



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マレック病ウイルスICP4ホモログによるウイルス遺伝子発現の活性化
Author(s)	遠藤, 大二
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第5019号
Issue Date	1996-06-28
DOI	https://doi.org/10.11501/3113532
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51387
Type	doctoral thesis
File Information	000000298723.pdf



マレック病ウイルスICP 4 ホモログによる
ウイルス遺伝子発現の活性化

遠 藤 大 二

①

博士論文

マレック病ウイルス ICP4 ホモロークによる
ウイルス遺伝子発現の活性化

第1章 序論

第2章 材料と方法

第3章 結果

第4章 考察

第5章 結論

第6章 参考文献

第7章 謝辞

第8章 略称

第9章 索引

第10章 小論文

第11章 ハイブリダイゼーション法によるICP4 遺伝子の検出

第12章 小論文

第13章 材料と方法

第14章 結果

第15章 考察

第16章 結論

第17章 参考文献

第18章 謝辞

第19章 略称

第20章 索引

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座

遠藤大二

目 次

第1章	序論	1
第2章	潜伏感染細胞における前初期蛋白質MDV ICP4によるウイルス遺伝子の活性化	4
2-1	小緒言	4
2-2	材料と方法	5
2-3	結果	13
2-4	考察	22
2-5	小括	28
第3章	MDV血清型1 特異的磷酸化蛋白質pp38のプロモーター/エンハンサー領域の同定とMDV ICP4による発現促進	29
3-1	小緒言	29
3-2	材料と方法	30
3-3	結果	35
3-4	考察	38
3-5	小括	44
第4章	<i>In situ</i> ハイブリダイゼーション法によるMDV ICP4 mRNAの検出	45
4-1	小緒言	45
4-2	材料と方法	46
4-3	結果	51
4-4	考察	56
4-5	小括	60
第5章	総括	61
第6章	謝辞	64
第7章	参考文献	65
第8章	英文抄録	73

略 語 表

ADV	: オーエスキー病ウイルス
cDNA	: complimentary DNA
CEF	: 鶏胚線維芽細胞
cpm	: 1分あたり計数率(count per minute)
cRNA	: complimentary RNA
DIG	: digoxigenin
DNA	: デオキシリボ核酸
dNTP	: デオキシリボヌクレオシド三磷酸
dNTPs	: 4種のデオキシヌクレオシド三磷酸(dATP, dCTP, dGTP および TTP)
DTT	: ジチオスレイトール
EBV	: Epstein-Barr ウイルス
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
EHV 1	: 馬ヘルペスウイルス1型
FCS	: 牛胎児血清
FFE	: 羽包上皮
FHV	: 猫ヘルペスウイルス
HCMV	: ヒトサイトメガロウイルス
HMG	: ハイモビリティグループ
HSV	: ヒト単純ヘルペスウイルス
HVT	: 七面鳥ヘルペスウイルス
ISH	: <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション
IUdR	: iodo-deoxyuridine
MD	: マレック病
MDV	: マレック病ウイルス
MDV ICP4	: MDV の ICP4 のホモローク
MDV pol	: MDV の DNA ポリメラーゼ
MSB-1	: MDCC-MSB1
NTP	: ヌクレオシド三磷酸
NTPs	: 4種のヌクレオシド三磷酸(ATP, CTP, GTP および UTP)
ORF	: オープンリーディングフレーム
PCR	: 遺伝子増幅法
pp38	: MDV 1 特異的磷酸化蛋白質
PSL	: バイオ・イメージングアナライザー上の放射能指数
RNA	: リボ核酸

RT-PCR	: 逆転写遺伝子増幅法
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SSC	: sodium saline citrate
VIA	: Virus internal antigen
VZV	: 帯状胞疹ウイルス

第1章 序論

マレック病 (MD) は、自然発生の胸腺細胞性のリンパ腫である。1967年に ChurchillとBiggsは、マレック病腫瘍より細胞随伴性のヘルペスウイルス (MDV) を分離し、このウイルスがレトロウイルスの混入のない条件で腫瘍を引き起こすことを示し、MDの原因であることを明らかにした²¹⁾。分離されたウイルスは培養細胞で継代可能で、継代中に弱毒化した²²⁾、この弱毒ウイルスをワクチンとして利用できることが示された²³⁾。その後、七面鳥から、MDVと血清学的に関連する無毒のウイルス (HVT) が分離され¹⁰⁰⁾、HVTがワクチンとして広く利用されるようになった⁶⁷⁾。Von Bülow と Biggs⁹⁸⁾ は、MDVを血清学的に関連する2種の血清型として分類した。すなわち、血清型1には病原性株と弱毒株ならびに非病原性株が、血清型2には自然例から分離された非病原性株が含まれる。加えて、彼らはHVTはMDVに含まれるものとし、血清型3のMDVとした。MDVのゲノムDNAの構造と塩基配列はヒト単純ヘルペスウイルス (HSV)、帯状疱疹ウイルス (VZV) が属するアルファヘルペスウイルス群に近く^{9, 88)}、ウイルスの増殖過程は Epstein-Barrウイルス (EBV) が属するガンマヘルペスウイルス群に近い^{64, 92)}。そのため、現在では未分類のヘルペスウイルスとされている。

一般に、ヘルペスウイルスは、感染した宿主体内において感染のステージと宿主細胞に依存して、子孫ウイルスを産生するような感染 (productive infection) である崩壊感染と、ウイルス活性化を伴わない潜伏感染双方の感染様式をとることが知られている⁷⁶⁾。MDVは感染初期 (3-6日) においてBリンパ球に感染しこれを破壊する^{14, 69)}。Bリンパ球の崩壊感染によるネクロシスは、感染鶏の免疫を抑制⁷⁰⁾する一方、Tリンパ球を免疫学的に活性化する^{14, 41, 42)}。この免疫学的な活性化は、Tリンパ球のMDV感染に対する受容性を高め、結果として潜伏感染の成立を促進することが示唆されている¹⁰⁾。一週間の潜伏期に続いて、感染後2週目から二次的な崩壊感染が羽包上皮 (FFE)、腎尿細管上皮等の上皮と一部のリンパ系の器官で開始される⁸³⁾。特にFFEにおいては、崩壊感染が顕著に進み、感染性のウイルス粒子が産生される。一方、マレック病による腫瘍

形成は感染後3-4週目に認められる¹¹⁾。腫瘍細胞はMDVが潜伏感染したTリンパ球であるが⁸⁷⁾、腫瘍化の時期は明らかにされていない。試験管内における腫瘍化が成功していないことから、感染鶏内におけるMDV感染細胞の詳細な観察が求められている。

MDVによる腫瘍形成過程の解析のためには、MDV感染細胞を細胞を高感度に出する方法の開発とともに、細胞内で発現するウイルス蛋白質の検索が必要となる。感染細胞は、従来抗体が用いられてきたが、この方法では、崩壊感染が成立し十分な抗原が蓄積しなければ検出は不可能である⁶⁹⁾。また、潜伏感染細胞には抗原の蓄積が起きないため、抗体による検出は難しい¹⁰⁾。一方、ウイルスゲノムを組織切片上で検出する方法として、*in situ*ハイブリダイゼーション法 (ISH法) が報告されている⁷⁸⁾。しかしながら、ウイルスゲノムのコピー数が少ない潜伏感染細胞では、パラフィン切片にISH法を応用してもウイルスゲノムの検出が難しい^{28, 29)}。それに対し、ウイルス転写産物を検出する場合には、発現頻度の高いmRNAを選択することによりウイルスゲノムの検出に比べ、顕著な感度の向上が期待される¹⁰⁴⁾。また、細胞にウイルスが感染した当初から発現し、ウイルス遺伝子活性化の最初のステップとなる転写産物を検出することにより、ウイルス抗原が細胞内に蓄積するのを待たずに、MDV感染細胞が検出できる。このような観察により、従来検出できなかった感染初期の細胞の検出が期待される。また、同時に腫瘍形成以前におけるMDV感染細胞の局在も解析できる。現在のところ、MDVについて、ウイルス遺伝子の転写活性化を引き起こすことが確認された遺伝子は報告されていない⁹⁾。有力な候補として、HSV感染において感染直後に発現し、ウイルス遺伝子群の発現を誘導することが示されているICP4のMDVにおけるホモログ (MDV ICP4遺伝子) があげられる²⁾。

MDVは試験管内で培養された鶏胚線維芽細胞 (CEF) に容易に感染し、感染細胞を非感染細胞と共培養することにより感染の継続 (継代) が可能である^{6, 86)}。CEFにおける感染実験で蛋白質合成阻害剤や、ウイルス複製の阻害剤を共存させることにより、ウイルス特異的な蛋白質群を感染後最初に発現される前初期蛋

白質、前初期蛋白質の発現後ウイルスゲノムの複製前に合成される初期蛋白質およびウイルスゲノム複製後に発現する後期蛋白質に分類することが可能である⁸⁵⁾。HSVおよびヒトサイトメガロウイルス (HCMV) ではこれらの蛋白質について機能解析が進んでおり、前初期蛋白質は主としてウイルス遺伝子群の調節因子、初期蛋白質は主としてウイルスゲノムの複製因子、そして、後期遺伝子群は主としてウイルス粒子を構築する構造蛋白質であることが報告されている^{90, 91)}。HSVについてはウイルスが細胞内に侵入後、前初期および初期蛋白質が崩壊感染を決定づけると考えられる⁹¹⁾。なかでも、HSVの前初期蛋白質の一つであるICP4は、多くの初期および後期遺伝子の発現開始を誘導し、また、ウイルス増殖に必須であることから重要な蛋白質とされている^{55, 60, 75)}。また、この蛋白質の遺伝子については、VZV、オーエスキー病ウイルス (ADV)、猫ヘルペスウイルス (FHV) および馬ヘルペスウイルス1型 (EHV 1) でそのホモログ (VZVのORF62、ADVのIE180、FHVのIEおよびEHV 1のIE1) の存在が報告されている^{20, 38, 40, 44, 51)}。MDVでもICP4のホモログが報告され、ウイルスの活性化への寄与が示唆されている²⁾。その遺伝子の塩基配列より、MDV ICP4は、アルファヘルペスウイルス群のICP4ホモログと類似する構造を取ることが予想されている。また、本遺伝子は、潜伏感染細胞においてはほとんど発現せず、崩壊感染細胞において強く発現することが観察されている^{18, 57)}。これらの知見から、MDV ICP4はMDVが細胞に感染した当初より発現し、ウイルスの活性化を促す事が示唆される。さらに、ウイルス遺伝子の転写を活性化することが示された場合には、MDV ICP4遺伝子は感染後それらの遺伝子に先んじて転写されることから、MDV ICP4をプローブとすることにより、他の遺伝子をプローブとするよりも高感度にMDV感染細胞を検出できる可能性がある。本研究は、MDV ICP4によるウイルス遺伝子活性化作用を試験管内で明らかにするとともに、ISH法により感染鶏内でのその発現を観察し、鶏体内でMDV感染細胞を高感度で検出する方法の確立を目的とする。

第2章および第3章において、MDV ICP4のウイルス遺伝子の転写活性化作用をMDV潜伏感染細胞を用いて検討した成績を述べる。さらに、第4章においては感染鶏内におけるMDV ICP4遺伝子発現をISH法により検出した成績を述べる。

第2章 潜伏感染細胞における前初期蛋白質MDV ICP4によるウイルス遺伝子の活性化

2-1 小緒言

MDVについては試験管内腫瘍化が成功していないため、腫瘍化とその状態の維持機構に関しては、病鶏材料または腫瘍から樹立された細胞株を用いて研究が行われてきた^{16, 84)}。これらの細胞内には、複数コピーのウイルスゲノムが検出されるが、MDV感染鶏血清と反応するウイルス抗原は検出されない。これらの性質からMD腫瘍株化細胞には、MDVが潜伏感染していると考えられている¹³⁾。

Schatら⁸⁵⁾およびSugayaら⁹²⁾は、MD腫瘍株化細胞において、10種程度の遺伝子が転写されており、それらは主として反復配列中に限局していることを報告した。一方、MD腫瘍株化細胞中のMDVは、CEFとの共培養により活性化し、CEFに崩壊感染する。また、MD腫瘍株化細胞をiodo-deoxyuridine (IUdR) 処理することにより、MDV1特異的磷酸化蛋白質(pp38)⁴⁵⁾および7-8種の転写産物が誘導される⁴⁵⁾。MD腫瘍細胞中のウイルスがIUdR処理やCEFとの共培養で活性化することは、この細胞がウイルス遺伝子に対する活性化因子を研究するために利用しうることを示している。特に、MDCC-MSB1 (MSB-1) については、ウイルス活性化機序に関する実験に数多く使われており^{12, 19, 43, 62, 93, 94, 96)}、MDV ICP4によるウイルス活性化を研究するための細胞として条件が整っている。

Prattら⁷³⁾は、MDV ICP4遺伝子を導入されたMSB-1細胞でpp38の発現が増強されたことを報告した。ただし、彼らは導入されたプラスミドからのMDV ICP4の発現は観察していない。また、彼らの観察がプラスミド導入後20日以上経過した後であったことから、MDV ICP4発現の直接の影響は明らかでない。直接の影響を観察するためには効率の良いプラスミドの細胞内導入と発現が必要となる。しかしながら、従来のトランスフェクション法では遺伝子の発現までに20時間以上を要し、MDV ICP4発現の直接の作用を観察するのは難しい。一方、細胞質内に導入されたプラスミドの核内輸送のキャリアとして非ヒストン蛋白質の一種であるハイモビリティグループ (HMG) 蛋白質の結合したDNAは、短時間のう

ちに核内へ移行し、発現するとの報告がある^{49, 50, 97)}。このキャリアは、トランスフェクションから発現までの時間を短縮し、結果として多数の細胞での同時発現を可能とする事が予想される。

本章では、HMG蛋白質を利用したトランスフェクション法を使用し、また、検出感度を高めるために逆転写酵素と遺伝子増幅法を組み合わせた検出法 (RT-PCR法) を用い、MDV ICP4発現の影響を検出した。トランスフェクションにより導入されたMDV ICP4遺伝子の発現は、潜伏感染中のMDVゲノム上のMDV ICP4遺伝子の発現を増加させたが、pp38およびMDVのDNAポリメラーゼ (MDV pol) についての有意な影響は観察されなかった。また、崩壊感染に伴うウイルスゲノムの自律的複製は観察されなかった。この結果から、MDV ICP4遺伝子の発現はウイルス活性化の初期段階を開始させるが初期遺伝子群の全面的な活性化には至らないことが示唆された。

2-2 材料と方法

(1) ウイルスと細胞

CEFは、発生開始10日目の鶏胚より調整した。すなわち、鶏胚を1%トリプシンを含む磷酸緩衝液中で消化、金属メッシュろ過、遠心 (1,200 rpm、5分) 後、抗生物質 (100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン)、抗真菌剤 (2.5 μ g/ml ファンギソン) と10% 牛胎児血清 (FCS、GIBCO BRL Life Technology Inc.、Gaithersburg、米国) を含むダイゴT培地 (日本製薬、東京) に懸濁することにより繊維芽細胞を調整した。続けて、繊維芽細胞を9 cmシャーレに1枚当たり 1×10^7 となるように分注し、一夜CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内にて培養した。翌日、定着した細胞をトリプシン消化後、1枚当たり 3×10^6 となるように新たな9 cmシャーレに分注し直した。分注時の培地には10% FCSを、維持培地には5% FCSを添加した。MD腫瘍株化細胞としては、悪性のMDV-BC1株によって生じたリンパ腫に由来するMSB-1を本研究科実験動物学研究室より分与い

ただいた。細胞培養用の培地としては、10% FCSを含むダイゴT培地を使用し、CO₂インキュベーター内にて培養した。

ウイルスは、強毒株のMd5とワクチン株であるCVI-988株¹⁰²⁾ (共立商事(株))を用いた。Md5株は、神経病変を起こした鶏のリンパ球を線維芽細胞(CEF)と共培養し、CEFで2代継代したものを、本研究科感染症学研究室より分与いただいた。CEFによるウイルスの継代は、感染細胞を非感染のCEFと共培養し、変性細胞が80%程度となった時点で細胞をトリプシン処理後懸濁し、非感染CEFと共培養することによりおこなった。

(2) ICP4ホモログの真核細胞発現用MDV ICP4プラスミドの構築

Andersonら²⁾によって、MDVのICP4ホモログが*Bam*HI領域上にコードされていることが示されたが、筆者はMSB-1においてこのICP4ホモログを発現させることを目的としてICP4ホモログのオープンリーディングフレーム(ORF)のフラグメントを作製し、真核細胞発現ベクター(pSV β ^{3,34)})に導入した。そのため、*Bam*HI MDVゲノムライブラリーのA断片³⁶⁾を鋳型として、pI1およびpI2プライマー(表2-1)を用いたPCR法により、ORF全長を含むDNA断片を作出した(図2-1)。プライマーはAndersonら²⁾およびMcKieら⁵⁹⁾が報告した塩基配列に基づいて設計された。PCR溶液は、各50 pmolのプライマー、2.5 Uのpfuポリメラーゼ(Promega Biotec、Madison、米国)、10 μ lの添付緩衝液(10x 緩衝液: 200 mM トリス、pH8.75、100 mM KCl、100 mM (NH₄) SO₄、1% Triton X-100、1 mg/ml 牛血清アルブミン)、50 ngの鋳型DNA(*Bam*HI MDVゲノムライブラリーのA断片)、2.5 U パーフェクトマッチ DNAポリメラーゼ エンハンサー(Stratagene、LaJolla、米国)を3.5 mM MgCl₂、0.2 mMの4種のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTPs)溶液に加え、蒸留水で全量100 μ lに合わせるにより作成した。PCRは、蒸発防止用のミネラルオイルを重層し、93℃で2分、58.1℃で2分、72℃で10分のインキュベーションを30サイクル繰り返すことにより実施した。反応終了後、1% アガロースゲル中での電気泳動により目的のDNA断片を精製した。つい

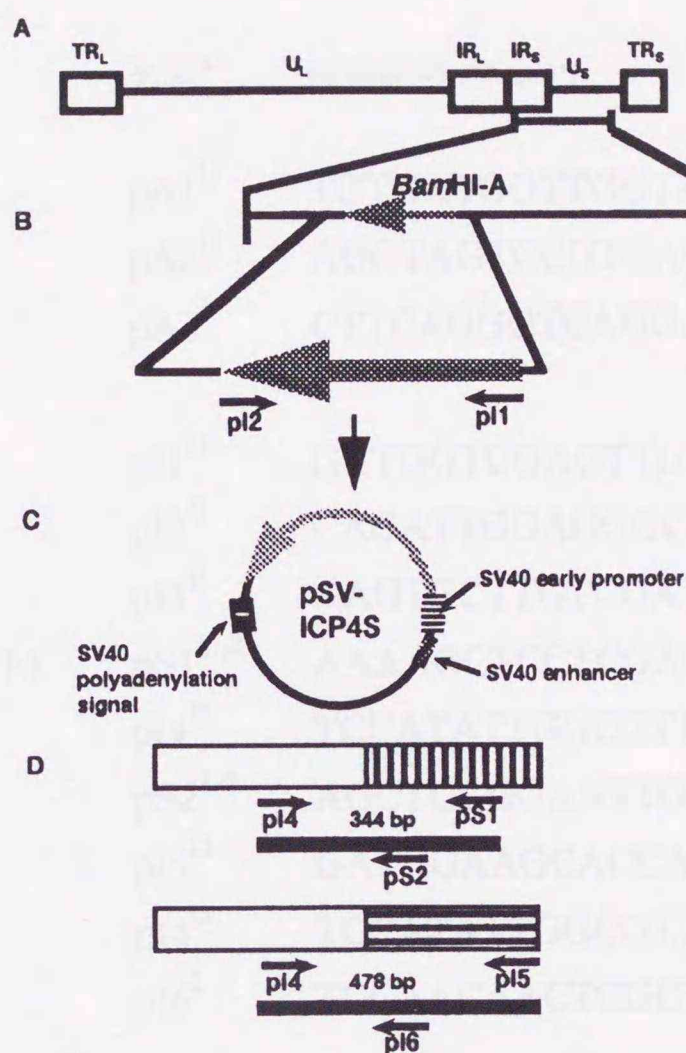


図2-1 MDV ICP4遺伝子、発現用プラスミドおよびPCRプライマーの構成。

- A : MDVゲノムの構造。DNAはLとSの部分からなり、両部分とも中央にそれぞれ U_L と U_S が倒置配列構造、 TR_L と IR_L および IR_S と TR_S によって挟まれた構造を取る。
- B : *Bam*HI-A MDVゲノムフラグメント上のMDV ICP4のORF。矢印で翻訳の方向を示す。ORFは発現用ベクターへ挿入するため、プライマーpI1とpI2により増幅された。
- C : MDV ICP4発現用プラスミドpSV-ICP4Sの構造。MDV ICP4はSV40の早期エンハンサーおよびプロモーターの調節下で発現する。MDV ICP4の転写物(リコンビナントMDV ICP4)はSV40のポリ(A)付加シグナルによりポリ(A)が付加される。
- D : リコンビナントMDV ICP4と内在性MDV ICP4を区別して増幅・検出するためのオリゴマー構成。白抜きの箱は、2種の転写物が持つ共通の塩基配列を示す。リコンビナントMDV ICP4転写物の5'末端には、SV40をもとに構築されたプラスミドpSVの配列が付加する。2種の転写物を増幅する上流のプライマーと検出用のプローブはそれぞれの転写物に特異的になるよう設計された。

表2-1 プライマーおよびプローブ

遺伝子/転写物	名称 ^a	塩基配列 (5' to 3')	増幅産物(bp)
鶏 βアクチン ^b	pA1 ^U	TGTGATGGTTGGTATGGGCC	443
	pA2 ^D	AGGTAGTCCGTCAGGTCACG	
	pA3 ^I	CTTCAGGGTCAGGATACCTC	
MDV ICP4 ^c (ORF) (RT) (リコンビナント) (内在性)	pI1 ^U	GATGGTCGAGTTGGGGTTCC	4320
	pI2 ^D	CAGATTGGAGGGCGAATTGA	
	pI3 ^R	AAGTGCTTGTCGATGCCCAC	
	pS1 ^{U,d}	AAAAGCTCCTCGAGGAACTG	344
	pI4 ^D	TCCATATTGGCGTTGCAACGG	
	pS2 ^{I,d}	AGCTGCGGAATTGTACCCGC	
	pI5 ^U	GATGGAAGCACCAATCCCTG	478
	pI4 ^D	TCCATATTGGCGTTGCAACGG	
	pI6 ^I	TCCAACAACCTCGCTATCGCG	
pp38 ^e	pP1 ^U	AAGGCGATAGAATGCCAGG	378
	pP2 ^D	TTGCATTCTCTGACTCCACG	
	pP3 ^I	CAGTGCGAAGGAGGAACATATGC	
MDV DNAポリメラーゼ ^f	pPol1 ^U	CCTTACCTGCGAGGAAGATC	619
	pPol2 ^D	GCAAAGCATCTCTAGTACCC	
	pPol3 ^I	GAATATGCGGTTTCACAAAG	
meqプロモーター ^g	Mp1 ^U	AATTCGGTGATATAAAGACG	248
	Mp2 ^D	TCCCCGAACCAAAATAATAA	

^a 肩字は以下の通り: U, 上流プライマー; D, 下流プライマー; I, 内部プローブ; R, RT専用プライマー。

^b 塩基配列は Kost ら⁵³⁾の報告に従った。

^c 塩基配列は Anderson ら²⁾の報告に従った。

^d 塩基配列は MacGregor と Caskey⁵⁸⁾の報告に従った。

^e 塩基配列は Endoh ら³¹⁾の報告に従った。

^f 塩基配列は Sui ら⁹⁵⁾の報告に従った。

^g 塩基配列は Jones ら⁴⁸⁾の報告に従った。

表 2-2 PCRの条件

PCR 産物	[Mg ²⁺] (mM)	アニーリング温度 (°C) ^a	サイクル数 ^b
鶏 βアクチン	1.5	54	25
リコンビナント MDV ICP4	3.0	60	30
内在性 MDV ICP4	3.0	55	27
meq プロモーター	1.5	55	28
pp38	1.5	56	27
MDV DNAポリメラーゼ	1.5	52	28

^a 全遺伝子について、変性は 94°C, 2 min、ポリメラーゼ反応は 72°C, 1 min で実施した。アニーリングは表に示す温度で 2 min 実施した。

^b サイクル数は相対的な転写量に依存して決定した。

で、DNA断片に*Not*Iリンカー (5'-AGCGGCCGCT-3')を接続し、pSV β の*Not*I切断部位に挿入した。そのDNAを宿主大腸菌 (DH5 α) にトランスフォームし、アンピシリンを含むLB寒天培地 (1.0% Bacto-tripton (Difco、Detroit、米国)、0.5% Bacto-yeast extract (Difco)、1.0% NaCl、1.5% Bacto-agar (Difco)、pH7.0) でコロニーを形成させた。ついで、MDV ICP4のORFを含む大腸菌をコロニーハイブリダイゼーションにより選択した。コロニーハイブリダイゼーションは常法に従い⁸²⁾、Whatmann541フィルター上で、標識されたpI3-pI4増幅産物をプローブとして実施した。陽性クローンのうち、MDV ICP4の翻訳方向とpSV β のDNA挿入位置における翻訳方向が一致するクローンをpSV-ICP4Sと命名した。

(3) トランスフェクション

本研究で著者は、pSV-ICP4Sを細胞内に導入するためのトランスフェクションに、HMG蛋白質およびリポソームを用いた。すなわち、トランスフェクションに先立ち、20 μ gのプラスミドDNAを6.5 μ gのHMG蛋白質 (和光純薬、大阪) と混合し、1時間室温においてDNA-蛋白質複合体を形成させた。このDNA-蛋白質複合体を1mlの生理食塩リン酸緩衝液 (PBS) で希釈した後、陽イオンリポソーム (ジーントランスファー、和光純薬、大阪) の乾燥フィルムと強く混合した。続けて、その混合液50 μ lを、2ml培地中に 1×10^5 個の細胞を含む3cmシャーレに入れた。24時間以内に細胞を実験に用いる場合にはそのまま用い、それ以後については24時間目に培養液を10% FCS加T培地に置換した。

