

蚕核多角体ウイルスを用いた日本脳炎ウイルス 外被膜糖タンパク (E) の発現

始 良 義 一

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

(主任: 五十嵐 章 教授)

Expression of Envelope Glycoprotein E of Japanese Encephalitis Virus using *Bombix mori* Nuclear Polyhedrosis Virus

Yoshikazu AIRA

Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University (Professor: Akira Igarashi)

Abstract: In order to prevent and control Japanese encephalitis (JE) in presently epidemic areas, development of the second generation JE vaccine using recombinant DNA technology has been postulated by the World Health Organization (WHO). Toward this objective, the author tried to express JE virus envelope glycoprotein (E) using *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus as a baculovirus expression vector. The cDNA segment approximately corresponding to the entire E protein gene was prepared from *E. coli* plasmid pUC13 inserted with cDNA fragment S22, which covers entire E protein gene with its flanking sequences on both ends. The E protein gene cDNA was then modified and inserted to the transfer vector plasmid pBF 48 which carries baculovirus polyhedrin gene promoter and terminal regions with their flanking sequences. In the resulting recombinant vector plasmid, the E protein gene should be linked to the polyhedrin gene promoter and the terminator in correct orientation. The DNAs from the recombinant vector plasmid and wild type baculovirus were co-transfected to BmN cells and recombinant virus was obtained by homologous recombination. In the BmN cells infected with one of the several recombinant viruses, expression of a protein was detected by the SDS-PAGE and Western blotting using an anti-E protein monoclonal as well as anti-JE virus polyclonal antibodies. The molecular weight of the expressed protein was estimated as 53 K daltons, similar to the value of JE virus E protein. Five out of the 9 mice immunized with the recombinant virus-infected BmN cell homogenate showed weak neutralization activity to JE virus in their sera. In contrast, none of the sera from mice immunized with uninfected cell homogenate showed positive neutralization. The result seems to be the promising first step toward the second generation JE vaccine in the future.

Key words: Japanese encephalitis virus, Envelope glycoprotein, Gene expression, Recombinant DNA, Nuclear polyhedrosis virus, Second generation vaccine

緒 言

日本脳炎 (JE) は日本においては現在では年間数十名の患者を見るにすぎないが、中国等の東アジアから、ヴェトナム、タイ等の東南アジア、更にはインド、ネパール、スリランカに至る南アジアにおいては現在もしばしば大流行によって多くの死者と重篤な後遺症患者が発生しており、社会的にも大きな問題となっている (Umenai *et al.*, 1985). 日本では中山株感染マウス脳由来の不活化精製ワクチンが開発され、小学校児童を中心として大規模に接種された結果、日本脳炎に対して優れた予防効果が表示されており、副作用もほとんど認められなかった (Hammon *et al.*, 1971). 韓国も日本と同様の日本脳炎ワクチンを生産し、大規模投与を行なった結果、著明な効果があったと報告している (Paik, 1983). 中国は独自の不活化日本脳炎ワクチンを北京株感染ハムスター腎細胞培養を用いて生産し、有効であると報告している (Li, 1983). しかしながら現行の中山ワクチン及び北京ワクチンとも、現在日本脳炎が流行している開発途上国において日本脳炎防除を目的として大規模投与を行うにはワクチン価格及び供給量の点に問題がある. この問題を解決するために遺伝子組換え法を用いた廉価な第二世代ワクチンを開発する必要が世界保健機構 (WHO) によって指摘されている.

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科に属し (Westaway *et al.*, 1985), この科には黄熱ウイルス、デングウイルス、ダニ脳炎ウイルス等、人または動物に脳炎や出血熱など重篤な疾病を引き起こすウイルスが含まれている (Shope, 1980; Monath, 1986). 日本脳炎ウイルスは血清学的にはマレー溪谷脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルスに近縁であり、フラビウイルスの中での subgroup を形成している (Porterfield, 1980, 1986). フラビウイルスは直径約 40-50 nm の外被膜を有する球状の粒子で、分子量約 400 万の (+) 鎖 1 本鎖 RNA を遺伝子とする. ウイルス粒子の構造蛋白質としては、膜蛋白質 (V1 または M)、カプシド蛋白質 (V2 または C)、外被膜糖蛋白質 (V3 または E) が存在する (Westaway, 1980).

日本脳炎ウイルスの構造蛋白質については M 蛋白質の分子量は約 8K, C 蛋白質の分子量は約 14K, E 蛋白質の分子量は約 53K であることがすでに報告されている (Shapiro *et al.*, 1971; Kitano *et al.*, 1974; Takegami *et al.*, 1982). 更に、いくつかのフラビウイルスについてはその遺伝子 RNA の塩基配列が解析され、構造蛋白質 (C, M, E) 及び、非構造蛋白質である NS1, ns2a, ns2b, NS3, ns4a, ns4b, NS5 を決定する領域の一部ないしは全部が解明されている (Rice *et al.*, 1985; Castle *et al.*, 1985, 1986; Wengler *et al.*, 1985; Dalgarno *et al.*, 1986; Zhao *et al.*, 1986; Trent *et al.*, 1987; Mackow *et al.*, 1987; McAda *et al.*, 1987). 我々は日本脳炎ウイルス野生株の一つである JaOArS982 株についてその全塩基配列を解明した結果、遺伝子 RNA は 10,976 塩基より成り、5' 末端の 95 塩基は noncoding region で、それにひき続き、構造蛋白質である C, PreM (M 前駆体), E, を決定する領域及び非構造蛋白質である NS1, ns2a, ns2b, NS3, ns4a, ns4b, NS5 を決定する領域が 10,296 塩基より成る一続きの open reading frame として存在し、それに引き続き 585 塩基の 3' 側 noncoding 領域が存在する事が判明した (Sumiyoshi *et al.*, 1986, 1987). 一方、宿主によって認識される日本脳炎ウイルスの主な抗原部位は E 蛋白質にあり、中和抗体も E 蛋白質を認識する事が知られている (Kimura-Kuroda and Yasui, 1983, 1986). 藤田らと我々は先に E 蛋白質領域の cDNA を含むプラスミド pS22 を構築して酵母での発現実験を行ったが、この方法で産生された蛋白質をマウスに免疫した結果では現行ワクチンに比べてウイルスを充分中和するような抗体は得られなかった (Fujita *et al.*, 1987).

