



Enteric adenovirus type 41 isolates : cloning, physical maps and diversity in restriction enzyme cleavage pattern

山下, 由美

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1723

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001723>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	やま した ゆ み 山下 由 美	（北海道）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1346号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成5年3月22日	
学位論文題目	Enteric Adenovirus Type 41 Isolates: Cloning, Physical Maps and Diversity in Restriction Enzyme Cleavage Pattern 胃腸炎アデノウイルス41型分離株：クローニング、制限酵素切断点地図の作製と制限酵素切断パターンの多様性	
審査委員	主査 教授 本 間 守 男	
	教授 松 村 武 男	教授 前 田 盛

論 文 内 容 の 要 旨

<緒言>

ヒトアデノウイルス41型（Ad41）は、Ad40とともに胃腸炎アデノウイルス（Enteric adenovirus）とも呼ばれ、小児ウイルス性胃腸炎の重要な起因ウイルスの一つである。両者は、他のヒトアデノウイルス（A-E亜群）とは異なる共通の抗原決定基を有し、ウイルスDNAの相同性が高い（62-69%）ことからともにF亜群に分類されている。

Ad41は、Ad5の初期遺伝子E1を導入したHEK細胞や他の血清型のアデノウイルスの初期遺伝子E1を発現している細胞では増殖することができるが、HeLa細胞やKB細胞などの通常のヒト培養細胞ではほとんど増殖しない。この難増殖性のためAd41の研究は他のウイルスに比べて遅れているが、ウイルスの複製の点で分子生物学的にきわめて興味深い性状を有している。これまでにAd41の数株のゲノムDNAがクローニングされているが、これらのウイルスはいずれも培養細胞で数代以上継代されており、従って継代中にゲノムに変異の生じている可能性を否定はできない。また、ヒトアデノウイルスDNAは齧歯類細胞をトランスフォームする能力を有するが、F亜群ウイルス、中でもAd41のトランスフォーム遺伝子についての研究は余り進んでいない。一方、組織培養で分離したAd40およびAd41については、DNAの制限酵素切断パターンから、ゲノムに変異を示す株が数例報告されているが、糞便検体から直接ウイルスDNAを抽出して制限酵素による切断パターンを検討した例はない。

本研究は、胃腸炎患者糞便検体からAd41ウイルスDNAを抽出してゲノム全域をクローニングし、各種制限酵素切断点地図を作製してそのゲノム構造を既報のAd41株のそれと比較し、さらに

トランスフォーム遺伝子について検討を加えた。また、クローニングしたDNAをプローブとして、日本の各地から得られたA d 40 およびA d 41 の制限酵素による切断パターンについて比較検討を行った。

＜材料と方法＞

1. 糞便材料：1986-87年に札幌市内で発生したアデノウイルス胃腸炎患者の16検体。1984-87年に愛媛県立衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所および大阪市立環境科学研究所で採取され、アデノウイルスが確認されたそれぞれ50、7および3検体。1986-87年に東京で発生した患者から採取され、帝京大学医学部小児科でA d 40 と同定された11検体。1982年に北海道立中央乳児院で集団発生し、A d 40 と同定された3検体。1983年に神奈川県立衛生研究所で採取され、A d 41 と同定された1検体。

2. ウイルスDNAの抽出：糞便検体の10%懸濁液500 μ lをProteinase KおよびRibonuclease A処理し、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈澱によりDNAを得た。

3. クローニング：A d 41 DNA100ngを制限酵素EcoR Iで切断後、ゲノムの中間の断片はpUC18のEcoR Iサイトに、両末端断片はEcoR I-Sma Iサイトにクローニングした。

4. 制限酵素切断点地図の作製：A d 41 DNAを制限酵素EcoR I、BamH I、HindIII、Kpn I、Sma I、Xho IおよびCla I単独で、あるいは任意の組合せの2種類の酵素で切断し、クローニングしたA d 41 DNAの各EcoR I断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、それぞれの酵素による切断点を決定した。