トランスフェクションによって細胞内に導入されたDNAの発現-時間関係を調べるため、ルシフェラーゼ遺伝子をSV40のプロモーターの下流に持つpGV-Cベクター (東洋インキ、東京) をトランスフェクトした。対照群には、ルシフェラーゼの代わりにベータガラクトシダーゼを持つpSV β ベクターを用いた。プラスミドの細胞内導入と発現の効率を示す細胞溶解液中のルシフェラーゼの発現量は、PicaGeneルシフェラーゼアッセイキット (東洋インキ、東京) を用いて定量した。すなわち、プラスミドを導入された細胞を細胞溶解液 (25 mM トリス燐

酸、pH 7.8、2 mM ジチオスレイトール (DTT)、2 mM 1,2-ジアミノシクロヘキサミン-N,N,N,N-四酢酸、10% グリセロールおよび1% TritonX-100) 中で15分間溶解後、ルシフェリン-ATP-アセチル補酵素A混合液 (20 mM トリシン、1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2$ 、2.67 mM MgSO_4 、0.1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、33.3 mM DTT、270 μM アセチル補酵素A、470 μM ルシフェリンおよび530 μM アデノシン三リン酸) と混合した。混合10秒後から1分間に化学発光をLSC-700液体シンチレーションカウンター (アロカ、東京) により測定した。

(4) RNAおよびDNAの抽出

トランスフェクションを施したMSB-1中におけるMDV遺伝子の発現量の変化を、RT-PCR法により検出するため、RNAは以下の手順で抽出された。すなわち、トランスフェクションを施したMSB-1を遠心 (1,200 rpm、5分、室温) により洗浄後、細胞を集め、ここに1 mlのRNA分離試薬 (TRIzol、GIBCO BRL Life Technology Inc.) を加え、緩やかにピペッティングを繰り返すことによって細胞を溶解させた。この溶解液をクロロホルム抽出後エタノール沈殿することによりRNAを沈殿として得た。つづけて、このRNAからBioMag Oligo (dT) ビーズ上でpoly (A)⁺RNAを精製した。すなわち、沈殿を90 μl の純水に溶解し、5 M NaCl を10 μl 加えた後、BioMag Oligo (dT) ビーズへpoly (A)⁺RNAを結合し、続けて0.17 M NaCl 溶液により洗浄した。洗浄されたpoly (A)⁺RNAは、BioMag Oligo (dT) ビーズを純水中に懸濁後60℃で5分間インキュベートすることにより、溶出した。

MDV感染細胞よりRNAを抽出する場合は、 1×10^5 個のCVI-988株感染CEFと共培養した結果80%の細胞に変性像が認められる 3×10^6 個のCEFよりRNAを抽出した。

MDVウイルスゲノムを含むMSB-1細胞のDNAは、Genosis社のDNA Isolator溶液を用いて抽出した (Genosis Biotechnologies、The Woodlands、米国)。すなわち、沈殿した細胞を1 mlのDNA Isolator溶液に懸濁後クロロホルムにて抽出した。抽出後の水層に溶出されたDNAはエタノールによって沈殿された。続いて、高分子量DNAを定量するために抽出されたDNAの一部をアガロースゲル内で短時

間泳動し、高分子量DNA画分をシリカマトリックスを用いて抽出した (Genomed GmbH, Oeynhausen, ドイツ)。このDNAを蒸留水に溶出した後、吸光度よりDNAの全量を算出した。

(5) RT-PCR法

逆転写反応は基本的にKramerとCoen⁵⁵⁾の方法に基づいて行った。すなわち、poly(A)⁺RNAを95℃、10分間加熱後、12 μ lの反応液中 (3 pmol pA2、pI3、pP2 および pPol2、250 mM KCl、10 mM Tris、pH8.3 および 1 mM EDTA) で65℃で5分間保持することにより、プライマーをアニーリングした。続けて、アニーリングが終わった溶液の半量を12 μ lのRT反応液 (1.5 mM dNTPs、7.5 mM DTT、15 mM MgCl₂、90 mM KCl、10 mM Tris、pH8.3) および10 Uの逆転写酵素 (SuperscriptII、GIBCO BRL Life Technology Inc.) と混合した。残りの半量は逆転写酵素を含まないことを除いてはRT反応液とまったく同じ組成のRT (-) 反応液と混合した。双方の反応液は、逆転写反応のため、42.5℃で1時間保温された。合成されたcDNAは、-80℃で保存された。

cDNAのPCRは20 μ lの容量で前述の方法に基づいて行われた。MDV ICP4については、プラスミド由来とウイルス由来の転写産物を区別して検出するため、上流側のPCR用プライマーは、それぞれプラスミド (pSV1) またはMDV特異性の配列 (pI4) を用いた (表2-1、図2-1)。

(6) 標準RNAの作成

各転写産物を定量するために、標準転写産物合成用プラスミドを作出した。すなわち、pA1-pA2、pSV1-pI3、pI4-pI3、pP1-pP2およびpPol1-pPol2を用いて各々 β アクチン、pSV-ICP4転写産物、MDV ICP4、pp38およびMDV polの遺伝子断片を増幅し、常法に従い⁸²⁾ プラスミドpGEM-T (Promega, LaJolla, 米国。 β アクチン、pSV-ICP4転写産物およびMDV polを挿入) またはpBluescript SK+

(MDV ICP4およびpp38を挿入)に挿入した。それぞれ、pG-CbA、pG-Siel、pBie2、pB-PP1およびpG-polと標記する。転写産物の定量のためには、1 μ gのプラスミドを切断後、T7 RNAポリメラーゼ反応液中(1.5 mM の4種のヌクレオシド三リン酸(NTPs)、7.5 mM DTT、15 mM $MgCl_2$ 、90 mM KCl、10 mM Tris、pH8.3および10 UのT7 RNAポリメラーゼを含む)でcRNAを合成した。合成されたcRNAは、フェノール:クロロホルム(1:1)抽出、エタノール沈澱後、100 μ lの純水に溶解された。このcRNA溶液のRNA濃度は、一部を希釈後吸光度によって決定した。cRNAは、0.0166、0.166、1.66 および 16.6 fM となるように希釈後(10 μ lあたり 10^2 、 10^3 、 10^4 および 10^5 分子)、10 μ gのtRNAと混合された。

(7) PCR産物の定量

PCR産物は、2% アガロースで泳動後、常法に従い⁸²⁾ ナイロン膜(BioDyne B、Pall Process Filtration Ltd、Portsmouth、英国)に転写された。ナイロン膜上におけるPCR産物は、ポリヌクレオチドキナーゼ(New England BioLabs、Inc.、Beverly、米国)により末端標識されたオリゴマーまたは³²P 標識されたcRNAにより検出された。ハイブリダイゼーションは、50 mM 燐酸カリウム、50 μ g/mlサケ精子DNA、2% Boeringer社製ブロック用試薬、7% SDS および 5x SSCの混合液中で65℃で24時間おこなった。ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を1x SSC により洗浄し、バイオ・イメージングアナライザーBAS1000(富士写真フィルム、東京)によりバンドの検出・定量を行った。バイオ・イメージングアナライザー上においてバンドの放射能強度はPSL単位で計測された。

2-3 結果

MDV ICP4の導入に先立ち、著者はルシフェラーゼ発現ベクターpGV-Cを用いてHMGおよびリポソームによるトランスフェクション後の遺伝子発現を調べたところ、pGV-C導入4時間後にルシフェラーゼ活性が認められた(図2-2)。細胞

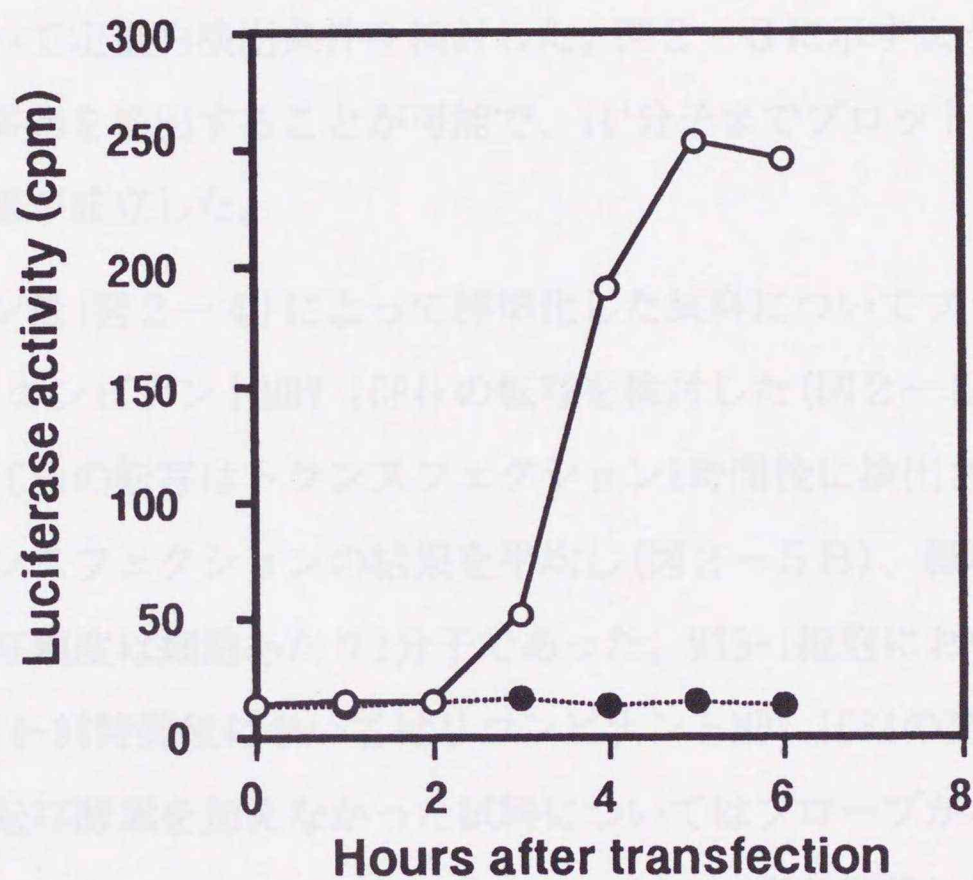


図2-2 トランスフェクトされたプラスミドの遺伝子発現。

白丸はHMG蛋白質とリポソームを用いてルシフェラーゼ発現ベクターpGV-CをトランスフェクトされたMSB-1細胞のルシフェラーゼ活性を示す。黒丸で示される対照群には、pSVbをトランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性は、MSB-1細胞溶解液をアセチル補酵素A, ルシフェリンおよびアデノシン三リン酸を含む溶液と混合した溶液の、混合後1分間あたりの発光量(cpm)として示される。

内のルシフェラーゼ活性は、5時間後に最大値を示した。この結果から導入プラスミドの核内移行と発現が4時間以内に開始されることが示された。

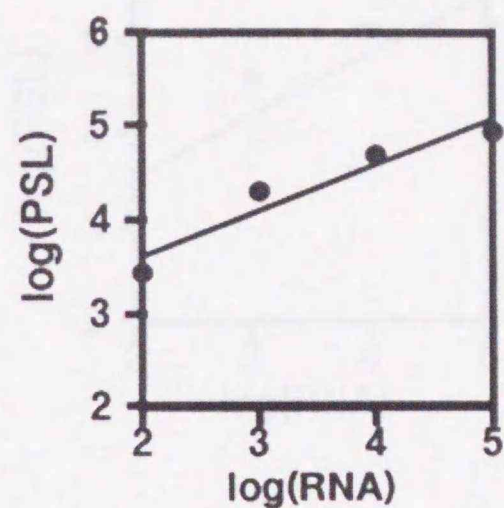
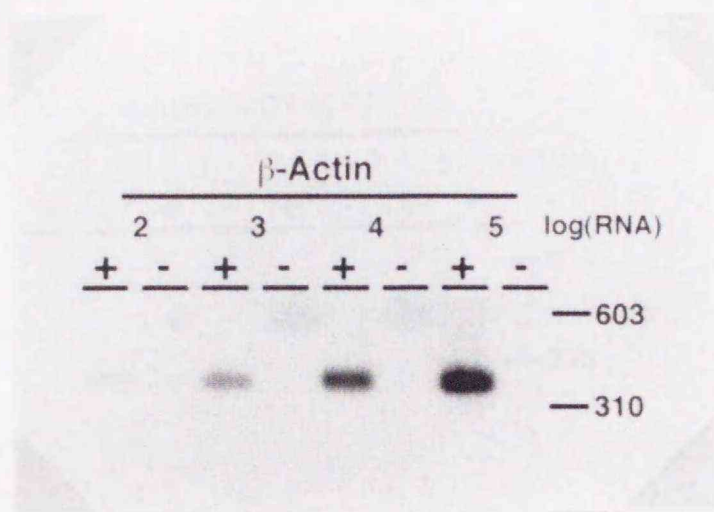
続いて、RT-PCR法用の標準試料より標準曲線を求めた(図2-3)。 β アクチン、pSV-ICP4S上のMDV ICP4(リコンビナントMDV ICP4)、MSB-1に感染しているウイルスゲノム上のMDV ICP4遺伝子(内在性MDV ICP4)、pp38およびMDV polの転写産物について定量的検出条件を検討した。図2-3に示すように本法では 10^2 分子の転写産物を検出することが可能で、 10^4 分子までブロット膜上の放射能と直線的な関係が成立した。

β アクチン量(図2-4)によって標準化した試料についてプラスミドからのMDV ICP4(リコンビナントMDV ICP4)の転写を検討した(図2-5A)。リコンビナントMDV ICP4の転写はトランスフェクション2時間後に検出された。3回の独立したトランスフェクションの結果を平均し(図2-5B)、標準曲線を基に算出すると転写頻度は細胞あたり2分子であった。MSB-1細胞においてトランスフェクション16-96時間後においてはリコンビナントMDV ICP4の発現は検出されなかった。逆転写酵素を加えなかった試料についてはプローブがハイブリダイズしなかったことから、トランスフェクション2および5時間後に認められたシグナルがpSV-ICP4Sの転写産物の存在を示すことが示唆された。このことは、 β アクチンのシグナルが全サンプルに認められたこと、およびハイブリダイズしたバンドがプライマーペアから予測されるサイズであったことから支持された。

リコンビナントMDV ICP4の転写量は低かったのに対し、内在性MDV ICP4の転写産物はトランスフェクション後に強く検出された(図2-6A)。同一のブロット膜上において、トランスフェクション後の内在性MDV ICP4の転写はMDVに崩壊感染したCEFよりも強く認められたが、 β アクチンの発現量によって補正した場合には同程度(細胞当たり約300 RNA分子)の転写産物が予想された。内在性のMDV ICP4転写産物は無処理のMSB-1細胞では検出されなかった。この結果は内在性のMDV ICP4の発現がトランスフェクション後に増強されたことを示している。

pp38転写産物については、無処理のMSB-1でも発現が認められ、また、pSV-ICP4

A



B

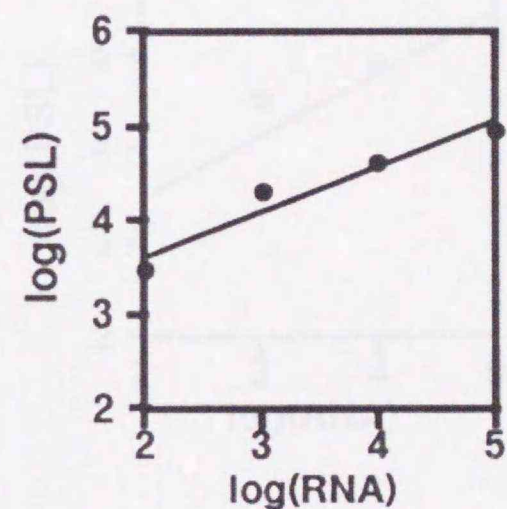
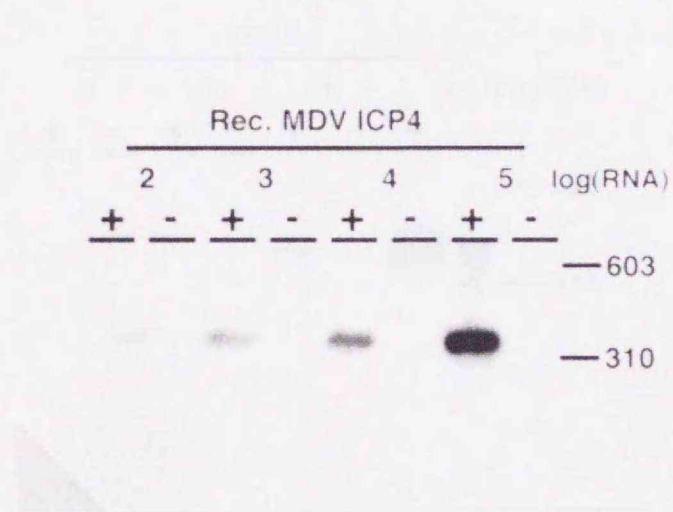
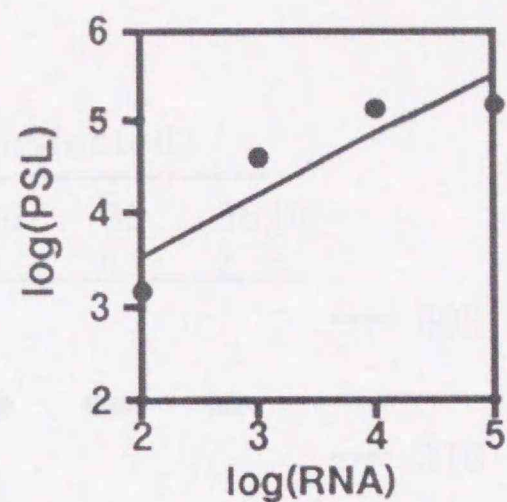
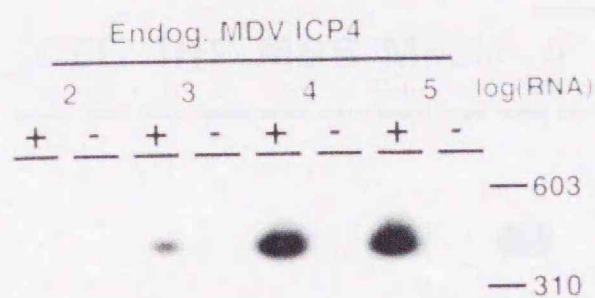


図2-3 RT-PCR産物定量用の標準曲線。

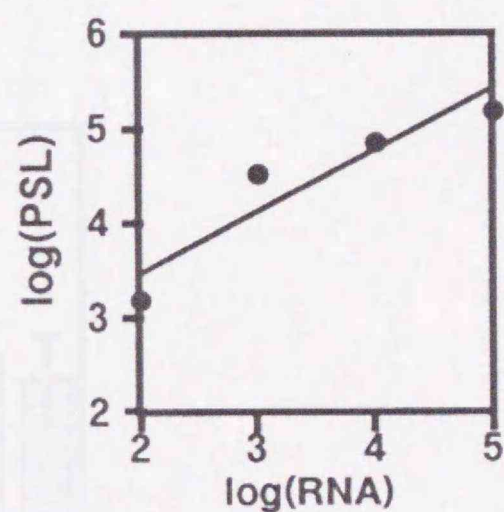
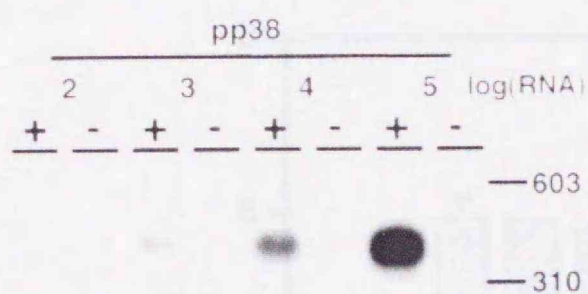
A : 10^2 , 10^3 , 10^4 および 10^5 分子の鶏 β アクチンの標準RNAを逆転写後(+)または逆転写なしに(-)、表2-2に示す条件で増幅し、ナイロンフィルターにプロット後、 ^{32}P 標識されたpA3をプローブとして増幅産物を検出した。各バンドの放射能は、バイオ・イメージングアナライザーBAS1000によりPSLとして定量した。PSLの対数を標準RNAのコピー数の対数に対してプロットした標準曲線を、増幅産物検出像の右に示す。

B : リコンビナントMDV ICP4(Rec. MDV ICP4)の標準RNAの増幅産物の検出像を左に、検出像をもとにプロットした標準曲線を右に示す。詳細はAに準じた。

C



D



E

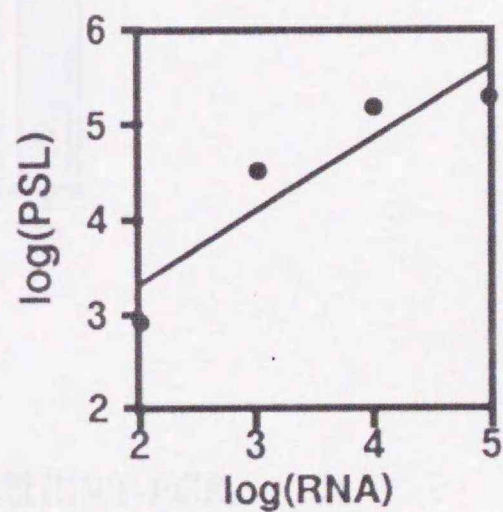
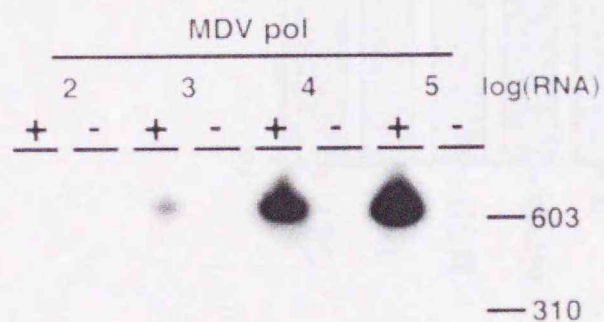


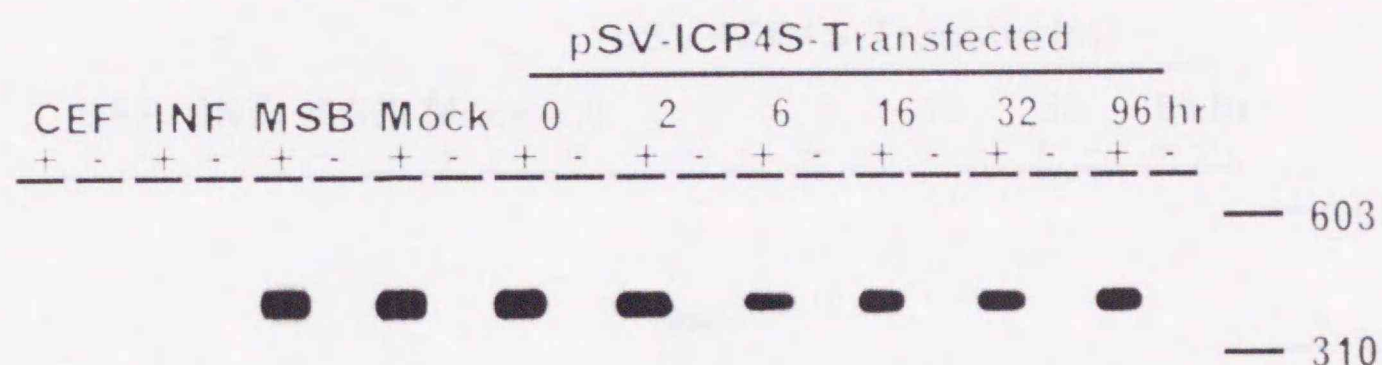
図2-3 RT-PCR産物定量用の標準曲線(前ページの続き)。

C : 内在性MDV ICP4(Endog. MDV ICP4)の標準RNAの増幅産物の検出像を左に、検出像をもとにプロットした標準曲線を右に示す。詳細はAに準じた。

D : pp38の標準RNAの増幅産物の検出像を左に、検出像をもとにプロットした標準曲線を右に示す。詳細はAに準じた。

E : MDV DNA polymerase(MDV pol)の標準RNAの増幅産物の検出像を左に、検出像をもとにプロットした標準曲線を右に示す。詳細はAに準じた。

