

■原 著■ 2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

## 匂い受容体の機能解析を目指したバイオインフォマティクス

大瀧丈二<sup>1,3</sup> 中山 堯<sup>2</sup> 後藤智範<sup>2</sup> 山本晴彦<sup>1</sup>

### Bioinformatics for Functional Analyses of Odorant Receptors

Joji M. Otaki<sup>1,3</sup>, Takashi Nakayama<sup>2</sup>, Tomonori Gotoh<sup>2</sup> and Haruhiko Yamamoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Information Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: otaki-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In order to delineate the functional aspects of odorant receptors as protein molecules, we here employed computational and biological approaches, each of which could eventually highlight different aspects of odorant receptors. We first characterized the non-redundant protein database to depict the general nature of proteins with a comprehensive database search strategy. We also employed a computational method called self-organizing map to understand possible relations of odorant receptors to other G-protein-coupled receptors. Furthermore, we have studied how to deliver foreign genes or proteins to olfactory sensory neurons in mice *in vivo*. Systematic synthesis of these computational and biological results could pave the way to our understanding of the whole nature of odorant receptors as protein molecules.

**Keywords:** odorant receptor, G-protein-coupled receptor, bioinformatics, database search, self-organizing map, gene/protein delivery

## 序論

鼻腔内に存在する嗅神経細胞が持つ匂い受容体は、外部からの匂い物質を捕える蛋白質分子である。哺乳類のゲノムには約 1000 種類ほどの匂い受容体遺伝子が保持されており、これは哺乳類の全遺伝子の約 4%にも相当する生物界で最も大きな遺伝子ファミリーである<sup>1)</sup>。その発見および分子レベルでの嗅覚系の解明という功績に対して、コロンビア大学のアクセル教授とハッチンソン・ガン研究センターのバック博士にノーベル生理学・医学賞が与えられたことは記憶に新しい<sup>2,3)</sup>。

匂い受容体蛋白質はホルモンをはじめとした生物学的に重要な化学物質一般の受容体、G蛋白質共役受容体 (GPCR) の一群を構成している。事実、多細胞動物において、匂い受容体を除いて考えても、GPCR は最も汎用されている受容体である<sup>4)</sup>。

本研究は、匂い受容体を GPCR のモデル系として捉え、情報科学および分子生物学の手法を用いて哺乳類の匂い受容体の機能解析のための基盤をつくるのが目的である。すべての GPCR は非常に類似し

た三次元構造を持つと考えられているが、個々の受容体の一次配列を用いた類似性検索では的確なライメントを得ることが難しく、GPCR スーパーファミリーの全体像を描くことは容易ではない<sup>4)</sup>。そのため、筆者らは、これまでもその代替あるいは補完となる方法論を模索してきたが<sup>5,6)</sup>、今までの方法とはまったく異なったアプローチが優れた結果を生み出す可能性もある。

そのような考えのもとに、本研究では、既存の類似性検索以外の方法で、計算機の使用によって GPCR および匂い受容体の機能を推測することに努力する。具体的には、①アミノ酸配列の組合わせを網羅的に検索することで、蛋白質データベースの性質を明らかにする。②自己組織化マップ (SOM) を用いて GPCR および匂い受容体の性質を検討する。さらに、③マウスの嗅神経細胞に外部から任意の遺伝子および蛋白質を導入する実験系を確立することを目指す。これは、情報科学的研究から得られた結果に基づき、嗅神経細胞に発現している匂い受

容体の性質を任意に操作することを目的とした実験方法の開発研究である。これら①から③にみられるように、情報科学と生物科学の手法を駆使し、総合的な蛋白質科学として GPCR および匂い受容体にアプローチする。

尚、今回の助成研究結果のうち、①に関する研究については専門誌に発表した<sup>7,8)</sup>。また、②および③に関する研究についても、近々発表予定である。この報告書では要点を述べるにとどめるが、詳細についてはそちらを参照されるとよい。

