linkage (-Man-GlcNAc- \rightarrow -GlcNAc-Asn)を開裂するが、PNGase Fはアスパラギン残基とN-アセチルグルコサミン残基の間 (-Man-GlcNAc-GlcNAc- \rightarrow -Asn)を開裂するため、タンパクからN-linked carbohydrateを完全に除くことができる (Tarentino *et al.*, 1985)。recombinant gLをEndo H, PNGase Fで処理するとそれぞれ18,500-Da, 18,000-Daの分子量にシフトした。この分子量の差(500-Da)は2つのN-アセチルグルコサミン残基に相当する。すなわちrecombinant gLの2カ所のpotential N-linked glycosylation siteには実際に糖鎖が付加されており、特に、native gLではcomplex型の糖鎖が付加されていることを示している。

考 察

本章ではMDV-1ゲノムのterminal repeat left end (TRL)に隣接したunique long region (UL)のDNA塩基配列を決定し、HSV-1のgL, UL2, UL3遺伝子に相同性のある3つのORFを同定した。MDV-1 UL2, UL3 ORFの予想されるアミノ酸配列はHSV-1 UL2, UL3とそれぞれ43%, 49%の高い相同性を示し、タンパクの生理活性は類似していると予想される。HSV-1 UL2遺伝子はuracil-DNA glycosylaseをコードし、この酵素はウイルスDNA複製の際、DNAが誤って取り込んだウラシル残基を取り除く機能を持っている (Mullaney *et al.*, 1989; Caradonna *et al.*, 1987)。HSV-1 UL3遺伝子はnuclear localizing phosphoproteinをコードしている。このタンパクはC末に核移行シグナル, RKPRK,を有しているが、同様の配列がMDV-1 UL3にも存在している(Fig. 22)。この

タンパクの機能については明らかではないが核内でのウイルスDNA複製になんらかの関与をしていると考えられている(Worrad and Caradonna, 1993)。MDV-1 gL ORFの予想されるアミノ酸配列はHSV-1 gLとわずか17%の相同性しかなかった。gLは最初、HSV-1で糖タンパクgHと感染細胞膜表面でcomplexを形成する糖タンパクとして同定された(Hutchinson *et al.*, 1992)。その後、HCMV, EBVでそれぞれgL homologが同定されたが、アミノ酸レベルでの互いの相同性は他の糖タンパクと比較して極めて低かった(Kaye *et al.*, 1992; Yaswen *et al.*, 1993)。これらのウイルス間ではgL遺伝子と隣接するUL2, UL3遺伝子のgene arrangementが保存されているので、gL遺伝子は‘positional homolog’と呼ばれている。MDV-1でもこのgene arrangementは保存されていた。 α -ヘルペスウイルスのgLには比較的相同性の高い領域が存在していることがアミノ酸配列のalignmentで明らかになった(Fig. 24)。HSV-1では、この領域にgL-gH complex形成に重要な領域が含まれている可能性が示唆されている (Roop *et al.*, 1993)。

MDV-1 gLの発現解析を行うために大腸菌で発現した

gL遺伝子産物を組換えFPVを用いて解析した。recombinant gLはnative-gLと同じ分子量であったが、糖鎖修飾に明らかな相違が確認された。native gLは小胞体からゴルジ体、さらに細胞膜表面に輸送されるのに対し、recombinant gLは小胞体にとどまりゴルジ体での糖鎖修飾は受けなかった。この結果は、gLの正常な糖鎖修飾、細胞内輸送にはMDV-1の他のタンパクが関与していることを示唆している。HSV-1, HCMV, EBVでは、gLはgHとcomplexを形成し、細胞膜表面へと輸送される。gLあるいはgH単独では正常なタンパクのコンフォメーション形成や細胞内輸送は達成されない。興味あることにMDV-1感染細胞ではgLとともに115-kDaの高分子量のポリペプチドが共沈する。この115-kDaポリペプチドは煮沸により検出されなくなる。この結果はgL-115-kDa complexが形成されていることを示唆している。MDV-1 gHは、Scott (1993)らによりDNA塩基配列が決定された。予想されるアミノ酸配列よりシグナル

ペプチドが開裂し、糖鎖修飾を受けたgHの分子量は約114-kDaと考えられている。MDV-1 gH遺伝子の発現はまだ確認されていないが、ヘルペスウイルスの研究よりMDV-1でも同様にgL, gHは、ウイルス増殖にとって必須タンパクであると予想される。抗MDV-1 gH抗体を取得し、組換えFPVでgL, gH両遺伝子を発現することによりこの115-kDaポリペプチドがMDV-1 gHであるかどうか明らかになるであろう。

文 献

- BROWNE, H., BAXTER, V., and MINSON, T. (1993). Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 74, 2813-2817.
- BLACKLAWS, B., KRISHNA, S., MINSON, A. C., and NASH, A. A. (1990). Immunogenicity of herpes simplex virus type 1 glycoproteins expressed in vaccinia recombinants. *Virology* 177, 727-736.
- CANTIN, E. M., EBERLE, R., BALDICK, J. L., MOSS, B., WILLEY, D. E., NOTKINS, A. L., and OPENSHAW, H. (1987). Expression of herpes simplex virus 1 glycoprotein B by a recombinant vaccinia virus and protection of mice against lethal herpes simplex virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5908-5912.
- CARADONNA, S., WORRAD, D., and LIRETTE, R. (1987). Isolation of a herpes simplex virus cDNA encoding the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase. *J. Virol.* 61, 3040-3047.
- COURTNEY, R. J. (1984). Virus specific components of herpes simplex virus involved in the immune response. In "Immunobiology of Herpes Simplex Virus Infection" (B. Rouse and C. Lopez, Eds.), pp 33-44. CRC Press, Boca Raton, FL.
- CREMER, K. J., MACKETT, M., WOHLBERG, C., NOTKINS, A. L., and MOSS, B. (1985). Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228, 737-740.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., and SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- FORRESTER, A., SULLIVAN, V., SIMMONS, A., BLACKLAWS, B., SMITH, G. L., NASH, A. A., and MINSON, A. C. (1991). Induction of protective immunity with antibody to herpes simplex virus type 1 glycoprotein H (gH) and analysis of the immune response to gH expressed in recombinant vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 72, 369-375.
- FUKUCHI, K., SUDO, M., LEE, Y. S., TANAKA, A., and NONOYAMA, M. (1984). Structure of Marek's disease virus DNA: detailed restriction enzyme map. *J. Virol.* 51, 102-109.
- FULLER, O. A., and SPEAR, P. G. (1985). Specificities of monoclonal and polyclonal antibodies that inhibit adsorption of herpes simplex virus to cells and lack of inhibition by potent neutralizing antibodies. *J. Virol.* 55, 475-482.
- FULLER, O. A., SANTOS, R. E., and SPEAR, P. G. (1989). Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J.*

Virol. 63, 3435-3443.