A



B

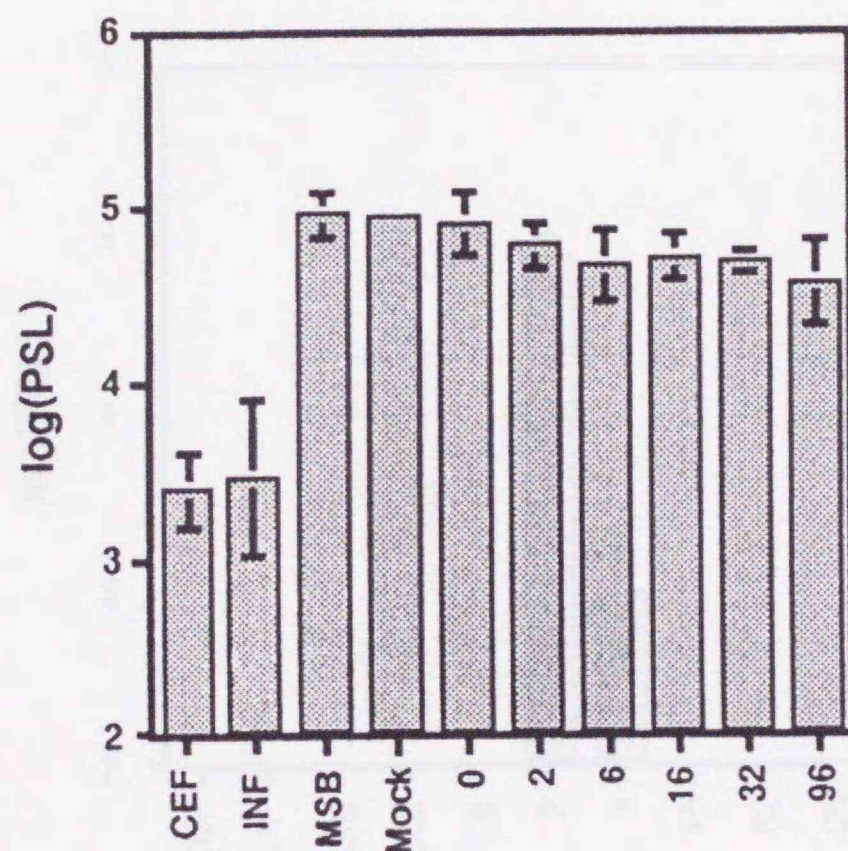
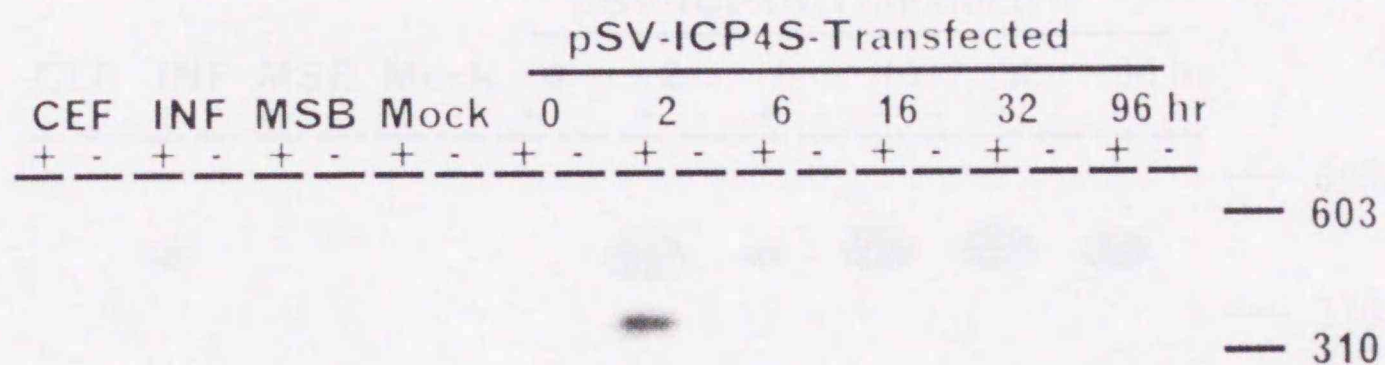


図2-4 トランスフェクション試料中の β アクチン定量用RT-PCR。

細胞5個相当(CEF:鶏胚線維芽細胞およびINF:MDV感染CEF)または50個相当(MSB:MSB-1、Mock:pSV β でトランスフェクトされたMSB-1およびpSV-ICP4S-Transfected;pSV-ICP4SでトランスフェクトされたMSB-1)のRNAを図2-3に準じて逆転写後、pA1とpA2を用いて増幅した。電気泳動・プロット後pA3とのハイブリダイゼーション結果をAに示す。3回の独立した実験の結果の平均および標準偏差をBに示す。

A



B

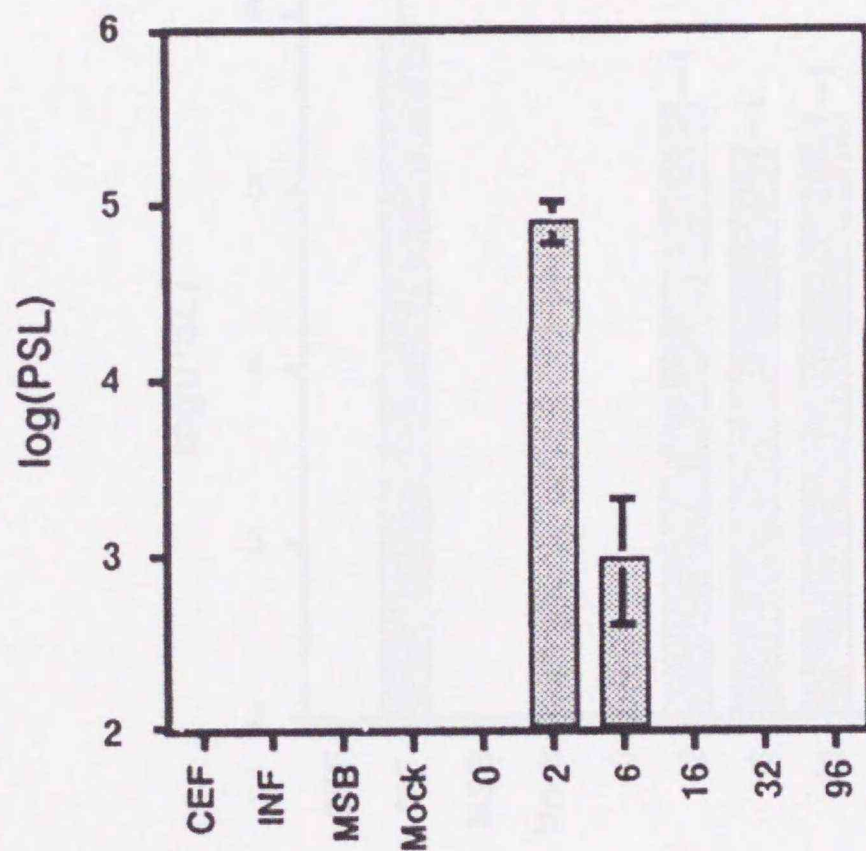


図2-5 トランスフェクション試料中のリコンビナントMDV ICP4定量用RT-PCR。
細胞500個相当(CEFおよびINF)または5,000個相当(MSB、Mock およびpSV-
ICP4S-Transfected)のRNAを図2-3に準じて逆転写後、pS1とpI4を用いて増幅
した。電気泳動・プロット後pS2とのハイブリダイゼーション結果をAに示す。
3回の独立した実験の結果の平均および標準偏差をBに示す。

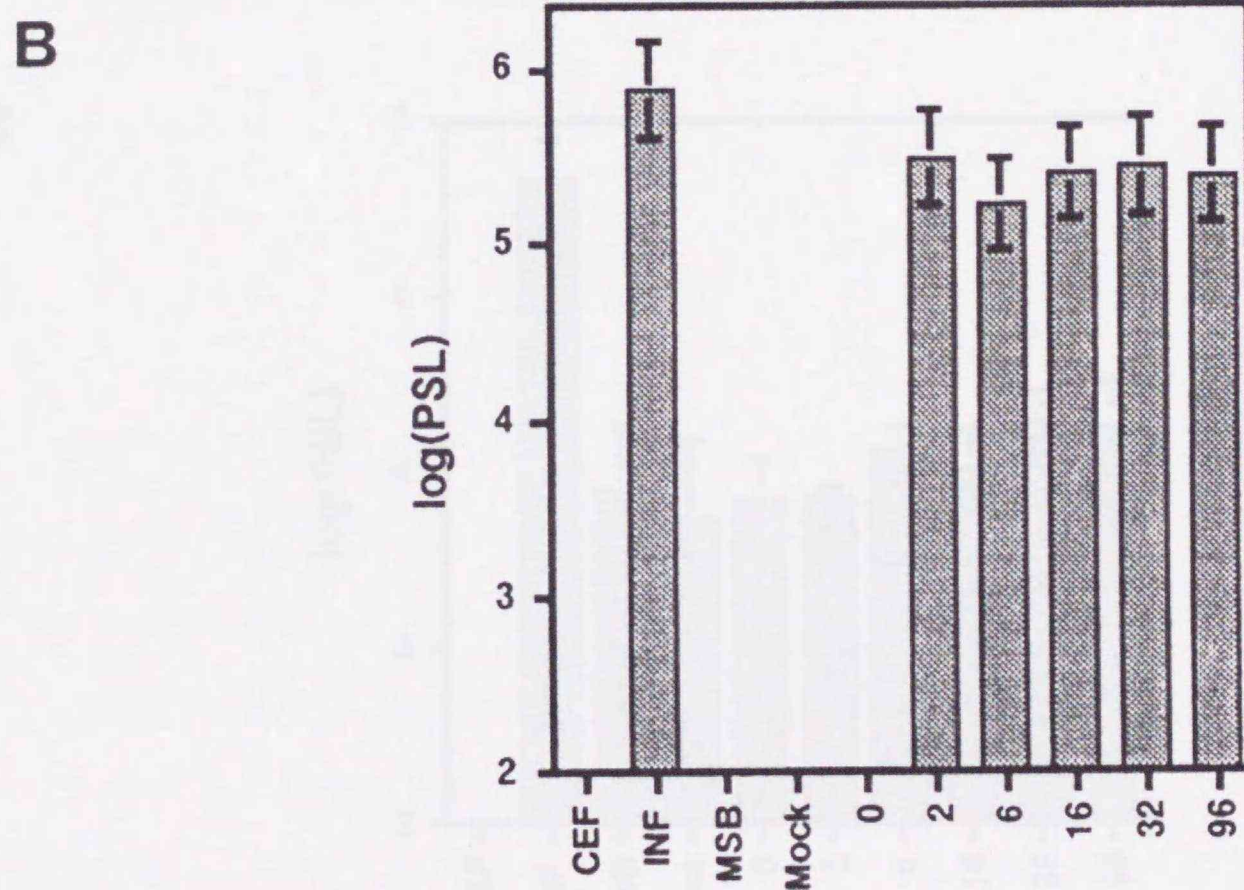
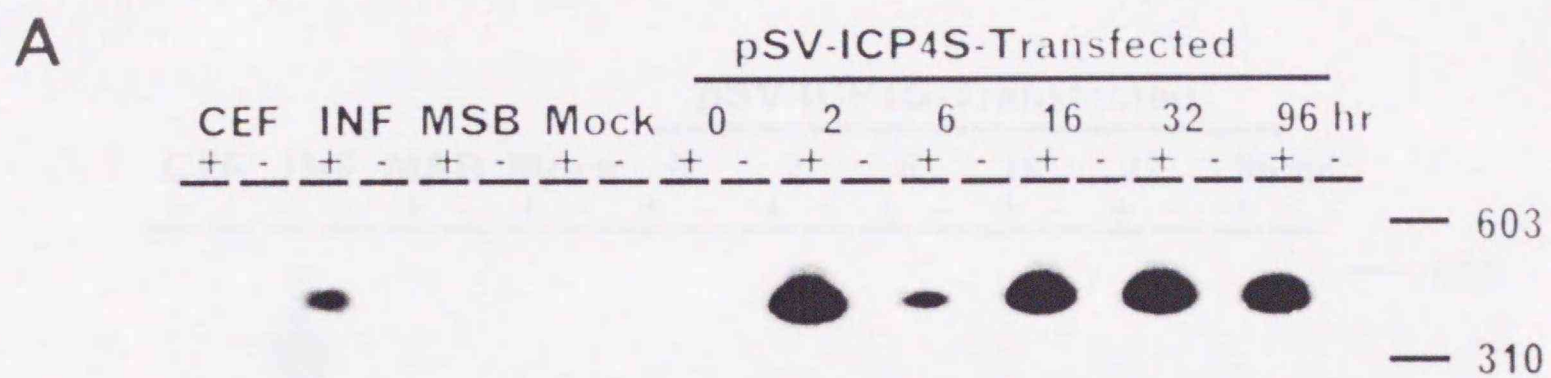
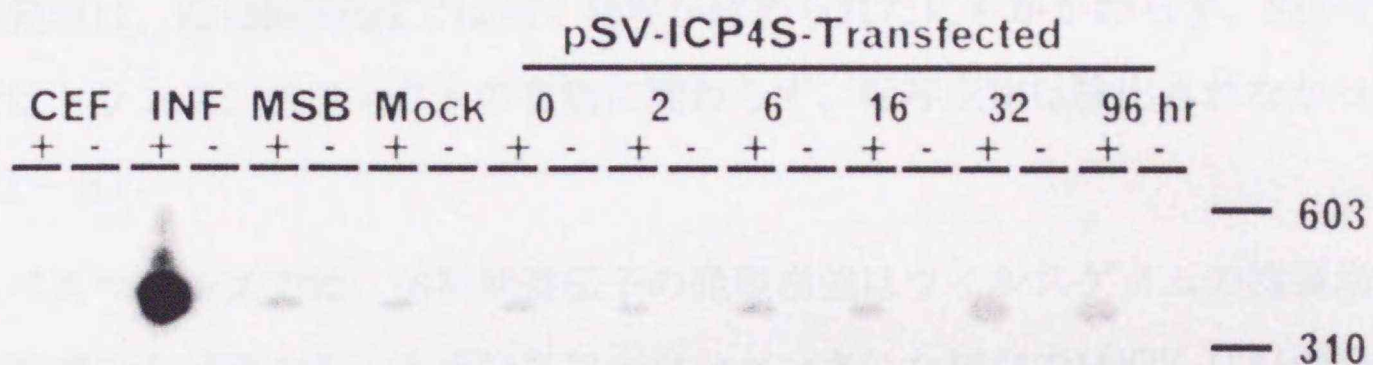


図2-6 トランスフェクション試料中の内在性MDV ICP4定量用RT-PCR。
各試料のRNA量およびRT-PCRは図2-5に準じた。PCRにはpI5とpI4を、増幅産物の検出にはpI6を用いた。ハイブリダイゼーション結果をAに示す。3回の独立した実験の結果の平均および標準偏差をBに示す。

A



B

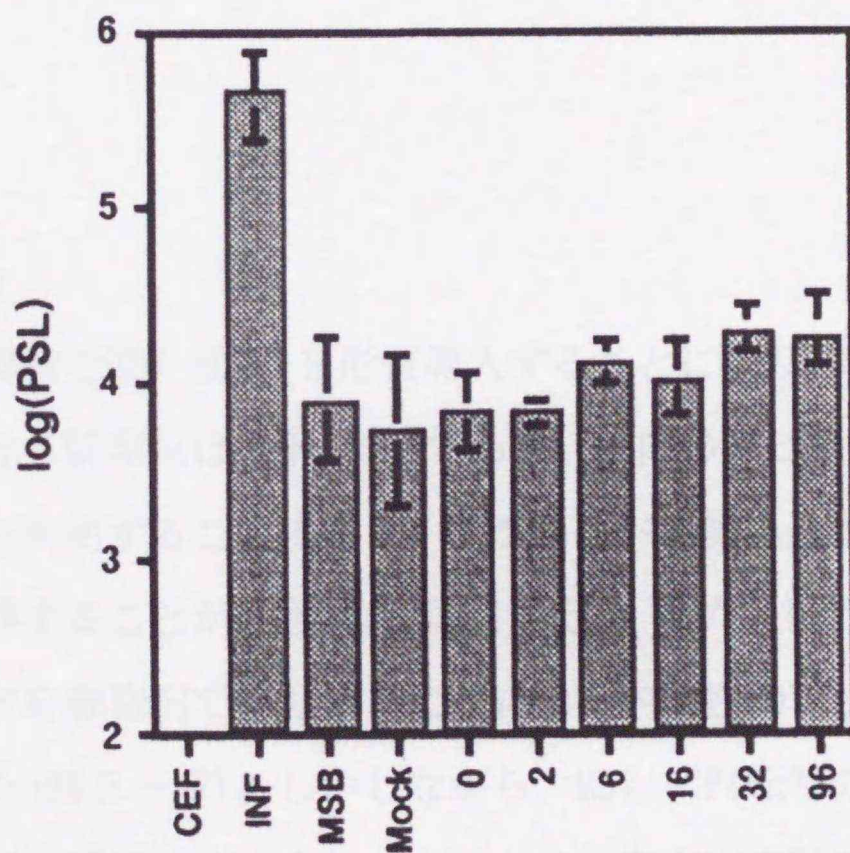


図2-7 トランスフェクション試料中のpp38定量用RT-PCR。

各試料のRNA量およびRT-PCRは図2-5に準じた。PCRにはpP1とpP2を、増幅産物の検出にはpP3を用いた。ハイブリダイゼーション結果をAに示す。3回の独立した実験の結果の平均および標準偏差をBに示す。

トランスフェクションにより増加傾向が認められたが(図2-7A)、3回の繰り返し実験の平均では、有意差はなかった(図2-7B)。一方、MDV DNAポリメラーゼの発現は、MDV感染細胞では強く発現が認められたにもかかわらず、MSB-1細胞ではトランススフェクトの有無に関わらず、転写産物は検出されなかった(図2-8)。

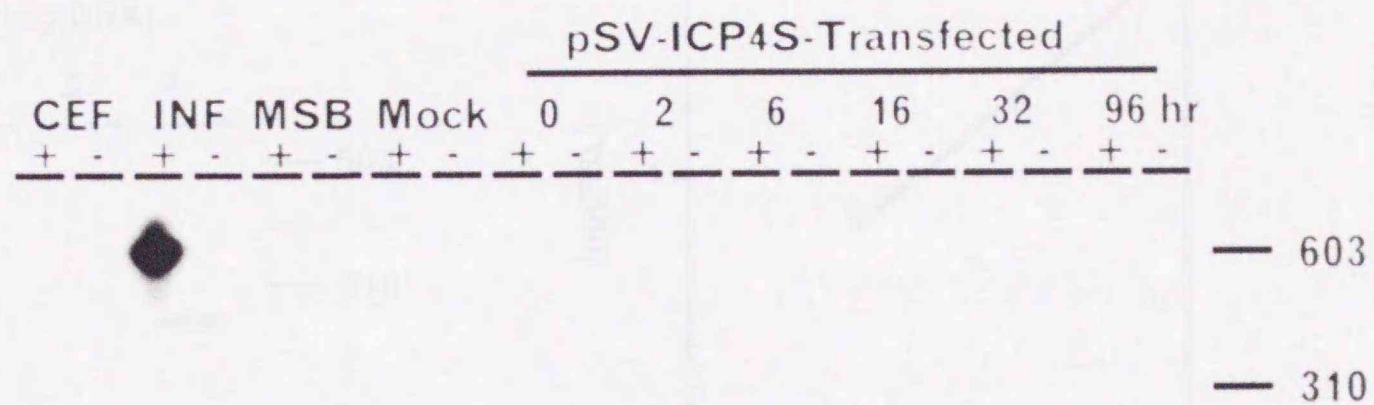
ヘルペスウイルスでは、前初期遺伝子の発現増強はウイルスゲノムの複製増強と崩壊感染を誘導する。トランスフェクションされた細胞ではMDV ICP4の発現の増強が、トランスフェクション後における細胞当たりのゲノムコピー数を変化させなかった(図2-9C)ことから、ウイルスゲノム自律的複製は誘導されなかったことが示唆された。

2-4 考察

著者は、本実験でMDV ICP4 を形質導入することによりMDV ICP4発現を誘導した。本章に於ける新知見は以下の3点である。核内の非ヒストン蛋白質と陽イオン性の脂質膜を利用することにより、プラスミドに組み込まれたMDV ICP4遺伝子の発現を誘導することが示された(図2-5)。また、MDV ICP4の全ORFを挿入したプラスミドを細胞内で転写することによる内在性MDV ICP4遺伝子の転写増強が観察された(図2-6)。しかしながら、MDV ICP4転写の増強はMDVのDNAポリメラーゼ発現を誘導せず、また、ウイルスの自立的複製を増進しなかった(図2-8、図2-9)。以下、これらの知見に関して考察する。

従来のトランスフェクション法では発現用プラスミドは細胞質内へ導入されても核内への移行は受動的に細胞分裂等に伴う移行に依存している。その結果として導入された遺伝子の発現は16-48時間後から検出される。Prattら⁷³⁾によるMDV ICP4の導入実験に於いても同様に22時間後に発現が観察されている。一方、非ヒストン蛋白質の一種であるHMG蛋白質と結合したプラスミドは短時間の

A



B

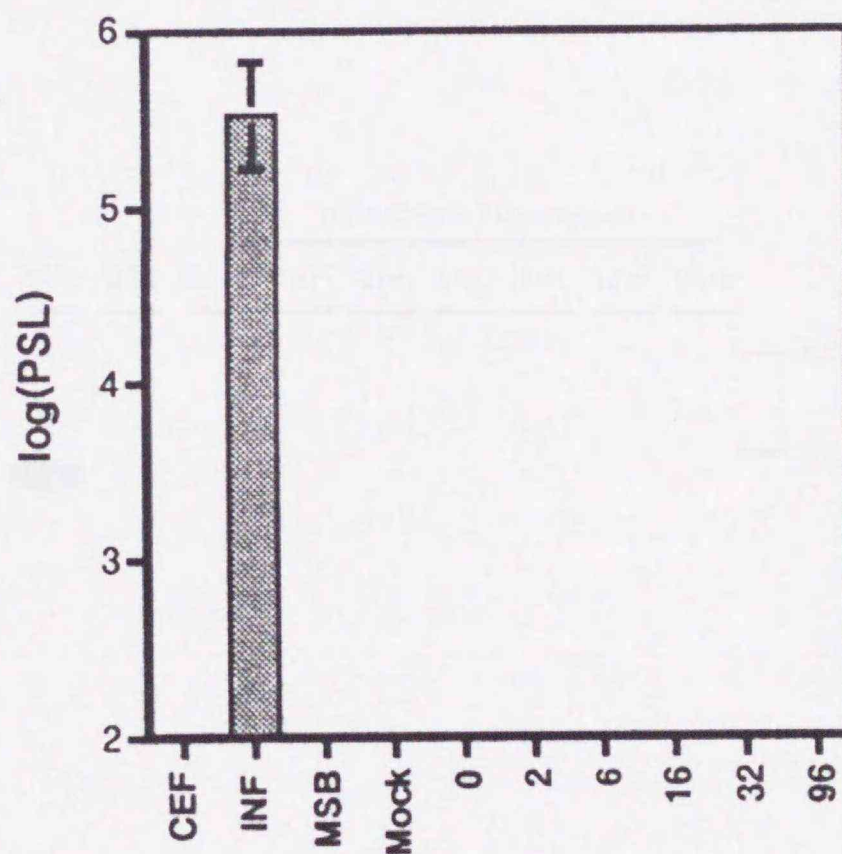


図2-8 トランスフェクション試料中のMDV DNA polymerase定量用RT-PCR。
各試料のRNA量およびRT-PCRは図2-5に準じた。PCRにはpPol1とpPol2を、
増幅産物の検出にはpPol3を用いた。ハイブリダイゼーション結果をAに示す。
3回の独立した実験の結果の平均および標準偏差をBに示す。

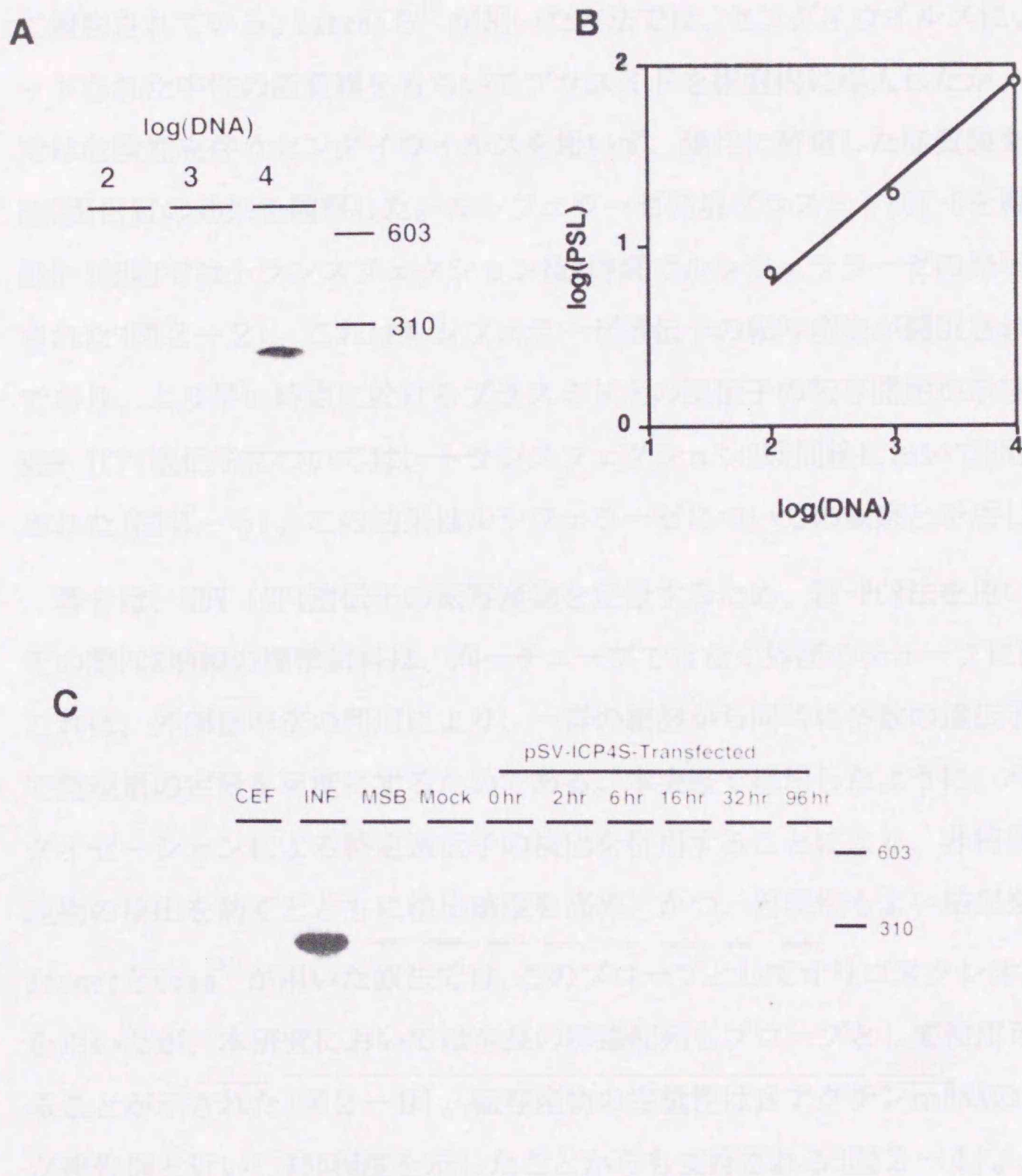


図2-9 MSB-1中のMDV ゲノムDNA定量用PCR。

pM1およびpM2による増幅の鋳型となるPr-meq-pBCプラスミドの102, 103および104分子のpM1とpM2で増幅後、図2-3に準じて各バンドの放射能をPSLとして定量した。ハイブリダイゼーションの結果をAに、PSLの対数を標準DNAのコピー数に対してプロットしBに示す。トランスフェクション試料から抽出された500 pgの高分子量DNAを鋳型とした増幅結果をCに示す。