## 材料と方法

### データベース検索と蛋白質発現

米国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) が管理している nr (non-redundant) 蛋白質データベース(2003年9月のエントリーレコード数 = 154 万件)をダウンロードした。アミノ酸は約5億個含まれる。検索過程を容易にするために、すべてのデータを XML 化し、mutant、mutation、engineered、engineering などの表示を持つ人工的な配列を含むサンプルは除外した結果、対象となるサンプル数は 1,539,248 となった。

全アミノ酸配列について1アミノ酸残基および3~5アミノ酸組の出現頻度を調べる JAVA プログラムを作成し、それぞれのアミノ酸組の出現頻度を検索した。検索結果は ystat などの統計ソフトを用いて検討した。

5アミノ酸組については、データベース中に存在しないものについて6種類を選び、ペプチドの化学合成および大腸菌 BL21Star(DE3)による融合蛋白質の産生を行った。

### 自己組織化マップ (SOM)

G 蛋白質共役受容体 (GPCR) のアミノ酸配列データを機能グループ (ファミリー) ごとに分類するシステムを開発する目的で自己組織化マップ (SOM)<sup>9)</sup>を用いた。

SOM の入力是对象とするデータの特徴ベクトルである。SOM の出力結果はこの特徴ベクトルに大きく依存するため、その検討が重要となる。そこで、入力ベクトルには記号表現および  $z$  値を用いた。記号表現とは、アミノ酸配列データを直接入力ベクトルとする方法である。 $z$  値とは、個々のアミノ酸の物理化学的性質を表わす数値である<sup>10)</sup>。GPCR サンプルを入力ベクトルに変換するために、配列データを1個、3個あるいは5個の  $z$  値に変換した。つまり、1アミノ酸が  $z$  値の組で表現される。得られた各  $z$  値表現のデータ列の自己共分散・相互共分散を

計算し、それを並べて SOM の特徴ベクトルとした。

データは GPCRDB で公開配布されている Class A GPCR を用いた。このデータはすでに15種類のファミリーに分類されている。GPCR の蛋白質配列データをダウンロードし、ファミリーごとに無作為に選んだデータの半数を訓練データとし ( $n = 2063$ )、残りの半数をテストデータ ( $n = 2053$ ) とした。

SOM はニューロン数を  $50 \times 50$  とし、バッチ方式で学習させた。バッチ SOM は、最初に全データを入力し、各データに最良一致するニューロンを見つけてそのデータをニューロンに一時的に記憶させ、着目ニューロンの重みベクトルを近傍内ニューロンの重みベクトルとする方法である。この処理を近傍を縮小しながら、収束するまで繰り返した。

### 遺伝子導入および蛋白質導入

緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子を持つアデノウイルス・ベクターをマウスの鼻腔内に注入した。24時間後、嗅上皮を露出させ、蛍光実体顕微鏡において観察した。

同様に、リポフェクション法に基づいた遺伝子導入試薬 NeuroPORTER (Gene Therapy System 社) を用いて、変異型 GFP 遺伝子を維持しているプラスミド pIRES2-EGFP (Clontech 社) の直接的な導入を試みた。

また、精製した蛋白質を直接マウスの嗅神経細胞へ導入するために、細胞膜透過性蛋白質である VP22 と緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質を pCRT7/VP22-1-TOPO プラスミド (Invitrogen 社) から大腸菌 BL21Star(DE3)において発現させた。この融合蛋白質のヒスチジン・タグをもとに精製後、精製蛋白質溶液をマウスの鼻腔へと吸入させ、蛍光実体顕微鏡で嗅上皮を観察した。

## 結果と討論

### ①データベース検索と蛋白質発現

#### 蛋白質のアミノ酸組成

蛋白質データベースの性質を調べる第一段階として、データベース全体のアミノ酸組成を調べた。それぞれのアミノ酸組成はロイシンの 9.68% からトリプトファンの 1.35% まで様々であった。これらのアミノ酸組成の昇順とアミノ酸の化学的性質との関連は認められなかったが、遺伝子のコドン表におけるアミノ酸の使用頻度との相関が認められた (Spearman 相関係数 0.81)。このことは、われわれが対象としている蛋白質データベースが地球上に存在する蛋白質の母集団全体を適切に反映していることを示唆している。