今回著者は、発現ベクターとしてバキュロウイルス科 (Baculoviridae) に属する蚕核多角体ウイルス (*Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus) を用いて E 蛋白質の発現実験を行った. E 蛋白質の遺伝子領域を含むプラスミド pS22 の DNA を改築し、蚕核多角体ウイルス組換え体作製用プラスミド pBF48 に組み込み増殖させた後、その DNA を蚕核多角体ウイルス標準株 T3 の DNA と共に

BmN 細胞にリン酸カルシウム共沈法で co-transfect し、ブランク法でリコンビナントウイルスを得た。得られたリコンビナントウイルスを BmN 細胞に感染させ SDS-PAGE と Western blotting 法で E 蛋白質の発現を解析した。Western blotting 法で陽性を示したリコンビナントウイルスを BmN 細胞に感染させ、その感染細胞乳剤をマウスに免疫して E 蛋白質に対する抗体産生の有無とその性質を調べた。本論文はこれらの実験結果について記述するものである。

実験材料と方法

細胞及びウイルス

蚕核多角体ウイルス及びそのリコンビナントウイルスの増殖と感染価測定、並びにリコンビナントウイルスの作製には BmN 細胞を用い、10%胎児牛血清 (FCS) を含む TC10 培養液を用いて28℃で培養した (前田, 1987)。

蚕核多角体ウイルスは標準株 T3 を用いた。感染価はウイルスを階段希釈した後、直径 60mm のペトリ皿に培養した BmN 細胞に接種し、吸着1時間後、0.75%アガロースと1.25% FCS を含む TC10 培地で覆い、28℃で4-5日培養した後、ニュートラルレッドを含む second overlay を施し、ブランク法により測定した (前田, 1987)。

日本脳炎ウイルスは野生株の一つである JaOArS 982 株を用い、感染価は橋本等の方法 (橋本ら, 1971) を改変して BHK21 細胞を用いたブランク法により37℃で測定した。BHK21 細胞は9% FCS を含む Eagle の培養液 (Eagle, 1959) を用いて37℃で培養した。

DNA の構築及びリコンビナントウイルスの作製

DNA の取扱いは Maniatis *et al.* (1982) に準じた。

プラスミド pS22 は、日本脳炎ウイルス JaOArS982 株の遺伝子 RNA 塩基配列の284番から2672番目の塩基に相当する cDNA 断片, S22, を大腸菌プラスミド pUC13 の Sma I site に組み込んだものであり、そのうち日本脳炎ウイルスの

E 蛋白質を決定する部分は978番から2476番目の塩基配列である (Sumiyoshi *et al.*, 1986)。pS22 を含む大腸菌を大量に培養し、塩化セシウム密度勾配遠心法 (CsCl 法) でプラスミド DNA を精製分離した。

プラスミド pS22 の polylinker site にある制限酵素 EcoR I site を後の操作に使用するまで保護するために EcoR I で消化し、Klenow large fragment で blunt end とした後 Xho I linker を付加し self-ligation した後、大腸菌を transform した。得られた transformant の中から目的とする長さの DNA を含むものを選んで増殖させた後、プラスミド DNA を CsCl 法で精製した。次に E 蛋白質遺伝子の 5' 末端側の flanking DNA を削除するために、プラスミド DNA を E 蛋白質遺伝子の開始コドンより49塩基上流に存在する制限酵素 MluI site で切断し、Bal31 で消化した。さらに Xho I で消化した後、self-ligation させ、大腸菌を transform した。得られたコロニーを個別に培養し、alkali-SDS 法でプラスミド DNA を精製し、Dideoxy chain termination 法 (Sanger *et al.*, 1977) によってその 5' 末端部分の塩基配列を解析した (図1)。

これらのプラスミド DNA のうち 5' 末端が E 蛋白質の開始コドンに近いクローン 59 を選び、E 蛋白質遺伝子の 3' 側の flanking DNA を削除するために、E 蛋白質の終止コドンの 6 塩基上流にある制限酵素 Sph I site で消化し、Klenow large fragment で E 蛋白質遺伝子の 3' 末端を blunt end とした。更に EcoR I 消化により 5' 末端を EcoR I の cohesive end として E 蛋白質遺伝子を殆ど完全な形として切り出し、遺伝子導入用ベクター pBF48 プラスミドに挿入し、組換え体作製用ベクター pF59 を構築した。この際、pUC プラスミド DNA を Pvu I 消化することにより pUC DNA が pBF48 に挿入されることを避け、E 蛋白質遺伝子の挿入効率を高めるようにした (図2)。プラスミド pBF48 は他の遺伝子導入用ベクタープラスミド (Maeda *et al.*, 1985) と同様、多角体遺伝子の promotor 領域及び terminal 領域をそれぞれの flanking 領域と共に含み、promotor と ter-

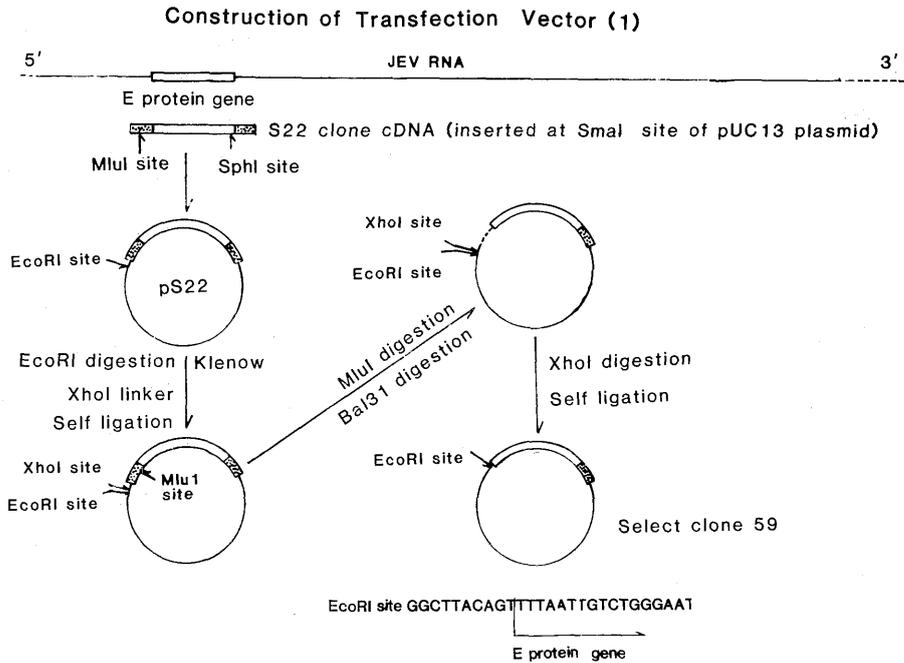


Fig. 1. Construction of the clone 59 inserted with the cDNA of Japanese encephalitis (JE) virus E protein gene with its flanking sequences. The cDNA of the E protein gene with its flanking sequences was first cloned at the SmaI site of the plasmid pUC 13. Details of the procedure were described in the text.