うちに核内へ移行し、組み込まれた遺伝子を発現することが、Kanedaら⁴⁹⁾によって報告されている。Kanedaら⁴⁹⁾が用いた方法では、センダイウイルスによってコートされた中性の脂質膜をもちいてプラスミドを細胞内に導入したが、本研究では危険性を伴うセンダイウイルスを用いず、陽性に荷電した脂質膜を用いてHMG蛋白質の効果を観察した。ルシフェラーゼ発現プラスミドpGV-Cを導入したMSB-1細胞ではトランスフェクション後4時間でルシフェラーゼの発現が観察された(図2-2)。これはルシフェラーゼ遺伝子の転写産物が翻訳された結果であり、より早い時点に於けるプラスミド上の遺伝子の転写開始が示唆された。MDV ICP4遺伝子については、トランスフェクション2時間後においてRNAが検出された(図2-5)。この結果はルシフェラーゼについての観察と矛盾しない。

著者は、MDV ICP4遺伝子の転写産物を定量するため、RT-PCR法を用いたが、その際PCR増幅の標準試料は、同一チューブではなく外部のチューブに置いた。これは、外部標準法の利用により、一群の細胞から同時に多数の遺伝子について発現量の定量を可能にするためである。本実験で採用したように、ハイブリダイゼーションによる特定遺伝子の検出を併用することにより、非特異的増幅産物の検出を防ぐとともに検出感度を高め、かつ、再現性もよい結果を得た。KramerとCoen⁵⁵⁾が用いた原法では、このプローブとしてオリゴヌクレオチドのみを用いたが、本研究においては全長の標識配列もプローブとして使用可能であることが示された(図2-9)。転写産物の定量性は β アクチンmRNAのコピー数が報告例と近い1,300程度を示したことからも支持される(図2-4)。

本研究において構築したプラスミドpSV-ICP4Sは、そのプロモーターとして、宿主域の広いSV40ウイルスの初期遺伝子を制御するプロモーターを用いているため、MSB-1細胞においてもMDV ICP4遺伝子の発現が期待された。本研究においては、pGV-Cの導入実験においてルシフェラーゼ遺伝子の発現を確認するとともに、MDV ICP4遺伝子の転写も検出した。検出されたコピー数は、崩壊感染中に見られるウイルス由来のMDV ICP4遺伝子の転写産物量に比べ180分の1であったが、トランスフェクションにより導入されたMDV ICP4遺伝子の検出としては最

初の報告である。ただし、導入されたプラスミドのMDV ICP4遺伝子の転写産物量は期待を下回った。検出量が少なかった原因としては、以下の3点があげられる。第一にプラスミドpSV-ICP4SがMSB-1細胞中で不安定である可能性、第二にpSV-ICP4Sから転写されたMDV ICP4転写産物はpoly(A)を有していない可能性、第三にSV40ウイルスの初期プロモーターがMSB-1細胞ではあまり有効に働かない可能性である。第一の可能性は、形質導入96時間後においてもMSB-1細胞中においてpSV-ICP4S DNAが検出された(図2-9)ことから否定される。第二および第三の可能性については、現在、検討のための実験を行っている。

MDV ICP4のmRNAは全長10-14 kbであることがノーザンブロットによって示されている^{18, 57)}。著者が行った予備実験では、ORFの最上流域をプローブとしたノーザンブロットでもっとも強く反応するバンドとして、約11 kbのpoly(A)⁺RNAが認められた(図4-2)。このことから、pI3とpI4による増幅産物はMDV ICP4のmRNAの存在を示唆するものと考えられる。著者は、遺伝子導入2-96時間後に内在性MDV ICP4遺伝子からの転写産物の増大を確認した(図2-6)。遺伝子導入対照群でMDV ICP4遺伝子の転写が認められなかったことから、MDV ICP4遺伝子の転写は導入されたMDV ICP4によって増強されたことが示唆される。

本研究では、前初期遺伝子転写産物によるそれ自身の増強が観察された。類似する報告がEBVのウイルス活性化因子の一つであるBZLF1についても示されている。Prangら⁷²⁾はBZLF1遺伝子を転写するよう構築したプラスミドを、EBVが潜伏感染するリンパ球細胞株に導入したところ、BZLF1遺伝子の転写増強を観察した。また、導入したBZLF1遺伝子は翻訳を欠損する様に構築されていたため、この増強はBZLF1遺伝子転写産物に依ることが示されている。Prangら⁷²⁾は、増強の機序として二つの可能性をあげた。第一の可能性として導入されたプラスミドから転写されたBZLF1遺伝子転写産物が内在性のBZLF1遺伝子発現の抑制機構を飽和させたこと、第二の可能性として導入されたBZLF1遺伝子の転写産物が内在性BZLF1を抑制している因子を減少させたことの2点が検討されている。第一の可能性はアンチセンス転写産物とBZLF1転写産物の二重鎖の形成が念頭に置かれているが、MDV ICP4にもアンチセンス転写産物が存在すること^{18, 57)}から現在

著者も検討を進めている。第二の可能性は、BZLF1遺伝子のプロモーターと相互作用する蛋白質を調べる必要があるが、現在、MDV ICP4遺伝子のプロモーターは同定されていないのでこの点についての検討は難しいのが現状である。

MDV1特異的磷酸化蛋白質pp38は、未処理のMSB-1においても低頻度で発現することが知られている。本研究で用いたMSB-1では、1.5%の細胞で蛋白質が検出された(4-3参照)。Prattら⁷³⁾も、トランスフェクション2-3日後までの期間については、pp38の発現量の増加は報告していない。本実験では3回の繰り返しのうち、2回について増加を示したが、1回は増加が認められず、結果としては有意差は認められなかった。これは、本研究で用いた定量的RT-PCRにより算出される転写量の分散が大きく、2倍程度の増加では有意な変化とならないことによると考えられる。

通常、ヘルペスウイルスの前初期遺伝子は、ウイルスゲノムの複製を伴う崩壊感染を誘導し、結果として細胞あたりのウイルスゲノムのコピー数が増大する^{76, 91)}。Prattら⁷³⁾は、MDV ICP4遺伝子導入により、pp38抗原が安定して発現する細胞株が樹立されることを報告したが、彼らはウイルスゲノムのコピー数の変動は観察していない。本実験において、MDV ICP4発現細胞におけるウイルスゲノムコピー数の増大は観察されなかった(図2-9)。MDV pol遺伝子産物はポリメラーゼ活性を確認されていないが、HSVのDNAポリメラーゼとのホモロジーの高さとその遺伝子のMDVゲノム上の位置からMDVのDNAポリメラーゼである事が予想される⁹⁵⁾。本実験において、MDV pol遺伝子の転写がMDV ICP4の発現によって誘導されなかったこと(図2-8)は、MDVゲノムコピー数が増加しなかった結果と一致する。これらの結果から、MSB-1細胞において、MDV ICP4の転写はウイルス遺伝子の発現を部分的に増強するが、ウイルスゲノムの自律的複製に至らないことが示唆された。

2-5 小括

MDV ICP4は、ウイルス増殖に必須なMDVの初期遺伝子群の転写増強を促す可能性が提示されてきた。著者は、陽イオン性リポソームを用いてMDV ICP4の蛋白質コード領域を含むプラスミドをリンパ芽球様細胞MSB-1に導入した。リポソーム形成に先立ち、導入プラスミドの核内移行のためのキャリアーとして、HMG蛋白質をDNAに結合させた。プラスミド導入2時間後に、定量的RT-PCR法によってMDV ICP4プラスミドの転写産物を検出した。MSB-1細胞内には、潜伏感染中のMDVゲノム上にMDV ICP4遺伝子(内在性MDV ICP4)が存在するが、この転写産物はプラスミド導入後2-96時間後において検出された。これらの結果は、MDV ICP4プラスミドの転写が内在性MDV ICP4遺伝子の発現を促進することを示唆している。一方、pp38遺伝子の転写物については有意差が認められず、MDV pol遺伝子について発現の活性化は認められなかった。また、MDVゲノムのコピー数に変化が認められなかった。これらの結果は、MDV ICP4遺伝子の発現が潜伏感染MDV遺伝子を部分的に活性化することを示唆している。

第3章 MDV血清型1特異的磷酸化蛋白質pp38のプロモーター/エンハンサー領域の同定とMDV ICP4による発現促進

3-1 小緒言

第2章において、MDV ICP4の発現は、それ自身の転写を促進したが、自律的複製を誘導しなかった。この結果から、MDV ICP4が部分的なウイルス活性化を誘導する可能性が示された。部分的にウイルスを活性化する場合として、IUDR処理が知られているが、この場合は、pp38の抗原誘導が特徴的な反応として報告されている⁴⁵⁾。しかしながら、本論文第2章においてMDV ICP4プラスミドをトランスフェクトされたMSB-1では、pp38転写量は増加する傾向が観察されたが、有意差は認められなかった(図2-6)。

pp38は、当初、MDV腫瘍で発現する唯一のMDV抗原として報告された⁶³⁾。また、腫瘍から樹立された細胞株においても、一部の細胞が常時発現している^{1, 30)}。その蛋白質に対するモノクローナル抗体M21⁶³⁾は、現在樹立されている抗MDV抗体の中では、もっとも特異的な反応性を組織切片上で示す抗体であり、病理切片上でのMDV感染の重要な指標と考えられる。MDV ICP4のウイルス活性化に関する効果を検討する上では、このpp38遺伝子への効果は、重要な作用として検討されるべきである。

pp38の遺伝子は、1991-1992年にMDVゲノム上のORFとして報告された^{19, 26)}。Cuiら²⁶⁾は、遺伝子周辺領域の塩基配列も報告し、Bradleyら⁸⁾により報告されていた132bpのリピート周辺の塩基配列との連結が明らかになった(図3-1)。これらのゲノムDNA解析により、pp38のORF上流におけるTATA配列、CAAT配列および転写因子結合配列の存在が示された²⁶⁾。一方、ゲノムDNAのORFから予想されている蛋白質の分子量は31,169であるのに対し、M21抗体と反応する物質の分子量は38-39kDaであり⁶³⁾分子量の相違は17%以上になる。このORFからの予想分子量とSDS-PAGEで測定された分子量との差は、分子量80以下である磷酸基の結合という修飾のみでは考えられない。分子量の大きな遺伝子産物ができる理由として、感染細胞におけるスプライシングによりゲノムDNA解析からは予想されな

ったmRNAが合成され、そのmRNA上に現在の予想よりも大きなORFが存在する可能性があげられる。pp38のプロモーター/エンハンサー領域はmRNAの転写開始領域に存在することが予想されるため、ゲノムの塩基配列に加えて、mRNA上のORF全長を含んだcDNAの解析が必要と考えられる。

本章では、ゲノム配列で報告されたORFの確認のため、pp38のcDNAを解析し、ORFから作出された組み換え蛋白質と感染細胞中のpp38の比較を行った。さらに、cDNA配列を基にプライマー伸長解析による転写開始点の解析をおこない、pp38のプロモーター領域を同定した。さらに、そのエレメントを指示遺伝子(ルシフェラーゼ)の上流に挿入し、pSV-ICP4Sと同時にトランスフェクトすることにより、MDV ICP4遺伝子産物の直接の効果を示した。

3-2 材料と方法

ウイルスと細胞の維持、RNA抽出、poly(A)⁺RNAの精製およびルシフェラーゼアッセイの方法に関しては、第2章に準じた。

(1) cDNAライブラリーの作出

cDNAの合成はCVI-988感染CEFより抽出・精製されたpoly(A)⁺RNAを鋳型として、Amersham社のcDNA合成キットおよびクローニングキットを用いて行った(Amersham International plc、Amersham Place、英国)。すなわち、二重鎖cDNAは一本目の合成によって生じたDNA-RNAヘテロ二重鎖のRNAをRNaseHで消化後、大腸菌のDNAポリメラーゼによって合成された。二重鎖になったcDNAの末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化した後、EcoRIリンカーを結合した。EcoRIリンカーが付加したcDNAは、EcoRIで切断後λgt11ファージに挿入され、パッケージングによりcDNAライブラリーを作出した。プローブにはBamHIゲノムフラグメントの1.0 kbp EcoRIサブフラグメントを用いた。ブランクハイブリダイゼーションは、大腸菌Y1090株を用いて行った。pp38をコードするcDNAを選択するため、BamHI-H MDVゲノムフラグメントのEcoRI-cサブフラグメント(図3-1)を標識

し、ハイブリダイズするプラークを選択した。陽性の λ gt11クローンのうち最長のインサート2本については、常法に従い⁷⁹⁾、ブルースクリプトKSおよびSKへサブクローニングされた(pBP1およびpBP2)。

(2) 塩基配列の決定

cDNA全長の塩基配列を決定するためpBP1およびpBP2についてexonuclease IIIおよびmung bean nuclease (東洋紡績、大阪)を用いてデリーションクローンを作成した。続いて、各デリーションクローンの塩基配列をジデオキシヌクレオチド法⁸¹⁾により決定後、重複する塩基配列を接続することによりcDNA全長の塩基配列を決定した。

(3) プライマー伸長解析による転写開始点の決定

転写開始点を決定するため、オリゴヌクレオチドPex1 (表3-1)をRNAとハイブリダイズ後、³²P-dCTP存在下で逆転写酵素によるcDNAの合成を行った⁸²⁾。合成されたcDNAの塩基数は、アクリルアミドゲル上での電気泳動により決定した。アクリルアミドゲル上での電気泳動用の分子量標準試料としては、BamHI-H MDV ゲノムフラグメントを鋳型とし、Pex1をプライマーとしてジデオキシヌクレオチド存在下で合成された標識DNAが用いられた。

(4) リコンビナントpp38の発現と精製

cDNA上のORFを発現するため、pBP1の0.9kbpのEcoRI-EcoRIフラグメントをpBluescriptSK+に挿入した(pBP3)。続いて、pBP3のBamHI-HindIIIフラグメントを発現用ベクターpQE9 (Qiagen Inc., Chatworth, 米国)に挿入した。作出されたpQP1プラスミドを発現用大腸菌M15/REP4株に導入後、2 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranosideによってリコンビナントpp38の発現を誘導した。pQP1から誘導されたりコンビナントpp38は、pp38のN末端に6残基のhistidineが

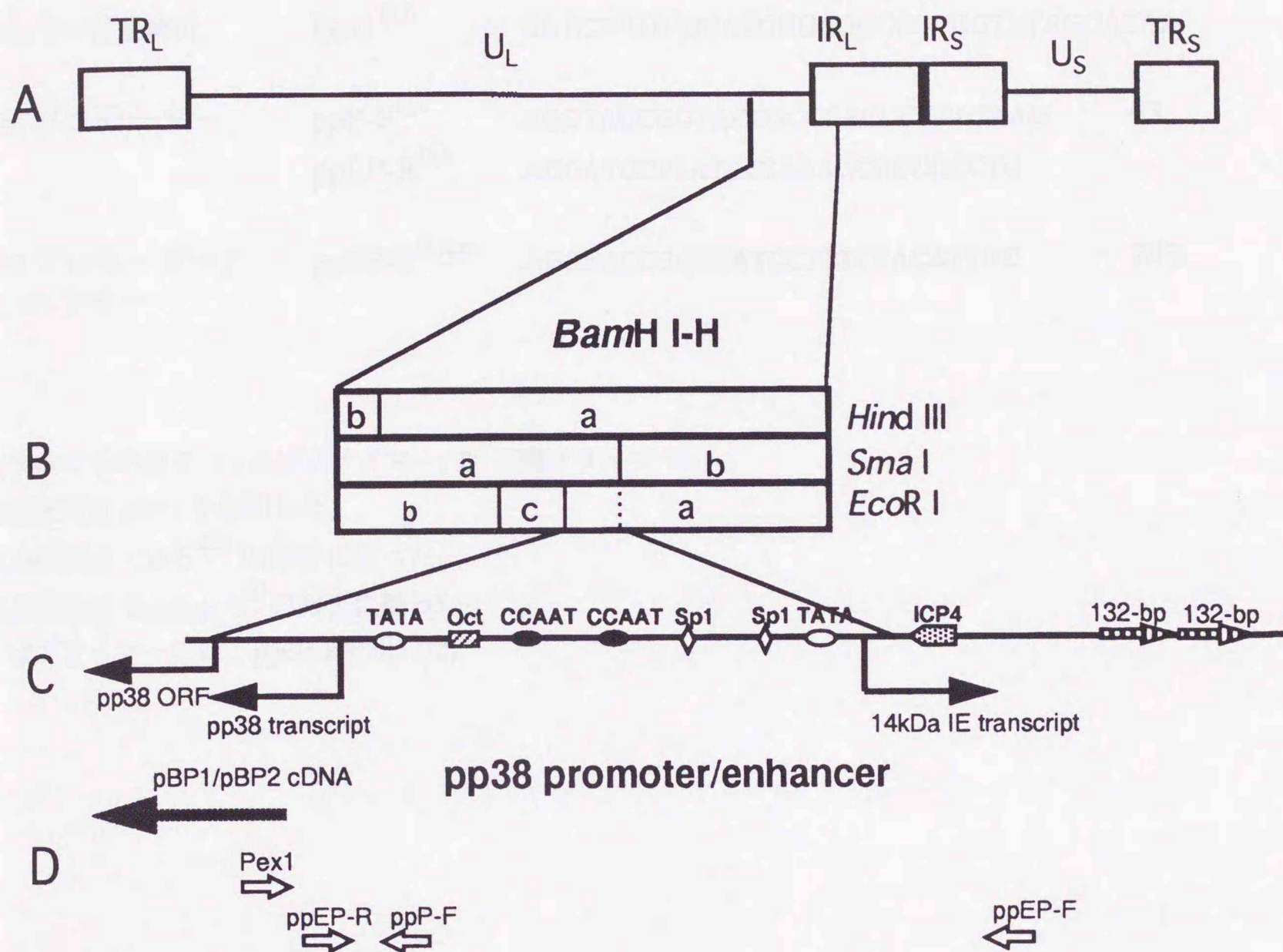


図3-1 pp38遺伝子およびそのプロモーター/エンハンサー領域。

A : MDVゲノムの構造を示す。名称は図2-1に準じた。

B : *Bam*HI-H MDVゲノムフラグメントの切断地図を示す。pp38のORFは、*Eco*RI-cサブフラグメント上に報告されている。

C : pp38のORF上流のMDVゲノムを模式的に示す。TATAとCCAATの転写開始シグナル、Oct, Sp1 およびICP4結合配列および132-bpリピート配列の位置を示す。加えて、過去に報告された転写開始点と翻訳開始点を矢印で示す。

D : pBP1およびpBP2 cDNAおよびプライマーPex1, ppEP-R, ppP-FとppEP-Fの位置および方向を矢印で示す。

表3-1 プライマー

用途/産物	名称 ^a	塩基配列 (5' to 3')	増幅産物(bp)
プライマー伸長解析	Pex1 ^{D,b}	GCTCTCGTCGGACGGGAGGCGGCGGTATAGGATAA	
pp38 プロモーター	ppP-F ^{U,c}	AGGTACCGGTACCGCCACCCGTATAAG	93
	ppEP-R ^{D,c}	AGGATCCTTATCCTATAACCGCCGCCTC	
pp38 プロモーター/ エンハンサー	ppEP-F ^{U,d,e}	AGGTACCGCCCATCCTTTCTACATTGC	743

^a 肩字は以下の通り: U, 上流プライマー; D, 下流プライマー。

^b 塩基配列は pBP1 を参照した。

^c 塩基配列は Cuiら²⁶⁾ の報告に従った。

^d 塩基配列は Bradley ら⁸⁾ の報告に従った。

^e 下流プライマーには、ppEP-Rを用いた。

存在するため、ニッケルとの親和性を保有する設計となっている。菌内で発現したリコンビナントpp38は、pH 8.0の塩酸グアニジンによる溶菌後、Ni-nitrilotriacetate 固定化アガロース (Qiagen Inc.) に吸着し、8 M urea、0.1 M NaH_2PO_4 、20 mM 2-mercaptoethanol、0.01 M Tris、pH 5.9によって溶出・精製された (Niアフィニティークロマトグラフィー)。

(5) 免疫ブロット解析

リコンビナント蛋白質の分子量を解析するため、常法に従って免疫ブロット解析を行った²⁴⁾。すなわち、感染細胞、リコンビナントpp38を発現した大腸菌および精製リコンビナントpp38をサンプル緩衝液 (50 mM Tris、pH 6.8、2% 2-mercaptoethanol、10% glycerol、1% SDS) 中に懸濁後、100℃、5分間加熱・溶解した。サンプル緩衝液中の蛋白質は12%ポリアクリルアミドゲル中で泳動後、セミドライブロット装置 (ATTO AE-6675ホライズブロット、アトー株式会社、東京) を用い、ブロット用緩衝液中で、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロットされた。PVDF膜上のpp38は、ブロッキング、モノクローナル抗体M21⁶³⁾、horse radish peroxidaseコンジュゲート抗マウス抗体との反応後、化学発光反応 (ECLシステム、Amersham International plc.) をエックス線フィルム上に感光することにより検出された。

(6) p38プロモーター/エンハンサーのルシフェラーゼ遺伝子との連結

MDV ICP4発現のpp38プロモーター/エンハンサー領域への作用を検討するため、pp38の転写開始点より上流743bpの断片をルシフェラーゼ遺伝子と連結した。すなわち、MDVゲノムDNAを鋳型としてプライマーppEP-FおよびppEP-R (表3-1) により増幅されたDNA断片を、pGV-BのKpnI-BglII切断部位に挿入しpGV-ppEPを作出した (図3-1)。エンハンサー領域を含まない対照として、ppP-FおよびppEP-Rにより増幅されたDNA断片をpGV-BのKpnI-BglII切断部位に挿入することによりpGV-ppPを作出した (図3-1)。これらのプラスミドは、2-2 (3)

の方法に従い、pSV-ICP4Sプラスミドと同時にMSB-1に導入された。

3-3 結果

MDV感染CEFより作出されたcDNAライブラリーのプラークハイブリダイゼーションにより、12個の陽性プラークを選択した。最長の2クローンについて塩基配列を決定したところ、19塩基のpoly(A)を持つ1,739塩基長からなり、その配列は2クローン間で完全に一致していた(図3-2)。cDNAの塩基配列はCuiらの報告²⁶⁾と一致しており、ORFから予測されるアミノ酸残基数も報告と同一であった。cDNA上には、Cuiらが報告した翻訳開始点よりも上流には翻訳開始点が予測されなかった。

pBP1およびpBP2のcDNAサイズは、過去に報告されたpp38転写産物のサイズと一致した。MDVゲノムDNAの塩基配列と比較したとき、その5'末端のゲノム上の位置は、報告されている転写開始シグナルの42塩基下流であった。通常転写開始シグナルの15-19塩基下流で転写が開始されることから、pBP1およびpBP2のcDNAの5'末端よりも上流から転写が開始されている可能性が示唆された。転写開始点の確認のためプライマー伸長解析を行ったところ、mRNAの5'末端はcDNAのそれよりも15-19塩基上流に存在することが示唆された(図3-3)。これらの結果から、pp38をコードするORFの翻訳開始点はcDNAでの予測と一致する事が示唆された。従って、ORFは870塩基からなり、予測されるアミノ酸残基の分子量の合計は32,000を越えないことが示唆された。