5. 細胞のトランスフォーメーション：ラット線維芽細胞株3Y1を用い、 10^8 細胞あたり5 μ gのDNAをリン酸カルシウム共沈法によりトランスフェクトし、5週間培養後にギムザ染色してフォーカスを数えた。

6. サザンハイブリダイゼーションによるゲノムDNAの制限酵素切断パターンの検出：検体のDNA50~100ngを制限酵素で切断、1.5%アガロースゲル上で電気泳動して分離した後ナイロン膜に転写し、 32 P標識したクローニングされたA d 40またはA d 41 DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにより検出した。

＜結果および考察＞

1. ウイルスDNAの検出とA d 41 DNAのクローニング：抽出されたDNA量は検体ごとに異なり、300ngから20 μ gの間に分布した。得られたDNAはほぼ均一で、細胞培養による分離や大量の検体を用いた超遠心等の煩雑で時間のかかる操作を経ずに、クローニングや分子疫学的検討に必要な量のウイルスDNAが得られることが明らかになった。

A d 41のうち、神奈川県立衛生研究所より供与されたSanekata株および愛媛県立衛生研究所より供与されたEhime 86-137株のDNAをEcoR I切断後pUC18にクローニングした結果、2株ともEcoR I切断後の6つのフラグメントのすべてをクローニングすることができた。

2. 制限酵素切断点地図による各株の比較: Eco R I、Bam H I、Hind III、Kpn I、Sma I、Xho I および Cla I による切断点を A d 41 ゲノム上に同定することができた。

Sanekata 株と Ehime 86-137 株の切断点地図は、Cla I を除いた他の 6 種の制限酵素すべてにおいて異なっていた。また、既報の A d 41 株と比較して、Sanekata 株は Bam H I、Kpn I、Sma I、Xho I および Cla I の切断点が異なっており、Ehime 86-137 株は Eco R I、Bam H I、Kpn I、Sma I、Xho I および Cla I の切断点が異なっていた。従って、2 株はいずれも新規の株であることが明らかとなった。

3. A d 41 のトランスフォーム活性の検討: A d 41 のトランスフォーム活性を調べ、かつ制限酵素切断点地図の左右端を決定した。即ち、Sanekata 株および Ehime 86-137 株のそれぞれゲノムの両端を含むクローンをトランスフェクトしたところ、Sanekata 株の Eco R I - E フラグメントおよび Ehime 86-137 株の Eco R I - F フラグメントにトランスフォーム活性がみられ、これらはそれぞれのゲノムの左端に位置付けられた。両株ともトランスフォーム活性は 0.5 フォーカス/ μ g DNA で、これに対して対照に用いた F 亜群の A d 40 札幌株、C 亜群の A d 5 および A 亜群の A d 12 のトランスフォーム活性は、それぞれ 0.5、10 および 5 フォーカス/ μ g DNA であった。以上の結果から A d 41 のトランスフォーム活性は、同じ F 亜群の A d 40 とほぼ同等で且つきわめて低いことが、この新規の株を用いた実験でも確かめられた。

4. 日本各地の胃腸炎アデノウイルス DNA の分子疫学的解析: 札幌、愛媛、大阪、東京および神奈川で得られた 91 検体中、型の同定された A d 40 の 41 検体および A d 41 の 17 検体について、各種制限酵素での切断パターンを検討した。A d 40 では 1 検体で Pvu II の切断パターンが一部異なったが、他の 40 検体の Eco R I、Bam H I、Hind III、Sma I および Pst I による切断パターンは全く同一であった。A d 41 の Eco R I による切断パターンは 3 つに別れ、I 型は Sanekata 株、II 型は Ehime 86-137 株を含む愛媛の 4 検体全部、III 型は大阪の 5 検体および札幌の 1 検体全部であった。A d 40 と A d 41 は抗原性を共有し、DNA の相同性が高いにもかかわらず、日本国内での変異株の分布に際だった差のあることが見いだされた。