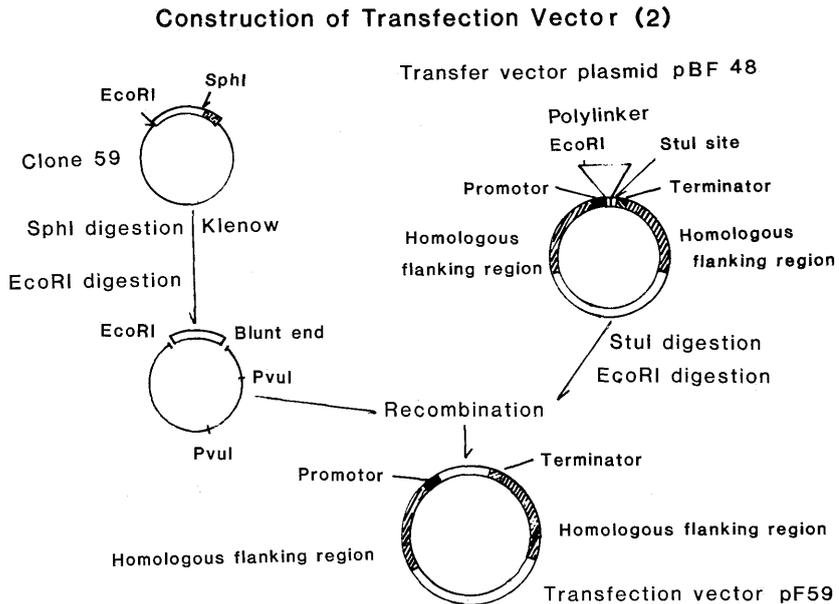
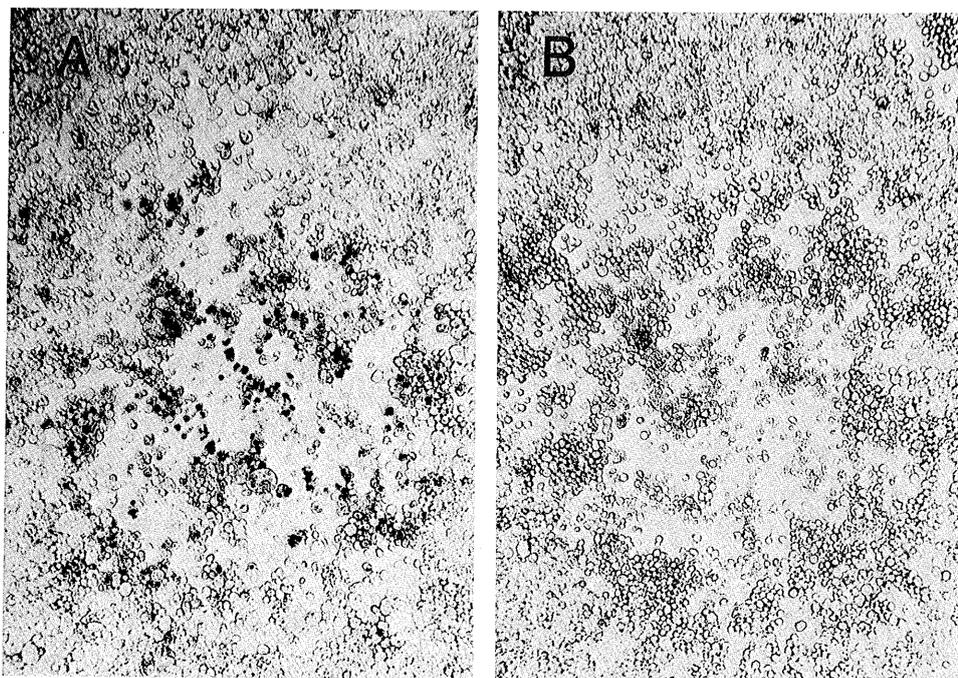


Fig. 2. Insertion of the cDNA of JE virus E protein gene to pBF plasmid vector. The pBF vector is the transfer vector to produce homologous recombination with *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus in the infected BmN cells. Details were explained in the text.

minal 領域の間には polylinker site を含む様に作製されている。発現を目的とする外来遺伝子はその 5' 末端を promoter 直後にある polylinker site に適当な制限酵素で挿入し、その 3' 末端は terminal 領域の直後にある Stu I site に blunt end で挿入する。得られたリコンビナントベクター DNA を蚕核多角体野生株 T3 の DNA と共に宿主細胞に co-transfect すると homologous recombination の原理でリコンビナントウイルスが形成される。このリコンビナントウイルスに感染した細胞では目的とする遺伝子産物が融合蛋白質として発現される様に考案されている (前田, 私信)。

プラスミド pF59 の DNA を大腸菌に transform した後 CsCl 法で精製した。プラスミド pF59 の DNA 20 μ l (1 mg/ml) と蚕核多角体ウイル

ス標準株 T3 の DNA 10 μ l (2-3 μ g) を carrier DNA 10 μ l (100 μ g) と共に 60 μ l の 2 M CaCl₂ 及び 420 μ l の蒸留水と混合した。この液を 500 μ l の 2 \times HBS buffer (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.12) に加え、約30分室温に放置した。この液 200 μ l を直径 35mm のペトリ皿に単層培養した BmM 細胞の培養液 2ml 中に加えた。約12時間28 $^{\circ}$ Cで培養した後新しい培養液 (10% FCS を含む TC10) と交換し、28 $^{\circ}$ Cで7日培養後、homologous recombination によって形成されたリコンビナントウイルスを含む感染培養液を採取した。試料を階段希釈の後、BmN 細胞を semi-confluent に増殖させた直径 60mm のペトリ皿当たり 100 μ l 接種し、吸着1時間後、0.75%アガロースと1.25% FCS を含む TC10 培地を重層し、



Plaque by wild type virus

Plaque by recombinant virus

Fig. 3. Plaques on BmN cells formed by the wild type baculovirus and its recombinant virus with cDNA insert of JE virus E-protein gene downstream to the polyhedrin gene promoter. Many dark spots due to the formation of intranuclear polyhedrin was observed in the plaques of the wild type virus by low-power magnification (Picture A), while such spots were not observed in the plaques of the recombinant virus (Picture B).

4-5 日後, リコンビナントウイルスによると思われるプラークを選択した(河合, 1986). 低倍率の光学顕微鏡によって, 野生株ウイルスのプラークには多角体による黒色の斑点が認められるが, リコンビナントウイルスのプラークにはそのような斑点が認められないので両者は容易に識別される(図3). リコンビナントウイルスを3回プラーク純化を行った後 BmN 細胞に数回継代して感染価を上昇させたものを種ウイルスとした. 種ウイルスは分注後 -70°C に保存し, 実験に用いた時の感染力価は 1.65×10^8 PFU/ml であった.

日本脳炎ウイルス E 蛋白質の発現

リコンビナント種ウイルスを直径 60mm ペトリ皿に培養した約 7×10^5 個の BmN 細胞に多重度約 20 で接種し, 吸着 1 時間の後, 1.25% FCS を含む TC10 培溶液を加えて 28°C で培養した. 感染後 2 日目の細胞及び培養上清を 0.125 M Tris-HCl, pH 6.4, 1% SDS, 1% 2メルカプトエタノール(2ME)で溶解し, 100°C , 2 分加熱後 SDS 加10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)によりポリペプチドを分離した(Laemmli, 1970). 陰性対照として, 蚕核多角体ウイルス標準株 T3 を感染させた BmN 細胞及びウイルス非感染の BmN 細胞を用い, 陽性対照としては精製日本脳炎ウイルスを用いて, 上記同様に処理して使用した. 分離されたポリペプチドの性質及び目的とする E 蛋白質の発現の有無を調べるために Western blotting 法(Burnette, 1981; Naser and Miltenburger, 1983)を使用した. この反応には日本脳炎ウイルスに対するポリクローン抗体及び E 蛋白質の linear epitope と反応すると思われるモノクローン抗体(Kobayashi *et al.*, 1984; Srivastava *et al.*, 1987)を用いて E 蛋白質発現の有無を検討した. リコンビナントウイルス感染細胞内に発現された E 蛋白質の局在を調べるために上記のポリクローン及びモノクローン抗体と, Cappel 社製 FITC 標識抗マウス IgG ウサギ IgG を用いた間接蛍光抗体法を使用した.