- HIGHLANDER, S. L., SUTHERLAND, S. L., GAGE, P. J., JOHNSON, D. C., LEVIN, M., and GLORIOSO, J. C. (1987). Neutralizing monoclonal antibodies for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *J. Virol.* 61, 3356-3364.
- HIGHLANDER, S. L., GAI, W., PERSON, S., LEVINE, M., and GLORIOSO, J. C. (1988). Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *J. Virol.* 62, 1881-1888.
- HUTCHINSON, L., BROWNE, H., WARGENT, V., DAVIS-POYNTER, N., PRIMORAC, S., GOLDSMITH, K., MINSON, A. C., and JOHNSON, D. C. (1992). A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* 66, 2240-2250.
- KAYE, J. F., GOMPELS, U. A., and MINSON, A. C. (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J. Gen. Virol.* 73, 2693-2698.
- KLENK, H. D. and ROTT, R. (1980). Cotranslational and posttranslational processing of viral glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 90, 19-48.
- KOERNER, T. J., HILL, J. E., MYERS, A. E., and TZAGOLOFF, A. (1991). High-expression vectors with multiple cloning sites for construction of trpE fusion genes: pATH vectors. *Methods Enzymol.* 194, 477-490.
- MARTIN, S., CANTIN, E., and ROUSE, B. T. (1989). Evaluation of antiviral immunity using vaccinia virus recombinants expressing cloned genes for herpes simplex virus type 1 glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 70, 1359-1370.
- McGEOCH, D. J., DALRYMPLE, M. A., DAVISON, A. J., DOLAN, A., FRAME, M. C., McNAB, D., PERRY, L. J., SCOTT, J. E., and TAYLOR, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69, 1531-1574.
- MULLANEY, J., McMOSS, H. W., and McGEOCH, D. J. (1989). Gene UL2 of herpes simplex virus type 1 encodes a uracil-DNA glycosylase. *J. Gen. Virol.* 70, 449-454.
- NAZERIAN, K., DHAWALE, S., and PAYNE, W. S. (1989). Structure proteins of two different plaque-size phenotypes of fowlpox virus. *Avian Disease* 33, 458-465.
- SCOTT, S. D., SMITH, G. D., ROSS, N. L. J., and BINNS, M. M. (1993). Identification and sequence analysis of the homologues of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein H in Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. *J. Gen. Virol.* 74, 1185-1190.
- TARENTINO, A. L., GOMEZ, C. M. and PLUMMER, T. H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671.
- WEIR, J. P., BENNETT, M., ALLEN, E. M., ELKINS, K. L., MARTIN, S., and ROUSE, B. T. (1989). Recombinant vaccinia virus expressing the herpes simplex virus type 1 glycoprotein C protects mice against herpes simplex virus challenge. *J. Gen. Virol.* 70, 2587-2594.
- WORRAD, D. M. and CARADONNA, S. (1993). The herpes simplex virus type 2 UL3 open reading frame encodes a nuclear localizing phosphoprotein. *Virology* 195, 364-376.
- YASWEN, L. R., STEPHENS, E. B., DAVENPORT, L. C., and HUTT-FLETCHER, L. M. (1993). Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology* 195, 387-396.
- von HEIJNE, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.

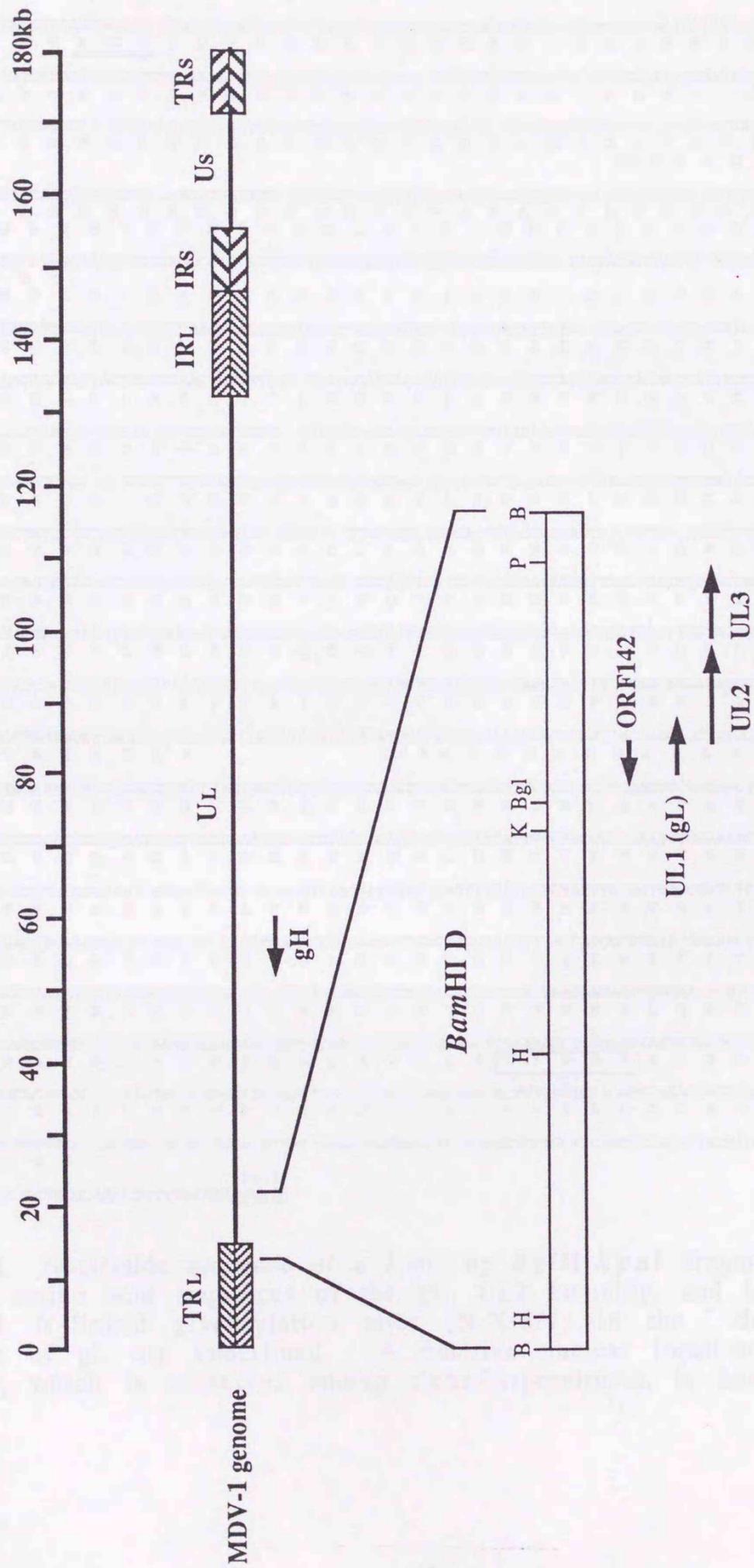


Fig. 21: Gene locations of the MDV-1 homologs of the HSV-1 gL, UL2, and UL3 genes in the BamHI D fragment of the MDV-1 genome. The genome is organized into the unique long (UL), unique short (US), internal repeats (IRL and IRS), and terminal repeats (TRL and TRS).

