



Title	Comparison of the complete DNA Sequences of the Oka Varicella Vaccine and Its Parental Virus
Author(s)	五味, 康行
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44667">https://hdl.handle.net/11094/44667</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	五 味 康 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 2 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 1 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Comparison of the Complete DNA Sequences of the Oka Varicella Vaccine and Its Parental Virus (Oka 水痘ワクチン株ウイルスと Oka 原株ウイルスの全塩基配列の比較)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山 西 弘一  (副査) 教 授 生 田 和良    教 授 松 浦 善治

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus; VZV) は、ヒトヘルペスウイルス属に属するウイルスである。水痘生ウイルス Oka ワクチン株は、1974 年に大阪大学微生物病研究所の高橋らによって開発され、日本だけでなく米国を含む様々な国で接種が行われておりその安全性、有効性について評価は確定されている。この Oka ワクチン株は、典型的な水痘症状を呈した患児の水痘液から分離された強毒ウイルス (Oka 原株) を、弱毒化のためにヒト胎児肺細胞とモルモット胎児細胞で継代して得られたものである。Oka ワクチン株は、Oka 原株とは異なった生物学的性状(ヒトでの低い病原性、温度感受性、モルモット胎児細胞での増殖性)を有することが知られているが、弱毒性に関する機構、またそれに関わる遺伝子等については、ほとんど解っていなかった。そこで我々は、弱毒化に関与している遺伝子の同定、またそれを利用したワクチン株の品質管理や新しいワクチンの開発について検討することを目的とし、Oka ワクチン株及び Oka 原株の全塩基配列を決定した。

### [方法ならびに成績]

#### 1. Oka ワクチン株と Oka 原株の全塩基配列の決定

Oka ワクチン株及び Oka 原株感染 MRC-5 細胞 (ヒト二倍体細胞) から抽出した DNA を鋳型とした PCR 法でゲノム (約 125 kbp) を完全にオーバーラップする約 40 種類の PCR 産物を得た。塩基配列の決定は、PCR 産物を直接シーケンスする方法で行なった。

両株の全塩基配列を比較した結果、42 の塩基置換 (20 アミノ酸置換) が検出され、アミノ酸置換は、gene 6、9A、10、21、31、39、50、52、55、59、62、64 に認められた。驚くべきことに、塩基置換の 1/3 以上 (15 塩基置換)、アミノ酸置換の約半分 (8 アミノ酸置換) は、gene 62 領域に集中していることが明らかになった。また、10 種類の臨床分離株の gene 62 の塩基配列も決定したところ、これら 15 の塩基置換はワクチン株にのみ特異的であった。この gene 62 の産物は、IE62 として知られる前初期タンパクで、転写調節に非常に重要な役割を持っていることが知られている。

また、ワクチン株の gene 62 の 15 塩基置換のうち、8 箇所では部分的な置換 (つまり同一箇所二種類の塩基が混在している状態) であった。そこで、この遺伝子を PCR 法で増幅し、その産物をクローニングした結果、ワ

クチン株は8種類以上のクローンからなるミックスポピュレーションであることが分かった。

## 2. IE62 のアミノ酸置換とウイルスの増殖性についての解析

ワクチン株をヒト胎児肺細胞に感染させ、プラーククロニングを行なった。得られたクローンの gene 62 の塩基配列を決定し、Oka 原株の IE62 と比較して8アミノ酸置換を持つクローン (S7-01) および5アミノ酸置換を持つクローン (S7-13) を得た。これらのクローンと Oka 原株の cell-to-cell の spreading を infectious center assay で比較した。

その結果、S7-01 は Oka 原株に比べ、プラークの大きさが有意に小さく、infectious center assay の結果からも、感染細胞から非感染細胞への spreading が有意に遅い (原株の約 0.25 倍) ことが明らかになった。また、S7-13 の spreading は S7-01 に比べて速かったが、Oka 原株より遅かった (原株の約 0.4 倍)。

## 3. IE62 のアミノ酸置換とトランス転写活性についての解析

次に、IE62 のアミノ酸置換が、IE62 自身のトランス転写活性にどのような影響を与えているかについて Luciferase Assay で調べた。まず原株の IE62、S7-01 の IE62、S7-13 の IE62 をそれぞれ発現するプラスミド (エフェクタープラスミド) を構築した。次いで、Luciferase 遺伝子の upstream に VZV DNA ポリメラーゼ遺伝子プロモータを挿入したプラスミド (レポータープラスミド) も構築した。いずれかのエフェクタープラスミド (0.25  $\mu$ g) とレポータープラスミド (0.25  $\mu$ g) を 293 細胞にコトランスフェクションし、24 時間後の Luciferase 活性を測定した。

その結果、Oka 原株 IE62 の DNA ポリメラーゼ遺伝子プロモータに対するトランス転写活性を 100%とした時、S7-01 の IE62 の活性は 32%、S7-13 の活性は 48%しかなかった。

### [総括]

上述のように、(1)Oka ワクチン株の gene 62 には、臨床分離株や Oka 原株ウイルスと比べ多くの置換が存在する、(2)ワクチン株ウイルスは少なくとも8種類以上のクローンからなるミックスポピュレーションである、(3)これらのクローンのうち Oka 原株の IE62 と比較してアミノ酸置換を多く有するクローンほど cell-to-cell の spreading が遅く、(4)同様にアミノ酸置換を多く有するクローンの IE62 ほど DNA polymerase 遺伝子プロモータに対するトランス転写活性は低い、という事実が明らかになった。以上のことから、IE62 のアミノ酸置換によるトランス転写活性の変化が、ウイルスの増殖性や spreading に関与している可能性が考えられた。またさらに、IE62 のアミノ酸置換によってワクチン株の弱毒性が規定されているという可能性も考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、水痘帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus; VZV) Oka ワクチン株と VZV Oka 原株の全塩基配列の比較解析と、VZV の弱毒化に関与している遺伝子の推定に関する研究である。Oka ワクチン株は、典型的な水痘を呈した患児から分離された強毒ウイルス (Oka 原株) を、ヒト胎児肺細胞とモルモット胎児細胞で継代して得られた弱毒株であるが、その弱毒性がどの遺伝子に起因するものなのかこれまで全く分かっていなかった。本研究では、弱毒 Oka ワクチン株と強毒 Oka 原株の全塩基配列の比較解析を行うことにより、弱毒株に特異的なアミノ酸変異が IE62 タンパク質 (転写調節タンパク質) 遺伝子に集中していることを初めて示した。さらに、Oka ワクチン株の IE62 タンパク質遺伝子のアミノ酸変異が、IE62 の転写調節活性を低下させること、また VZV の増殖性を低下させることを証明した。これらの結果は、VZV の弱毒化の機構解明に重要な示唆を与えたという点から、学位の授与に値すると考えられる。