動物への免疫

約 10^5 個の BmN 細胞にリコンビナントウイル

スを多重度約 20 で感染させ, 培養後 2 日目に細胞を Freund の incomplete adjuvant と混合したものをマウス 1 匹当たり 1 回の免疫量とした. 免疫は Balb/c マウスの生後 4 週目から始めて約 1 週間隔で 7 回腹腔内に接種した. 陰性対照として非感染 BmN 細胞を同様の方法でマウスに接種した. 陽性対照としては市販の日本脳炎ワクチン(阪大微生物病研究会製) 0.1 ml を同様の方法で接種した. Western blotting 法による染色度から推定すると, 1 回の免疫に用いたリコンビナントウイルス感染 BmN 細胞中に含まれる日本脳炎ウイルス E 蛋白質の量は約 0.02 ml の市販ワクチンに含まれる E 蛋白質の量に相当する. 最終の免疫後 1 週間目にマウスを個体別に採血し, 血清を分離して日本脳炎ウイルスに対する抗体価を測定した.

日本脳炎ウイルスに対する抗体価の測定

免疫マウス血清の日本脳炎ウイルス JaOArS982 株に対する抗体価は中和法と ELISA により測定した. 中和抗体価は, 橋本等の方法(橋本ら, 1971)を改変して BHK21 細胞を用いたプラーク減少中和法によって測定し, ウイルスと希釈液のみを混合した対照のプラーク数に比べて 50%以上のプラーク減少が観察された場合を陽性と判定した. ELISA 抗体価は精製ウイルスを抗原とした微量間接法(Voller *et al.*, 1976)で測定し, 二次血清には Cappel 社製ベルオキンダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ IgG を使用し, 希釈液のみによる吸光度の 2 倍以上を示したものを陽性と判定した.

結 果

日本脳炎ウイルス E 蛋白質の発現

合計 14 のプラーク純化したリコンビナントウイルスについて感染 BmN 細胞及びその培養液中に日本脳炎ウイルス E 蛋白質が発現しているか否かを検索した. その結果, 一つのリコンビナントウイルス(No. 4)からプラーク純化によって得られた 4 つの独立した subclone ウイルスすべてについて, ウイルス感染 BmN 細胞中に SDS-PAGE と Western blotting 法で日本脳炎ウイルスに対する

モノクローン抗体と反応する蛋白質が認められ、その分子量は 53K ダルトンと推定された (図4)。この蛋白質のバンドは感染後 2-3 日目の細胞中に最も強く認められたが、感染細胞培養液中には検出されず、陰性対照の細胞中にも検出されなかった。

リコンビナントウイルス感染 BmN 細胞内に発現された E 蛋白質の局在は間接蛍光抗体法によっては明らかにすることはできなかった。

リコンビナントウイルス感染 BmN 細胞で免疫さ

れたマウス血清の日本脳炎ウイルスに対する抗体価
免疫マウスより得られた血清の中和試験と ELISA の結果は表1に示したとおりである。血清希釈 1:10 において、リコンビナントウイルス (No. 4) を感染させた BmN 細胞で免疫された実験群マウス 9 匹中 5 匹 (No. 16, 17, 18, 19, 21) に日本脳炎ウイルスに対する中和活性が認められ、その中の一匹 (No. 18) は確実に中和陽性であった。それに対して、陰性対照群マウス10匹の血清 (No. 1-10) には日本脳炎ウイルスに対する中和

Western Blotting Pattern of *Bombyx mori* Cells Infected with Several Clones of Recombinant Viruses

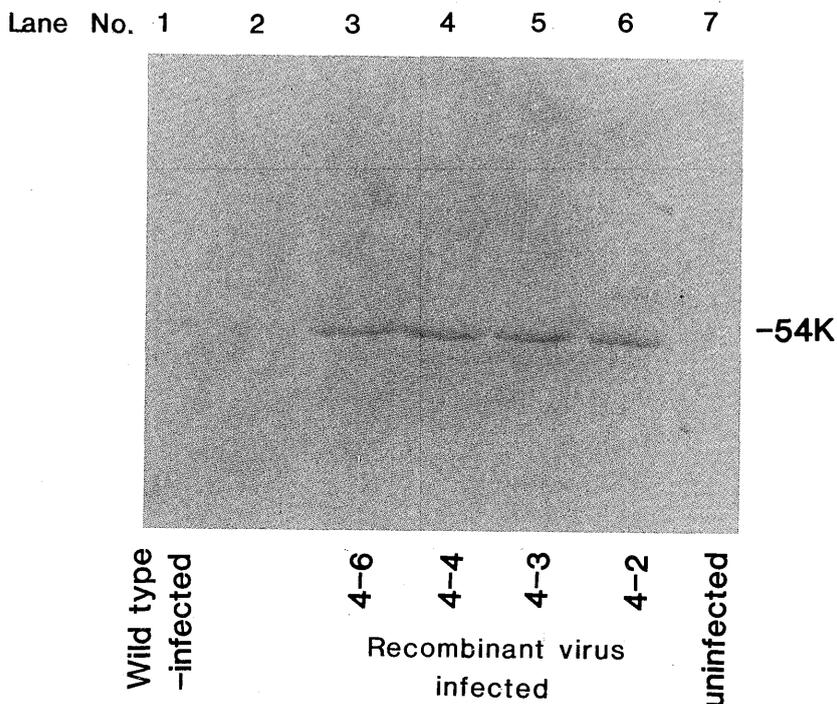


Fig. 4. The Western blotting pattern of the BmN cells infected with the wild type baculovirus or the recombinant virus with cDNA insert of JE virus E protein gene. The nitrocellulose membrane was stained with anti-JE monoclonal antibody after polypeptides were separated by the SDS-PAGE and electrophoretically transferred to the membrane.

lane 1, BmN cells infected with the wild type baculovirus

lane 2, no sample

lane 3-6, BmN cells infected with recombinant virus (4-2, 4-3, 4-4, and 4-6 were obtained from independent plaques formed by the recombinant virus No.4)

lane 7, uninfected BmN cells

抗体が認められなかった。しかしながら、血清希釈 1:100 及び 1:1000 においては実験群、及び陰性対照群共に日本脳炎ウイルスに対する中和活性が認められなかった。一方、陽性対照ワクチン接種群マ

ウス 5 匹の血清 (No. 11-15) では、1:100 の希釈でもすべての血清に中和活性が認められ、1:1000 の血清希釈でも 1 匹のマウス血清 (No. 13) は中和抗体が陽性であった。

Table 1. Result of the neutralization and ELISA tests on serum from each mouse in three groups

