



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	島	員	洋
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7659	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(MDV1, MDV2, MDV3)に分類されている。MDV1は、腫瘍原性株であり、ニワトリに悪性リンパ腫を起こす。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。MDV2及びMDV3は、非腫瘍原性株であり、MDV3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(MD LCL)が樹立されて以来、数々のMD LCLが報告されている。MDリンパ腫及びMD LCLには、何れもMDV1遺伝子の存在することが示されているが、MDV1特異抗原は見出されていない。本研究の目的は、MD LCLや、MDV1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、MDV1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: MDV1としてBC-1株, JM株, C2株, MDV2としてHPRS24株, MDV3(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。MD LCL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: MDV1感染細胞及びMDCC-MSB1の可溶画分からニワトリ抗MDV1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、ウェ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、MAb 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 MAb 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 MAb は、MDV 1 感染細胞とのみ反応した。
 - 2) これらの MAb 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 处理するか、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 MAb 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 MAb 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), ウィ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 MAb を用い、抗原の分布状況を調べた。ウィ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]

MAb 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起こすが、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誘導抗原に対する单クロ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。