### 3 アミノ酸組における分布

8000 種類存在する 3 アミノ酸組の出現頻度分布を調べた。データベース中の 1 アミノ酸残基の存在比の違いを補正するために、検索した 1 アミノ酸残基の出現頻度から予想される各 3 アミノ酸組の出現頻度の期待数を算出し、3 アミノ酸組を検索した実際の出現頻度と算出した期待数との比を求め、さらに 1 を引いた値を相対出現頻度 (RF) とし、その分布を図 1 に  $D_{\text{Triplet}}$  として表示した。また、対照として、JAVA プログラムでデータベース中の 1 アミノ酸残基と同じ存在比のアミノ酸群から無作為に 3 アミノ酸を発生させ、同様に理論的相対出現頻度を求め、その分布を図 1 に  $D_{\text{Random}}$  として表示した。図から明らかのように、理論的相対出現頻度分布  $D_{\text{Random}}$  と比較して、検索結果の分布  $D_{\text{Triplet}}$  は幅が広いことがわかった。つまり、ある 3 アミノ酸組は期待されるよりも頻繁に蛋白質中出现し、また別の 3 アミノ酸組は理論的に予測されるよりも稀にしか使用されていないこととなる。

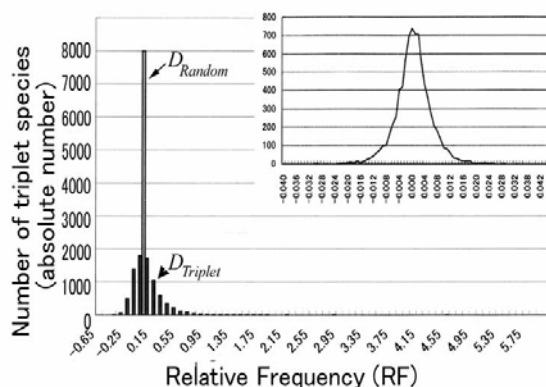


図 1. 3 アミノ酸組の相対出現頻度分布. 挿入図は  $D_{\text{Random}}$  を拡大したもので、分布の正規性を示している。

ゲノム・プロジェクトが完了している生物学的なモデル生物、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、大腸菌のデータを抽出したのものについても同様の計算を行ったが、その結果はデータベース全体を対象にした結果と基本的に同一の傾向を示した(図 2)。このことから、図 1 および図 2 で示された理論値からのずれは、データベースの人為的偏りによるのではない可能性が高い。つまり、この理論値からのずれは生物の蛋白質構成における本質的な性質であると考えられる。

さらに、このような理論値からのずれは、4 アミノ酸組および 5 アミノ酸組においても見られた。特に 5 アミノ酸組においては、以下に論じるように、このずれがさらに顕著となり、理論的には出現することが期待されているが実際にはデータベース中に

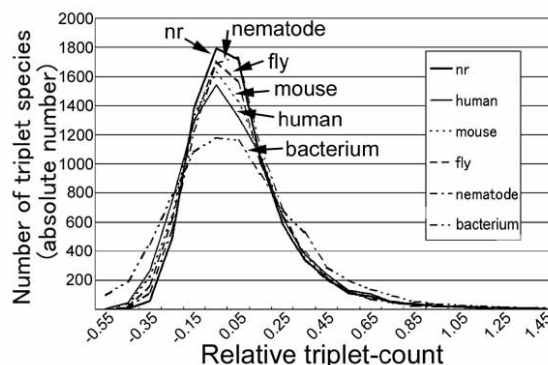


図 2. 生物種別の 3 アミノ酸組の相対出現頻度の分布。

出現しないのがみられた。今後、どのようなアミノ酸組が GPCR あるいは匂い受容体のどの部分に出現するのかを検討することによって、蛋白質分子としての匂い受容体の性質に迫ることができるだろう。