BglII
AGATCTTGTGGTTCTTGGGATGTCGAGTTCAGATGATGAATAGCATTGTGTATATGTTGTGATTGCAAATCCACTGTATGGTTATAT 90

AGTCAGAATTAATAAAAATGTTTCAAGTTTACACCTTCCAGTATTGTTATGGGTATTATGGGTGGGCGAGGGCGTGTACAATATTTAA 180

TTTTAGAGCCTTTACACATCCCAACAGTTTAAATCGGAGCTGCTCGGTAGCATGAAAATTTATAGAGTACTCGTGCATCTTCTTCGT 270
UL1 (gL) ► M K I Y R V L V H L S F V

GCTAGGTATGTTTACTAAGACCAATACGGTCTCGCATGGTTCGAAATACGACCTGGTACACGGCTTATGAGGGTAGCGAACATAAGCTC 360
L G M F T K T N T V L A W S K Y D L V H G F M R V A N I S S

CATTATCGGCTCGACTGCCTTCCGAACTTATTATCTTGAACCGGGGTATGCCGACTTCCATCAGACGATATCCCACGGGCATTTT 450
I M R L D C L P N L L S S N A G Y A A L P S D D I P T G I F

TATTAAGTCAACTGCAGCATAACCGAATCATTCTATGGTATGAACAAAAGCCATGCCAGCGTGGATCAATCTATTATGGGCACTGT 540
I K V N C S I P E F I L W Y E Q K A M A A W I N P I M G T V

TCTAATGATGAATGACGTTTGAAGCGGATTGGAGAATCTGTGAAGGTGGGACTTCTTACATTCTAAAACGGATAGCTGAAAAGG 630
L M M N D V L K S G L E N S V K V G L L T F L K R I A E K G

ACCCAATGGACCTCTAGAAATCGCGGATCGGGTGCATCAATTAATGCGCTGCCGATATTTCATGCTATGGCTCAACTAGACTTGA 720
P N G P L R N R G S G C I N L I A P A D I S C Y G S T R L D
UL2 ► M A Q L D L

CAGGTTAACCGAGACTTCGAAGATGATAGTCGGGAATGCCATGTCGAGCTAAAGCGATGCGCCGAACCACCTCTGGCAGCCGACGAGC 810
R F N R D F E D D S R G M P C R A K A M R R T T S G S R R A
T G L T E T S K M I V G E C H V E L K R C A E P P L A A D E

CAATGCCATAAAAAATGTCGTAGGCTGCAGGACC TCCAAAGGTTTATATCGACACGCGGTGATACATCACCTTCATCGGATAATAATC 900
N A *
P M P K K C R R P A G P P K G F I S T R G D T S P S S D N N

ACATACATTCAATCAATCCTTAACGAATGGAGACAGTTGCGTACAACCGTGGGATATTATAGCGAACGCGTATAACATCCATGAAAATT 990
H I H S I Q S L T N G D S C V Q P W D I I A N A Y N I H E N

GGAAACAAC TACTACTCCCGAACGTGTTGCTTAGAGGATCAGAAATCTTAGCGGAGTATGAGCGCAGAGCTATTACCGAAGAAGTCT 1080
W K Q L L L P E L C C L R G S E I L A E Y E R R A I T E E V

ATCCCCCAAAATGGATATTTTCGCATGGACCAGGTATTGCGCTCCAGAGTCTGTTAAAGCAGTAATCGTAGGACAGGACCCGTATGCTA 1170
Y P P K M D I F A W T R Y C A P E S V K A V I V G Q D P Y A

ACCCGGTCAAGCGCAGGCTTGGCGTTTAGCGTTAAACAAGGAGTTGCCATCCCCCGAGCTTAAAAAATATTTTATTGGCGGTCAAAG 1260
N P G Q A H G L A F S V K Q G V A I P P S L K N I L L A V K

CATGCTATCCTCAGCAGATCTGGGAAATCATGGATGTTGGAGGCTGGAGTAAACGCGGAGTTTATTGCTAAATCTGTCTTAACTG 1350
A C Y P S A D L G N H G C L E A W S K R G V L L L N S V L T

TCAAGAGAGGAGACCCCTGGATCTACCATTCCGTAGGATGGCAGTTCTTCCGAAATATACTTCGGCGACTGTCATCGACAACGCGTG 1440
V K R G D P G S H S V G W Q F F I R N I L R R L S S T T R

GTATAGTATTTATGTTATGGGAGCGCAACGACAACCATGTATTTTCAGACTGATTATGACGACCGTCACTTGGTACTGAAATACAGCC 1530
G I V F M L W G A Q R Q T M Y F Q T D Y D D R H L V L K Y S

ATCCATCTCCCTTATCCAGAAAACCGTTTGCTACCTGTACACATTTCAAGAAGCCAACGATTTTCTCAGTAAGATAGGTAGAGGCTGTA 1620
H P S P L S R K P F A T C T H F K E A N D F L S K I G R G C

TCGACTGGAGCCTTACCGCGTAAGTACGGGATGTGTAATCATTACATGTACAAAAGCCGGGTCACAAACACCTATCGATATCAATCA 1710
I D W S L T A *
UL3 ► M Y K R P G H K H L S I S I

TAATGGATACCAACACCTTCCGTATTAACGTGTAGCAAGCTGGGGTTGGAATTGCGCATCATCCAGTCCGGCAACTCAATGCTTAG 1800
I M D T N T P S V L T V L A S W G W N C A S S S P A T Q C L

AGCGTTCACGACGGGATGCCGCGAGAAGGGCCCTCAGCACAAAGTTGCGATTATTGCGAACCGTGAATGTGAAAACGGCCACCTA 1890
E R S T Q G C L R E G P S A Q G C D Y C E P V N V E N G P P

CGACGTTTGTGAAAAATCAGGATCACGCGAAAAATCAAGAATATACCCATTTTGATACCTATTTATGGTTTCTCTATCGATGAATTGG 1980
T T F V K N Q D H A K N Q E Y T H F D T L F M V S S I D E L

GAAGACGTC AACTGACTGATACTATACGAAGAGACTTGAGACATTCACTTGCCAAGTTTACCATCGCTGTACGAAAACCTTCTTCAATCT 2070
G R R Q L T D T I R R D L R H S L A K F T I A C T K T S S F

CTTCATCATATGCTACAAGAAAGGGTCGTAAAAAAGGGCCCTAGAATCAGCCGAGTAAACAAGAGCTTGCAAATGTTTCAATATTATGTC 2160
S S S Y A T R K G R K K K G P R T Q P S N K S L Q M F I L C

GTAGGGCGCACGCTAAACATATTCGAGCACAAATACAAGCGGTAATCCAAGCTCGAAAACCTAGGAAATACTATACTCGGGCTATAGATG 2250
R R A H A K H I R A Q L Q A V I Q A R K P R K Y Y T R A I D

GCAGCACGCATCCAGTAGTACCCGTGTTGTATATGAGTTTGCTGCAATAGATACTGTCACTACATCGAGACAACGTGATAGTAGATT 2340
G S T H P V V P V F V Y E F A A I D T V S L H R D N V I V D

