

## 論文内容の要旨

応用動物科学専攻  
平成 13 年度博士課程入学

氏名 ORKASH HUSHUR  
(ウリケシ ワシュル)  
指導教官氏名 小野寺 節

### Molecular Biological Studies on Alphaherpesviruses with a Narrow Host Range (宿主域の狭いアルファヘルペスウイルスに関する分子生物学的研究)

アルファヘルペスウイルス亜科はヘルペスウイルス科に設定されている 3 つの亜科のうちのひとつである。本ウイルス亜科には、本研究の対象であるウシヘルペスウイルス 1 型 (BHV-1) とイヌヘルペスウイルス (CHV) に加え、オーエスキー病ウイルス (PRV)、マレック病ウイルス、ウマヘルペスウイルス 1 型などの獣医学分野で重要なウイルスが数多く含まれている。ヘルペスウイルスは 120 から 250kbp の二本鎖 DNA をゲノムとする大型ウイルスであり、直径 100-110nm の正二十面体構造のヌクレオカプシドとそれを取り囲むテグメントとエンベロープでウイルス粒子は形成されている。エンベロープには少なくとも 10 種類の糖タンパクが存在し、ウイルスの吸着、侵入に重要な役割を果たすと考えられている。侵入したヌクレオカプシドは細胞質内を移動して核にウイルス DNA を移行させる。ウイルス DNA からは前初期、初期、後期の 3 遺伝子群がカスケード様に発現し、ウイルス DNA の複製とウイルスタンパクの産生がなされる。核内で組み立てられたヌクレオカプシドは核膜と細胞質膜に出芽してエンベロープを獲得し成熟ウイルスとなる。

アルファヘルペスウイルスの中で最も研究が進んでいるヒト単純ヘルペスウイルス、PRV、ウマヘルペスウイルス 1 型などは多くの動物種由来の培養細胞で増殖が可能で、自然宿主以外の動物に対しても病原性を示し、広い宿主域を有する。特に PRV は自然宿主であるブタに加え、ヒトを除くほとんどのほ乳類に感染が可能で、感染した場合は重篤な神経症状を引き起こす。対照的に、同じアルファヘルペスウイルスに分類される BHV-1 と CHV の宿主域は狭く、本来の宿主であるウシとイヌにしか通常は病原性を示さず、自然宿主以外の動物由来の培養細胞では増殖しないことが多い。このように同じアルファヘルペスウイルスには宿主域の広いものと狭いものが知られているが、その理由には不明な点が多く残されている。本研究では宿主域の狭いアルファヘルペスウイルスである BHV-1 と CHV の増殖性状の解明を進めるため、その前初期遺伝子と糖タンパクの機能について解析した。さらに、ウイルスベクターとして期待される CHV の分子生物学的研究を飛躍的に向上させるため、CHV のゲノム全体のクローニ化を試みた。

## 第一章 前初期遺伝子発現以降におけるウシヘルペスウイルス 1 型の増殖抑制

BHV-1 は世界中に分布するウシの重篤な呼吸器症の原因であり、生殖器への感染も起こす重要な病原体である。BHV-1 はウシ由来の MDBK 細胞ではよく増殖するが、マウス由来の A31 細胞では増殖しない。一方、PRV は両細胞で増殖が可能である。BHV-1 のゲノムに PRV の糖タンパク gB と gC を組み込むと A31 細胞への侵入効率が向上するが、核へ移行したゲノムの前初期 (IE) 遺伝子のひとつである ICP4 の転写が検出されず、増殖は認められないことが報告されている。そこで、BHV-1 の前初期遺伝子が A31 細胞でなぜ活性化しないかを解明するため、IE 遺伝子のプロモーター活性を PRV と比較することにより解析した。

緑色蛍光色素 (GFP) 遺伝子上流に BHV-1 と PRV の IE プロモーターをそれぞれ組み込んだプラスミドを MDBK 細胞と A31 細胞へ導入して、GFP の発現を比較した。