さらに、cDNA上の870塩基ORFがpp38をコードすることを確認するために、組み換え蛋白質を作出した。組み換えpp38蛋白質は、cDNA上の第一アミノ酸と第二アミノ酸の間にRGSHHHHHGSPGLQCの15アミノ酸残基が付加し、予想分子量はORFによりコードされる蛋白質に比べ930増加する。このリコンビナント蛋白質を、電気泳動後、PVDF膜上に転写し、M21抗体と反応させたところ39、38、36、


```

-40      -30      -20      -10      -1
TATAA GAATCGTAAT TTCCTCTGGC CTCGAGTGGC GGTGCGACTT

10      20      30      40      50      60      70      80      90
GCTCTCGTCG GACGGGAGGC GCGGTATAG GATAAGAGAT CACAAAAAAG CGAGACCTGG ATCGAACGGC AACGTCTCGT CCCGGTTGTT

100     110     120     130     140     150     160     170     180
AATCGTTTGG AACTTCTTCG CCTGATCGGT GGTGTAACCG TGTAGGTATT TTTAGTTTTT ATGTACCATT TCGGTTGCTT TATTATATTT

190     200     210     220     230     240     250     260     270
CCACCCATC GTTTTTCTTT ATAACATAGT TTGACCCTCT CGGCATCACA GATGGCACCC TCCCTCCACT CATGACCCAC AACCGCGATT

280     290     300     310     320     330     340     350     360
TGTTTTTCAT CTTCAACCCA CAGCCATCCT TGTCTTTCTG CCCGCACCGC ACGCTTTGCT CGTCCCGCGC TGCAAGATCG GCAGGGGGTG

370     380     390     400     410     420     430     440     450
ATGGAATTTC AAGCAGAACA CGAAGGGCTG ACGGCGTCTT GGGTCGCCCC CGCTCCCCAG GGTGGAAGAG GGGCGGAGGG CCGCGCAGGG
MetGluPheGlu AlaGluHis GluGlyLeu ThrAlaSerTrp ValAlaPro AlaProGln GlyGlyLysGly AlaGluGly ArgAlaGly

460     470     480     490     500     510     520     530     540
GTGCGCCAGC AGGCAGGGCA TGGGAAAACA GAAGCGGAAT GCGCCGAGGA CGGCGAGAAA TCGGGGGACG CCGAGATGAG CGCTTTGGAT
ValAlaAspGlu AlaGlyHis GlyLysThr GluAlaGluCys AlaGluAsp GlyGluLys CysGlyAspAla GluMetSer AlaLeuAsp

550     560     570     580     590     600     610     620     630
CGGGTCCAGA GGGACCGGTG GAGATTCACT TCTCCGCCCC CTCCTCTGG AGTCACGGGG AAGGGGGCTA TTCCAATAAA GGGTGATGGG
ArgValGlnArg AspArgTrp ArgPheSer SerProProPro HisSerGly ValThrGly LysGlyAlaIle ProIleLys GlyAspGly
Gln

640     650     660     670     680     690     700     710     720
AAGGCGATAG AATGCCAGGA GCTAACCGGA GAGGGAGAGT GGCTGTACAG GTGGGAGGAG CTACCGCCTG AGCCCCGGAG GTCAGGGAAT
LysAlaIleGlu CysGlnGlu LeuThrGly GluGlyGluTrp LeuSerArg TrpGluGlu LeuProProGlu ProArgArg SerGlyAsn

730     740     750     760     770     780     790     800     810
GAACATCTTG ACGAAAGTCG GTATGCGAAA CAAACCGAAA GGGGTAGCTC TACGGGGAAA GAAGAGGGAG ATGGTATGAA GCAGATGGGG
GluHisLeuAsp GluSerArg TyrAlaLys GlnThrGluArg GlySerSer ThrGlyLys GluGluGlyAsp GlyMetLys GlnMetGly

820     830     840     850     860     870     880     890     900
GAGCTTGCCC AGCAGTGCAG AGGAGGAACA TATGCGGACT TGCTTGTGCA AGCAGAGCAA GCTGTGTGAC ATTCCGTTTC CGCATTAATG
GluLeuAlaGln GlnCysGlu GlyGlyThr TyrAlaAspLeu LeuValGlu AlaGluGln AlaValValHis SerValArg AlaLeuMet

910     920     930     940     950     960     970     980     990
CTGGCCGAAA GACAAAACCC AAATATATTG GGGGAGCATT TGAATAAAAA ACGGGTTCTT GTACAACGAC CCCGTAATAT TCTATCCGTG
LeuAlaGluArg GlnAsnPro AsnIleLeu GlyGluHisLeu AsnLysLys ArgValLeu ValGlnArgPro ArgThrIle LeuSerVal

1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GAGTCAGAGA ATGCAACAAT GCGTTCTTAT ATGCTGGTTA CATTGATCTG TTCTGCAAAA TCATTATTAC TAGGATCGTG CATGTCATTT
GluSerGluAsn AlaThrMet ArgSerTyr MetLeuValThr LeuIleCys SerAlaLys SerLeuLeuLeu GlySerCys MetSerPhe

1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
TTCGCTGGTA TGTTAGTCGG TAGAACGGCA GACGTAAAAA CACCAATTATG GGATACTGTA TGTTTGTGTA TGGCTTTCTG TGCAGGCATT
PheAlaGlyMet LeuValGly ArgThrAla AspValLysThr ProLeuTrp AspThrVal CysLeuLeuMet AlaPheCys AlaGlyIle

1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
GTCGTTGGGG GAGTGGATTC TGGGGAGGTG GAATCTGGTG AAACAAAATC TGAATCAAAT TAAATTTAAT ACAGTGTAGC CGTACCCGAC
ValValGlyGly ValAspSer GlyGluVal GluSerGlyGlu ThrLysSer GluSerAsn ***

1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
GTTGGAGGCG GAGATTAAAC GAATTCAC CTTTACGAAT ATTGGTGCAG ACAAAGACCA AAAAATGGAA AATGGACAGC TGCAGCACGA

1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
AAGTCTCGAT TTGGATGCAG ATGCCGTTTC TATACCCGAG ACTATCTCCC CACCAATCGA GGAAGAACCT GTGCTTACAG ATATTGATGA

1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530
ACAATCAGAA TATATTCAAT TACAATTAGA ATCGGTTACC AGATACAATA ATTCCGCACT GTTGCCCATTA TACGATGATG CAGTTGTCCC

1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600    1610    1620
ACCCCTTCA TACGATTCCT TATCCCGGAT ACATAATGTT AACAATTCTG AAAGTTGCGC AGAAGTTGAC TTGCGTTTGA TCATTGACAA

1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700    1710
TGATGGATGT GCGATCGCTA CATTATTAAT ACTTTTTTTG ACGGTAGTTT CTGCAACCCT TGTAACCTATT ATCACAGAAA CATAATTGAC

1720    1730    1740    1750    1760
GTATGTGATA CAATAAATAT GCACGTACCA AAAAAAAAAA AAAAAAAA

```

図3-2 pBP1のcDNA塩基配列。

番号はcDNAの5'末端を1として記載する。プライマー伸長解析の対象となったMDVゲノムの塩基配列上の位置は、cDNAの5'末端を0として、マイナスの数値で示す。プライマー伸長反応の停止が認められた位置は塩基の上に/のマークを示す。cDNA上のORFから予測されるアミノ酸配列を塩基配列の下に示す。PAGE緩衝液中で荷電するアミノ酸のクラスターをアミノ酸配列の下線部に示す。cDNAライブラリーを作成したCVI-988とChenら¹⁹⁾またはCuiら²⁶⁾の報告が一致しない塩基配列はcDNA配列の上に、Chenら¹⁹⁾またはCuiら²⁶⁾が報告した塩基配列を記載し、アミノ酸が異なる場合はその上にChenら¹⁹⁾が予測したアミノ酸を記す。

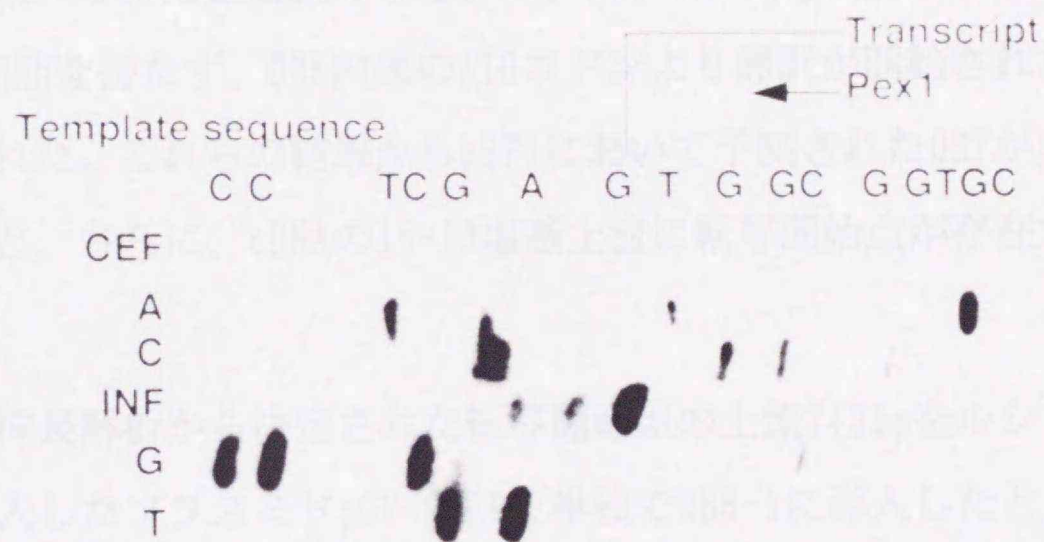


図3-3 プライマー伸長解析によるpp38 mRNA転写開始点の決定。

MDV感染CEF(INF)またはCEFから抽出されたRNAにPex1をアニールし、逆転写した産物の電気泳動結果を示す。A-Tのレーンは、逆転写産物用の分子量マーカーとして、MDVゲノム断片を鋳型、Pex1をプライマーとして塩基配列決定を行った結果を示す。

34および24 kDaにバンドを生じた(図3-4)。感染細胞をブロットした結果M21抗体と反応する蛋白質は38 kDaに認められた。さらに、リコンビナント蛋白質をNiアフィニティーカラムで精製後、電気泳動し、上記と同様にブロット膜上でM21抗体と反応したところ、39 kDaにバンドが認められた(図3-4)。pQP1に存在するリコンビナント蛋白質のORFの5'末端にはHHHHHHをコードする配列が存在し、HHHHHH配列はNiアフィニティーカラムクロマトグラフィーへの親和性を有することから、Niアフィニティーカラムで精製後認められた39 kDaの蛋白質は、pQP1上のリコンビナント蛋白質ORF全長が翻訳された産物であることが示唆された。また、Niアフィニティーカラムクロマトグラフィーの結果は、免疫ブロットの結果みられた蛋白質のうち、38、36、34 および24 kDaの蛋白質はそのN末端にHHHHHHを持たず、ORF内部のATGコドンより翻訳が開始された産物であることが示された。これらの結果からpBP1において予測されたORFがpp38をコードしていること、さらに、cDNAの15-19塩基上流に転写開始点が存在することが確認された。

プライマー伸長解析から決定された転写開始点の上流743bpをルシフェラーゼの上流に挿入したプラスミドpGV-ppEPを単独でMSB-1に導入したところ、陰性対照のpGV-Bの導入結果に比べルシフェラーゼ活性は2倍となった(図3-5)。pGV-ppEPと同時にpSV-ICP4Sをトランスフェクトした場合には、ルシフェラーゼ活性はpGV-Bの4倍の値を示した。一方、pGV-ppPとpSV-ICP4Sを同時にトランスフェクトした場合は、pGV-ppP単独でのトランスフェクションの結果とほぼ同じルシフェラーゼ活性を示した。この結果から、pSV-ICP4SがpGV-ppEPのエンハンサー活性を増強するがプロモーター活性を増強しないことが示唆された。

3-4 考察

pp38は、腫瘍細胞における発現が報告されていることから、腫瘍化またはその維持のために作用していることが示唆されてきた^{45, 63)}。また、ウイルス活性

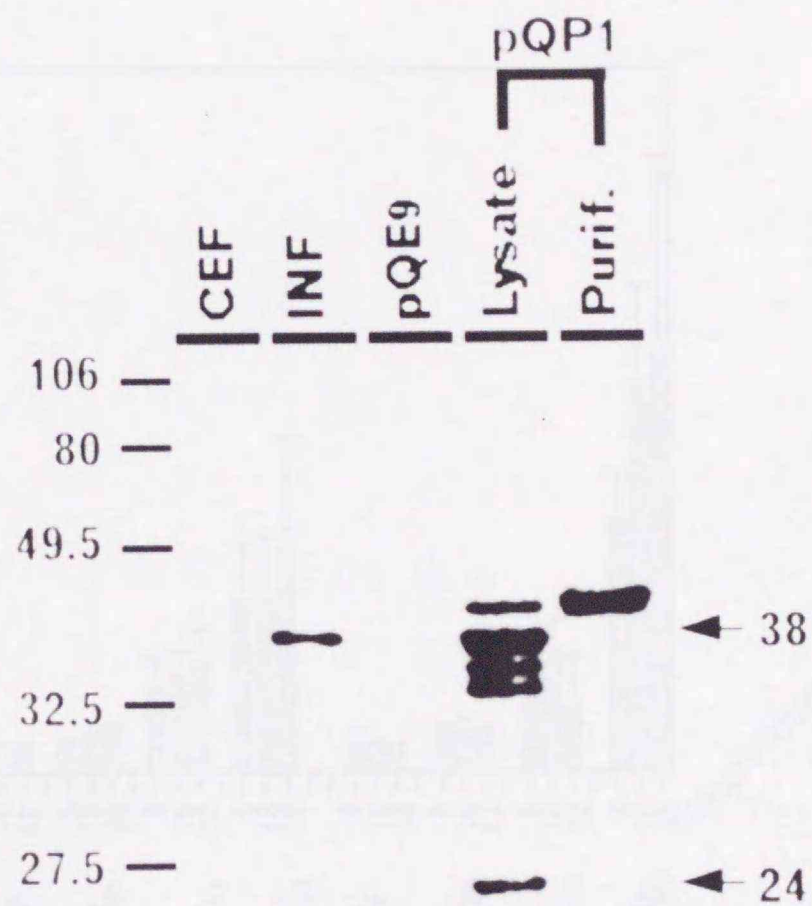


図3-4 リコンビナント蛋白質(pQP1)の、免疫プロット。

pBP1上のORFが挿入された大腸菌発現用プラスミドpQP1をもつ大腸菌の溶解液(Lysate)およびNi カラムにより精製されたリコンビナント蛋白質(Purif.)を、MDV感染CEF(INF)の溶解液と同時に泳動し、PVDF膜へプロット後抗体と反応させた結果を示す。pQE9のレーンには、pQE9をもつ大腸菌の溶解液を泳動した。各バンドはモノクローナル抗体M21と反応する蛋白質に対応する。分子量マーカーの泳動位置を左に、感染細胞中のpp38およびM21が反応する抗原であるpp24の泳動位置を右に示す。

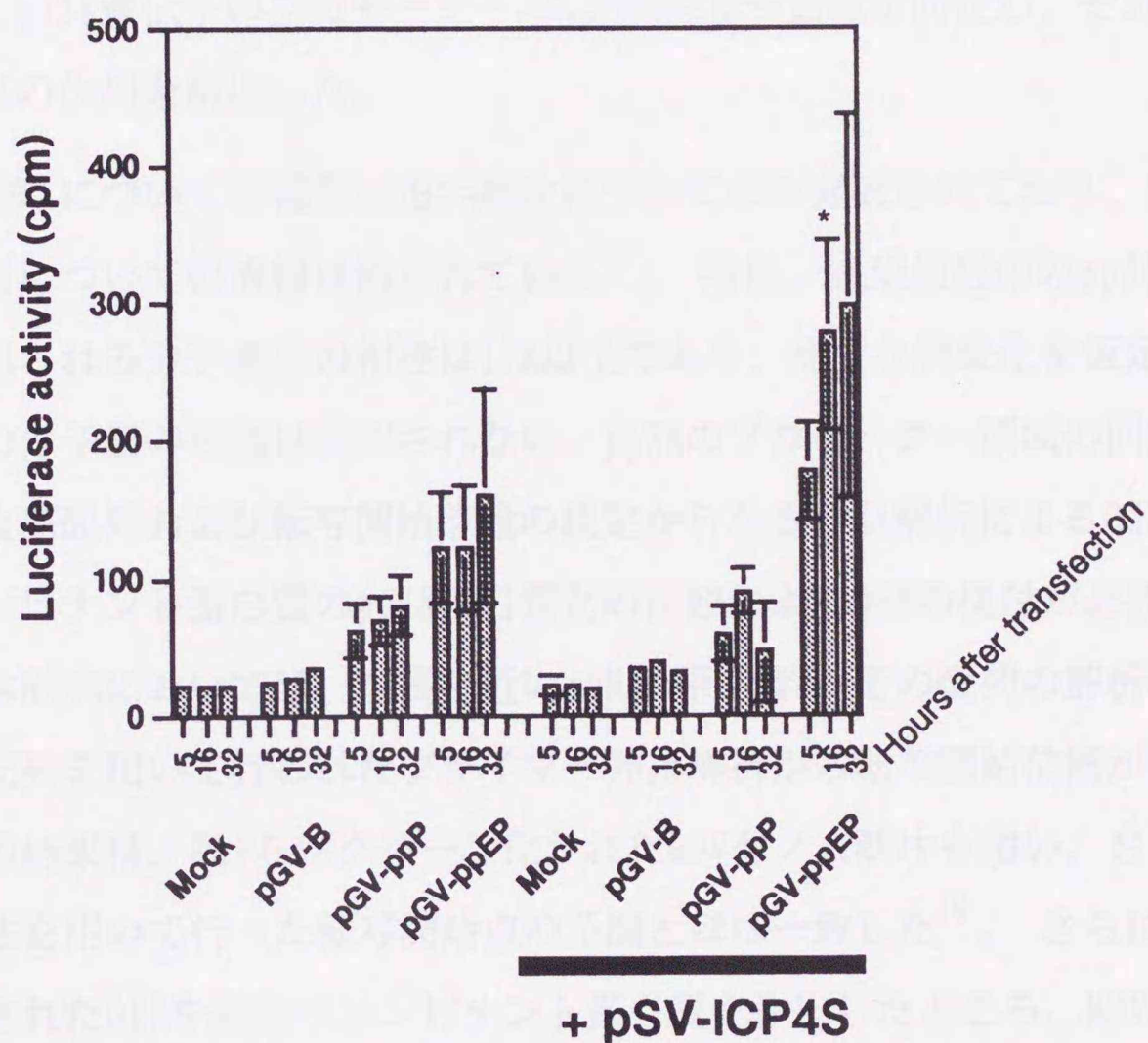


図3-5 pp38のプロモーター/エンハンサーに対するMDV ICP4の効果。

指示プラスミド(Mock: プラスミドなし、pGV-B: ルシフェラーゼ遺伝子上流にプロモーターもエンハンサーも持たない基本ベクター、pGV-ppP: ルシフェラーゼ遺伝子上流にpp38のプロモーターを挿入したプラスミド、pGV-ppEP: ルシフェラーゼ遺伝子上流にpp38のプロモーターおよびエンハンサーを挿入したプラスミド)をトランスフェクション後ルシフェラーゼの活性を測定した。一部の細胞は、各指示プラスミドと同時にpSV-ICP4Sをトランスフェクションした(+pSV-ICP4S)。pGV-ppEPとpSV-ICP4Sの同時トランスフェクション16時間後のカラム上の星印は、pGV-ppEP単独トランスフェクション16時間後のルシフェラーゼ活性との有意差(0.05)を示す。

化に伴って発現量を著しく増加させることから、ウイルス活性化の指標としても考えられている⁷³⁾。本論文第2章において、pp38遺伝子の発現はMDV ICP4遺伝子のトランスフェクションにより増加傾向は示したが、有意な差は認められなかった(図2-6)。第2章において示された可能性を検討するため、本章においては、pp38遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を同定し、それに対するMDV ICP4の作用を検出した。

pp38のcDNAについての報告は短い断片についてのみ発表されており、産生される蛋白質についての情報は限られている²⁷⁾。特に、感染細胞中のpp38と遺伝子から予想される分子量との相違は17%以上であり、高度な磷酸化を仮定した場合でもこの分子量の相違は説明されない。pp38のプロモーター領域の同定のためには、塩基配列および転写開始位置の決定からなるcDNA解析によるORFの予測と、リコンビナント蛋白質のpp38蛋白質との比較によるORFの検討が必要と考えられる。本研究においては、全長に近いcDNAが得られ、その配列の解析と5'末端の塩基配列を用いて行われたプライマー伸長解析から転写開始位置が確認された。この結果は、Cuiらがクローン化されたMDVゲノム断片を用い、S1ヌクレアーゼ法を用いて行った転写開始点の予測とほぼ一致した²⁶⁾。さらに、cDNA上で同定されたORFを基にリコンビナント蛋白質を作出したところ、MDV感染細胞中のpp38とほぼ同じ泳動度を示した(図3-4)。大腸菌中においては、翻訳後の修飾が少ないため、リコンビナントpp38の分子量は、ORFの塩基配列からの予測に近い値をとることが示唆される。SDS-PAGE電気泳動においてリコンビナントpp38の泳動が標準蛋白質からの予測よりも遅くなった理由としては、電荷を持つアミノ酸のクラスターが考えられる。pp38のORFから予測されるアミノ酸配列上では、グルタミン酸およびアスパラギン酸等の電荷を持つアミノ酸が1アミノ酸おきにならぶ電荷をもつアミノ酸のクラスターが2箇所存在する。これらの電荷をもつアミノ酸クラスターにはSDSが結合せず、陽極への移動力が減少することが示唆される。この電荷をもつアミノ酸クラスターは感染細胞中のpp38にも存在することから、pp38の電気泳動を遅らせる原因として示唆される。さらに、これらのことから、ゲノムDNA解析により予想されていたORFがpp38の全

長をコードしていることが示唆された。また、プライマー伸長解析の結果からも、ゲノムDNA解析から予測された転写調節領域がpp38のmRNAの転写を調節していることが示唆された。

cDNA解析およびリコンビナント蛋白質解析の結果は、いずれもpp38転写に関わるTATA配列が、pp38翻訳開始点の-400 bpの位置に存在することを示唆した。これは、Cuiらの結果と一致する。このTATA配列の上流には、不完全なICP4結合配列、Sp1結合配列、CAAT配列およびOct-1結合配列が報告されている²⁶⁾。これらの転写因子結合配列は直列に連続することにより転写因子の結合による転写誘導の際、さらに転写を増強することが知られている⁷⁵⁾。プロモーターなし(pGV-B)およびプロモーターのみ(pGV-ppP)のプラスミドに比べ、エンハンサー領域を含むプラスミド(pGV-ppEP)は2倍のルシフェラーゼ活性を示した。この結果からpp38エンハンサー領域がMSB-1細胞中で転写誘導能を持つことが示唆された。これは、未処理のMSB-1中においてもpp38が発現する知見と一致する。また、pp38エンハンサー領域と同じDNA領域をエンハンサー領域として利用する14 kDa IE遺伝子が他のウイルス因子を必要とせず発現することからも支持される⁸⁾。

pp38エンハンサー領域のトランスフェクションにおいて、MDV ICP4を同時に導入した場合、ルシフェラーゼ発現量がpGV-ppEP単独のトランスフェクションに比べ1.5倍の発光量であった(図3-5)。このpGV-ppEPでルシフェラーゼ遺伝子上流に接続した断片には、不完全なHSVのICP4結合配列5'-CTCGTCCCCGCGTGC-3'が含まれている⁸⁾。MDV ICP4については、結合配列は報告されていないが、哺乳動物ヘルペスウイルスのICP4ホモログがいずれも類似する配列に結合することから¹⁰³⁾、MDV ICP4の結合配列も類似することが予想されている²⁾。pp38上流に存在する上記の不完全なICP4結合配列は、強い結合を生じるコンセンサス配列である5'-ATCGTCNNNNYCGRC-3'³²⁾に比べ3塩基の相違がある。完全なICP4結合配列は、ICP4の結合により転写を抑制するのに対し、不完全なICP4結合配列は単独ではICP4の結合により弱い転写促進作用が報告されている³⁹⁾。本研究

で見られた、ICP4結合による効果としては、低い値にとどまったことはGu³⁹⁾の実験結果と一致する。不完全なICP4結合配列の解析では、結合配列を直列に重複させることによりその効果を著しく増強したが、本研究においても今後その様なDNA構築を試験することによりMDV ICP4の弱い結合による転写増強を明らかにできる事が示唆される。また、pGV-ppEP単独トランスフェクションに比して、pSV-ICP4S同時トランスフェクションによるルシフェラーゼ発光量の増加は導入後16時間ではみとめられず48時間後に観察されていることから、MDV ICP4プラスミド導入により二次的に発現が促進された因子による影響の可能性も否定できない。それらの二次的な因子も含めたMDV ICP4トランスフェクションの効果としては、第2章で観察されたpp38の転写促進の傾向について、本章の実験結果は有意差をもって証明したといえる。

以上の結果から、MDV ICP4の発現は、pp38の発現を促進する事が示唆された。ただし、その作用は、必ずしも強いとはいえず、また、MDV ICP4の発現からpp38の発現促進まで時間を要することから、感染鶏内においては、MDV ICP4転写陽性でpp38陰性という細胞が存在することが予想される。ICP4が前初期蛋白質であること⁹¹⁾を勘案すると、MDV ICP4発現は感染直後から開始され、pp38等一部の初期蛋白質が弱く発現するまではウイルスの活性化が進行する事が示唆される。ただし、第2章で見られたように、この活性化は必ずしも崩壊感染に結びつかない。すなわち、MDV ICP4の転写は崩壊感染成立の成否と関わりなく、感染初期の細胞の指標となる可能性が示唆された。これらの知見は、感染鶏内における感染が進行する機序を検討する上で重要な知見といえる。

3-5 小括

磷酸化蛋白質pp38は、MD腫瘍における発現が報告されている数少ない抗原であり、また、パラフィン切片上で反応するモノクローナル抗体が病理観察上利用されてきたことから、MDVによる発癌機序の解析と病理所見による分析において重要な指標となっている。MDV ICP4によるMSB-1細胞のトランスフェクションによりpp38遺伝子の転写産物は増加傾向は示したが有意差は認められなかった。MDV ICP4によるMDV遺伝子の活性化を検討する上において、pp38発現促進作用の有無は重要な事項である。著者はcDNA解析、組み換え蛋白質の作出およびプライマー伸長解析によりプロモーター領域を同定した。続けて、プロモーター/エンハンサー領域をルシフェラーゼ遺伝子と接続したプラスミド(pGV-ppEP)を作出し、MDV ICP4発現プラスミドと同時にトランスフェクトした。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は、pGV-ppEP単独のトランスフェクションに比べ2倍増加した。この結果から、MDV ICP4がpp38のプロモーター/エンハンサーに対して発現促進に作用することが示唆された。

第4章 *In situ* ハイブリダイゼーション法によるMDV ICP4 mRNAの検出

4-1 小緒言

著者は、第2章および第3章においてMDV ICP4がMDVウイルスを部分的に活性化する可能性を示唆した。MDV ICP4が前初期蛋白質であるとの報告をあわせて検討すると、感染細胞内においてもMDV ICP4は細胞の感染当初から発現し、MDV遺伝子群の活性化に関与することが示唆される。従って、MDV ICP4遺伝子は初期および後期蛋白質遺伝子等に比べ多くの感染細胞で転写される可能性が示唆された。本章では、感染鶏内におけるMDV ICP4発現細胞を*in situ*ハイブリダイゼーション (ISH) 法を用いて検出することを目的とする。観察の対象としてはMDV接種後4週目の感染鶏を用いた。この時期に感染鶏の一部が神経症状を示すことが報告されいてるが腫瘍は形成されておらず、腫瘍形成の上では潜伏期と考えられている。MDV感染細胞としては、典型的な崩壊感染細胞がFFEに、肝臓・腎臓等に形成されたリンパ球浸潤には、潜伏感染細胞と二次的な崩壊感染細胞が報告されている^{17, 83)}。また、神経中にも感染細胞を含む形質細胞・リンパ球等の細胞の存在が報告されており^{17, 83)}、多様な感染細胞が同一鶏中で観察されることが予想される。