Group (Immunizing antigen)	Mouse number	Result of neutralization test at serum dilution of			Result of ELISA test (OD490)	
		1 : 10	1 : 100	1 : 1000		
Group 1	1	0.0 (-)	6.5 (-)	6.1 (-)	0.188 (-)	
	2	0.0 (-)	1.5 (-)	4.9 (-)	0.219 (-)	
	3	0.0 (-)	5.2 (-)	0.0 (-)	0.152 (-)	
	4	11.0 (-)	7.7 (-)	8.5 (-)	0.165 (-)	
Negative control (Uninfected BmN cells)	5	0.0 (-)	0.0 (-)	2.4 (-)	0.157 (-)	
	6	9.1 (-)	1.5 (-)	0.7 (-)	0.233 (+)	
	7	14.1 (-)	1.5 (-)	7.8 (-)	0.171 (-)	
	8	0.0 (-)	7.7 (-)	9.3 (-)	0.203 (-)	
	9	0.0 (-)	1.5 (-)	3.9 (-)	0.179 (-)	
	10	37.6 (-)	0.0 (-)	15.3 (-)	0.187 (-)	
Group 2	11	98.3 (+)	74.8 (+)	13.6 (-)	0.321 (+)	
	12	99.4 (+)	65.0 (+)	3.2 (-)	0.339 (+)	
	Positive control (Commercial JE vaccine)	13	94.2 (+)	100.0 (+)	98.3 (+)	0.333 (+)
		14	96.4 (+)	87.2 (+)	42.4 (-)	0.334 (+)
		15	87.2 (+)	70.7 (+)	28.0 (-)	0.333 (+)
Group 3	16	51.0 (+)	26.9 (-)	7.8 (-)	0.139 (-)	
	17	64.3 (+)	14.6 (-)	0.0 (-)	0.132 (-)	
	18	81.7 (+)	20.8 (-)	0.0 (-)	0.230 (+)	
	Test group (BmN cells infected with recombinant baculovirus)	19	58.5 (+)	0.0 (-)	9.3 (-)	0.223 (+)
		20	28.4 (-)	2.4 (-)	16.4 (-)	0.113 (-)
		21	51.4 (+)	28.0 (-)	18.2 (-)	0.264 (+)
		22	46.9 (-)	4.9 (-)	3.9 (-)	0.241 (+)
		23	37.9 (-)	2.4 (-)	6.6 (-)	0.238 (+)
24		36.1 (-)	8.5 (-)	9.4 (-)	0.201 (-)	

Group 1, negative control immunized with uninfected BmN cells, group 2, positive control immunized with commercial Japanese encephalitis (JE) vaccine (Biken), and group 3, test group immunized with BmN cells infected with recombinant baculovirus inserted with JE virus envelope glycoprotein gene.

Figures in the neutralization test is the percent plaque reduction compared with the number of plaques in the control with virus diluent. More than 50% plaque reduction was considered as positive, and less than 50% as negative neutralization.

The result of the ELISA test was considered as positive when the observed OD was above 0.220 (twice the OD of diluent only), and negative when the observed OD was below 0.220.

ELISA では希釈液のみの対照が示した吸光度の2倍(0.220)以上を示した血清が実験群では5匹(No. 18, 19, 21, 22, 23)であったのに対して、陰性対照群では1匹(No. 6)に過ぎず、陽性対照のマウス血清(No. 11-15)はすべて0.320以上の高い吸光度を示した。従って、中和及びELISA共に陽性を示したマウスは実験群9匹中3匹(No. 18, 19, 21)存在したが、陰性対照群では全く見られず、陽性対照群では全てのマウスが中和及びELISA共に陽性であった。

考 察

この研究は安価な日本脳炎ワクチンを作るための予備実験としての性格を有している。現実にはワクチンとして使うためには、遺伝子操作によって発現される蛋白質を抗原として投与した時に、目的とする抗体すなわちウイルスに対する中和抗体を生体が作る必要がある。日本脳炎ウイルスのE蛋白質は分子量53Kダルトンの糖蛋白質であり(Shapiro *et al.*, 1971; Kitano *et al.*, 1974; Takegami *et al.*, 1982; Sumiyoshi *et al.*, 1986, 1987), その遺伝子の塩基配列から推測されるアミノ酸配列を基にしたhydrophilicity curveをSumiyoshi *et al.* (1986)の結果から改編すると図5に示すようになる。E蛋白質は全体として阻水性が強く、その両末端は疎

水性であり、殊にC末端がきわめて阻水性が強くなっている。通常阻水性の蛋白質は糖鎖、或は磷酸基などの側鎖が付くことによってある程度親水性の割合を増し、それにより立体構造を保持するともいわれている。また糖鎖は時においては抗原性に関与しているとも言われているので、遺伝子組換えによる発現系も側鎖を付加するような系が望ましい。今回真核細胞の発現系の中から、遺伝子が発現した時に大量の蛋白質を産生すると言われているbaculovirusの系を使用した。この系は糖鎖及び磷酸基も付加すると思われる(前田, 1987)。Baculovirusの発現系としては、*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*の系(Smith *et al.*, 1983)と*Bombix mori nuclear polyhedrosis virus*(蚕核多角体ウイルス)の系(Maeda *et al.*, 1985)が報告されており、通常*Autographa californica*の系が広く用いられている。しかしながら*Autographa californica*の系は培養細胞レベルでの実験しかできないのに対して*Bombix mori nuclear polyhedrosis virus*の系では*in vivo*の感染系として蚕があり蚕生体より大量の蛋白質を得ることができる利点がある(Maeda *et al.*, 1985)。安価なワクチンを作るという目的を考慮して、著者は高価なFCSなどを使わずに大量の蛋白質の産生が期待できるという点で蚕核多角体ウイルスの系を選んだ。

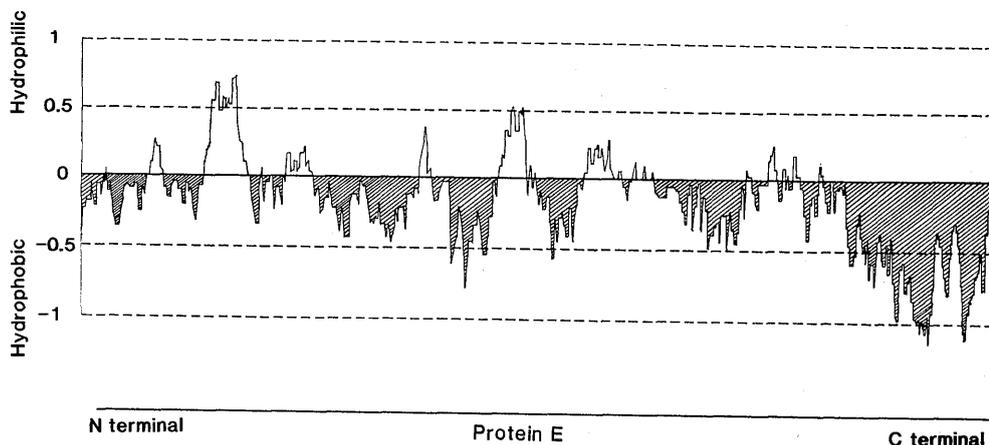


Fig. 5. Hydrophilicity curve of the E protein of JE virus (modified from Sumiyoshi *et al.*, 1986).