MDBK 細胞では両プロモーターともよく機能して GFP の強い発現が認められた。A31 細胞では、PRV のプロモーターにより強い GFP の発現が認められたのに対して、BHV-1 のプロモーターは著しく弱い活性しか示さなかった。そこで、ニワトリベータアクチンプロモーターにより BHV-1 の IE 遺伝子を A31 細胞でも強く発現するプラスミドを構築した。本プラスミドを感染性 BHV-1 ゲノム DNA とともに A31 細胞へ導入したが、ウイルスの再生産は認められなかった。以上のことから A31 細胞のような非感受性細胞での BHV-1 の増殖は IE 遺伝子の発現に加え、それ以降の段階でも制約を受ける可能性が明らかになった。

## 第二章 糖タンパク G をコードする塩基配列を欠くイヌヘルペスウイルス変異株の作出とその性状

ヘルペスウイルスの各種糖タンパクは細胞への吸着、侵入に重要な役割を果たし、その宿主域に大きな影響を与えるものと考えられている。CHV の糖タンパクについては gB、gC、gD などについての研究が行われているが、gG の機能についての研究は全く行われていない。そこで、gG 遺伝子の塩基配列を欠如した CHV 変異株を作出し、その性状を解析した。

gG 遺伝子欠損 CHV 変異株 (CHVdG) の増殖曲線を、親株を対照に用いて作成したところ、細胞外へのウイルス産生量には有意な差は認められなかった。吸着効率も同程度であり、gG が少なくとも培養細胞レベルでは非必須遺伝子であることが示された。一方、プラックサイズは CHVdG の方が小さく、培養液を介さない cell-to-cell での感染の広がり効率が低いことが示唆された。そこでメチルセルロースを含む半固形培地下での増殖曲線を検討したところ、増殖効率が親株にくらべ抑制されることが示された。以上のことから CHV の gG は非必須遺伝子であるが、最初に感染した細胞から隣接した細胞への感染拡大の効率を高める機能があることが推定された。

### 第三章 イヌヘルペスウイルスゲノムの感染性 Bacterial Artificial genome としてのクローニング

ヘルペスウイルスの宿主域を含む分子生物学的研究には第二章で用いたような組換え体の作出が必要不可欠であるが、従来の真核細胞内での相同組換え法ではその作出には時間がかかるとともに、煩雑な過程と熟練した手技も必要とされる。一方、ヘルペスウイルスのゲノムは大きく、通常のプラスミドにクローン化することは不可能である。そこで、巨大な DNA のクローン化も可能である Bacterial Artificial genome (BAC) に CHV のゲノムを組み込み、感染性 BAC としてクローン化し、簡便な組換え法を可能とすることを試みた。

BAC ベクターである pBeloBACII に GFP 遺伝子を追加挿入し、さらに CHV のチミジンキナーゼ遺伝子の中に組み込んだ導入用プラスミドを構築した。本プラスミドを CHV 感染細胞に導入し、相同組換えが起きたゲノムに由来する CHV を GFP の発現を指標に選択し、ブラック純化した。選択された CHV (CHV/BAC) は BAC ベクターをゲノム内に有しており、その感染細胞内の環状化ゲノム DNA を抽出し、大腸菌を形質転換することによりクローン化することに成功した。大腸菌の中でクローン化された CHV/BAC の DNA を MDCK 細胞へ導入することにより、感染性のウイルス、CHV/BAC2 を回収することもできた。制限酵素切断地図解析により、CHV/BAC と CHV/BAC2 とともに TK 遺伝子中に BAC ベクターが挿入されていることが示されるとともに、他の遺伝子には変化がないことが確認された。作出された CHV/BAC ゲノムは大腸菌の中で迅速かつ簡便に行いうる数多くの DNA 改変の手法を応用することを可能にするものと考えられる。

本研究により得られた宿主域の狭いアルファヘルペスウイルスである BHV-1 と CHV の増殖に関する新たな知見に加え、BAC にクローン化された CHV ゲノムは今後のアルファヘルペスウイルスの宿主域を規定する因子の解明に貢献するとともに、CHV をベクターとする新規ワクチンや遺伝子治療の開発研究に貢献するものと期待される。