

Title	水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) によりbiochemical transformさせたマウス細胞中のウイルスDNA, RNA, タンパクの解析
Author(s)	Harvey, Campo-Vera
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35264">https://hdl.handle.net/11094/35264</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	ハルベイ カンポ ベラ HARVEY CAMPO-VERA
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7662 号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)によりbiochemical transform させたマウス細胞中のウイルスDNA, RNA, タンパクの解析
論文審査委員	(主査) 教授 高橋 理明 (副査) 教授 加藤 四郎 教授 羽倉 明

### 論文内容の要旨

#### [目的]

VZVは一般に小児期に感染しその後ウイルスは体内の神経細胞に潜伏し、免疫機能の低下や加齢により再活性化され帯状疱疹となることが知られている。しかしその潜伏感染や再活性化の機構は未だ解明されていない。一方in vitroではVZVはヒトの細胞に感染させると細胞を破壊し完全増殖をするが、マウスの細胞では不完全増殖をする。私共の研究室ではさきにVZVをマウスL細胞チミジンキナーゼ欠如(LTK<sup>-</sup>)細胞に感染させ、いわゆるbiochemical transform細胞を得ているがその細胞中でのウイルスDNA, RNA及びタンパクの発現の解析を行いin vitroにおけるVZVの潜伏状態の解明を目ざした。

#### [方法]

- 1) ウイルス及び細胞: VZVはOka及びKawaguchi株が用い、ウイルスの増殖にはヒト胎児繊維芽細胞(HEF)を用いた。又マウス細胞(LTK<sup>-</sup>)をVZVでbiochemical transformさせた細胞L(O)cl 3, 13, 33, cl(K)cl 1, 2, 3を用いた。
- 2) VZV-DNAのクローニング: VZV(Oka株)のDNAをウイルス粒子より精製しSstI, Hind IIIで切断しPUC12にてクローニングを行った。又クローニングされたSstIのG断片を更にAclIで切断しDNAL断片のクローニングを行った(pkA-5H)。
- 3) 細胞DNAの調整: biochemical transform細胞を集めて洗浄後SDS, Pronase Kを加えて溶解した。更にフェノール+クロロフォルム液で処理しイソプロパノールを加えてDNAを沈澱させた。
- 4) Southern blot: 細胞より抽出したDNAをBamHI及びBglIIで切断し0.5% agarose中で泳動さ

- せ、ニトロセルロースに transfer して in vitro で nick translate させたウイルス DNA と反応させた。
- 5) Northern blot : biochemical transform させた LTK<sup>+</sup>細胞を Guanidine/CsCl を加えて細胞を溶解し更にエタノールで RNA を沈澱させ精製し 1.5% agarose 中で泳動し更にニトロセルロースに transfer して材料とした。
  - 6) ウイルスタンパクの解析 : LTK<sup>+</sup>細胞及び感染 HEF 細胞を <sup>35</sup>S-メチオニンでラベルし detergent にて溶解後 VZV の糖タンパクに対するモノクローン抗体 (McAb) で免疫沈澱させ更に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて解析した。
  - 7) 蛍光抗体法 : LTK<sup>+</sup>細胞を VZV-McAb を用いて間接法にて染色した。

#### [成 績]

- 1) マウス細胞中のウイルス DNA の検索 : 6 種の LTK<sup>+</sup>細胞の DNA を Bg III にて切断しウイルス DNA と Southern blot を行った結果いずれの biochemical transform 細胞にもウイルス感染 HEF 細胞中よりの DNA 切断パターンと同様のパターンが見いだされた。
- 2) マウス L(O)cl 3 細胞中の RNA を抽出し Northern blot し Pst-C, Hind III-D 及び pKA-5H DNA クローンとの hybridize させた結果 Pst-C とは 4 種の, Hind III-D とは 3 種の, pKA-5H (VZV の gpI をコードしている) とは 2 層の RNA が反応した。いずれの RNA も VZV 感染 HEF 細胞中にも見いだされた。
- 3) L(O)cl 3 細胞と gp I, II, IV と反応する McAb と反応させ蛍光抗体法で抗原の有無を検索した結果 gp I の McAb のみが反応した。
- 4) L(O)cl 3 を <sup>35</sup>S-メチオニンでラベルし抗 gp I McAb と反応させ SDS-PAGE にて分析した結果分子量 83-94,000 の抗原と反応した。

#### [総 括]

- 1) VZV で biochemical transform したマウス細胞中には VZV-DNA がほぼ完全な形で存在した。
- 2) クローニングされた VZV-DNA を用いてマウス細胞よりの RNA と Northern blotting を行った結果ウイルス感染 HEF 細胞よりの RNA と同じ分子量の RNA が見いだされた。
- 3) 3-4% の細胞が VZV-糖タンパク gp I を発現していることが蛍光抗体及び SDS-PAGE にて見いだされた。

以上の結果より VZV はマウス細胞では abortive な感染をおこし, biochemical transform 細胞ではウイルス DNA, RNA は lytic な感染とほぼ同様に見いだされるが, ウイルスタンパクは完全には発現されていないことが判明した。この VZV 感染系は VZV の潜伏感染の機構を in vitro レベルで解析するための有用な系となりうる可能性がある。

### 論文の審査結果の要旨

- (1) VZV で biochemical transform したマウス細胞中には VZV-DNA がほぼ完全な形で存在した。

- (2) クローニングされたVZV-DNAを用いてマウス細胞よりのRNAとNorthern blottingを行った結果ウイルス感染細胞よりのRNAと同じ分子量のRNAが見出された。
- (3) 3～4%の細胞がVZV-糖タンパク gp Iを発現していることが蛍光抗体法及びSDS-PAGEにて見出された。

以上の結果よりVZVはマウス細胞ではabortiveな感染をおこしbiochemical transform細胞ではウイルスDNA, RNAはlyticな感染とほぼ同様に見出されるが, ウイルスタンパクは完全には発現されていないことが判明した。このVZV感染系はVZVの潜伏感染の機構をin vitroレベルで解析するための有用な系となりうる可能性がある。