

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 泉屋 吉宏

指導教官名 高橋 英司

The Genome of Marek's disease virus

(マレック病ウイルスゲノム)

マレック病(MD)は 1960 年頃から多くの国々で養鶏産業に大きな被害を及ぼしている鶏の伝染性悪性 T リンパ腫である。MD の原因となるのが細胞随伴性の増殖を示すマレック病ウイルス(MDV)であり、現在までに各国で数多く分離されている。その後 MDV と血清学的に交差するウイルス株が健康な鶏や七面鳥その他の鶉鶏類の鳥から分離され、現在は血清学的に関連のあるこれらのウイルスは、3つの血清型(MDV1, MDV2, MDV3=HVT:七面鳥ヘルペスウイルス)に分類されている。これら血清型による分類はウイルスの腫瘍原性の有無による分類と完全に重なる。すなわち、腫瘍原性のあるウイルス株はすべて MDV1 に属する。MD の発症はワクチンによって防御される。現在はワクチンとして、培養細胞で継代し弱毒化した MDV1 や非腫瘍原性である MDV2、または HVT が単独もしくは混合して用いられている。

MDV は当初、その T 細胞親和性や自然宿主に対して T リンパ腫を引き起こすことから、腫瘍原性をもつヘルペスウイルスの多くが属する *gammaherpesvirus* に分類された。しかしその後の分子生物学的解析から、MDV は明らかな腫瘍原性は示さない *alphaherpesvirus* と系統発生的に近似し、一部の遺伝子を除いて *gammaherpesvirus* とは類似していないことが示唆された。現在では MDV は、その遺伝子構造から *alphaherpesvirus* に分類されている。このことは、腫瘍発生機構を解明するにあたって、遺伝子構造が異なるため *gammaherpesvirus* を比較対照とすることが難しいことを示している。これゆえ MDV1 の腫瘍原性を解明する1つの手段として、非腫瘍原性である MDV2 と腫瘍原性である MDV1 を比較解析する方法を着想した。また、MDV のその特異的生物学的性状についての解析も非常に重要な課題である。MDV の特性に係わる遺伝子としては、3つの MDV に共通して認められ、なお且つ他の *alphaherpesvirus* には保存されていない遺伝子が関わっている可能性が考えられる。

本研究はこれら課題を解明することを最終目的として、2部から構成されている。第1部においてはMDV2の全塩基配列を決定し、MDV1の遺伝子及び他の alphaherpesvirus の遺伝子と比較解析を行った。第2部ではMDVに特異的に認められる遺伝子を大腸菌及びバキュロウイルス発現系を用いて発現し、特異抗体を作成後、MDV感染細胞における特異的遺伝子の翻訳産物の同定を行った。

第一部 MDV の遺伝学的研究

MDVの研究は他の alphaherpesvirus の研究に比べ、その引き起こす病気の重要性を考慮すると非常に遅れていると言えよう。これは、MDVが細胞随伴性の増殖を示すために取り扱いが容易ではないこととその遺伝子情報が部分的にしか明らかになっていないためであると考えられた。そこで著者は、MDV2ゲノム完全長の塩基配列の解析を行い、MDV2の全塩基配列の決定を完了することに成功した。遺伝子解析は以前当研究室で作製したゲノムライブラリーを用いて行った。完全長の塩基配列を決定するため、著者はゲノムライブラリーに欠けていた *EcoRI*-A(24.8 kb)及び-B(18.0 kb)断片をコスミド・ベクターにクローニングした。次にサブクローニングを行い、デリーション・クローンを作成後センス及びアンチセンス両方の塩基配列を決定した。断片のつなぎ目となる部分はダイレクトシーケンスにより確認を行った。この結果、MDV2の遺伝子は164,270 bpより構成され、そのG+C含量は53.6%であることが明らかとなった。MDV2ゲノムには合計102個の蛋白をコードし得る open reading frames(ORFs)が認められた。同定された多くのMDV2遺伝子は人単純ヘルペスウイルス(HSV-1)の相同領域に存在する遺伝子と相同性が認められた。そこで、HSV-1の遺伝子に準じてMDV2遺伝子の命名を行った。

次に遺伝子の領域毎に詳細な解析を行った。MDV2ゲノムの Unique Short 領域は12,109 bpで構成され、12個の蛋白をコードし得る ORF が認められた。これらのうち7つはHSV-1の遺伝子と相同性が認められたが、残り5つには認められなかった。また、鳥類のヘルペスウイルスに特異的に保存されている遺伝子(SORF3)がMDV2においても認められた。さらに、転写産物の解析により2つの遺伝子を除くすべてのこの領域の遺伝子が mRNA に転写されていることが明らかとなった。

MDV2の Unique Long 領域は109,933 bpよりなり、68個の蛋白をコードすると考えられる ORF が存在した。これら領域のG+C含量は50.3%であった。68個のORFのうち60個が他の alphaherpesvirus と相同性が認められ、5つのORFがMDVにのみ共通して保存されていた。今後MDVの特異的生物学的性状との関係について、これらの遺伝子のさらなる解析が必要であると思われる。さらに、この領域の転写産物の解析を行った結果、UL21、UL41相同遺伝子以外のすべての遺伝子が unique もしくは3'末端を共有する mRNA に転写されている事が明らかとなった。