### 出現しない 5 アミノ酸組

約 5 億個のアミノ酸を持つ全データベース中の 5 アミノ酸組 320 万種について考えると、それぞれの 5 アミノ酸組について平均 150 回程度の出現が期待される。データベース中のアミノ酸出現率を基にして理論的に出現回数を計算すると、データベース中に存在しない(出現回数 1 回未満)と期待される 5 アミノ酸組は 832 種類であった。

実際にデータベース中に存在する全 5 アミノ酸組について検索したところ、データベース中にまったく存在しない 5 アミノ酸組が 12080 組存在した。これは、アミノ酸組の分布の偏りが極端なまでに表出した現象であると捉えることができる。

これらの特定の 5 アミノ酸組がデータベース中にまったく出現しない理由については正確なことは言えないが、化学的あるいは生物学的に合成が困難であることも可能性として考えられないわけではない。そこで、6 種類の 5 アミノ酸組を選び、それらを化学合成した。一般的な Fmoc 法により、高収率でペプチドを得ることができた。また、これら 6 種類のアミノ酸配列に対応する DNA 配列をプラスミドに組み込み、融合蛋白質として大腸菌 BL21Star(DE3) において発現を誘導した結果、高レベルの発現が観察された。

これらの結果から、データベース中出现しない 5 アミノ酸組は、その産生が化学的・生物学的に不可能ではないと言える。特定の 5 アミノ酸がデータベース中に存在しないのは、蛋白質分子の機能的な進化の結果であると考えられる。

## ②自己組織化マップによる GPCR の分類

### アラインメントされている蛋白質配列

SOM の分類能力を検討するための第一段階として、すでにアラインされている 1397 種類の GPCR を対象とした。これらの GPCR サンプルは長さが 248 アミノ酸残基に揃えられたものである。また、これらの GPCR サンプルはすでに 15 の既成のファミリーに分類されてある。15 のファミリー (amine, peptide, hormone protein, rhodopsin, olfactory, prostanoid, nucleotide-like, cannabinoid, platelet-activating factor, gonadotropin-releasing hormone, tyrotropin-releasing hormone & secretagougue, melatonin, viral, lysosphingolipid & LPA (EDG), and leukotriene B4) はリガンドの化学的性質、配列の類似性、薬理的データなどによって分けられたものであるが、絶対的・統一的な基準は存在しない。ここでは、それぞれの GPCR サンプルの特徴ベクトルを構成するために、記号表現、3 個の  $z$  値による表示、5 個の  $z$  値による表示という 3 種類の方法を用いた。それぞれのファミリーに任意の色を割り当て、色マップを作成し、ファミリーのクラスタリングの程度と分類精度を検討したところ、3 種類の方法それぞれの出力マップは異なったクラスタリングの程度を示した。しかし、どの方法でも 99% 以上の分類精度を得ることができた。

匂い受容体に注目すると、記号表現の場合は、1 個の受容体サンプルが rhodopsin ファミリーとして誤分類されたが、3 個あるいは 5 個の  $z$  値を使用した場合、誤分類はまったくみられなかった。これは、われわれの使用したプログラムが匂い受容体を含めた GPCR の配列を的確に読み取ることができ、その結果として GPCR サンプルの分類を的確に行うことができる可能性を示している。

### アラインメントされていないサンプル

次に、われわれはアラインされていない GPCR のサンプルを対象とした。記号表現は定義上難しいため、1 個、3 個、5 個の  $z$  値をそれぞれ用いた。

試行によって多少の違いはあるものの、5 個の  $z$  値を用いた場合、総合で 98.5% の分類精度を得ることができた。このことは、われわれの SOM プログラムが GPCR サンプルの分類法として適切であることを意味している。

5 個の  $z$  値を使用した場合の出力について検討してみると、匂い受容体が最も広範囲 (全体の約 1/3 程度) を占めることがわかった (図 3)。しかも、匂い受容体は、例えばアミン受容体やペプチド受容体のように散在的ではなく、連続的な分布を示してい