従来、崩壊感染細胞の検出にはマレック病感染鶏血清^{33, 99)}が用いられてきた。マレック病感染鶏血清との反応により、MDV崩壊感染細胞内にはウイルス内部抗原 (Virus internal antigen; VIA) が観察される。潜伏感染細胞は、血清による直接の検出が困難で、VIA陰性の細胞をCEFと共培養した際の細胞変性像により検出される¹⁵⁾。パラフィン切片では抗体の反応が十分に起きないため、VIAの検出は凍結切片で行われてきた。また、MDVに対する単クローン抗体も数多く作成されてきたが、それらのほとんどはパラフィン切片上では良好な反応は見られていない。さらに、凍結切片では形態観察の可能な範囲に限られる事からもウイルス遺伝子発現の新しい検出法が求められている。遺伝子に注目した場合、MDVはそのゲノムサイズから遺伝子は約70あると予想されており⁹⁾、すでに28種の遺伝子の塩基配列が報告されている^{5, 7, 17-19, 25-27, 43, 46, 48, 54, 56, 57, 66, 71, 74, 77, 80, 81, 88, 89,}

^{105, 106)}。これらの遺伝子はいずれも容易に入手できることから、現在ではこれらを基にした観察が有利と考えられる。すなわち、各遺伝子を基にリコンビナント蛋白質を作出し、その蛋白質での免疫によりパラフィン切片上でも反応する抗血清を入手することも可能である^{26, 31, 65, 66, 79)}。しかしながら、過去の報告では、パラフィン切片上で良好な反応を示す抗体が少なかったことから⁶³⁾、抗血清作出に於いてパラフィン切片上でも反応する抗血清が得られる可能性は低いと予想される²⁴⁾。

近年、パラフィン切片上における遺伝子発現の検出法として、ISH法が注目されている³⁷⁾。これは、切片上の細胞内のmRNAを標識されたプローブとのハイブリダイゼーションによって検出する方法で、クローニングされた遺伝子があれば、抗体作出の必要がなく遺伝子発現を検出できるという長所を持つ。著者はマウスのレニン遺伝子について、digoxigenin (DIG) 標識されたRNAプローブを用いたISH法による検出を報告した(RNA ISH法)⁵²⁾。本章では、この技術をMDV ICP4に応用することにより、感染後4週目の感染鶏中においてMDV ICP4のmRNAの発現がFFEおよび腎臓の上皮細胞ならびに肝臓、腎臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経に浸潤したリンパ様細胞に検出された。

4-2 材料と方法

ウイルスと細胞の維持、PCR法、RNAの抽出、poly(A)⁺RNAの精製およびcRNAプローブの作出法は第2章に従った。ノーザンブロット用ナイロン膜の作出は、第3章に従った。

(1) 鶏へのMDV接種

鶏はShaver 288系の白色レグホンの有精卵(ホクレン、札幌)をふ化させた雛を用いた。ふ化5日後に、鶏で継代後CEFで増殖された7,200 pfuのウイルス(MDV

Md5株)を筋肉内投与した。接種4週後翼麻痺および脚弱等の神経症状を呈した鶏を放血後、組織の採材を行った

(2) ICP4ホモログのプローブ作出用プラスミドへの組み込み

プローブに用いたDNA断片は、p17-p18(表4-1)およびp14-p15(表2-1)のプライマーペアを用いたPCR法により増幅し、p17とp18の増幅産物はpGEM-Tプラスミドへ、p14とp15の増幅産物はpBluescriptプラスミドへそれぞれ挿入した(それぞれpGielおよびpBie2、図4-1)。プライマーの塩基配列はAnderson²⁾およびMcKieら⁵⁹⁾の報告に基づいて決定した。

(3) cRNAプローブの合成

cRNAプローブは、pGielまたはpBie2を鋳型とし、MDV ICP4転写産物検出用のプローブをT7、T3またはSP6 RNAポリメラーゼを用いて、試験管内転写反応によって合成された⁸²⁾。ISH法のためのプローブを合成する場合には、DIG-dUTP存在下で、転写反応を行うことにより、DIG標識されたcRNAプローブを作出した。

(4) ノーザンブロット解析

MSB-1より抽出したmRNAの発現量の変化は、ノーザンブロットによって解析した⁸²⁾。すなわち、300 ngのpoly(A)⁺RNAを1x MOPS緩衝液(20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)、5 mM 酢酸ナトリウム、0.1 mM EDTA、pH 8.0)、50% フォルムアミド、6% フォルムアルデヒド中で、65℃、5分間加熱後氷上で急冷して変性させ、ここに0.5 μ lのエチジウムブロミド(5 mg/ml)と2.5 μ lのゲルローディングバッファー(50% グリセロール、0.1 mg/ml ブロモフェノールブルー)を加えたものを1x MOPS緩衝液中で1% アガロースゲルにアプライし電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを長波長紫外線(304 nm)トランスイルミネーター上で写真に撮り、poly(A)⁺RNAをアガロースゲルからナイロ

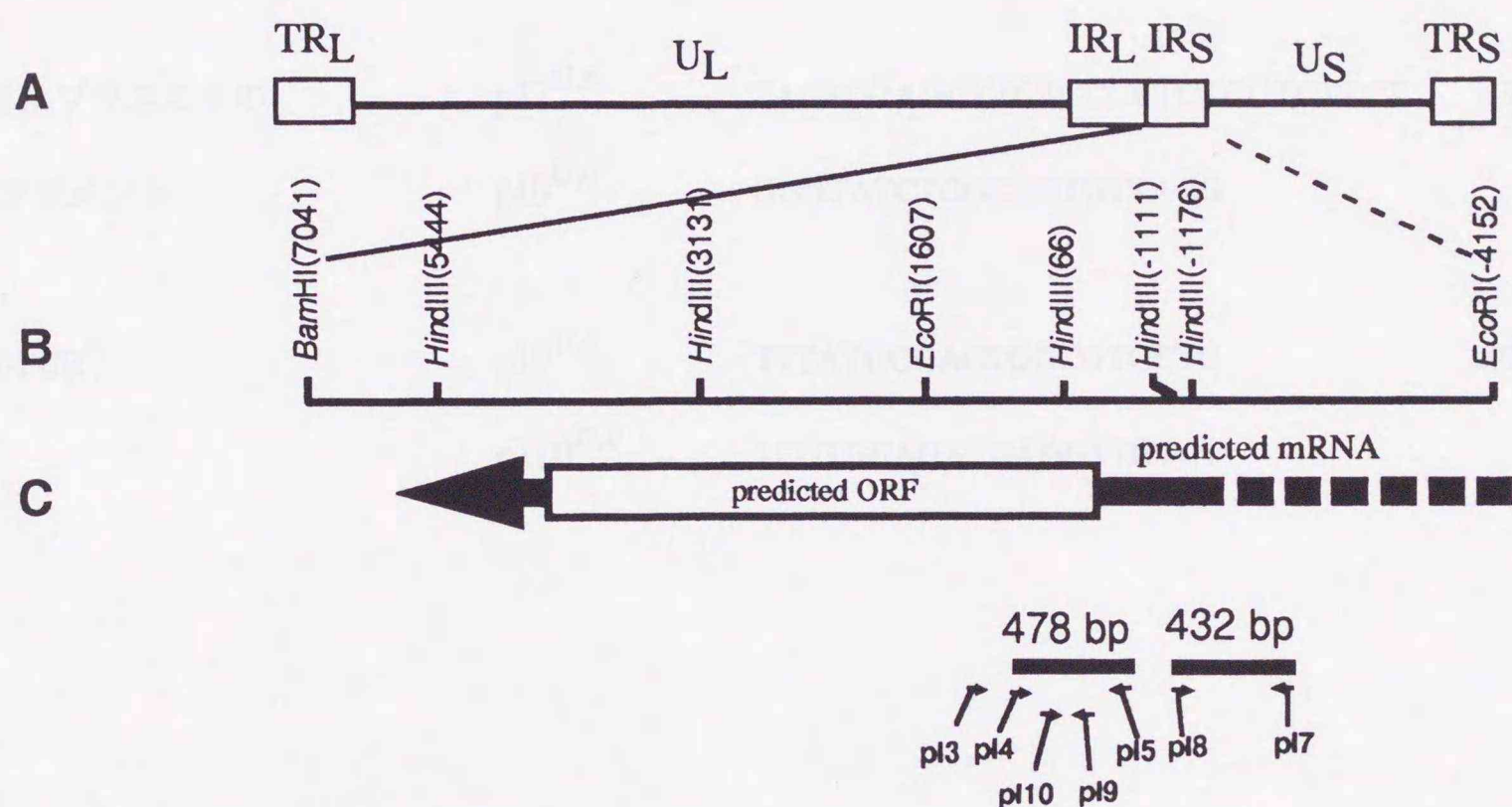


図4-1 MDV ICP4遺伝子と検出用断片の構成。

- A : MDVゲノムの構造。名称は図2-1に準じた。
- B : *Bam*HI-A MDVゲノムフラグメントの切断地図。各制限酵素表示の括弧内に予想される翻訳開始点を1とした切断位置を示す。
- C : MDV ICP4について予想されているORF(白抜きの箱)およびmRNA(矢印)。MDV ICP4のmRNAについては転写開始点が同定されていないため5'末端は点線で示す。pGie1およびpBie2を構成するDNA断片の位置およびサイズを太線で示す。DNA断片の下にプライマーpI4、pI5、pI7、pI8、pI9およびpI10の位置および方向を矢印で示す。

表4-1 プライマー

用途/産物	名称 ^a	塩基配列 (5' to 3')	増幅産物(bp)
pGie1 プラスミドの フラグメント	pI7 ^{U,b}	TACTCGAGCTTCTCCCCTCTCCTCTTCT	432 bp
	pI8 ^{D,c}	GGGTATCTGGCAGTGTTAGG	
RT-PCR ^d	pI9 ^{U,c}	TTTATGCGACTGGCGTGCTG	285 bp
	pI10 ^{D,c}	TCGTGGAGATGAGGTTGTGT	

^a 肩字は以下の通り: U, 上流プライマー; D, 下流プライマー

^b 塩基配列は McKieら⁵⁹⁾の報告に従った。

^c 塩基配列は Anderson ら²⁾の報告に従った。

^d 変性は 94°C, 1 min、アニーリングは 56°C で 1 min、ポリメラーゼ反応は 72°C, 1 min とした。PCRはこの反応を 35 サイクル反復することにより実施した。

ン膜(BIODYNE B、PALL社)にブロットした。poly(A)⁺RNAが吸着したナイロン膜に紫外線を照射することによってpoly(A)⁺RNAをナイロン膜に固定した。このナイロン膜をハイブリダイゼーション液(50%ホルムアミド、5x SSC、50 mM 磷酸ナトリウム、pH7.0、7% SDS、2% Blocking reagent(Boeringer-Manheim GmbH)、0.1% lauroylsarcosine、100 μg/ml 変性サケ精子DNA)に浸し、42℃で12~24時間インキュベートした後に、放射能ラベルしたDNAプローブを加えて42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後、フィルターを0.1x SSC、0.1% SDS溶液で65℃、10分間の洗浄を2回行った。得られた結果は、バイオ・イメージングアナライザーBAS1000(富士写真フイルム)で解析された。

(5) ISH法

切片の作成とその他の手技は、Kon^ら⁵²⁾の方法に従った。すなわち、採材された組織は4% パラホルムアルデヒドで固定され、パラフィンに包埋された後、常法に従い3 μm厚の切片を作成した。細胞については0.5%のアガロースに封入後、組織と同様に固定・包埋および薄切を行った。プローブとしては、pGielを切断後DIG存在下でT7 RNAポリメラーゼにより転写することにより作出したDIG標識cRNAプローブを用いた。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、200 μg/ml tRNA、1x デンハルト溶液、10% 硫酸デキストラン、600 mM NaCl、0.25% SDS、1 mM EDTA、pH8.0および0.1-1 μg/ml DIG標識cRNA溶液中で50℃、24時間保温することにより行った。洗浄と発色はKon^ら⁵²⁾の方法に従った。

(6) RT-PCR

細胞および組織のmRNAについてRT-PCRを実施する際には、2-2(4)の方法にしたがってRNAを抽出した。RT反応は、各試料0.5 μgのRNAを鋳型とし、pI3(表2-1)をプライマーとして、2-2(5)に準じて実施した。PCRは、pI9と

pI10 (表4-1) をプライマーとして、2-2 (5) に準じて実施した。PCR産物は、³²P標識されたpBie2プラスミドの478bpフラグメントをプローブとしたサザンブロット (2-2 (7) 参照) により検出された。

4-3 結果

ISH法の実施に先立ち、MDV ICP4 mRNAを検出するためのプローブを選択するため、pGielおよびpBie2を鋳型としてcRNAプローブを作出し、感染CEFのpoly (A)⁺RNAについてノーザンブロット解析を行った (図4-2)。その結果pGielを用いたブロット像で、より明瞭に11 kbのバンドが認められた。このプローブはIRs-Us方向の転写産物のみとハイブリダイズすることと、対象とした遺伝子領域ではIRs-Us方向の10 kb以上の転写産物としては、MDV ICP4のみが報告されていることから、pGielから合成されたcRNAプローブは特異的にMDV ICP4 mRNAとハイブリダイズする事が示唆された。

続いて、pGielを鋳型として合成されたcRNAプローブを用いて、ISH法をおこなったところ、陰性対照であるCEFには陽性反応が見られなかったのに対し、崩壊感染中のCEFでは92%の細胞に陽性反応が認められた (図4-3)。また、MSB-1細胞においては0.35%の細胞に陽性反応が認められた。一方、感染CEF標本についてISH法をおこなったのと同じのパラフィンブロックから切片を作出し、M21抗体により染色したところ1.5%の細胞で弱い陽性反応が認められた (結果は示さず)。

観察に供した5例の鶏すべてについて腰仙骨神経叢および坐骨神経の腫大が認められ、神経病変は藤本らの分類に基づき^{35, 61)}、R1型に分類された。pGielから合成されたcRNAプローブを用いたISH法によりMDV ICP4転写産物はFFE、肝臓、腎臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経に浸潤したリンパ様細胞に認められた (図4-4)。検出されたシグナルは、FFEでは核および細胞質の両方に存在が認められた (図4-4 A) のに対し、腰仙骨神経叢および坐骨神経のリンパ様細胞にお

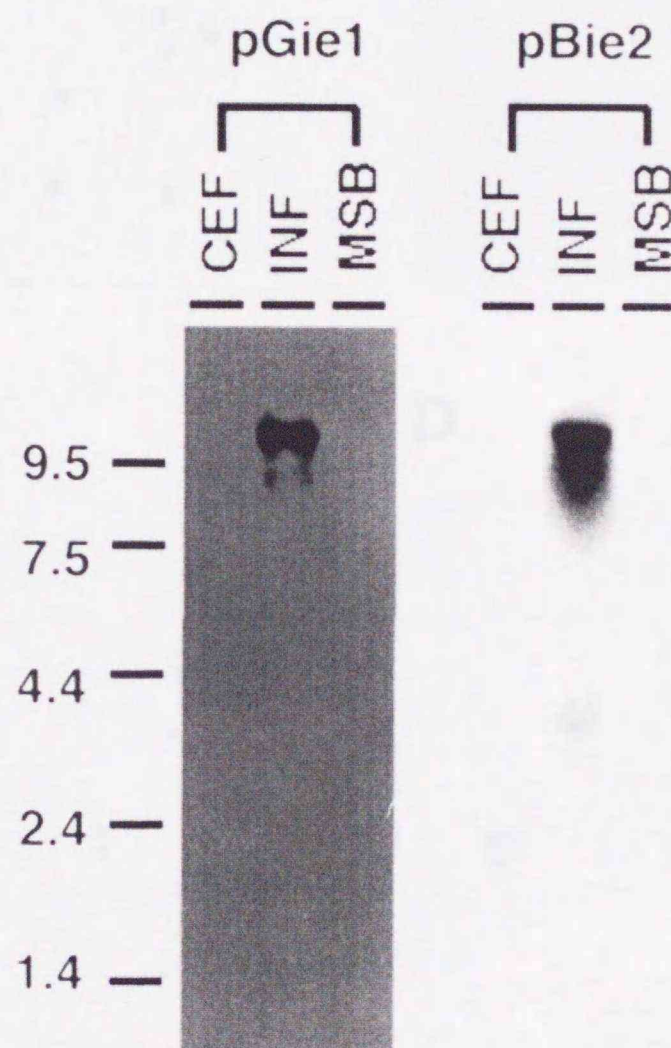


図4-2 ISH法に用いるプローブ選択のためのノーザンブロット解析。

CEF, MDV感染CEF(INF)またはMSB-1より抽出した $0.5\mu\text{g}$ のpoly(A)+RNAをアガロースゲルで泳動、ナイロンフィルターへブロット後、pGie1またはpBie2から合成されたcRNAプローブとハイブリダイズした。図の左側に標準試料の泳動位置を示す。

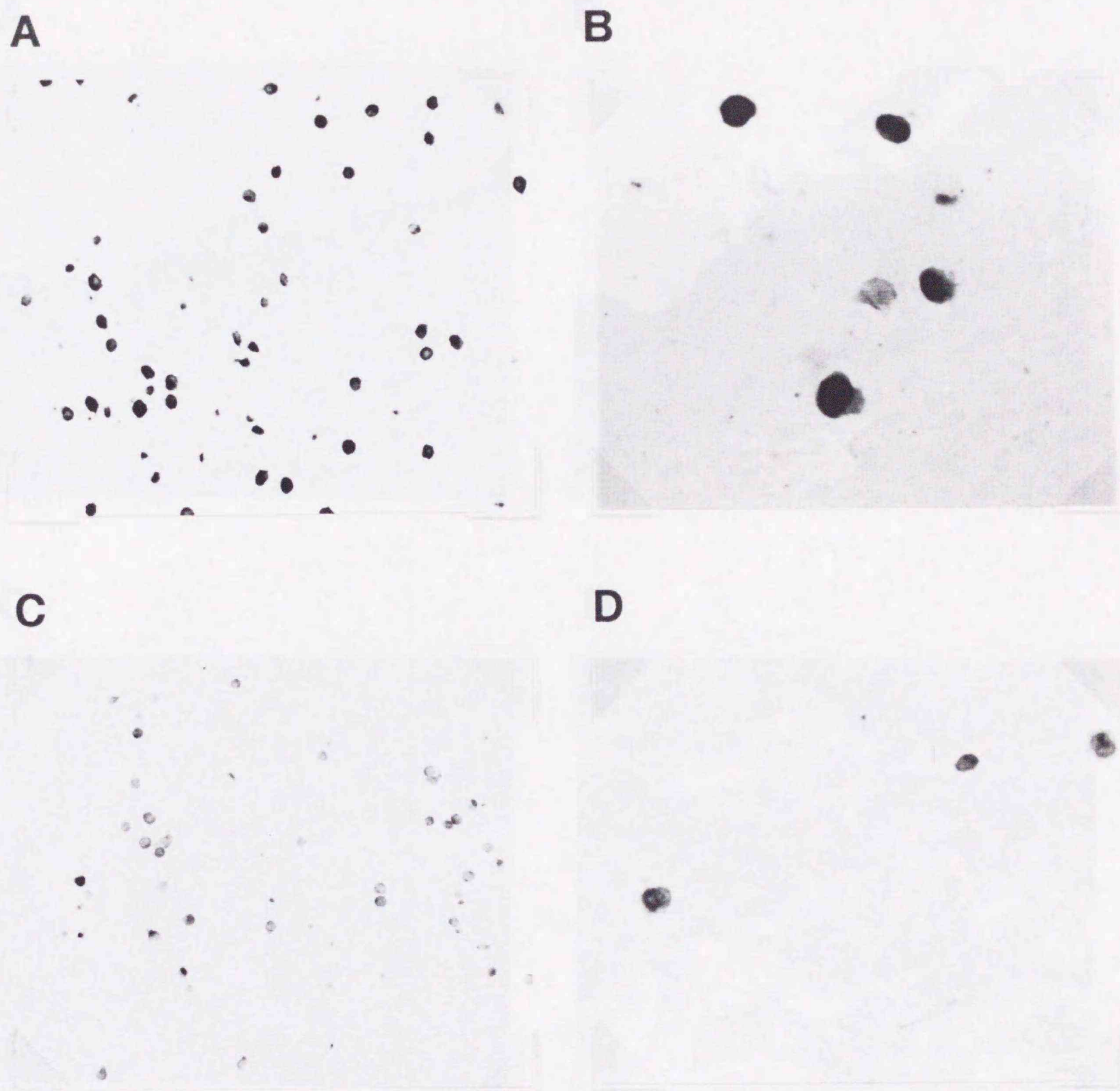
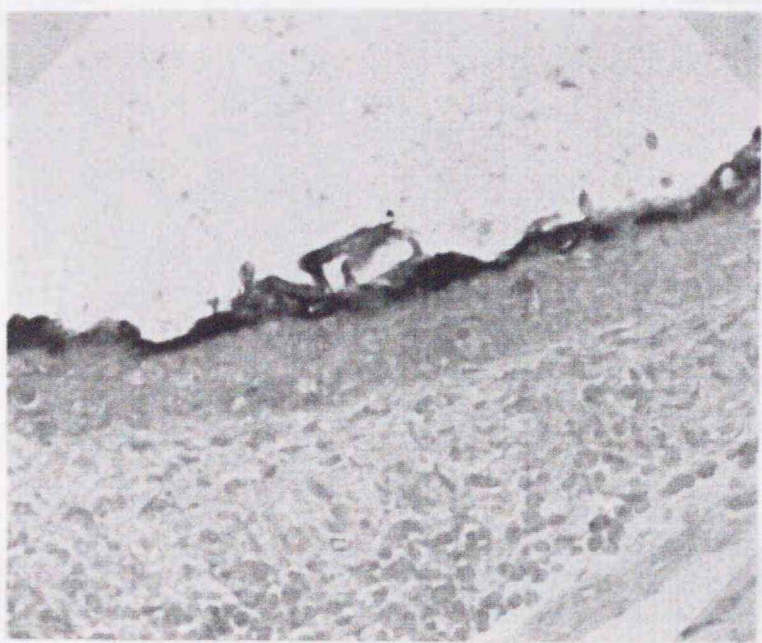


図4-3 培養細胞のISH像。

- A : アガロース封入、固定、パラフィン包埋後、薄切されたMDV感染CEFのISH像を示す(132倍)。プローブにはpGielから合成されたDIG標識cRNAプローブを用いた。ハイブリダイゼーションの条件は本文4-2(4)に従った。
- B : Aの細胞の高倍率像を示す(792倍)。
- C : Aに準じて処理されたMSB-1細胞(132倍)。
- D : Cの細胞の高倍率像を示す(792倍)。