論文審査の結果の要旨

研究の背景

ヒトアデノウイルス 41 型 (A d 41) は、A d 40 と共に小児のウイルス性胃腸炎の重要な起因ウイルスの一つである。

A d 41 は、HeLa 細胞や KB 細胞などの通常のヒト培養細胞ではほとんど増殖しないため研究は他のウイルスに比べて遅れているが、ウイルスの複製の点で分子生物学的にきわめて興味深い。これまでに研究室で培養された数株の A d 41 ゲノムがクローニングされているが、新鮮臨床分離株からは未だされていない。また、ヒトアデノウイルス DNA は齧歯類細胞をトランスフォームする能力を有するが、A d 41 のトランスフォーム遺伝子についての研究は余り進んでいない。一方、組織培養で分離した A d 40 および A d 41 については、DNA の制限酵素切断パターンから、ゲノムに変異を示

す株が数例報告されているが、糞便検体から直接ウイルスDNAを抽出して制限酵素による切断パターンを検討した例はない。

申請者はこれらの背景から、A d 41 臨床分離株ゲノムDNAを糞便検体から直接抽出、クローニングし、制限酵素切断点地図を作製した。また、トランスフォーム遺伝子を同定し、更にA d 41 の変異株の分布をA d 40 と比較することを目的として、以下の実験を行った。

成績

1. ウイルスDNAの抽出とA d 41 DNAのクローニング：1982-87年に札幌、東京、神奈川、大阪および愛媛で採取されたアデノウイルス胃腸炎患者糞便計91検体をウイルス材料として用いた。ウイルスDNAは酵素処理とエタノール沈澱により抽出した。抽出されたDNA量は300ngから20 μ gの間に分布し、クローニングや分子疫学的解析に十分な量であった。A d 41のうち、Sanekata株およびEhime 86-137株のDNAをEcoR I切断後pUC18にクローニングした結果、2株ともEcoR I切断後の6つのフラグメントのすべてをクローニングすることができた。

2. 制限酵素切断点地図による各株の比較：EcoR I、BamH I、Hind III、Kpn I、Sma I、Xho IおよびCla Iによる切断点をA d 41 ゲノム上に同定することができた。Sanekata株とEhime 86-137株の切断点地図は、Cla Iを除いた他の6種の制限酵素すべてにおいて異なっていた。また既報のA d 41株と比較して、Sanekata株はBamH I、Kpn I、Sma I、Xho IおよびCla Iの切断点が異なっており、Ehime 86-137株はそれに加えてEcoR Iの切断点が異なっていた。従って、2株はいずれも新規の株であることが明らかとなった。

3. A d 41のトランスフォーム活性の検討：Sanekata株およびEhime 86-137株のそれぞれのゲノムの両端を含むクローンをラット線維芽細胞株3Y1にトランスフェクトしたところ、Sanekata株のEcoR I-EフラグメントおよびEhime 86-137株のEcoR I-Fフラグメントに0.5フォーカス/ μ g DNAのトランスフォーム活性がみられた。これに対して対照に用いたA d 40、A d 5およびA d 12は、それぞれ0.5、10および5フォーカス/ μ g DNAであったことから、A d 41のトランスフォーム活性は、A d 40とほぼ同等で且つきわめて低いことが、この新規の株を用いた実験でも確かめられた。

4. 日本各地の胃腸炎アデノウイルスDNAの分子疫学的解析：型の同定されたA d 40の41検体およびA d 41の17検体について、各種制限酵素での切断パターンをクローニングしたDNAをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより検討した。A d 40では1検体でPvu IIの切断パターンが一部異なったが、他の40検体のEcoR I、BamH I、Hind III、Sma IおよびPst Iによる切断パターンは全く同一であった。A d 41のEcoR Iによる切断パターンは3つに別れ、I型はSanekata株、II型はEhime 86-137株を含む愛媛の4検体全部、III型は大阪の5検体および札幌の1検体全部であった。A d 41とA d 40は抗原性を共有し、DNAの相同性が高いにもかかわらず、日本国内での変異株の分布に際違った差のあることが見いだされた。

本研究は、A d 41について、臨床分離株の研究が未だ十分に行われていない現状において、そのゲノム構造、トランスフォーム遺伝子および変異株の分布に就いて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。