

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

ウリケシ ワシユル

氏名 ORKASH HUSHUR

ヘルペスウイルスは二本鎖 DNA をゲノムとし、エンベロープを有する大型ウイルスである。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。本亜科で最も研究が進んでいるヒト単純ヘルペスウイルス、オーエスキー病ウイルス (PRV) などは広い宿主域を有するのに対し、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) の宿主域は狭い。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 (IE) 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ン化を試みた。

### 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 はウシ由来の MDBK 細胞で増殖するが、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 の糖タンパクを組み込むと A31 細胞への侵入効率が向上するが、IE 遺伝子の転写が検出されず、増殖は認められない。そこで、BHV-1 の IE 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 と比較した。緑色蛍光色素 (GFP) 遺伝子の下流に両ウイルスの 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たが、A31 細胞では 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、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

CHV の糖タンパクのひとつである 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 での感染の広がりの効率が低いことが示唆された。そこで半固形培地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

巨大な DNA のクローニングも可能である Bacterial Artificial genome (BAC) に CHV のゲノムを組み込み、感染性 DNA としてクローニングを試みた。BAC ベクターと GFP 遺伝子を 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 CHV を GFP の発現を指標に選択した。選択された CHV (CHV/BAC) 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ニングに成功した。クローニングされた CHV/BAC の DNA を培養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な DNA 改変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 にクローニングされた 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。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)論文として価値あるものと認めた。