A



B



C



D

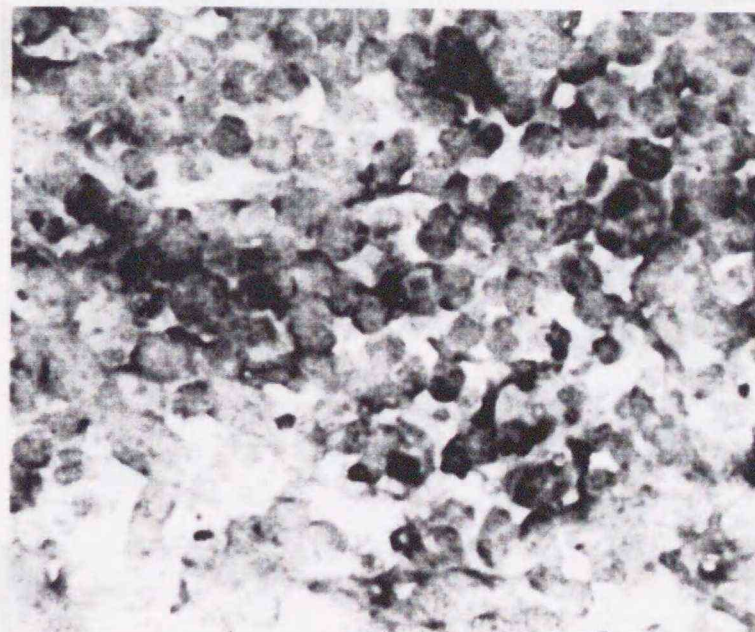


図4-4 感染鶏組織のISH像。

A : 固定、パラフィン包埋後、薄切されたMDV感染鶏のFFEのISH像を示す(132倍)。プローブおよびハイブリダイゼーションの条件は 図4-3に従った。

B : AのISH像の強拡大結果を示す(792倍)。

C : Aに準じて処理された肝臓のリンパ様細胞の浸潤のISH像を示す(132倍)。

D : CのISH像の強拡大結果を示す(792倍)。

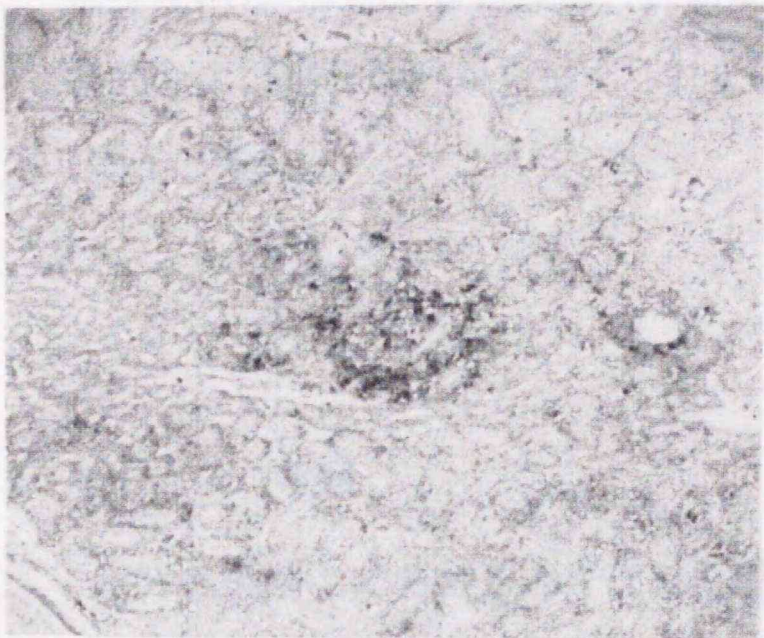
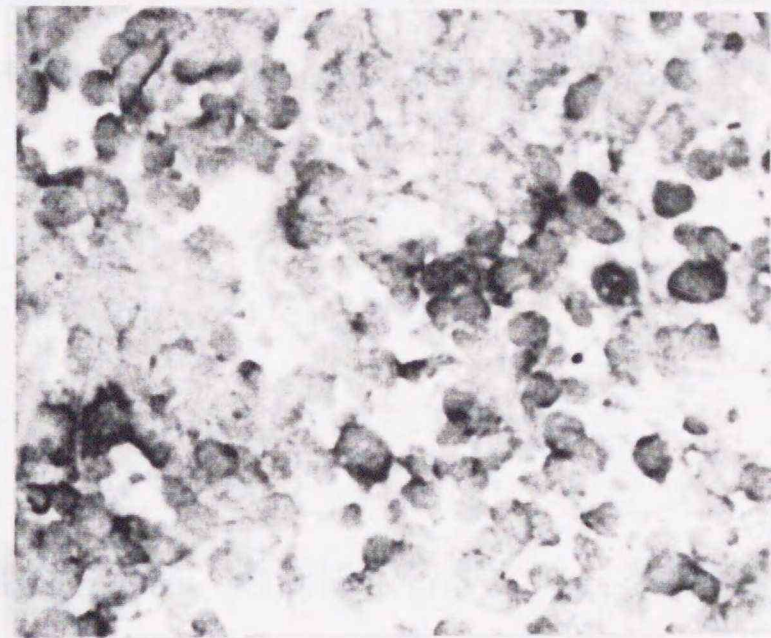
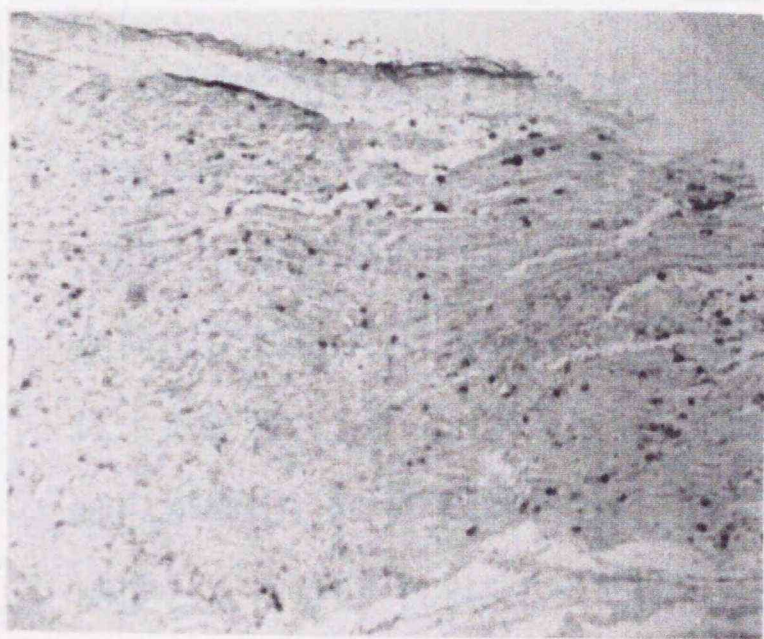
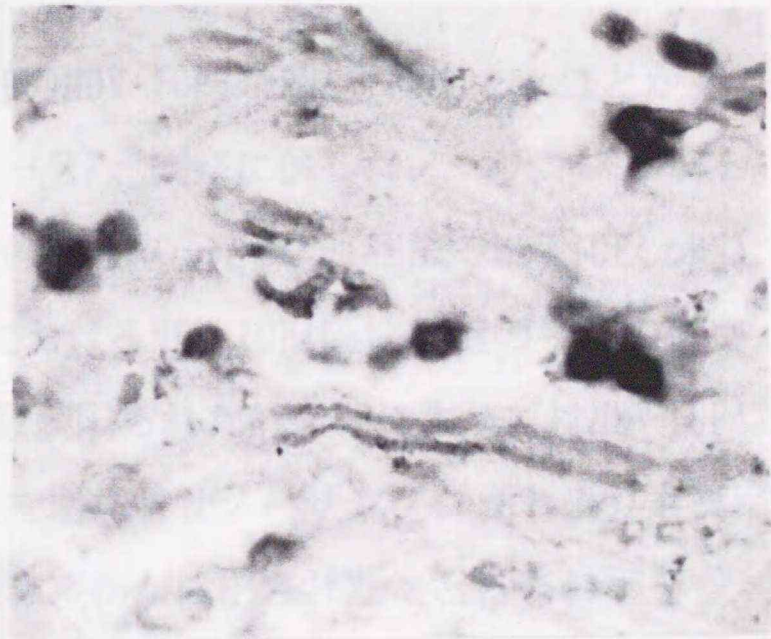
E**F****G****H**

図4-4 感染鶏組織のISH像(前ページの続き)。

E : Aに準じて処理された腎臓のリンパ様細胞の浸潤のISH像を示す(132倍)。

F : EのISH像の強拡大結果を示す(792倍)。

G : Aに準じて処理されたMDV感染鶏の坐骨神経のISH像を示す(132倍)。

H : GのISH像の強拡大結果を示す(792倍)。

いては主として細胞質に局在していることが認められた(図4-4H)。MDV ICP4転写産物は、FFEを含む皮膚、肝および腎臓のリンパ球小結節ならびに腰仙骨神経叢および坐骨神経から抽出されたRNAを用いたRT-PCRにおいても確認された(図4-5)。

4-4 考察

MDV感染鶏中におけるMDV ICP4発現細胞の同定は、過去に報告がない。本研究において、著者はMDV感染CEFとMSB-1細胞ならびにMDV感染鶏組織のホルマリン固定・パラフィン包埋された切片について、DIG標識された0.55 kbのcRNAプローブを用いて、感染細胞の検出とMDV ICP4のmRNAの細胞内局在を観察した。

本研究に用いたプローブは、全長11 kbのMDV ICP4 mRNAを検出することがノーザンブロットによって示された(図4-2)。観察に供したノーザンブロットでMDV ICP4のmRNAが検出されなかったMSB-1細胞の一部で、ISH法でMDV ICP4 mRNAが検出されたが、これは、MSB-1細胞中におけるMDV ICP4陽性細胞の頻度の低さによると考えられる(図4-3)。増幅回数に限られたRT-PCRによってはMDV ICP4 mRNAが検出されず(図2-6)、増幅回数を増加させノーザンブロットよりも高感度となったRT-PCRによってMDV ICP4転写産物が検出されたことはこの事を支持している(図4-5)。MSB-1細胞については、0.5-2%の細胞でMDVが偶発的に活性化し、MDV抗原陽性となることが知られている^{1, 30)}。本研究でも1.5%の細胞がpp38陽性であった(結果は示さず)。AkiyamaとKato¹⁾およびDunnとNazerian³⁰⁾の報告と本研究でのMDV ICP4陽性MSB-1細胞の比率の一致から、MDV ICP4のmRNA陽性細胞はMDV抗原陽性細胞であることが示唆される。MSB-1細胞のISH法のシグナルが、ウイルスゲノムDNAとのハイブリダイゼーションの結果である可能性は以下の二点で否定的といえる。第一に、本研究ではDNA検出のための変性操作を行わなかった事、第二に、感染CEFとMSB-1細胞ではウイルスゲノムのコピー数は大きく異なるが、ISH法のシグナルは両細胞で同程度であった事である。

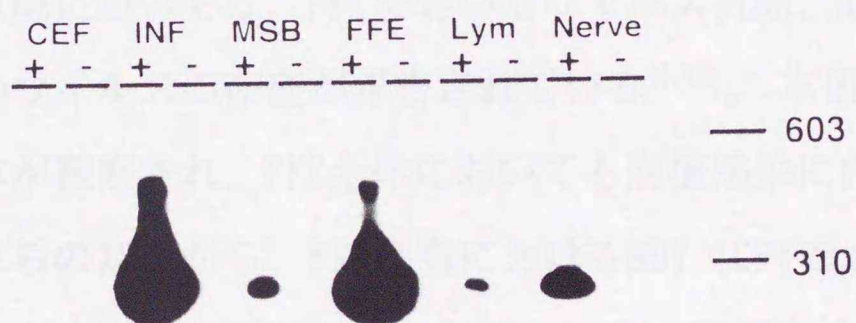


図4-5 ISH解析に用いた細胞・組織のRT-PCR。

CEF, MDV感染CEF(INF), MSB-1(MSB), FFE, 肝臓および腎臓のリンパ球小結節(Lym)ならびに腰仙骨神経叢および坐骨神経(Nerve)から抽出された0.5 μ gのRNAを図2-3に記述した方法に準じて逆転写後、pI9とpI10を用いて増幅した。電気泳動、ブロット後、pBie2の478bpのDNA断片とのハイブリダイゼーション結果を示す。

今回使用したプローブについて培養細胞で確立した実験条件は、組織切片においても応用可能であった(図4-4)。観察に供した鶏はすべてに腰仙骨神経叢および坐骨神経の腫大が見られたが、ファブリキウス囊と脾臓等のリンパ系臓器と他の内臓について顕著な変化は認められなかった。本研究に用いたMd5株は、リンパ系臓器における高度な壊死と、リンパ腫および神経の腫大を伴わない早期の個体死を引き起こすことが分離当初報告されている¹⁰¹⁾。しかしながら、本研究で観察された鶏は、いずれも早期死を免れており、また、神経の腫大も観察されている。MDVに対しては、鶏の系統による感受性の差が知られていることから¹⁶⁾、今回使用した鶏群のMd5に対する感受性が低かった可能性が示唆される。

MDV感染2週目以降においては、FFEにおいてウイルス抗原、細胞変性像、封入体および感染性のウイルスの存在が報告されている^{10, 68)}。本研究においても一部の細胞に封入体が観察され、FFE全体においても崩壊感染に伴う細胞変性像が認められた。これらの知見から、FFE細胞におけるMDV ICP4のmRNAの強いシグナルは、崩壊感染に由来することが示唆される。一方、肝臓および腎臓のリンパ様細胞の浸潤については、細胞形態の保存が悪く、細かい形態分類はできなかった(図4-4 D、F)。典型的なリンパ腫が認められなかったことから、肝および腎臓のリンパ様細胞の浸潤がMDV感染によるリンパ球増加と関連する証拠は得られていない。しかしながら、腎臓においては上皮の変性像が認められたことと(図4-4 F)、予備的に行ったM21による染色で上皮が反応したこと(結果は示さず)から、MDVの感染があることが示唆される。また、非感染鶏と感染鶏におけるリンパ球小結節周辺の組織でISHによるシグナルが認められなかったこと(図4-4 D、F)から、感染鶏のリンパ様細胞で検出されたシグナルはMDV ICP4のmRNAに由来する事が示唆される。腰仙骨神経叢および坐骨神経については、神経の腫大、脱髄および小リンパ球と形質細胞の浸潤から、MD神経病変であることが示唆された⁶⁸⁾。これらの神経で、浸潤したリンパ様細胞にMDV ICP4のmRNAのシグナルが認められた知見は、Rossら⁷⁸⁾が神経病変中の浸潤リンパ球中にISH法によりMDVゲノムを検出したことと一致する。本研究では、腫瘍性

の病変が認められていないのに対し、Rossら⁷⁸⁾は腫瘍性の病変を持つ鶏でリンパ球中のMDVゲノムを検出した。神経中のリンパ様細胞におけるMDV遺伝子の発現については、腫瘍性の病変を持つ鶏についても、検討されるべきである。さらに、本研究で観察されたリンパ様細胞におけるISH法のシグナルについては、同一鶏の切片でMDV ICP4のmRNAと同一の塩基配列を持つプローブ(本研究のプローブの反対鎖)でシグナルが検出されなかったこと(結果は示さず)からも、MDV ICP4の転写を示すことが示唆される。

本研究でISH法のシグナルが陽性となった細胞のうち、FFEは崩壊感染が報告されている。それに対し、感染後の腫瘍の潜伏期において、肝臓、腎臓および末梢神経に浸潤するリンパ様細胞については、崩壊感染の頻度が低いことが報告されている¹⁶⁾。このことから、本研究においてISH法のシグナル陽性であったリンパ様細胞は、ウイルスの活性化程度が崩壊感染のレベルに達していない可能性が示唆される。すなわち、第2章および第3章で予測されたMDVが部分的に活性化している細胞をISH法により検出した可能性が示された。

一般的には、転写産物の局在はその翻訳能と関係すると考えられている^{4, 104)}。感染CEFにおいては、MDV ICP4のmRNAは核内および細胞質内に検出された(図4-3)。また、FFE細胞においても感染CEFと同様にMDV ICP4のmRNAは核および細胞質に認められた(図4-4B)。核および細胞質における翻訳活性のあるmRNAの存在はHCMVの主要初期抗原転写産物で報告されている¹⁰⁴⁾。核内へのmRNAの蓄積は、プロセシングの障害等により翻訳が進まない状況を示す場合があるが⁴⁷⁾、HCMVの主要初期抗原転写産物についての報告¹⁰⁴⁾を勘案すると、MDV感染CEFで認められた核でのシグナルは、必ずしもMDV ICP4の翻訳を否定する知見ではない。また、神経内のリンパ様細胞ではMDV ICP4のmRNAは主として細胞質に認められたが、これらの細胞においてMDV ICP4の翻訳が効率よく進行しているとの証拠も得られていない。今後、これらのリンパ様細胞についてMDV ICP4遺伝子産物の局在が検討されるべきである。さらに、MDVの初期および後期蛋白質遺伝子の発現について、本研究で用いたISH法を用いて検討することにより、リンパ球中

のMDVの活性化の機序についての重要な知見を得ることができると考えられる。

4-5 小括

著者は、DIG標識cRNAプローブによるISH法を用いて感染鶏においてリンパ様細胞とその他の組織におけるMDV ICP4の発現を検出した。プローブのための遺伝子領域はMDV ICP4のORFの1 kb上流の0.55 kbを用いた。方法の確立に当たっては、試験管内感染細胞およびリンパ芽球様細胞株を用い、ウイルスが活性化している細胞でMDV ICP4のmRNAが検出される事を確認した。リンパ芽球様株化細胞MSB-1では、0.35%の細胞においてMDV ICP4のmRNAが検出された。この方法を用いて感染鶏の各組織中のMDV ICP4遺伝子の発現を調べたところ、細胞変性像が認められたFFEにおいてMDV ICP4のmRNA が検出された。また、肝臓、腎臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経に浸潤したリンパ様細胞においてプローブとの反応が検出された。FFE、肝および腎臓のリンパ球小結節ならびに腰仙骨神経叢および坐骨神経におけるMDV ICP4遺伝子の転写はRT-PCR法を用いても確認された。感染後の腫瘍の潜伏期において、リンパ様細胞の崩壊感染の頻度が低いことから、本研究においてISH法のシグナル陽性であったリンパ様細胞は、ウイルスが部分的に活性化した細胞であることが示唆される。

マレック病の発病機構の解明のためには、感染ウイルスの活性化機構を明らかにするとともにそれらの知見に基づいて組織内のウイルス転写産物の検出がもとめられる。マレック病ウイルス (MDV) については、ほとんどの遺伝子発現が抑制される潜伏感染から、ウイルス粒子形成を伴う崩壊感染まで、多様な感染形式が知られている。現在までに28のMDV遺伝子が報告されたにもかかわらず、それらの感染を決定づけるウイルス側の因子は報告されていない。著者は、アルファヘルペスウイルス群でウイルス活性化の初期因子として知られているヒト単純ヘルペスウイルスICP4のMDVのホモログ (MDV ICP4) に注目した。本研究は、MDV ICP4の感染初期過程におけるMDV遺伝子の活性化作用を明らかにするとともに、感染鶏内での検出を目的とする。

第一に、MDV ICP4のオープンリーディングフレーム (ORF) を含んだプラスミド (pSV-ICP4S) を作出し、ハイモビリティグループ (HMG) 蛋白質とリポソームを用いた方法でマレック病腫瘍株化細胞にトランスフェクトすることにより、短時間のうちにMDV ICP4を発現させた。その結果、腫瘍株化細胞に潜伏感染しているMDVゲノム上のMDV ICP4遺伝子の転写が促進された。一方、このMDV ICP4の発現にもかかわらず、MDVのDNAポリメラーゼ遺伝子については発現量の変化は認められず、pp38遺伝子の転写についてはわずかな増加が認められたが、有意ではなかった。また、MDVゲノムの細胞あたりのコピー数については、変化が認められなかった。これらの結果から、MDV ICP4の発現は、それ自身のDNAポリメラーゼによるゲノムの自律的複製を伴う全面的なウイルスの活性化にはいたらないことが示唆された。

磷酸化蛋白質pp38は、MD腫瘍において発現が認められている数少ないウイルス抗原で、腫瘍化への関与が議論されてきた。また、そのORFの上流にはICP4結合配列と2種の転写因子結合配列を含むプロモーター/エンハンサー領域が報告されており、MDV ICP4によって活性化される可能性が指摘されてきた。しかし

ながら、MDV ICP4をトランスフェクトした細胞において、pp38の発現量は、わずかな増加にとどまった。著者は、pp38のcDNA解析とプライマー伸長解析により、pp38のプロモーター/エンハンサー領域を同定し、さらに、cDNA上の翻訳領域からリコンビナント蛋白質を作出することにより、転写開始点の妥当性を確認した。これらの結果により確認された転写調節領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、pSV-ICP4Sと同時にMD腫瘍細胞に導入することにより、MDV ICP4のpp38プロモータ領域への直接の効果を検出した。これらの結果から、トランスフェクトされたMDV ICP4は、pp38プロモーター/エンハンサ領域を活性化することが示された。

上記の結果から、MDV ICP4は、少なくとも一部のウイルス遺伝子を活性化するが、最終的な活性化までには進行しないことが示唆された。このMDV ICP4遺伝子の転写を感染鶏中で検出するため、ノーザンブロット解析により、MDV ICP4のORFの1 kb上流の0.55 kbのDNA断片から転写されたcRNAをプローブとして選択した。この領域のdigoxigenin (DIG) 標識したcRNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーション (ISH) 法を行ったところ、92%のMDV感染CEFと0.35%のMSB-1において陽性シグナルを検出した。同時にISH法を行った非感染CEFがISH陰性であったことと、MSB-1細胞における陽性シグナルの頻度が報告されている抗原陽性比率と一致することから、ISH陽性シグナルがMDV ICP4遺伝子の転写を示すことが示唆された。続けて上記のDIG標識cRNAプローブを用いて感染鶏のパラフィン切片においてISH法を行ったところ、FFEならびに腎臓、肝臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経中に浸潤したリンパ様細胞においてMDV ICP4 mRNAの発現を検出した。これらの組織におけるMDV ICP4 mRNAの発現は、RT-PCR法によって確認された。

MDV ICP4トランスフェクション実験の結果から、MDV ICP4遺伝子の転写産物を検出するプローブを用いたISH法により崩壊感染細胞に加えて、崩壊感染の前段階と崩壊感染をおこさない細胞の一部が検出される可能性が示唆された。本研究では、崩壊感染が報告されているFFEに加えて、感染後の腫瘍の潜伏期にお

いては崩壊感染の頻度が低いことが予想されるリンパ様細胞においてもMDV ICP4のmRNAの陽性細胞の存在が認められた。これらのリンパ様細胞中においてはMDV遺伝子群が部分的に活性化している可能性も示唆される。本研究で確立されたISH法を用いて、MDV遺伝子を活性化するMDV ICP4遺伝子および活性化される遺伝子群の発現を感染鶏内で観察することにより、MD発病に関する重要な知見を得る事が可能となる。

第6章 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座教授 佐藤文昭先生に深く感謝いたします。また、本稿のご校閲をしていただきました、同研究科診断治療学講座教授 板倉智敏先生、同研究科環境獣医科学講座助教授 桑原幹典先生、並びに酪農学園大学獣医学科教授 林 正信先生に厚くお礼申し上げます。また本研究の遂行に際し、ウイルス学および分子生物学に関して多大なるご助言をいただきました東京医科歯科大学医学部教授 平井莞二先生、並びに、*in situ*ハイブリダイゼーション技術を始めとする種々の組織学的技術を提供いただくとともに研究全般にわたるご助言をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座助教授 昆 泰寛先生に深く感謝いたします。最後になりましたが、実験の遂行にあたり、多大なるご助力をいただきました、環境獣医科学講座放射線学教室各位に謹んでお礼申し上げます。

第7章 参考文献

1. Akiyama, Y. & Kato, S.: Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken J.* 17: 105-116, 1974.
2. Anderson, A.S., Francesconi, A. & Morgan, R.W.: Complete nucleotide sequence of the Marek's disease virus ICP4 gene. *Virology* 189: 657-667, 1992.
3. Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M. & Hauser, H.: Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68: 213-219, 1988.
4. Arthur, J., Efstathiou, S. & Simmons, A.: Intranuclear foci containing low abundance herpes simplex virus latency-associated transcripts visualized by non-isotopic *in situ* hybridization. *J. Gen. Virol.* 74: 1363-1370, 1993.
5. Becker, Y., Asher, Y., Tabor, E., Davidson, I. & Malkinson, M.: Open reading frames in a 4556 nucleotide sequence within MDV-1 *Bam*H I-D DNA fragment: evidence for splicing of mRNA from a new viral glycoprotein gene. *Virus Genes* 8: 55-69, 1994.
6. Biggs, P.M. & Milne, B.S.: Biological properties of a number of Marek's disease virus isolates. In: P.M. Biggs, G.deThé and L.N. Payne eds., *Oncogenesis and Herpesviruses*, pp.88-94, IARC, Lyons, 1972.
7. Binns, M.M. & Ross, N.L.: Nucleotide sequence of the Marek's disease virus (MDV) RB-1B A antigen gene and the identification of the MDV A antigen as the herpes simplex virus-1 glycoprotein C homologue. *Virus Res.* 12: 371-381, 1989.
8. Bradley, G., Hayashi, M., Lancz, G., Tanaka, A. & Nonoyama, M.: Structure of the Marek's disease virus *Bam*H I-H gene family: genes of putative importance for tumor induction. *J. Virol.* 63: 2534-2542, 1989.
9. Buckmaster, A.E., Scott, S.D., Sanderson, M.J., Boursnell, M.E., Ross, N.L. & Binns, M.M.: Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. *J. Gen. Virol.* 69: 2033-2042, 1988.
10. Calnek, B.W.: Marek's disease--a model for herpesvirus oncology. *Crit. Rev. Microbiol.* 12: 293-320, 1986.
11. Calnek, B.W., Adldinger, H.K. & Kahn, D.E.: Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219-233, 1970.
12. Calnek, B.W., Carlisle, J.C., Fabricant, J., Murthy, K.K. & Schat, K.A.: Comparative pathogenesis studies with oncogenic and nononcogenic Marek's disease viruses and turkey herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 40: 541-548, 1979.
13. Calnek, B.W. & Schat, K.A.: Proliferation of chicken lymphoblastoid cells after in vitro infection with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 35: 728-737, 1991.

14. Calnek, B.W., Schat, K.A., Ross, L.J., Shek, W.R. & Chen, C.L.: Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. In vivo infection. *Int. J. Cancer* 33: 389-398, 1984.
15. Calnek, B.W., Shek, W.R. & Schat, K.A.: Latent infections with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 585-590, 1981.
16. Calnek, B.W. & Witter, R.L.: Marek's Disease. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M.Reid, H.W.Yoder Jr. eds., Diseases of Poultry, 9th ed., pp.342-385, Iowa State University Press, Ames, 1991.
17. Camp, H.S., Coussens, P.M. & Silva, R.F.: Cloning, sequencing, and functional analysis of a Marek's disease virus origin of DNA replication. *J. Virol.* 65: 6320-6324, 1991.
18. Cantello, J.L., Anderson, A.S. & Morgan, R.W.: Identification of latency-associated transcripts that map antisense to the ICP4 homolog gene of Marek's disease virus. *J. Virol.* 68: 6280-6290, 1994.
19. Chen, X.B., Sondermeijer, P.J. & Velicer, L.F.: Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells. *J. Virol.* 66: 85-94, 1992.
20. Cheung, A.K.: DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res.* 17: 4637-4646, 1989.
21. Churchill, A.E. & Biggs, P.M.: Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 215: 528-530, 1967.
22. Churchill, A.E., Cubb, R.C. & Baxendale, C.W.: The attenuation with loss of oncogenicity of the herpes type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J. Gen. Virol.* 4: 557-564, 1969.
23. Churchill, A.E., Payne, L.N. & Cubb, R.C.: Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature* 221: 744-747, 1969.
24. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. & Strober, W. eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1991.
25. Coussens, P.M. & Velicer, L.F.: Structure and complete nucleotide sequence of the Marek's disease herpesvirus gp57-65 gene. *J. Virol.* 62: 2373-2379, 1988.
26. Cui, Z.Z., Lee, L.F., Liu, J.L. & Kung, H.J.: Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. *J. Virol.* 65: 6509-6515, 1991.
27. Cui, Z.Z., Yan, D. & Lee, L.F.: Marek's disease virus gene clones encoding virus-specific phosphorylated polypeptides and serological characterization of fusion proteins. *Virus Genes* 3: 309-322, 1990.
28. Delecluse, H.J. & Hammerschmidt, W.: Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J. Virol.* 67: 82-92, 1993.