た。これは匂い受容体に特徴的な配列の存在を示しており、他の配列解析結果<sup>13)</sup>と矛盾しない。また、匂い受容体だけに着目した場合の分類精度は 99.8% に達した。

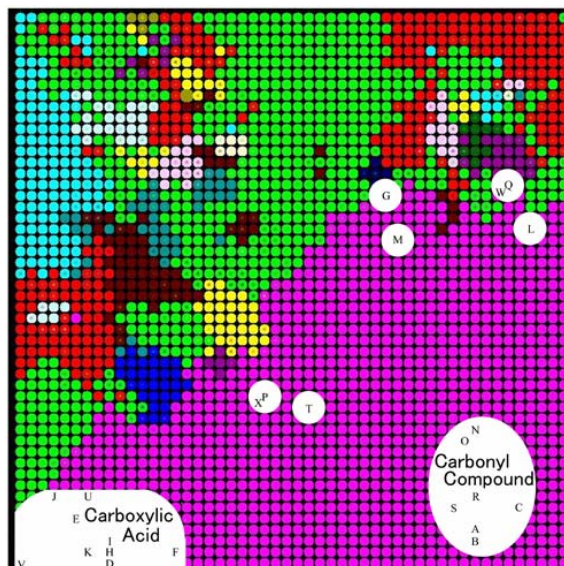


図 3. 5 個の  $z$  値を用いた場合の SOM の出力地図. 最も広い赤紫の領域が匂い受容体に対応する。また、リガンドが判明している A~X までの匂い受容体について地図上の位置を示した。

### 匂い受容体の分布

われわれの SOM プログラムは蛋白質の一次配列だけによって GPCR を分類し、2 次元平面上の位置関係を示すことができる。このようにして出来上がった受容体地図の性質をさらに調べるために、ここでも匂い受容体に着目した。

匂い受容体は SOM の出力地図において最も広い範囲を占めるにもかかわらず、匂い受容体というファミリー・カテゴリーはリガンドの性質を直接的に反映するものではない。リガンドとしての匂い物質には、化学的に様々な化合物が含まれているからである。いくつかの匂い受容体については対応するリガンド (匂い物質) が知られているので、これらのリガンドの特異性が SOM の出力地図においてどのように反映されているのかについて調べるため、すでにリガンドが決定されている匂い受容体 24 サンプルに着目した。

これらの受容体は、地図上では、主に二つのクラスターを形成した (図 3)。そのうちの一つのクラスターには 9 サンプルが含まれ、これらの匂い受容体はカルボン酸のリガンドを持つ傾向にあった。もう一つのクラスターには 7 サンプルが含まれ、これらの匂い受容体はカルボニル化合物をリガンドに持つ傾向が見られた。他の受容体 8 サンプルは、たとえ

カルボン酸やカルボニル化合物をリガンドとして持ってもクラスターを形成しなかった。

総合的に考えると、リガンド特異性はある程度地図上に反映されていると思われるが、例えば G 蛋白質結合領域や構造変化に関わる領域など、他の要素も地図上に反映されていると思われる。

### ③嗅神経細胞への遺伝子導入および蛋白質導入

#### GFP アデノウイルスによる予備的検討

情報科学的方法で得られた結果を生物学的に確認するためには、匂い受容体を発現している嗅神経細胞に任意の生体分子を導入する実験が必要となる。嗅神経細胞に遺伝子や蛋白質を外部から効率よく送り届けるには、第一に試薬そのものを効率よく嗅神経細胞の表面まで届けなければならない。つまり、試薬をマウスにいかにもく吸入させるかが第一のポイントになる。

嗅神経細胞への遺伝子導入には、筆者らはアデノウイルス・ベクターを用いた実験系を開発してきた<sup>12,13)</sup>。しかし、アデノウイルス・ベクターの作製は煩雑であるという点で汎用性に乏しく、より優れた遺伝子・蛋白質導入系の開発が望まれる。