Terminal Repeat Long 及び Internal Repeat Long 領域はともに11,825 bpよりなりそれらのG+C含量は62.2%であった。これらの領域にはDNA複製起点が存在し、UL9蛋白が認識すると考えら

れる CGTTCGCAC モチーフが保存されていた。また他の鳥類のヘルペスウイルスと同様に ICP0 相同遺伝子は保存されていなかった。このことから、鳥類のヘルペスウイルスの再活性化には哺乳類のヘルペスウイルスとは異なった機構が存在する可能性が示唆された。また、これらの領域には9つの ORF 様配列が存在していたが、それらの ORF の配置は他のすべてのヘルペスウイルスと全く異なり、その推定アミノ酸配列についても他のヘルペスウイルス蛋白との相同性は認められなかった。また、これらの領域においては UL 及び US 領域と異なり、MDV1 と全く相同性が存在せず、さらに腫瘍の原因と考えられている *meq* の相同体も保存されていなかった。このことは、なぜ MDV2 が非腫瘍原性であるのかを示唆するものである。

Terminal Repeat Short 及び Internal Repeat Short 領域はそれぞれ 9,481 bp 及び 9,098 bp より構成され、それらの領域には ICP4 相同遺伝子が保存されていた。MDV2 の ICP4 遺伝子は最初の開始コドンから翻訳されていると仮定した場合、6,099 bp とすべてのヘルペスウイルスの中で最も大きく、MDV1 ICP4 蛋白との相同性は 47.3 %であった。MDV1 GA 株の ICP4 蛋白とは 810 番目のメチオニンから相同性が認められることから、今後の課題として実際の翻訳開始部位を決定する必要があると思われた。

ヘルペスウイルスにはゲノムの末端にゲノムの cleavage 及び packaging signal として共通したモチーフが存在する。しかし、MDV2 には他の alphaherpesvirus とは異なり、他のリンパ球指向性ヘルペスウイルスと類似してテロメア配列がこのモチーフ内に存在していた。このテロメア配列のウイルスの複製や細胞指向性との関係については未だ明らかではないが、リンパ球指向性ヘルペスウイルスに共通して存在する事から DNA 複製や宿主細胞のゲノムへの組み込みなどの重要な役割があるのではないかと推定された。さらに、この繰り返しの数は MDV1 のそれとは大きく異なり、またクローンによってもその数は異なることから、非常に多様性のある領域であることが示唆された。

第一部で得られた結果は、今後の MDV の研究に大いに役立つことが期待でき、特に、腫瘍発生機構の解明や MDV の特異的生物学性状を理解する上で有用であると考えられた。

第二部 MDV 特異的遺伝子産物の同定

第1部で得られた結果から、MDV には少なくとも5つの特異的な遺伝子が保存されている事が明らかとなった。これら遺伝子のうち、MDV2 ORF873 遺伝子の機能解析を行うために、まず、ORF873 遺伝子を部分的にクローニングし、大腸菌で組換え蛋白を発現させた。精製した組換え発現蛋白をマウスに免疫し、特異的な血清と1つのモノクローナル抗体を作出した。また、バキュロウイルス発現系を用いた ORF873 組換え蛋白も作製した。この蛋白は先の特異抗体によって 108kDa の蛋白として発現していることが確認されるとともに、特異抗体の有用性が確認された。次にバキュロウイルスによって発現された組換え蛋白を用いて、この蛋白の免疫原性について検討した。この結果、この蛋

白は3つの血清型のいずれの感染血清とも反応せず、少なくとも以前の研究で明らかとされた glycoprotein I, E や pp38 蛋白に比べて免疫原性が低いことが示唆された。次にマウスで作製した特異抗体を用いたイムノプロット解析によって、MDV 特異的蛋白が感染細胞中で発現されているかを検討した。その結果、この MDV 特異蛋白は MDV2 感染細胞中で 108 kDa の蛋白として発現されていることが確認された。推定アミノ酸配列から、これらの蛋白には糖鎖付加可能部位及び、疎水性の高い膜貫通領域と考えられる領域が存在し膜糖蛋白であると考えられたが、推定アミノ酸配列より計算した分子量と同じであったことと、ツニカマイシンによって糖鎖付加を抑制しても分子量の減少が認められなかったことから、糖蛋白ではないことが明らかとなった。発現部位については作成したモノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法で解析したところ、これらの蛋白は細胞質内で発現している可能性が示唆された。さらに、この蛋白は細胞骨格にそって検出され、アクチンもしくはチューブリンなどの宿主因子と相互作用しているのではないかと考えられた。

MDV2 の全塩基配列を決定することによって、MDV2 には MDV1 において腫瘍発生の原因遺伝子であると考えられている *meq* 遺伝子が認められなかった。この結果は MDV1 の腫瘍を引き起こす原因が *meq* である可能性を強く示唆するものである。また、MDV には血清型間に共通して保存されている特異的遺伝子が少なくとも5つ存在することが今回初めて明らかとなった。今後はこれらの遺伝子の機能についての研究が重要である。

本研究は MDV で最初に全塩基配列が明らかにするものであったが、この基礎的研究成果は、今後の MDV の分子生物学的研究に大きく貢献するものであると考えられる。