29. Delecluse, H.J., Schuller, S. & Hammerschmidt, W.: Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *EMBO J.* **12**: 3277-3286, 1993.
30. Dunn, K. & Nazerian, K.: Induction of Marek's disease virus antigens by IdUrd in a chicken lymphoblastoid cell line. *J. Gen. Virol.* **34**: 413-419, 1977.
31. Endoh, D., Niikura, M., Hirai, K., Inagaki, N., Hayashi, M., Nakajima, K. & Sato, F.: Expression and purification of recombinant Marek's disease virus serotype 1 specific phosphorylated protein pp38 in *E. coli*. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 823-826, 1994.
32. Faber, S.W. & Wilcox, K.W.: Association of the herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with specific nucleotide sequences in DNA. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6067-6083, 1986.
33. Frazier, J.A. & Biggs, P.M.: Marek's disease herpesvirus particles in tissues from chickens free of precipitating antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**: 1519-1523, 1972.
34. Frebourg, T. & Brison, O.: Plasmid vectors with multiple cloning sites and cat-reporter gene for promoter cloning and analysis in animal cells. *Gene* **65**: 315-318, 1988.
35. Fujimoto, Y., Mikami, T., Narita, M. & Okada, K.: Pathological studies of Marek's disease in Japanese quail. *Jpn. J. Vet. Res.* **23**: 119-124, 1975.
36. Fukuchi, K., Sudo, M., Lee, Y.S., Tanaka, A. & Nonoyama, M.: Structure of Marek's disease virus DNA: detailed restriction enzyme map. *J. Virol.* **51**: 102-109, 1984.
37. Gowans, E.J., Jilbert, A.R. & Burrell, C.J.: Detection of specific DNA and RNA sequences in tissues and cells by *in situ* hybridization. In: R.H. Symons ed., *Nucleic Acid Probes*, pp.139-158. CRC Press, Boca Raton, 1989.
38. Grundy, F.J., Baumann, R.P. & O'Callaghan, D.J.: DNA sequence and comparative analyses of the equine herpesvirus type 1 immediate early gene. *Virology* **172**: 223-236, 1989.
39. Gu, B. & DeLuca, N.: Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **68**: 7953-7965, 1994.
40. Harty, R.N., Colle, C.F., Grundy, F.J. & O'Callaghan, D.J.: Mapping the termini and intron of the spliced immediate-early transcript of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **63**: 5101-5110, 1989.
41. Higashihara, T., Mikami, T., Kodama, H., Izawa, H. & Okada, I.: Comparison of the major histocompatibility antigen on Marek's disease-derived cell lines detected by membrane fluorescent antibody, cytotoxicity, and lymphoagglutination tests. *Poult. Sci.* **64**: 877-881, 1985.
42. Higashihara, T., Mikami, T., Onuma, M., Izawa, H., Matsuda, H. & Okada, I.: Expression of major histocompatibility antigens on Marek's disease lymphoma-

- derived cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* **46**: 105-113, 1984.
43. Hong, Y. & Coussens, P.M.: Identification of an immediate-early gene in the Marek's disease virus long internal repeat region which encodes a unique 14-kilodalton polypeptide. *J. Virol.* **68**: 3593-3603, 1994.
 44. Ihara, S., Feldman, S., Watanabe, S. & Ben-Porat, T.: Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. *Virology* **131**: 437-454, 1983.
 45. Ikuta, K., Nakajima, K., Naito, M., Ann, S.H., Ueda, S., Kato, S. & Hirai, K.: Identification of Marek's disease virus-specific antigens in Marek's disease lymphoblastoid cell lines using monoclonal antibody against virus-specific phosphorylated polypeptides. *Int. J. Cancer* **35**: 257-264, 1985.
 46. Iwata, A., Ueda, S., Ishihama, A. & Hirai, K.: Sequence determination of cDNA clones of transcripts from the tumor-associated region of the Marek's disease virus genome. *Virology* **187**: 805-808, 1992.
 47. Johnston, D.S.: The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**: 161-170, 1995.
 48. Jones, D., Lee, L., Liu, J.L., Kung, H.J. & Tillotson, J.K.: Marek's disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4042-4046, 1992.
 49. Kaneda, Y., Iwai, K. & Uchida, T.: Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* **243**: 375-378, 1989.
 50. Kato, K., Nakanishi, M., Kaneda, Y., Uchida, T. & Okada, Y.: Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. Co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. *J. Biol. Chem.* **266**: 3361-3364, 1991.
 51. Kawaguchi, Y., Maeda, K., Miyazawa, T., Ono, M., Kai, C. & Mikami, T.: Nucleotide sequence and characterization of the feline herpesvirus type 1 immediate early gene. *Virology* **204**: 430-435, 1994.
 52. Kon, Y., Endoh, D., Fukamizu, A., Murakami, K., Hashimoto, Y. & Sugimura, M.: A simple method of Hybridohistochemistry for detection of renin mRNA in the mouse kidney. *J. Vet. Med. Sci.* **55**: 461-463, 1993.
 53. Kost, T.A., Theodorakis, N. & Hughes, S.H.: The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* **11**: 8287-8301, 1983.
 54. Koptidesova, D., Kopacek, J., Zelnik, V., Ross, N.L., Pastorekova, S. & Pastorek, J.: Identification and characterization of a cDNA clone derived from the Marek's disease tumour cell line RPL1 encoding a homologue of alpha-transinducing factor (VP16) of HSV-1. *Arch. Virol.* **140**: 355-362, 1995.
 55. Kramer, M.F. & Coen, D.M.: Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* **69**: 1389-1399, 1995.
 56. Levy, H., Maray, T., Davidson, I., Malkinson, M. & Becker, Y.: Identification of

- viral proteins encoded by two DNA fragments of herpesvirus of turkeys (HVT). *Virus Genes* 5: 227-233, 1991.
57. Li, D.S., Pastorek, J., Zelnik, V., Smith, G.D. & Ross, L.J.: Identification of novel transcripts complementary to the Marek's disease virus homologue of the ICP4 gene of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 75: 1713-1722, 1994.
 58. MacGregor, G.R. & Caskey, C.T.: Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 2365, 1989.
 59. McKie, E.A., Ubukata, E., Hasegawa, S., Zhang, S.J., Nonoyama, M. & Tanaka, A.: The transcripts from the sequences flanking the short component of Marek's disease virus during latent infection form a unique family of 3'-coterminal RNAs. *J. Virol.* 69: 1310-1314, 1995.
 60. Metzler, D.W. & Wilcox, K.W.: Isolation of Herpes simplex virus regulatory protein ICP4 as a homodimeric complex. *J. Virol.* 55: 329-337, 1985.
 61. Moriguchi, R., Yoshida, H., Fujimoto, Y., Mikami, T. & Izawa, H.: Feather-pulp lesions in chickens with naturally occurring Marek's disease lymphomas. *Avian Dis.* 31: 156-168, 1987.
 62. Murthy, K.K. & Calnek, B.W.: Pathogenesis of Marek's disease; effect of immunization with inactivated viral and tumor-associated antigens. *Infect. Immun.* 26: 547-553, 1979.
 63. Nakajima, K., Ikuta, K., Naito, M., Ueda, S., Kato, S. & Hirai, K.: Analysis of Marek's disease virus serotype 1-specific phosphorylated polypeptides in virus-infected cells and Marek's disease lymphoblastoid cells. *J. Gen. Virol.* 68: 1379-1389, 1987.
 64. Ngu, V.A. & Osunkoya, B.O.: The Epstein-Barr Virus (EBV) and Marek's Disease. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 4: 37-40, 1973.
 65. Niikura, M., Matsuura, Y., Endoh, D., Onuma, M. & Mikami, T.: Expression of the Marek's disease virus (MDV) homolog of glycoprotein B of herpes simplex virus by a recombinant baculovirus and its identification as the B antigen (gp100, gp60, gp49) of MDV. *J. Virol.* 66: 2631-2638, 1992.
 66. Niikura, M., Matsuura, Y., Hattori, M., Onuma, M. & Mikami, T.: Expression of the A antigen (gp57-65) of Marek's disease virus by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.* 72: 1099-1104, 1991.
 67. Okazaki, W., Purchase, H.G. & Burmester, B.R.: Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* 14: 413-429, 1970.
 68. Payne, L.N.: Pathology. In: L.N. Payne ed., Marek's Disease, pp.43-75, Martinus Nijhoff, Boston, 1985.
 69. Payne, L.N. & Rennie, M.: Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1559-1573, 1973.
 70. Payne, L.N. & Rennie, M.: Sequential changes in the numbers of B and T lymphocytes and other leukocytes in the blood in Marek's disease. *Int. J. Cancer*

- 18: 510-520, 1976.
71. Peng, F., Bradley, G., Tanaka, A., Lancz, G. & Nonoyama, M.: Isolation and characterization of cDNAs from *Bam*H I-H gene family RNAs associated with the tumorigenicity of Marek's disease virus. *J. Virol.* **66**: 7389-7396, 1992.
 72. Prang, N., Wolf, H. & Schwarzmann, F.: Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J. Virol.* **69**: 2644-2648, 1995.
 73. Pratt, W.D., Cantello, J., Morgan, R.W. & Schat, K.A.: Enhanced expression of the Marek's disease virus-specific phosphoproteins after stable transfection of MSB-1 cells with the Marek's disease virus homologue of ICP4. *Virology* **201**: 132-136, 1994.
 74. Ren, D., Lee, L.F. & Coussens, P.M.: Identification and characterization of Marek's disease virus genes homologous to ICP27 and glycoprotein K of herpes simplex virus-1. *Virology* **204**: 242-250, 1994.
 75. Rivera, G.R., Imbalzano, A.N., Gu, B. & Deluca, N.A.: The role of ICP4 repressor activity in temporal expression of the IE-3 and latency-associated transcript promoters during HSV-1 infection. *Virology* **202**: 550-564, 1994.
 76. Roizman, B.: The family herpesviridae: general description, taxonomy, and classification. In: B. Roizman ed., *The Herpesviruses*, pp.1-23, Plenum Press, New York, 1982.
 77. Ross, L.J., Binns, M.M. & Pastorek, J.: DNA sequence and organization of genes in a 5.5 kbp EcoRI fragment mapping in the short unique segment of Marek's disease virus (strain RB1B). *J. Gen. Virol.* **72**: 949-954, 1991.
 78. Ross, N.L., DeLorbe, W., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Brahic, M. & Haase, A.: Persistence and expression of Marek's disease virus DNA in tumour cells and peripheral nerves studied by *in situ* hybridization. *J. Gen. Virol.* **57**: 285-296, 1981.
 79. Sakaguchi, M., Hirayama, Y., Maeda, H., Matsuo, K., Yamamoto, M. & Hirai, K.: Construction of recombinant Marek's disease virus type 1 (MDV1) expressing the Escherichia coli lacZ gene as a possible live vaccine vector: the US10 gene of MDV1 as a stable insertion site. *Vaccine* **12**: 953-957, 1994.
 80. Sakaguchi, M., Urakawa, T., Hirayama, Y., Miki, N., Yamamoto, M. & Hirai, K.: Sequence determination and genetic content of an 8.9-kb restriction fragment in the short unique region and the internal inverted repeat of Marek's disease virus type 1 DNA. *Virus Genes* **6**: 365-378, 1992.
 81. Sakaguchi, M., Urakawa, T., Hirayama, Y., Miki, N., Yamamoto, M., Zhu, G.S. & Hirai, K.: Marek's disease virus protein kinase gene identified within the short unique region of the viral genome is not essential for viral replication in cell culture and vaccine-induced immunity in chickens. *Virology* **195**: 140-148, 1993.
 82. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

83. Schat, K.A.: Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumours. *Cancer Surv.* 6: 1-37, 1987.
84. Schat, K.A.: Importance of cell-mediated immunity in Marek's disease and other viral tumor diseases. *Poult. Sci.* 70: 1165-1175, 1991.
85. Schat, K.A., Buckmaster, A. & Ross, L.J.: Partial transcription map of Marek's disease herpesvirus in lytically infected cells and lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 44: 101-109, 1989.
86. Schat, K.A. & Calnek, B.W.: Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 1075-1082, 1978.
87. Schat, K.A., Chen, C.L., Calnek, B.W. & Char, D.: Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J. Virol.* 65: 1408-1413, 1991.
88. Scott, S.D., Ross, N.L. & Binns, M.M.: Nucleotide and predicted amino acid sequences of the Marek's disease virus and turkey herpesvirus thymidine kinase genes; comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 70: 3055-3065, 1989.
89. Scott, S.D., Smith, G.D., Ross, N.L. & Binns, M.M.: 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, 1993.
90. Somogyi, T., Colimon, R. & Michelson, S.: An illustrated guide to the structure of the human cytomegalovirus genome and a review of transcription data. *Prog. Med. Virol.* 33: 99-133, 1986.
91. Spear, P.G. & Roizman, B.: Herpes simplex viruses. In: J. Tooze ed., DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses, pp.615-745, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980.
92. Sugaya, K., Bradley, G., Nonoyama, M. & Tanaka, A.: Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J. Virol.* 64: 5773-5782, 1990.
93. Sugimoto, C., Kodama, H. & Mikami, T.: Anti-tumor immunity against Marek's disease-derived lymphoblastoid cell line (MSB-1). *Jpn. J. Vet. Res.* 26: 57-67, 1978.
94. Sugimoto, C., Kodama, H. & Mikami, T.: Complement-dependent antibody cytotoxicity test of chicken antibody with duck complement used against cells of a Marek's disease lymphoma-derived cell line (MSB-1). *Avian Dis.* 23: 229-234, 1979.
95. Sui, D., Wu, P., Kung, H.J. & Lee, L.F.: Identification and characterization of a Marek's disease virus gene encoding DNA polymerase. *Virus Res.* 36: 269-278, 1995.
96. Suzuki, K., Mikami, T., Onuma, M., Kodama, H. & Izawa, H.: Properties of Marek's disease tumor-associated surface antigen of MSB-1 cells. *Zentralbl.*

- Veterinarmed. [B]* 28: 684-692, 1981.
97. Tomita, N., Higaki, J., Morishita, R., Kato, K., Mikami, H., Kaneda, Y. & Ogihara, T.: Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 129-134, 1992.
 98. Von Bülow, V. & Biggs, P.M.: Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. *Avian Pathol.* 4: 133-146, 1975.
 99. Watanabe, M.: Experiences with complement fixing sera from pigeons in avian leukosis. *Bibl. Haematol.* 36: 183-191, 1970.
 100. Witter, R.L., Nazerian, K., Purchase, H.G. & Burgoyne, G.H.: Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 31: 525-538, 1970.
 101. Witter, R.L., Sharma, J.M. & Fadly, A.M.: Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 24: 210-232, 1980.
 102. Witter, R.L., Silva, R.F. & Lee, L.F.: New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected biological and molecular characteristics. *Avian Dis.* 31: 829-840, 1987.
 103. Wu, C.-L. & Wilcox, K.W.: The conserved DNA-binding domains encoded by the herpes simplex virus type 1 ICP4, pseudorabies virus IE180, and varicella-zoster virus ORF62 genes recognize similar sites in the corresponding promoters. *J. Virol.* 65: 1149-1159, 1991.
 104. Wu, T.C., Lee, W.A., Pizzorno, M.C., Au, W.C., Chan, Y.J., Hruban, R.H., Hutchins, G.M. & Hayward, G.S.: Localization of the human cytomegalovirus 2.7-kb major early beta-gene transcripts by RNA *in situ* hybridization in permissive and nonpermissive infections. *Am. J. Pathol.* 141: 1247-1254, 1992.
 105. Yanagida, N., Yoshida, S., Nazerian, K. & Lee, L.F.: Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins. *J. Gen. Virol.* 74: 1837-1845, 1993.
 106. Yoshida, S., Lee, L.F., Yanagida, N. & Nazerian, K.: Identification and characterization of a Marek's disease virus gene homologous to glycoprotein L of herpes simplex virus. *Virology* 204: 414-419, 1994.

Enhancement of gene expression by Marek's disease virus homologue of the herpes simplex virus-1 ICP4

Daiji Endoh

Marek's disease (MD) is a disease of domestic chickens caused by cell-associated herpes virus (MDV) and characterized principally by T cell lymphoma and demyelinating peripheral neuropathy. Three general types of virus-cell interactions are recognized: lytic, latent and transforming. Activation of virus genes is an important step for determining virus-cell interactions. The MDV homologue of the herpes simplex virus-1-ICP4 (MDV ICP4) may be an important activator of virus genes. The aim of this study is to show the evidence for activation of virus genes by MDV ICP4 and the existence of the cells expressing MDV ICP4 in the tissues of MDV-infected chickens.

Although MD tumor cell line, MDCC-MSB-1 (MSB-1) contains multiple copies of MDV genomes, the transcription of MDV DNA occurs along limited portions of the viral genome. To observe the effect of MDV ICP4 on the expression of viral genes, I transfected MSB-1 tumor cells with plasmid including a coding region of MDV ICP4 using a cationic liposome. As carriers for intranuclear transport, high mobility group-1 and -2 proteins were bound to the plasmid DNA before forming liposomes. I detected transcripts from the plasmid 2 hr after transfection by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. I also detected abundant transcripts of MDV ICP4 from MDV genomes in MSB-1 cells (endogenous ICP4) 2 - 96 hr after transfection. Although there was no significant difference, transcripts of phosphorylated protein pp38 were also increased. These findings suggested that expression of the introduced MDV ICP4 gene enhanced the expression of endogenous MDV ICP4 and pp38. On the other hand, transcripts of MDV DNA polymerase were not detected in transfected MSB-1 cells and quantitative PCR analysis for virus genome DNA indicated

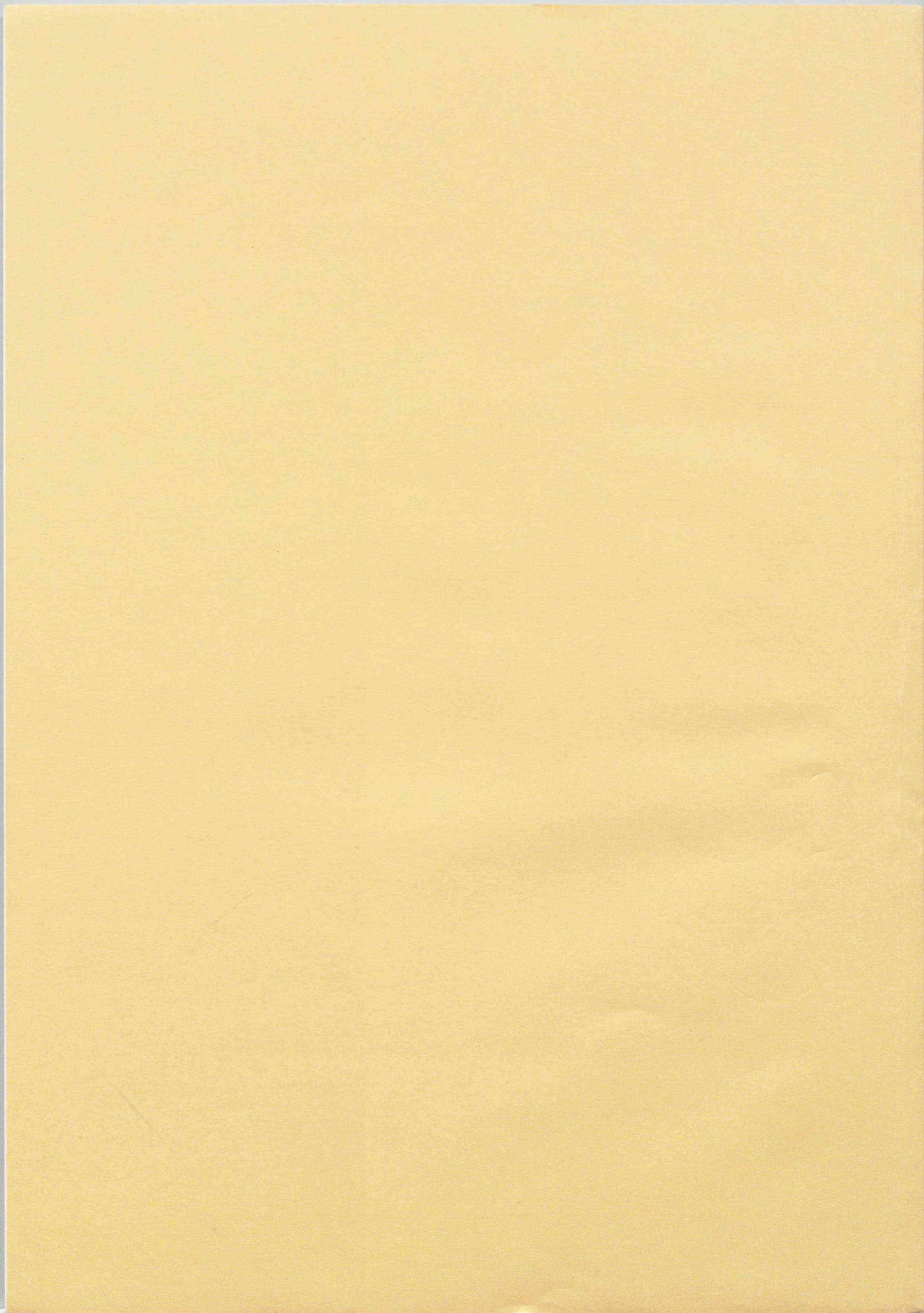
no significant alteration of copy number of the virus genome in transfected MSB-1 cells, suggesting that viral replication requires more than turning on the MDV ICP4 gene.

pp38 is one of few proteins that is detected in the MD lymphoma and lymphoblastoid cell lines and is also known as one of few proteins that could be detected on paraffin-embedded sections. Thus pp38 is an important indicator of MD-infected cells in MDV-infected tissues. In this study, the promoter/enhancer element of pp38 was identified by cDNA analysis and by open reading frame (ORF) analysis with recombinant protein. Namely, the cDNA coding full length pp38 was cloned and analyzed to ensure that the predicted ORF was the actual ORF *in vivo*. A full length recombinant protein coded by the entire open reading frame of the MDV pp38 cDNA was synthesized in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Immunoblot analysis indicated that the expressed recombinant protein had the same mobility as the pp38 in infected cells. These findings and the result of primer extension analysis showed that the promoter of pp38 exists 15-19 bases upstream from the 5'-end of the cDNA and that the enhancer sequences include ICP4, Sp-1 and Oct-1 binding elements. The promoter/enhancer fragment was ligated into plasmid pGV-B on just upstream of the luciferase gene as a reporter gene. The luciferase gene of the constructed plasmid was expressed in MSB-1 cells. Expression of the luciferase under the control of the promoter/enhancer of pp38 gene was enhanced when the cells were co-transfected with the MDV ICP4-expressing plasmid. These findings suggest that MDV ICP4 upregulates the enhancer of pp38.

Transfection experiments using MDV ICP4-expressing plasmid suggest that the expression of MDV ICP4 preceded the expression of early or late genes. Thus a variety stage of MDV infection may be detected using MDV ICP4 as an indicator. To observe the MDV ICP4-expressing cells *in vivo*, I showed transcripts of the MDV ICP4 on paraformaldehyde-fixed and paraffin embedded cells by *in situ* hybridization (ISH). A cRNA-probe synthesized from 0.55 kb DNA fragment clones from 1 kb upstream of ORF of

MDV ICP4 was selected as the probe for MDV ICP4 transcripts, as it hybridized to full length transcripts on Northern blot. Using the digoxigenin-labeled 0.55 kb cRNA probe, MDV ICP4 transcripts were detected in 92% of lytically-infected chicken embryo fibroblasts (CEF) and in 0.35% of MSB-1. No signal was observed on uninfected CEF. By this ISH method, I detected MDV ICP4 transcripts in the feather follicle epithelium (FFE), lymphoid cells in the liver, kidneys and nerve of infected chickens. The MDV ICP4 transcripts were also detected in the FFE, nerve and lymphocytic foci of liver and kidney by RT-PCR.

In conclusion, MDV ICP4 is suggested to activate some MDV genes, while infection does not proceed to the lytic stage with MDV ICP4 alone. And I detected the MDV ICP4 transcripts in the lymphoid cells of MDV-infected chickens by the ISH method. As the significant proportion of lymphoid cells are reported to be non-lytic on the pre-tumorigenic stage, ISH signals in the lymphoid cells may indicate the partial activation of MDV genes by MDV ICP4. The application of the ISH method on the observation of the expression of viral transactivators may resulted in significant advances in understanding the mechanisms for tumorigenesis by MDV.

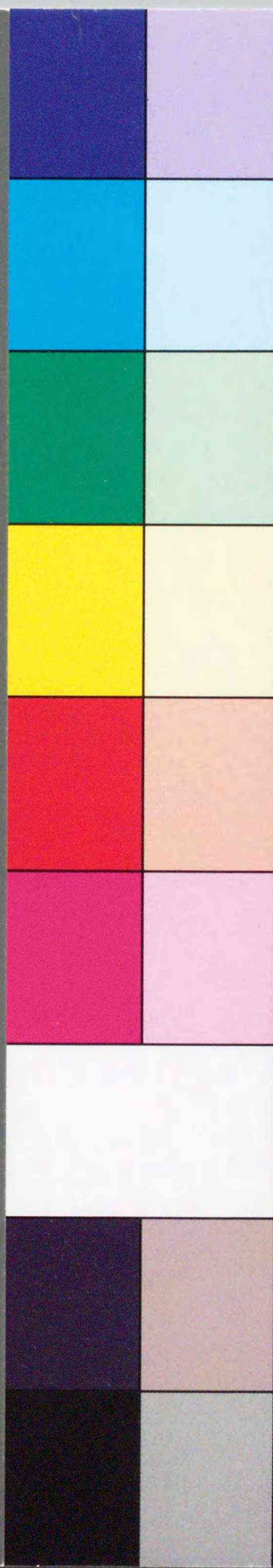


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

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