本研究では、吸入法を再検討する目的で、GFP (緑色蛍光蛋白質) 遺伝子を持つアデノウイルス・ベクターを用いた。このアデノウイルスが持つ GFP 遺伝子は強力な CMV プロモーターによって哺乳類細胞内で発現される。GFP は励起光を当てると緑色の蛍光を発するため、その遺伝子が細胞に導入され、発現したことがわかるのである。つまり、非常に効率のよい遺伝子導入・発現マーカーとして GFP を使用することができる。

吸入方法は、マイクロシリンジを使用する方法や噴霧する方法などが考えられるが、この研究では、自然吸入法を行うことにした。具体的には、全身麻酔下でマウスを横たわせ、微量ピペットで数マイクロリットルずつ鼻孔に滴下するという方法である。

図 4 に示すように、ウイルス処理を施した嗅上皮では、特定の部分に緑色の蛍光が見られた。その部分に GFP 発現細胞が存在することを示している。

遺伝子導入効率については、表 1 に示した通りである。表 1 の作成にあたっては、蛍光顕微鏡による観察後、写真撮影し、画像上でとらえた嗅上皮全体の面積に対する緑色蛍光領域を蛍光面積率とした。計測は 3 回行い、平均±SD を示した。

アデノウイルスで処理した個体 8 頭のうち 7 頭において図 4 のような緑色蛍光が見られたことから (GFP 発現個体率 87.5%)、吸入についてはかなり信用できる方法を確立したと言ってよいであろう。

つまり、自然吸入法を用いて、嗅神経細胞に効率よく遺伝子を導入できることが示された。

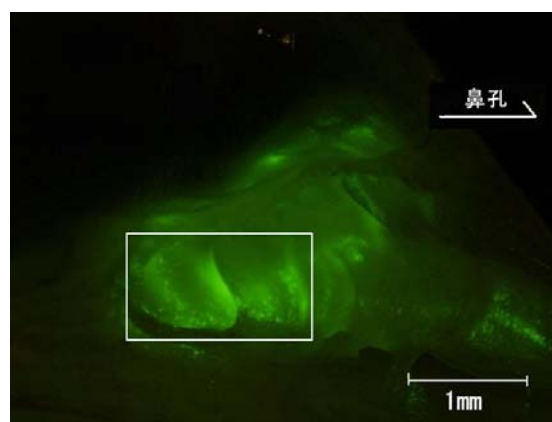


図 4. アデノウイルス・ベクターによるマウス嗅上皮への GFP 遺伝子の導入および発現。緑色蛍光が GFP の発現を示す。四角内の領域に顕著な蛍光が見られる。

表 1. アデノウイルス・ベクターによる GFP 導入

日齢	頭数	吸入量(μL)	蛍光面積率
P2	1	2.0	7.15±2.06%
	1	2.0	1.60±0.36%
P3	2	2.0	0%
		2.5	計測不可
P7	1	5.0	8.70±2.9%
	1	4.5	0.45±0.12%
	1	4.0	0.78±0.06%
	1	5.0	1.47±0.48%
合計	8		平均 3.36%

#### リポフェクション法における遺伝子導入の検討

以上のような自然吸入法を用いて市販のリポフェクション試薬 (NeuroPORTER, Gene Therapy System 社) による遺伝子導入を試みた。用いたプラスミドは pIRES2-EGFP プラスミド (Clontech 社) である。このプラスミドは EGFP (緑色蛍光蛋白質の変異体) の遺伝子を保持しているため、上述のアデノウイルスと同じように緑色蛍光を観察することで遺伝子導入効率を定量化することができる。

表 2 に示すように、1 頭ではあるが、比較的明確な GFP 発現が得られた。このような蛍光は無処理のものでは決して見られなかった。しかし、GFP 発現個体率は 6.3% に過ぎず、この遺伝子導入法は再現性に乏しいことは否めない。