CTCTGGTTCGTGAGTGCCTCGCTTGCATATAATAATGTTGTAGTCTCCGCTCTTTGGCATCTGCCTCAGACTATATGCTTTTCTTGA 2430
S S G S *

PstI
ATACGACTAGGAAGCTGTTTACAAACTGCAG

Fig. 22: Nucleotide sequence of a 2,462 bp *BglIII-KpnI* fragment of MDV-1 and deduced amino acid sequences of the gL, UL2 homolog, and UL3 homolog genes. Potential N-linked glycosylation sites (N-X-S/T) in the deduced amino acid sequence of gL are underlined. A putative nuclear localization signal in UL3 homolog, which is conserved among alpha-herpesviruses, is boxed.


```

1 .....MAQLDLTGLTETSKMIVGECHVELKRCAEP 30
      :. | |. ... .. : .....
1 MKRACSRSPSPRRRPSSPRRTPPRDGTPPQKADADDPTPGASNDASTETR 50
      .
31 PLAADPEMPKRCRRPAGPPKGFISTRGDTSPSSDNNHIHSIQSLTNGD.. 78
| .:| | : :. ||: : : ..... ||. . .: : | | | :
51 PGSGGEPAACRSSGPAALLAALAEAGPAGVTFSSAPPDPPMD.LTNGGVS 99
      .
79 ....SCVQPWDIIANAYNIHENWKQLLPELCCLRGSEILAEYERRAITE 124
|.. .|..: ..: |.:|:|: | | |. ...:| | | | : | | |. | |
100 PAATSAPLDWTTFRRVFLIDDARPLMEPELANPLTAHLLAEYNRRCQTE 149
      .
125 EVYPPKMDIFAWTRYCAPESVKAVIVGQDPYANPGQAHGLAFSVKQGVAI 174
| | . | | : | : | . | | | | . | : . | : . | : | | | | | : | | | | | | | | : . . | :
150 EVLPPREDVFSWTRYCTPDEVVVIIIGQDPYHHPGQAHGLAFSVRANVPP 199
      .
175 PPSLKNILLAVKACYPADLGNHGCLEAWSKRGVLLLNSVLTVKRGDPGS 224
| | | | : | : | | | | . | | | . | : . | | | | | | . : | | | | | | | | | | : : |
200 PPSLRNVLAAVKNCYPEARMSGHGCKWARDGVLLLNTTLTVKRGAAAS 249
      .
225 HHSVGVQFFIRNILRRLSSTTRGIVFMLWGAQRQTMYFQTDYDDRHLVLK 274
| .:| | : | : .:| | | . . | : | | | | | . : | . . . . | | |
250 HSRIGWDRFVGGVIRRLAARRPGLVFMWLGTHAQNAIRPD..PRVHCVLK 297
      .
275 YSHPSPLSRKPFATCTHFKEANFLSKIGRGCIDWSLTA 313
: | | | | | | : | | : | | | | : | . . : . : | | | | :
298 FSHPSPLSKVPFGTCQHFLVANRYLETRSISPIDWSV.. 334

```

Percent Identity: 42.9 %

Percent Similarity: 59.4 %

Fig. 23-2: Alignment of the predicted amino acid sequence of MDV-1 UL2 (above) and HSV-1 UL2 (below, McGeoch *et al.*, 1988). Identical residues are indicated by vertical lines. Gaps are indicated by dot.

MDV gL	71	GIFIKVNCS	IP	EFILWYEQ	KAMA	AWINP
VZV ORF60	73	GIVVKTK	CP	VEVILWFK	DKQ	MAYWTNP
EHV1 62	106	GIMVKAH	CNP	PEAILW	VDTP	PKPVWVNP
HSV1 gL	79	GIFLRYH	CP	GLDTVL	WDRHA	QKAYWVNP

Fig. 24: Alignment of the amino acid sequences from a highly conserved region of the gL homologs of four different herpesviruses. The position of the first depicted amino acid is shown. Amino acids identical to those found in MDV are boxed. VZV ORF60, varicella-zoster virus open reading frame 60 (Davison and Scott, 1986); EHV-1 62, equine herpesvirus type 1 gene 62 (Telford *et al.*, 1992); HSV-1 gL, herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (UL1) (McGeoch *et al.*, 1988).

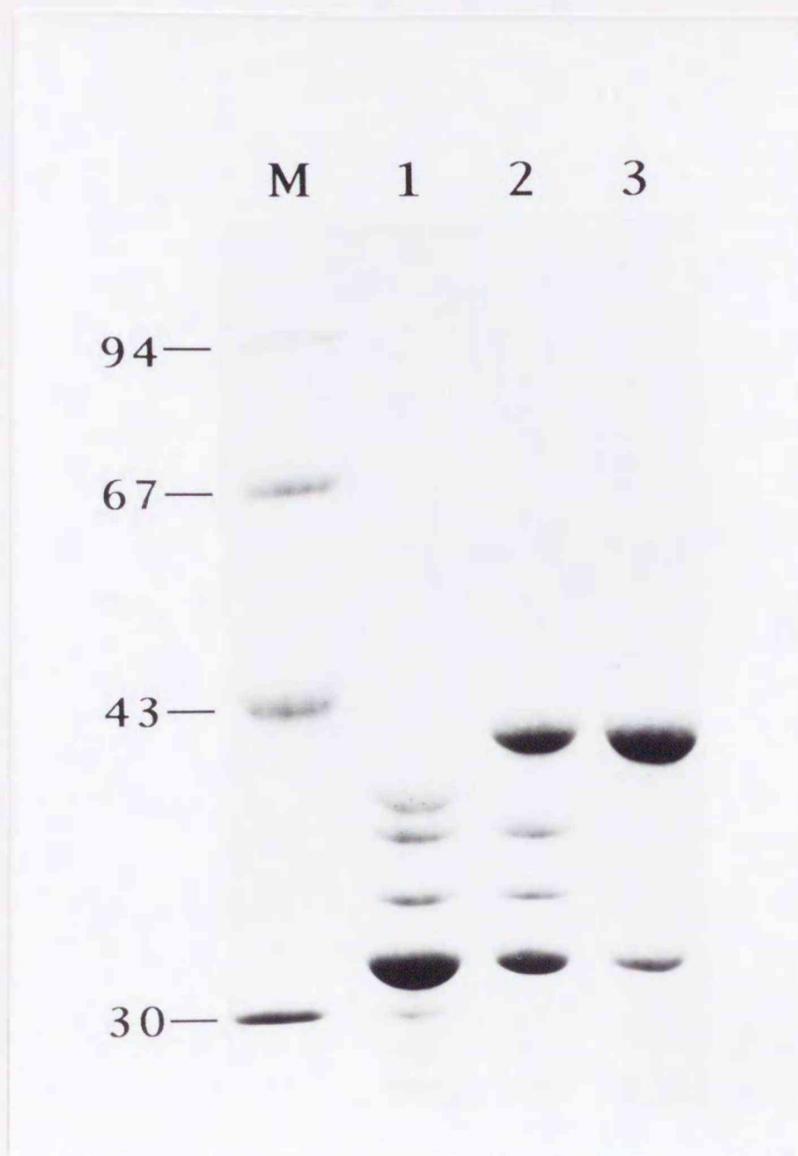


Fig. 25: Expression of a *trpE*-gL fusion protein. A portion of the MDV-1 gL ORF was cloned into the *E. coli* expression vector pATH10 to generate plasmid pATH10-UL1B. RR1 cells were transformed with pATH10 (lane 1) or pATH10-UL1B (lane 2). The *trpE*-gL fusion proteins were partially purified by incubating at 65°C in the presence of 1.0 % SDS (lane 3). Molecular weight standards (lane M) are indicated on the left.