DNA 組換え体としての baculovirus の安全性はかなり高いと言われている (前田, 1987). 自然界においても宿主昆虫の種類が違うだけで baculovirus は感染しないし, 培養細胞のレベルにおいても baculovirus の宿主領域は狭く, ウイルスと宿主細胞の組合せが異なると感染が成立しなくなることが知られている. Baculovirus の DNA を transfection 法により細胞に取り込ませると感染が成立して次代のウイルスを得ることができる. しかしながら元来 baculovirus が増殖できない細胞に transfection 法でウイルス DNA を取り込ませても転写の段階で選択が働きウイルスは産生されない. 日本脳炎ウイルス E 蛋白質遺伝子を組み込んだ蚕核多角体ウイルスの場合にも, このリコンビナントウイルスを日本脳炎ウイルスが増殖できる蚊由来の C6/36 細胞 (Igarashi, 1978) に接種しても, 或は, リコンビナントウイルスの DNA を取り込ませてもウイルスは増殖できなかつた. 従って, baculovirus の自然界における宿主である昆虫から遠くかけはなれた脊椎動物にリコンビナント蚕核多角体ウイルスを含んだままの細胞を免疫しても組換え DNA 実験としての安全性は高いと思われる.

今回, リコンビナント蚕核多角体ウイルスを感染させた BmN 細胞をマウスに免疫してマウス血清で日本脳炎ウイルスに対する中和活性を調べた結果, 1:10 の血清希釈において陰性対照として用いた非感染 BmN 細胞で免疫した群と比較して差があるかもしれないと思われるものが9匹中5匹存在し, その中の3匹は ELISA も陽性であり, 更にその中の1匹 (No. 18) は明らかに中和陽性であった. しかしながらこれらの血清を 1:100 又は 1:1000 に希釈すると殆んど中和活性は認められなかったのに対して, 陽性対照として用いたワクチン接種群では 1:100 の血清希釈では5匹全部に, 1:1000 の血清希釈でも5匹中1匹の血清に中和活性が認められ, 両群の間に明白な差が存在した. Western blotting 法での染色度から, 陽性対照のワクチン接種群はリコンビナントウイルス感染細胞接種群に比べて約5倍量の E 蛋白質で免疫されたと推測されるが, この免疫原の量的差に比べて中和抗体価の差の方が遙かに大きな結果が得られた. こ

の原因として, 発現された日本脳炎ウイルスの E 蛋白質は細胞内にとどまり抗原として十分に暴露されなかつた可能性や, E 蛋白質が日本脳炎ウイルス粒子内で本来取るべき3次元的立体構造を取れなかつた結果, 日本脳炎ウイルスの中和に関する epitope が宿主であるマウスによって充分認識されなかつた可能性も考えられる. Kimura-Kuroda and Yasui (1983, 1986) によると, E 蛋白質上には少なくとも9個の異なる epitope が存在し, それらに対するモノクローン抗体には中和活性はないが高い ELISA 抗体価を持つものや, 高い中和活性があるが ELISA 抗体価は中等度のものが存在する. 表1のリコンビナントウイルス感染細胞で免疫されたマウスの血清で, 中和抗体と ELISA 抗体の結果が一致しないものが存在するのは, 個々のマウスによって認識された E 蛋白質上の epitope が異なる場合がある事を示唆するとも考えられる. ウイルス非感染細胞で免疫されたマウスの1匹が ELISA 陽性を示した原因は不明であるが, この研究で使用した ELISA 抗原は蚊由来の C6/36 細胞で増殖したウイルス粒子を精製したものであり, ウイルス粒子の外被膜に存在するかもしれない宿主細胞由来の抗原が, 同じ昆虫由来の BmN 細胞と共通の抗原性を有する可能性とも考えられる.

今回の研究の使用したリコンビナント蚕核多角体ウイルスの系で発現された日本脳炎ウイルス E 蛋白質がリコンビナントウイルスを感染させた BmN 細胞の中にとどまった結果, その細胞で免疫されたマウスが充分な中和抗体を産生できなかったとすれば, 今後この系をそのまま用いてワクチンを開発することには問題がある. 即ち, 発現される E 蛋白質の量を増加する事により目的とする中和抗体を産生させる事ができたとしても, ワクチンとして使用するためには発現された E 蛋白質を高度に精製しなければならない. 更に, 日本脳炎ウイルスの中和に関する epitope が linear でなく conformational であるとする, リコンビナントウイルス感染細胞で発現された E 蛋白質に, 日本脳炎ウイルス粒子内で本来それが取るべき立体構造と同じ或はそれに近い構造を取らせ, それを保持させながら精製する過程にはかなりの困難が予想される. 従って

今後、発現された E 蛋白質がリコンビナントウイルス感染細胞の培養液上清中にできるように工夫する事がこの問題を解決するために必要であると思われる。藤田らが酵母で発現させた E 蛋白質 (Fujita *et al.*, 1987) も細胞内に存在していたということである (藤田, 私信)。また蚕核多角体ウイルスでの発現系においては親水性の蛋白質の遺伝子を組み込んだリコンビナントウイルスでは目的とする蛋白質が感染細胞の培養液上清中にでてくるが、疎水性蛋白質の遺伝子を組み込んだリコンビナントウイルスでは目的とする蛋白質が感染細胞中にとどまる事が多いようである (前田, 私信)。従って、遺伝子組換え法によって E 蛋白質を感染細胞培養液上清中に産生させるには、E 蛋白質のなかでも特に疎水性の強いと思われる N 末端側と C 末端側をそれぞれ決定する E 蛋白質遺伝子の 5' 末端側と 3' 末端側の部分を削除したリコンビナントウイルスを作製するか、或は、E 蛋白質の N 末端に作用して細胞膜を透過させるのに必要であろうと思われるシグナルペプチドを決定する塩基配列を見つけ出して、E 蛋白質の C 末端のアンカー領域を決定する領域を削除した E 蛋白質遺伝子と同時に組み込んだリコンビナントウイルスを構築するのが良いと思われる。しかしながら、発現実験を行なうにあたっては発現された蛋白質の検出系が問題となる。少量の蛋白質に対して有効な検出系としては抗体或は酵素活性などがあり、今回の研究では抗体を用いる方法で E 蛋白質を検出した。日本脳炎ウイルスの E 蛋白質に対する抗体の抗原認識部位に関しては保井等がモノクローン抗体を用いて研究しているが (Kimura-Kuroda and Yasui, 1983, 1986)、未だ E 蛋白質上のどこに中和に関する epitope が存在しているか判明していない。従って、インフルエンザウイルス (Wiley *et al.*, 1981) やポリオウイルス (Minor *et al.*, 1983) に関する研究に比べて、今後更に詳しく解析すべき分野が残されていると思われる。我々の研究結果では、日本脳炎ウイルス E 蛋白質に対するモノクローン抗体のほとんどがウイルスを SDS 処理及び 2ME 処理する事によって Western blotting 法における反応性を消失し、日本脳炎ウイルスに近縁なマレー溪谷脳炎ウイ

