



Title	マレック病ウイルス感染細胞及びマレック病リンパ腫細胞より検出されたマレック病ウイルス1型特異的リン酸化蛋白に関する研究
Author(s)	中島, 員洋
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35303
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	なか	じま	かず	ひろ
	中	島	員	洋
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7 6 5 9	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	マレック病ウイルス感染細胞及びマレック病リンパ腫細胞より検出 されたマレック病ウイルス1型特異的リン酸化蛋白に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教 授	加藤	四郎	
	(副査)			
	教 授	高橋	理明	教 授 羽倉 明

論文内容の要旨

〔目 的〕

マレック病（MD）ウイルス（MDV）は、ヘルペスウイルス科に属し、血清型として3型（MDV 1, MDV 2, MDV 3）に分類されている。MDV 1は、腫瘍原性株であり、ニワトリに悪性リンパ腫をおこす。この株は、培養細胞を継代することにより容易に腫瘍原性を失う。MDV 2及びMDV 3は、非腫瘍原性株であり、MDV 3は、シチメンチョウヘルペスウイルス（HVT）とも呼ばれMD予防ワクチンとして用いられている。本研究室で最初にMDリンパ腫由来細胞株（MDLCL）が樹立されて以来、数々のMDLCLが報告されている。MDリンパ腫及びMDLCLには、何れもMDV 1遺伝子の存在することが示されているが、MDV 1特異抗原は見出されていない。本研究の目的は、MDLCLや、MDV 1感染細胞を抗原とするマウスの単クローン抗体（MAb）を作製し、MDV 1特異的腫瘍抗原を同定することにある。

〔方 法〕

1. ウイルスと細胞：MDV 1としてBC-1株、JM株、C2株、MDV 2としてHPRS24株、MDV 3（HVT）として01株を用いた。ウイルス感染系としてニワトリ胚線維芽細胞を用いた。MDLCLとしてMDCC-MSB1、MDCC-LS1、MDCC-RP1、ニワトリリンパ性白血病（LL）由来細胞として、LSCC-1104B1を用いた。
2. MAbの作製：MDV 1感染細胞及びMDCC-MSB1の可溶画分からニワトリ抗MDV 1抗体結合セファロース4Bカラムクロマトグラフィーにより精製濃縮される画分を免疫原としてマウスハイブリドーマを作製した。

3. 生化学的解析：感染細胞及びリンパ腫細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニン及び $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で標識後、免疫沈澱を行ない、1次元、2次元SDS-PAGEにより解析した。細胞分画は、Kruegerらの方法を用いた。リン酸化アミノ酸の解析、ペプチドマッピング、ウエスタンブロッティングは常法により行なった。mRNAは抽出後、蔗糖密度勾配沈降法により分画し、in vitroでの翻訳系を用いて解析した。
4. 動物実験：3週齢のSPF鶏にMDV 1 JM株を接種して発症したMD鶏の皮膚及び腫瘍病巣の凍結切片標本を作製後、MA bを用いた蛍光抗体間接法により抗原の発現を検索した。

[成 績]

1. MDLCL内に発現しているMDV 1 抗原に対するMA bの作製。
 - 1) MDV 1 感染細胞を抗原として免疫したマウスより3株、MDCC-MSB 1を抗原として免疫したマウスより4株のハイブリドーマを得た。これらのMA bは、MDV 1 感染細胞とのみ反応した。
 - 2) これらのMA bは、MDLCL (MDV 1 産生細胞を含む株、MDV非産生細胞のみよりなる株の何れも)をIUdR処理するか、低温(33°C)で培養した場合に、その細胞質と反応した。
2. MDV 1 特異的リン酸化蛋白の生化学的解析。
 - 1) これらMA bを用いた免疫沈澱法により $[^{35}\text{S}]$ メチオニンあるいは $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸標識MDV 1 感染細胞及びMDLCLより少なくとも2種のMDV 1 特異的リン酸化蛋白[39/36K (pI4.9/5.0), 24K (pI5.8, 6.0)]が検出された。
 - 2) MDV 1 感染細胞から、これらMA bによって検出されるMDV 1 特異的リン酸化蛋白のリン酸化アミノ酸の解析を行なった結果、リン酸化セリンが検出された。
 - 3) ペプチドマッピング法により、39/36K, 24K間で共通するスポットが検出された。
 - 4) 39/36K, 24Kは異なったmRNAから翻訳されている事が明らかとなった。
 - 5) MDV 1 特異的リン酸化蛋白の存在部位をMDV 1 感染細胞を用いて調べた結果、小胞体に存在する事が明らかとなった。
3. MD発症鶏腫瘍病巣からのMDV 1 特異的リン酸化蛋白の検出。

MD発症病鶏の皮膚及び腫瘍病巣の凍結切片標本を作製後、これら標本につきMDV後期抗原である分泌型糖蛋白(gA)、ウイルス中和に関与する糖蛋白(gB)及び今回得たMDVの初期抗原であるMDV 1 特異的リン酸化蛋白に対するMA bを用い、抗原の分布状況を調べた。ウイルス増殖部位である羽毛根部からは、いずれの抗原も検出されたが、腫瘍病巣にはgAおよびgBは殆ど認められず、多数のMDV 1 特異的リン酸化蛋白陽性細胞が認められた。

[総 括]

MA bを作製し、MDV 1 特異的リン酸化蛋白を同定した。本抗原がMDLCLに共通して存在する事を明らかにするとともに、MDV 1 特異的リン酸化蛋白の生化学的同定を行なった。さらに本抗原が、ニワトリのMDリンパ腫細胞に腫瘍付随抗原として発現していることを見出した。

論文の審査結果の要旨

マレック病ウイルス1型(MDV1)はニワトリに悪性リンパ腫をおこすが、これ迄MDVで腫瘍化した細胞にはMDV誘導抗原は見出されていなかった。本論文は、多種類のMDV1誘導抗原に対する単クローン抗体を作製して抗原の解析を行い、MDV1特異的リン酸化蛋白を同定したものである。さらに、この抗原が腫瘍抗原としてMDリンパ腫由来培養株化細胞とニワトリのMDリンパ腫細胞の細胞質に発現していることなどを初めて示したものでMDVによる腫瘍化機構の研究における重要な知見と考える。