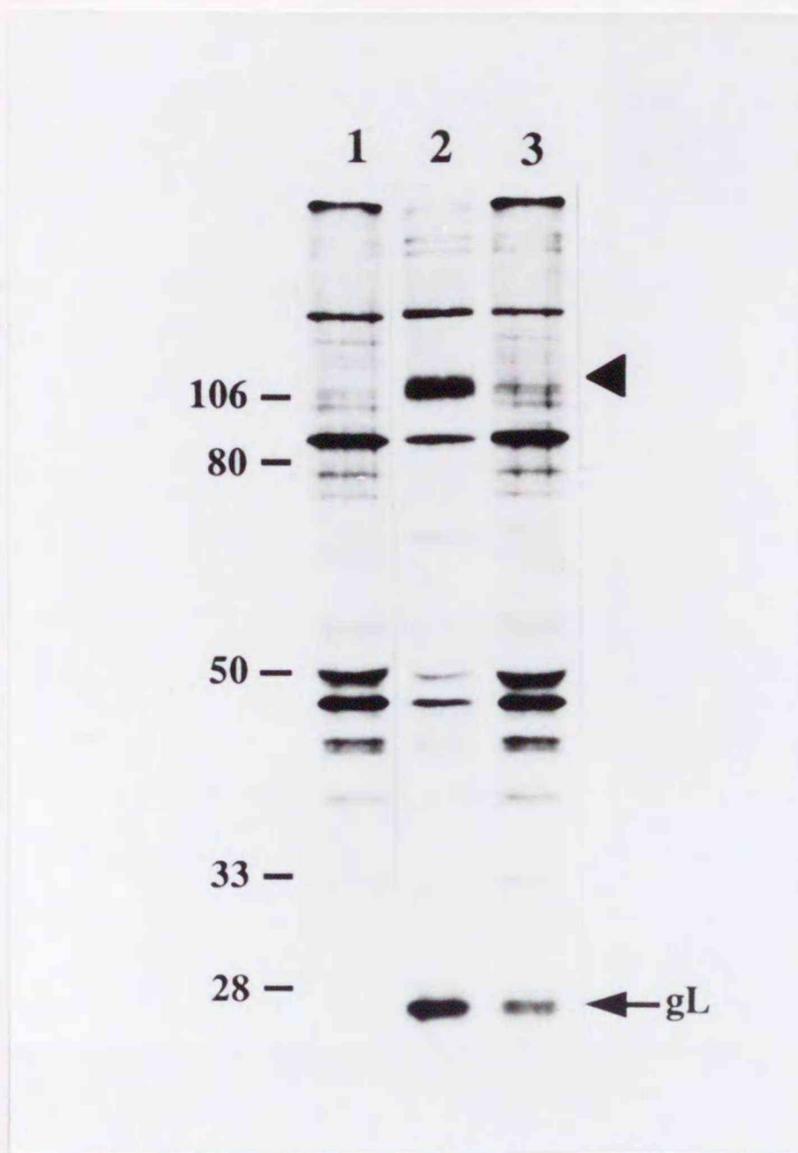


Fig. 26: Immunoprecipitation of gL from MDV-1-infected cells with a polyclonal anti-gL serum. DEF cells infected with MDV-1 were radiolabeled with [³⁵S]methionine at 48 hr postinfection for 6 hr. Cell lysates from uninfected DEF cells (lane 1) and DEF cells infected with MDV-1 (lane 2) were immunoprecipitated with a polyclonal anti-gL serum. Cell lysates from DEF cells infected with MDV-1 were boiled in the presence of the lysis buffer for 10 min before adding a polyclonal anti-gL serum (lane 3), and then immunoprecipitation was performed. The position of gL is indicated. The arrow head indicates the presence of a 115-kDa polypeptide associated with gL. The protein mass standards are shown on the left of the autoradiogram in kilodaltons.

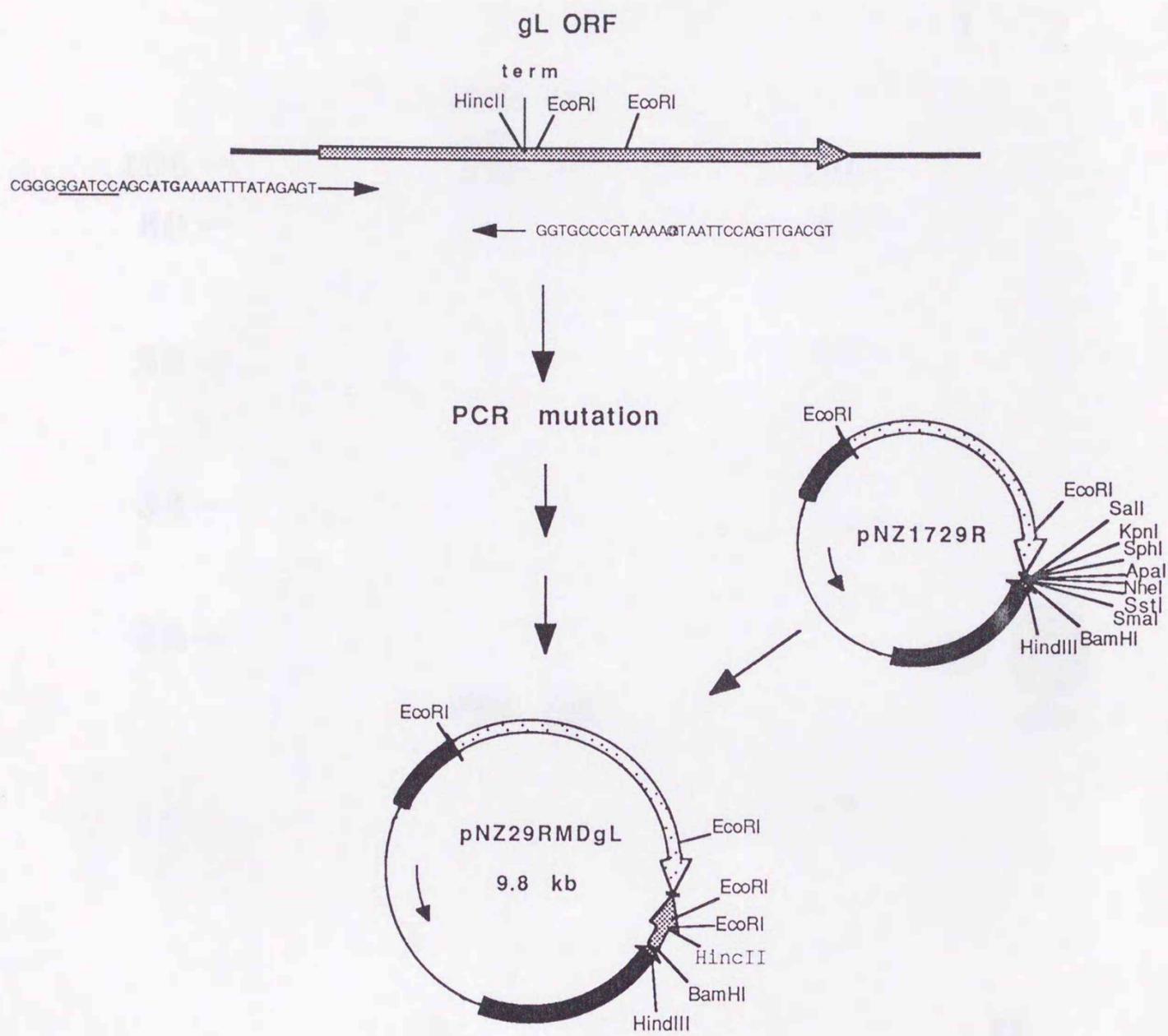


Fig. 27: Construction of transfer vector containing the gL gene. The gL gene was modified by PCR to create BamHI site in front of its ATG codon and change a potential poxvirus early transcription signal ,TTTTTAT, to TTTTCAT.