条件を最適化すればリポフェクション法の効率を上げることは可能だと思われるが、条件検討のための時間的余裕がないため、今回はリポフェクション法をこれ以上追求することは止め、蛋白質導入へ向けて実験を開始した。

表 2. リポフェクション試薬による GFP 導入

日齢	頭数	吸入量( $\mu$ L)	蛍光面積率
P2	5	3.2	0%
	3	3.2	4.87%
P3	3	3.7	0%
P7	2	3.5	0%
	2	3.5	0%
	1	3.5	0%

### 蛋白質導入に関する予備的検討

そのような理由から、大腸菌内で緑色蛍光蛋白質を生産し、その蛋白質を精製し、嗅神経細胞へ導入する方法を検討することにした。その一つの方法が VP22 を用いる方法である。VP22 は細胞膜透過性蛋白質であり、VP22 との融合蛋白質を作製することにより、任意の蛋白質を外部から細胞内へ導入することができる<sup>14-16)</sup>。

この方法によって嗅神経細胞に緑色蛋白質を導入することができるか否かを検討するために、VP22 と EGFP との融合遺伝子を作製し、大腸菌 BL21Star (DE3) において発現させた。IPTG による発現誘導後、約 50 kDa の融合蛋白質の発現がポリアクリルアミドゲル上で検出された。

現在、精製した蛋白質をマウスに吸入させる実験を続けており、良好な結果を得ている。

### 結論

上述のように、主として 3 種類の実験法を用いて研究を進めているが、現在のところ、それぞれの研究において初期的な展開がみられたところである。情報科学と生物科学のさらなる有機的な連携により、今後、より深く蛋白質としての匂い受容体の機能に迫りたい。

### 謝辞

本研究は、2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成のもとに行われた。

### 文献

- 1) Buck L and Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175-187.
- 2) 大瀧丈二(2005) におい受容体の発見にノーベル賞! *Aroma Research* **6**: 308-311.
- 3) 大瀧丈二(2005) におい受容の生物学的意義—ノーベル賞受賞研究から観る—。アロマセラピー学雑誌 **5**: 1-8
- 4) Bockaert J, and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**: 1723-1729.
- 5) Otaki JM and Firestein S (2001) Length analyses of mammalian G-protein-coupled receptors. *J. Theor. Biol.* **211**: 77-100.
- 6) Otaki JM and Yamamoto H (2003) Length analyses of *Drosophila* odorant receptors. *J. Theor. Biol.* **233**: 27-37.
- 7) Otaki JM, Gotoh T, and Yamamoto H (2003) Frequency distribution of the number of amino acid triplets in the non-redundant protein database. *J. Jpn. Soc. Information Knowledge* **13**: 25-38.
- 8) Otaki JM, Ienaka S, Gotoh T, and Yamamoto H (2005) Availability of short amino acid sequences in proteins. *Protein Science* **14**: 617-625
- 9) Kohonen T (2001) *Self-Organizing Maps*. Third Edition, Springer-Verlag, Berlin
- 10) Sandberg M, Eriksson L, Jonsson J, Sjöström M and Wold S (1998) New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate characterization of 87 amino acids. *J. Med. Chem.* **41**: 2481-2491.
- 11) Liu AH, Zhang X, Stolovitzky GA, Califano A, and Firestein SJ (2003) Motif-based construction of a functional map for mammalian olfactory receptors. *Genomics* **81**: 443-456.
- 12) Zhao H, Otaki JM, and Firestein S (1996) Adenovirus-mediated gene transfer in olfactory neurons *in vivo*. *J. Neurobiol.* **30**: 521-530.
- 13) Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Miko-shiba K, Firestein S (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**: 237-242.
- 14) Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**: 223-233.
- 15) Phelan A, Elliott G and O'Hare P (1998) Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.* **16**: 440-443.
- 16) Brewis N, Phelan A, Webb J, Drew J, Elliott G, and O'Hare P (2000) Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J. Virol.* **74**: 105-1056.