



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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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指した。

## [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纖維芽細胞 (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 Accl で切断し DNA L 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 を沈殿させた。
- 4) Southern blot: 細胞より抽出した DNA を BamH I 及び Bgl II 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を沈殿させ精製し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ナル抗体(McAb)で免疫沈殿させ更に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にて切斷しウイルス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切斷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gp1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。