Fig. 28: Expression of MDV-1 gL in cells infected with a recombinant FPV carrying the gL gene. CEF cells were infected with recFPV-gL or parent FPV at an moi of 5 PFU per cell. At 24 hr postinfection, the cells were radiolabeled with [35 S]methionine for 6 hr. (A) Uninfected DEF cells (lane 1), CEF cells infected with parent FPV (lane 2), DEF cells infected with MDV-1 (lane 3), and CEF cells infected with recFPV-gL (lane 4) were immunoprecipitated with polyclonal anti-gL serum. To detect equal intensity of bands, various amounts of the samples were assayed. (B) To quantitate the expression levels, equivalent amounts of cell lysates from MDV-1-infected cells (lane 1) and recFPV-gL-infected cells (lane 2) were immunoprecipitated with polyclonal anti-gL serum. The protein mass standards are shown on the left of the autoradiogram in kilodaltons.

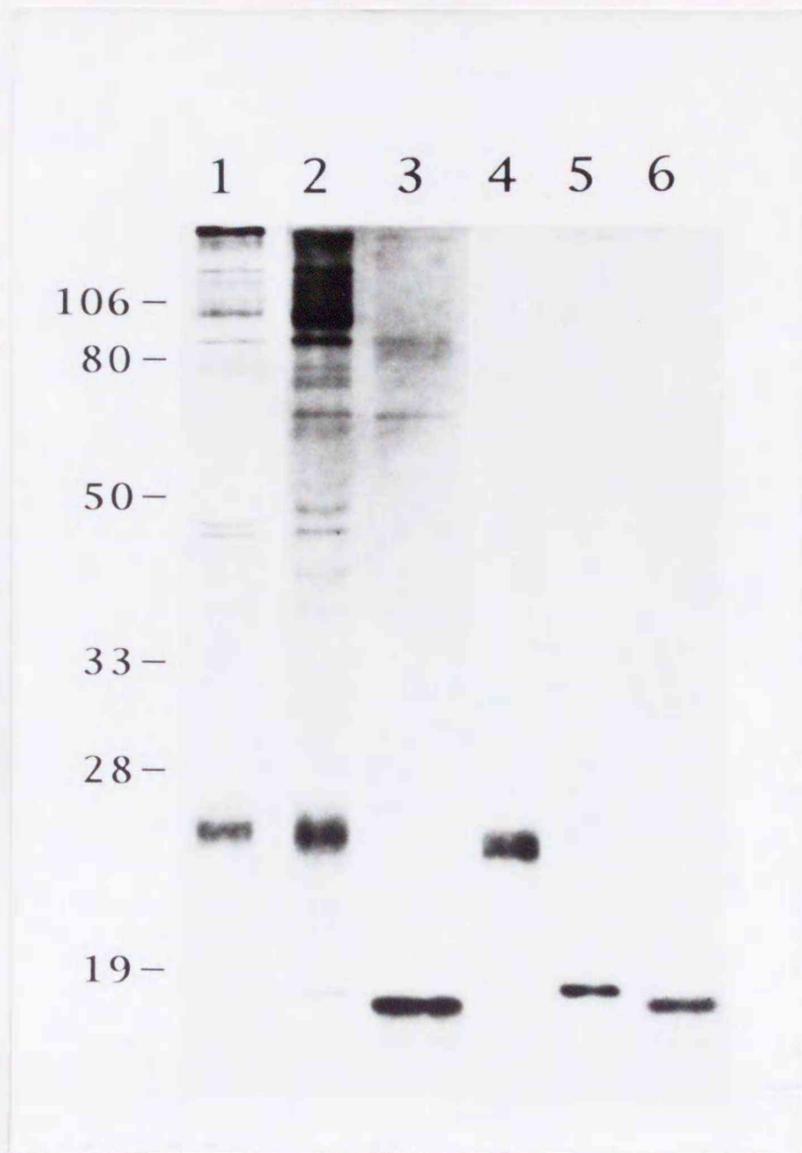


Fig. 29: Effects of endoglycosidases on native and recombinant gLs. Cells were radiolabeled with [³⁵S]methionine at 48 hr (MDV-1) or 24 hr (recFPV-gL) postinfection for 6 hr. DEF cells infected with MDV-1 (lanes 1, 2, and 3) and CEF cells infected with recFPV-gL (lanes 4, 5, and 6) were immunoprecipitated with polyclonal anti-gL serum. The immunoprecipitated proteins were mock digested (lanes 1 and 4), treated with Endo H (lanes 2 and 5), or treated with PNGase F (lanes 3 and 6). The protein mass standards are shown on the left of autoradiogram in kilodaltons.