ルスと交差反応を示すモノクローン抗体の一つのみがその反応性を保持していた (Srivastava *et al.*, 1987)。おそらくこのモノクローン抗体は、その認識部位が E 蛋白質上の linear epitope であり、SDS と 2ME 処理によって E 蛋白質の立体構造が変化しても Western blotting 法での反応性があまり影響されなかったと思われる。今回の研究において発現された蛋白質が確かに日本脳炎ウイルスの E 蛋白質であると言うためには Western blotting 法において反応するモノクローン抗体を使わざる得なかったが、このモノクローン抗体の認識部位は E 蛋白質上のどこか未だ決定されていない。従って、今後の発現実験において日本脳炎ウイルス E 蛋白質の遺伝子領域を一部分でも欠損させると E 蛋白質の検出結果が陰性となった場合、遺伝子の発現自体が陰性なのか、或は検出系に問題があるのかを考えねばならない。よって、今回の研究では E 蛋白質遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端の疎水性領域を削除した発現実験は行なわなかった。しかしながら、今回の実験でリコンビナント蚕核多角体ウイルスの系を用いれば確かに E 蛋白質の発現が今後期待されることが確認された。また今回作製したリコンビナント蚕核多角体ウイルスに感染した BmN 細胞における E 蛋白質の産生及び感染性ウイルスの増殖曲線を調べた結果、それらは前田らが他の蛋白質の発現実験で報告している結果と一致していた (前田, 1987, 私信)。しかしながら SDS-PAGE における染色度によると、E 蛋白質の産生量は、同じ発現系を用いて成功している他の蛋白質 (河合, 1986; 多田ら, 1986; 帯刀, 1987) の産生量に比べて少なかった。疎水性蛋白質遺伝子を組み込んだ発現実験では蛋白質の産生量が少ない事が多いようである (前田, 私信)。

現在進行中の研究として、(1) 今回作製したリコンビナントウイルスを感染させた蚕生体より得られた検体を実験動物へ免疫すること、(2) 日本脳炎ウイルス E 蛋白質遺伝子の様々な領域に相当する cDNA を組み込んだ DNA 組換え体を用いた発現実験を行なって日本脳炎ウイルスに対する抗体の E 蛋白質上での抗原認識部位を推測すること、及び (3) E 蛋白質を感染細胞培養液中に発現できる

ようなリコンビナントウイルスの作製を行っている。

最近日本脳炎ウイルス遺伝子の塩基配列については我々の JaOArS982 株を用いた報告 (Sumiyoshi *et al.*, 1986, 1987) の他に, McAda らによって中山株の塩基配列の一部が報告されたが (McAda *et al.*, 1987), この二つの株の E 蛋白質遺伝子領域の塩基配列から推測されるアミノ酸配列の違いは僅かであった。木村と保井 (1986) は日本脳炎ウイルスに対して強い中和活性を示すモノクローン抗体の反応性は日本脳炎ウイルス株間でほとんど差が認められないと報告している。日本脳炎ウイルスは RNA ウィルスであり DNA ウィルスに比べてはるかにその遺伝子が変異しやすいと考えられるにもかかわらず, 1935年に分離された中山株と1982年に分離された JaOArS982 株の間に中和抗体と反応する E 蛋白質のアミノ配列に僅かの差しか存在しないこと, 及び中山株が分離後40年以上たった今日でもワクチンとして使えることから, 今後将来も日本脳炎の E 蛋白質上の中和に関する epitope はそれほど変化するとは思えない。従って JaOArS982 株を使ったこの実験結果は今後そのまま実際に応用できると思われる。

結 論

現在日本脳炎が流行している地域において日本脳炎の防除を行うには, 組換え DNA 技術を用いた第二世代日本脳炎ワクチンを開発する必要性が世界保健機構 (WHO) によって指摘されている。著者

はこの目的のために, パキョロウィルスに属する蚕核多角体ウイルスの発現系を用いて日本脳炎ウイルスの外被膜糖蛋白質 E の産生を試みた。まず E 蛋白質遺伝子とその前後の塩基配列に相当する cDNA を大腸菌プラスミド pUC13 に組み込んだ pS22 プラスミドから, 殆ど完全な E 蛋白質遺伝子に相当する cDNA 断片を調製した。この DNA を多角体遺伝子の promoter 領域と terminal 領域をそれぞれの flanking sequence と共に有する遺伝子導入用ベクター pBF48 プラスミドに組み込み, E 蛋白質遺伝子を多角体遺伝子 promoter 及び terminator と結合させた組換え体を構築した。その DNA を蚕核多角体ウイルス DNA と共に BmN 細胞に co-transfect して homologous recombination の原理でリコンビナントウイルスを作製した。このようにして得られたリコンビナントウイルスの一つに感染した BmN 細胞中に発現された蛋白質を SDS-PAGE 及び Western blotting 法により検出した。その結果, 分子量が E 蛋白質と殆ど同じ約 53K ダルトンで, E 蛋白質に対するモノクローン抗体及び日本脳炎ウイルスに対するポリクローン抗体と反応する蛋白質が発現している事が確認された。このリコンビナントウイルスに感染した BmN 細胞乳剤で免疫したマウス 9 匹中 5 匹に日本脳炎ウイルスに対する若干の中和抗体産生が認められたのに対して, ウィルス非感染の BmN 細胞で免疫されたマウスはすべて日本脳炎ウイルスに対する中和抗体が陰性であった。この結果は今後第二世代の日本脳炎ワクチンを開発するための有益な第一歩と思われる。

謝 辞

この研究にあたっては BmN 細胞, pBF ベクタープラスミド, 蚕核多角体ウイルスの分与および実験に関する御指導, 御助言をいただきました鳥取大学農学部応用昆虫学教室の前田進先生に深く感謝の意を表します。実験及び論文の作製にあたって終始御懇切なる御指導, 御校閲を頂いた当部門五十嵐章教授に深甚なる感謝の意を表します。なお, 本研究の動物実験は財団法人阪大微生物病研究会において行われました。