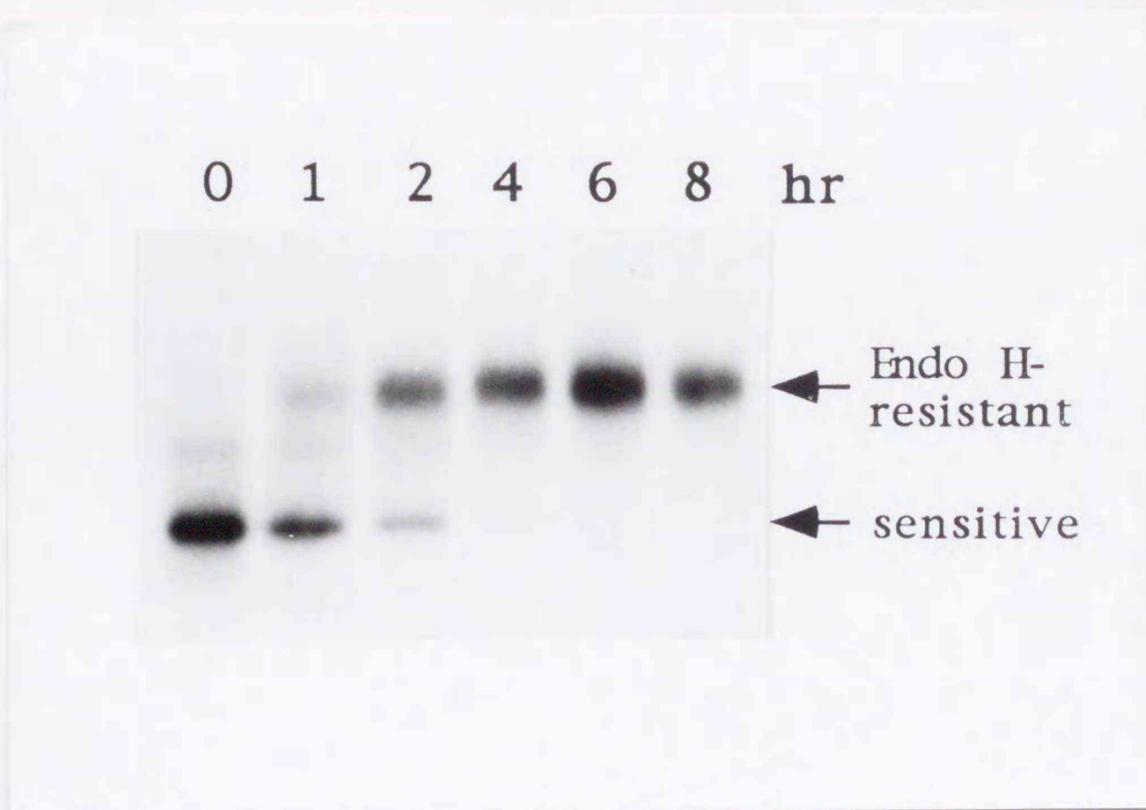


Fig. 30: Analysis of intracellular transport of native gL as determined by pulse-chase experiment. MDV-1-infected cells were pulse-labeled with [35 S] methionine at 48 hr postinfection for 20 min, and then chased for indicated times. Cell lysates were immunoprecipitated with polyclonal anti-gL serum, and then the immunoprecipitated proteins were subjected to treatment with Endo H. Endo H-resistant and sensitive forms of native gL are shown on the right of the autoradiogram.

第4部 総括

結論

本報はMDV-2, -3のglycoprotein B (gB) 遺伝子およびMDV-1のglycoprotein L (gL) 遺伝子を同定し、組換えFPV発現システムを利用して発現解析を行った。MDV-1, -2, -3間のgB遺伝子の相同性は、アミノ酸レベルで70%以上であり、さらにシステイン残基およびpotential N-linked glycosylation siteも非常によく保存されていた。しかし、タンパクレベルの解析では、gB-1とgB-3は糖鎖修飾が異なっており、またgB-1に対するモノクローナル抗体 1AN86はgB-3を認識するが、gB-2は認識しなかった。以上の結果より3つのgBはタンパクのコンフォメーションは非常に類似しているが、それぞれのgBには限定された領域に特異的なエピトープが存在していると予想された。gB-1/gB-2 キメラタンパクを用いた動物実験でこの特異的領域の1つは、gB-1のgp49-1領域に存在していることが明らかになった。

gBはヘルペスウイルスで最もよく保存されている糖タンパクでウイルスの宿主細胞への侵入、cell to cell fusionに重要な役割を果たしている。またHSV-1 gB, PRV gIIは2量体として感染細胞膜表面で発現している。一方、MDV gBではこのような生理活性、分子構造に関してほとんど解明されていない。本報ではgB-1前駆体の開裂部位を同定し、この部位に存在する3つのアルギニン残基が開裂に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに開裂しないmutant gB-1はwt gB-1と同様に効率よく感染膜表面に輸送され、*in vivo*における免疫原性も保持されていた。この結果は、gB-1の膜表面への輸送には前駆体の開裂は必須過程ではないことを示している。

HSV-1の糖タンパクの1つであるgLはウイルス増殖にとって必須タンパクで、別の糖タンパク glycoprotein H (gH) とcomplexを形成する。このgL-gH complexの形成は、正確なプロセッシングと細胞内輸送に不可欠である。本報では、MDV-1 gL遺伝子をクローニングし、組換えFPVで発現解析を行った。native gLは、小胞体からゴルジ体へと輸送される間にhigh mannose型からcomplex型への糖鎖修飾を受けるのに対し、

recombinant gLはhigh mannose型の糖鎖しか付加されていなかった。この結果より recombinant gLはnative gLとは異なったプロセッシングを受け、その大部分は小胞体にとどまっていると考えられた。MDV-1 gLの正常なプロセッシングおよび細胞内輸送にはMDV-1の他のタンパクが関与していることを示唆している。MDV感染細胞ではgLとcomplexを形成していると考えられる115-kDaポリペプチドが観察された。この分子量はMDV-1 gHの予想される分子量と一致しており、HSV-1と同様にgL-gH complexの存在が予想される。

今後の展望

ウイルス病に果たしてきたワクチンの役割は大きく、多くのウイルス感染症がワクチンにより予防されてきた。マレック病もその1つである。マレック病は、養鶏産業に著しい損害を与えており、その防疫のためには、ワクチンが不可欠である。MDVワクチンは当初、MDV-3 (HVT: herpesvirus of turkey)が用いられてきたが、強毒株の出現により、いわゆる‘ワクチンブレイク’が起こり新たにMDV-2, -3の混合ワクチンが開発された。しかし、最近さらに強毒な株が出現しワクチン効果の低下が懸念されている。著者はMDVの遺伝子レベルでの基礎研究を通じ、新規MDVワクチンの可能性について研究を行ってきた。現在までのヘルペスウイルスの研究は、その重要度からヒトに感染する単純ヘルペスウイルス(HSV), 水痘・帯状ウイルス(VZV), エプスタイン-バーウイルス(EBV), 唾液腺ウイルス(HCMV)等の研究が先行して行われてきた。これらの研究成果は、牛、馬、豚、鶏等の家畜に感染するヘルペスウイルスの研究指針に大きな影響とその方向性を与えた。MDVの研究も例外ではなく部分的に解析されたDNA塩基配列は、すでに全DNA塩基配列が決定されているHSV-1 DNAと比較され、その遺伝子産物の機能を推測することができた。一方、*in vitro*で得られた実験結果を*in vivo*動物実験で評価するには本来の宿主で調べなければならないが、この点では逆に家畜ヘルペスウイルスの臨床データがヒトヘルペスウイルスの研究に役立っている。MDVワクチンは実用化されている唯一のガン予防ワクチンであり、細胞性免疫が発ガン予防に重要な役割を果たしていると考えられている。この発ガン予防のメカニズムの解明も、MDVと同属のヒトのガンウイル

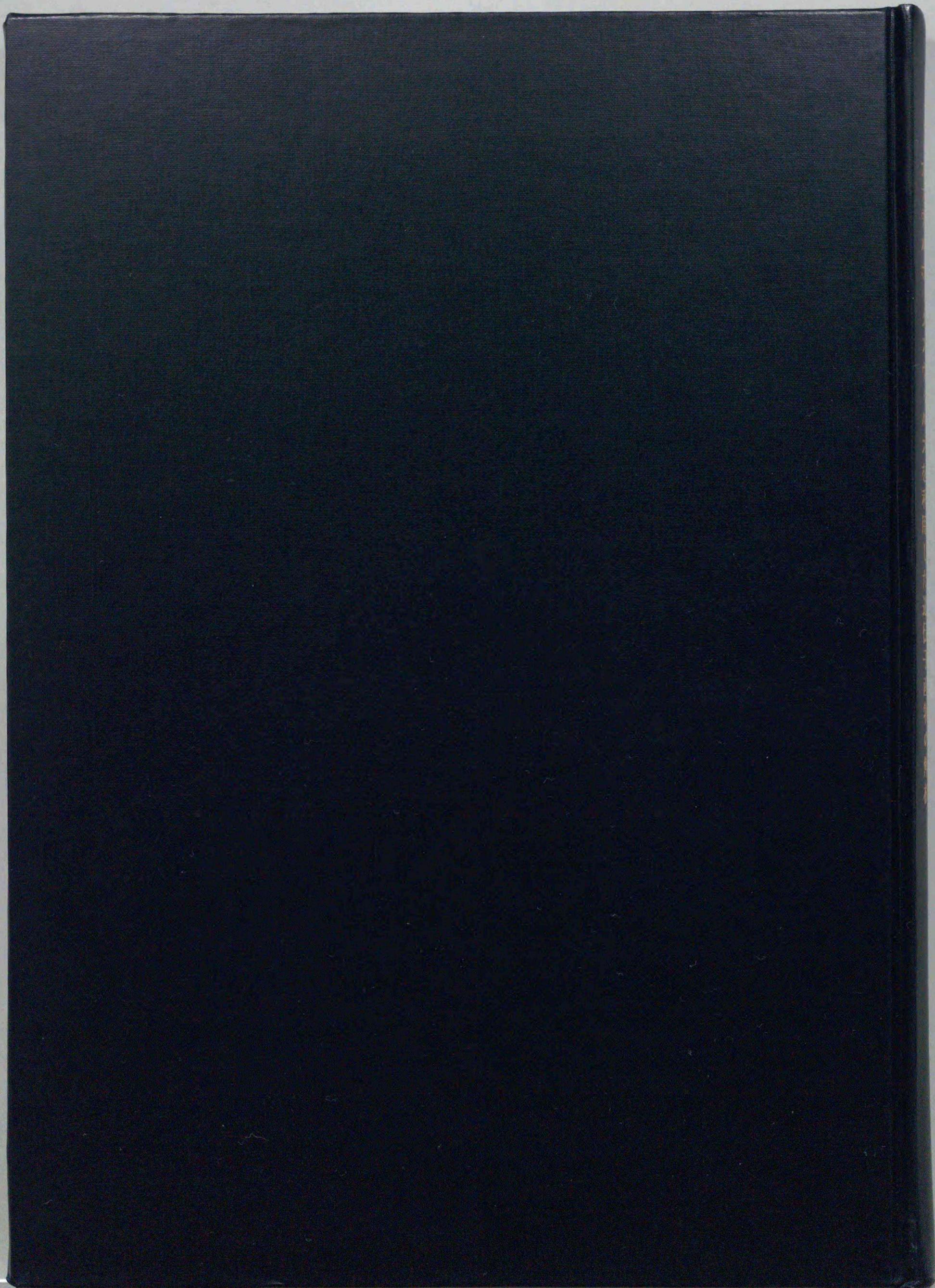
スであるEBVが引き起こすパーキットリンパ腫、上咽頭ガン、伝染性単核症の予防機構を知るための手がかりとなるであろう。

MDV遺伝子の発現解析には組換えFPV発現システムが利用された。この組換えFPV発現システムは、主にニワトリ用のウィルス性疾病の解析を目的として開発され、多くの利点を有している。i) 組換えFPVに挿入された外来遺伝子は、プロモーター強度を変化させることで、その発現量が細胞に及ぼす複雑な生理活性をモニターできる。ii) 複数の抗原遺伝子を同時に挿入できるので抗原-抗原相互作用を評価できる。iii) 鳥類にしか感染しないので安全性が高い。iv) 細胞質のみで増殖するので染色体へのインテグレーションが起こらない。v) 免疫に必要な抗原タンパクだけを発現するので病原性への復帰を恐れる必要はない。vi) 液性免疫ばかりでなく細胞性免疫もまた誘導することができる。このように*in vitro*, *in vivo*実験から有意義な知見を得ることが期待できる。本報で示した組換えrecFPV-gB1は、authenticなgB-1を発現し、この組換えFPVでワクチネーションしたニワトリは強毒MDV-1に対して感染防御に成功した。組換えFPVの感染防御実験は米国農務省 Avian disease and Oncology Laboratoryで行われ、すでにフィールドテストによりワクチンとしての有効性と安全性が確認されている。世界初の組換えウィルスワクチンの実用化が間近に迫っている。

近年、遺伝子工学の急速な進歩により、多くのウィルスゲノムのDNA塩基配列が決定され、機能解析が行われてきている。さらに、ウィルスを用いた発現系の開発も並行して行われている。一方、液性免疫・細胞性免疫を含む宿主側からの免疫応答、ウィルスビリオンに対する細胞表面のレセプター等については解明されていない多くの事柄が残されている。著者は、このような宿主側から見たウィルスとの関係について興味を持っており、今後の研究課題としたいと考えている。

謝 辞

本研究は、1991年10月より1993年10月までの2年間にわたり米国農務省 Avian Disease and Oncology Laboratory (ADOL)においてDr. Lucy F. Lee の御指導のもと行われたものであり、研究を行うにあたり多くの御助言、御示唆を承りましたADOL Dr. Lucy F. Lee、同研究所所長 Dr. Richard L. Witter、同研究所 Dr. Keyvan Nazerian ならびに同研究所の諸氏に深く感謝いたします。また共同研究者であり米国滞在中、公私にわたり、多大な御厚意を承りました日本ゼオン株式会社生化学研究所主席研究員柳田昇氏に深く感謝いたします。本研究論文の発表に際し、多大な御尽力をいただいた北海道大学理学部化学第二学科教授杉本和則先生に深く感謝いたします。最後に本研究の機会を与えていただきました日本ゼオン株式会社生化学研究所所長鴨川幸市氏に深く感謝いたします。

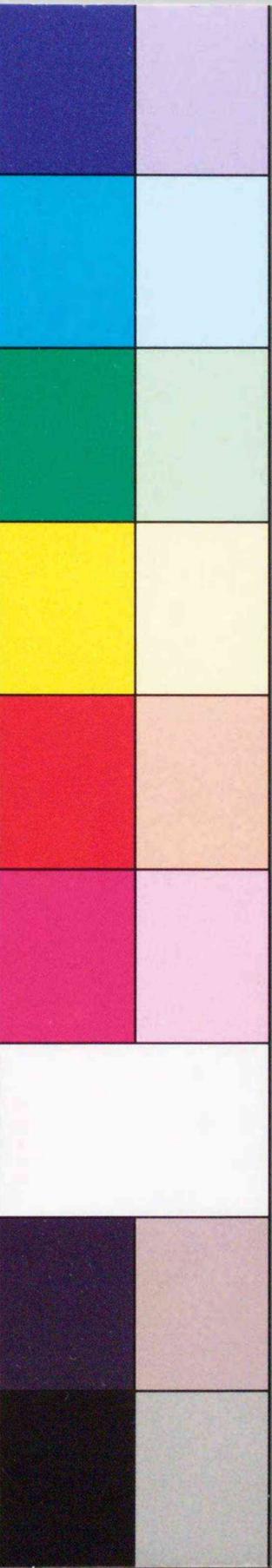


Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

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