文 献

- 1) Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.
- 2) Castle, E., Nowak, T., Leidner, U., Wengler, G. & Wengler, G. (1985): Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV 2 of the flavivirus West Nile virus and the genome sequence for these proteins. *Virology*, 145, 227-236.
- 3) Castle, E., Leidner, U., Novak, T., Wengler, G. & Wengler, G. (1986): Primary structure of the West Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology*, 146, 10-26.
- 4) Dalgarno, L., Trent, D. W., Strauss, J. H. & Rice, C. M. (1986): Partial nucleotide sequence of the Murray Valley encephalitis virus genome. Comparison of the encoded polypeptides with yellow fever virus structural and nonstructural proteins. *J. Mol. Biol.*, 187, 309-323.
- 5) Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432-437.
- 6) Fujita, H., Sumiyoshi, H., Mori, C., Manabe, S., Takagi, M., Yoshida, I., Morita, K., Fuke, I., Fukai, K. & Igarashi, A. (1987): Studies in the development of Japanese encephalitis vaccine: expression of virus envelope glycoprotein V3(E) gene in yeast. *Bull. WHO.*, 65, 303-308.
- 7) Hammon, W. McD., Kitaoka, M. & Downs, W. G. (1971): Immunization for Japanese Encephalitis. Igaku Shoin, Tokyo.
- 8) 橋本信夫, 山田堅一郎, 金光正次 (1971): マイクロタイター法による B 群アルボウイルスの中和抗体測定法. *ウイルス*, 21, 55-59.
- 9) Igarashi, A. (1978): Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, 40, 531-544.
- 10) 河合 孝 (1986): 昆虫ウイルスのベクターと家蚕を用いた有用タンパク質の合成に関する基礎的研究. 昭和60年度文部省科学研究費(一般研究A)研究成果報告書.
- 11) Kimura-Kuroda, J. & Yasui, K. (1983): Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3(E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 45, 124-132.
- 12) Kimura-Kuroda, J. & Yasui, K. (1986): Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 67, 2663-2672.
- 13) 木村純子, 保井孝太郎 (1986): モノクローナル抗体による日本脳炎ウイルス E 膜糖蛋白の解析-一株特異的抗原決定基, フラビウイルス交差反応性抗原決定基の性質-. 第34回日本ウイルス学会総会抄録, 1045, 福岡.
- 14) Kitano, T., Suzuki, K. & Yamaguchi, T. (1974): Morphological, chemical, and biological characteristics of Japanese encephalitis virus virion and its hemagglutinin. *J. Virol.*, 14, 631-639.
- 15) Kobayashi, Y., Hasegawa, H., Tamai, T. & Kusuda, T. (1984): Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 44, 117-123.
- 16) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- 17) Li Ho-min (1983) The quality control of Japanese encephalitis inactivated vaccine. WHO Working Group Conference on the Prevention and Control of Japanese Encephalitis, Tokyo.
- 18) 前田 進 (1987): バキュロウイルス・ベクター. ウィルス, 37, 1-11.
- 19) Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. & Furusawa, M. (1985): Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315, 592-594.
- 20) Mackow, E., Makino, Y., Zhao, B., Zhang, Y-M., Markoff, L., Buckler-White, A., Guiler, M., Chanock, R. & Lai, C-J. (1987): The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*, 159, 217-228.
- 21) Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 22) McAda, P. C., Mason, P. W., Schmaljohn, C. S., Dalrymple, J. M., Mason, T. L. & Fournier, M. J. (1987): Partial nucleotide sequence of Japanese encephalitis virus genome. *Virology*, 158, 348-360.
- 23) Minor, P. D., Schild, G. C., Bootman, J., Evans, D. M. A., Ferguson, M., Reeve, P., Spits, M., Stanway, G., Cann, A. J., Hauptman, R., Clarke, L. D., Mountford, R. C. & Almond, J. W. (1983): Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature*, 301, 674-679.
- 24) Monath, T. P. (1986): Pathology of the flaviviruses. pp375-440. *In* S. Schlesinger & M. J. Schlesinger (ed.). *The Togaviridae and Flaviviridae. The viruses* (Series ed.: H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner), Plenum Press, New York.
- 25) Naser, W. L. & Miltenburger, H. G. (1983): Rapid baculovirus detection, identification and serological classification by western blotting-ELISA using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 64, 639-647.
- 26) 帯刀益夫 (1987) : 動物細胞を利用した物質生産. 現代化学, 増刊 10, 212-219.
- 27) Paik, S. B. (1983): Production of JE vaccine and its efficacy in the Republic of Korea. WHO Working Group Conference on the Prevention and Control of Japanese Encephalitis, Tokyo.
- 28) Porterfield, J. S. (1980): Antigenic characteristics and classification of Togaviridae. pp13-46. *In* R. W. Schlesinger (ed.). *The Togaviruses, Biology, Structure, Replication*. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- 29) Porterfield, J. S. (1986): Comparative and historical aspects of the Togaviridae and Flaviviridae. pp1-19. *In* S. Schlesinger, & M. J. Schlesinger (ed.). *The Togaviridae and Flaviviridae. The Viruses* (Series ed.: H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner), Plenum Press, New York.
- 30) Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S-J. Sheets, R. L. & Strauss, J. H. (1985): Nucleotide sequence of yellow fever virus: implication for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229, 726-733.
- 31) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 74, 5463-5467.
- 32) Shapiro, D. Brandt, W. E., Cardiff, R. D. & Russell, P. K. (1979): The proteins of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 44, 108-124.
- 33) Shope, R. E. (1980): Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by

- togaviruses in man and domestic and wild vertebrate animals. pp47-82. *In* R. W. Schlesinger (ed.). *The Togaviruses, Biology, Structure, Replication*. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- 34) Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. (1983): Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165.
 - 35) Srivastava, A. K., Aira, Y., Mori, C., Kobayashi, Y. & Igarashi, A. (1987): Antigenicity of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein V3(E) and its cyanogen bromide cleaved fragments examined by monoclonal antibodies and Western blotting. *Arch. Virol.*, 96, 97-107.
 - 36) Sumiyoshi, H., Morita, K., Mori, C., Fuke, I., Shiba, T., Sakaki, Y. & Igarashi, A. (1986): Sequence of 3000 nucleotides at the 5' end of Japanese encephalitis virus RNA. *Gene*, 48, 195-201.
 - 37) Sumiyoshi, H., Mori, C., Fuke, I., Morita, K., Kuhara, S., Kondou, I., Kikuchi, Y., Nagamatsu, H. & Igarashi, A. (1987): Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology*, in press.
 - 38) 多田章夫, 関根大正, 前田 進, 布施 晃, 清水文七 (1986): パピローマウイルス E2 遺伝子のカイロ核多角体ウイルスベクター系における発現. 第34回日本ウイルス学会総会抄録. 4007, 福岡.
 - 39) Takegami, T., Miyamoto, H., Nakamura, H. & Yasui, K. (1982): Biological activities of the structural proteins of Japanese encephalitis virus. *Acta Virol.*, 26: 312-320.
 - 40) Trent, D. W., Kinney, R. M., Johnson, B. J. B., Vorndam, A. V., Grant, J. A., Deubel, V., Rice, C. M. & Hahn, C. (1987): Partial nucleotide sequence of St. Louis encephalitis virus RNA: structural proteins, NS1, ns2a, and ns2b. *Virology*, 156, 293-304.
 - 41) Umenai, T., Krzysko, R., Bektimirov, A. & Assaad, F. A. (1985): Japanese encephalitis: current worldwide status. *Bull. WHO.*, 63: 625-631.
 - 42) Voller, A., Bidwell, D. & Bartlett, A. (1976): Microplate enzyme immunoassays for immunodiagnosis of virus infection. pp506-512. *In* N. K. Rose & N. Friedman (ed.). *Manual of Clinical Immunology*. American Society for Microbiology, Whington, D. C.
 - 43) Wengler, G., Castle, E., Leidner, U., Nowak, T. & Wengler, G. (1985): Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and its gene. *Virology*, 147, 264-274.
 - 44) Westaway, E. G. (1980): Replication of flaviviruses. pp531-581. *In* R. W. Schlesinger (ed.). *The Togaviruses, Biology, Structure, Replication*. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
 - 45) Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Ya., Horzenik, M. C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K. & Trent, D. W. (1985): *Flaviviridae*. *Intervirology*, 24, 183-192.
 - 46) Wiley, D. C., Wilson, I. A. & Skehel, J. J. (1981): Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, 289, 373-378.
 - 47) Zhao, B., Mackow, E., Buckler-White, A., Markoff, L., Chanock, R. M., Lai, C.-J. & Makino, Y. (1986): Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of gene coding for structural proteins. *Virology*, 155, 77-88.