

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻
平成 12 年度博士課程入学

氏名 加藤 健太郎
指導教官 明石 博臣

論文題目: **Studies on Molecular Interactions in Herpesvirus Replication**

(ヘルペスウイルス複製過程における分子間相互作用に関する研究)

ヘルペスウイルス感染症は、その幾つかが法定・届出伝染病、海外悪性伝染病及び、感染症予防法においても指定を受けていることから明らかなように獣医学領域において国内外での経済的被害は甚大であり、医学領域も含め重要な研究課題となっている。

獣医学領域で問題視されているヘルペスウイルスとして、猫鼻気管炎ウイルス、犬ヘルペスウイルス、マレック病ウイルス (MDV)、オーエスキー病ウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、馬鼻肺炎ウイルス、B ウイルス等が挙げられるが、宿主特異性が高く、潜伏感染することがその大きな特徴である。また、その症状は多彩で、発疹を伴う皮膚疾患、呼吸器症状、生殖器感染による流・死産、神経症状、悪性腫瘍等を呈する。

本研究はリンパ球好性腫瘍ヘルペスウイルスをその対象とし、家禽類に流行性の悪性リンパ腫を引き起こす MDV と、同じくヒトにリンパ腫瘍疾患を起こす Epstein-Barr ウイルス (EBV) に焦点を当て、そのウイルス制御因子の機能発現機構について、特に抗ウイルス剤の標的として注目されるウイルス特異的酵素を中心として、他のウイルス因子あるいは宿主細胞因子との相互作用に関して解析を行った。

従来、ウイルス研究は主にウイルス因子側より展開されてきた。しかし、「ウイルスは自身では増殖不能という性状ゆえに宿主細胞機構を巧みに利用してその保存を試みる」といったウイルスの性状を鑑みると、根本的なウイルスの増殖機構を理解するためにはウイルス因

子と宿主因子の相互作用の研究は必須である。本研究はヘルペスウイルス制御因子の機能発現機構を宿主細胞機構との相互作用の観点から解析したものであるが、従来とは異なる視点からの全く新しい知見を得るものと考えられる。本論文は、以下の5章より構成されている。

第1章：マレック病ウイルス2型(MDV2)の UL25, UL26, UL26.5, UL27, UL28, UL29 相同遺伝子の同定

マレック病ウイルス (MDV) は、家禽類において流行性の悪性リンパ腫を引き起こすマレック病 (MD) の原因ウイルスである。マレック病は生ワクチンによって選択的にその発癌が防圧された唯一の疾病であり、獣医学領域のみならず、医学、理学領域でも癌制圧に重要な示唆を与えるものとして広く注目を集めてきた。血清型から3つに分類され、血清1型 (MDV1) は腫瘍原性を有する株と弱毒株を含むのに対し、血清2型 (MDV2) と3型 (HVT) は非腫瘍原性である。MDV1 弱毒株あるいは後者2つの血清型株は、MD に対する効果的な生ワクチンとして使用されている。これらの背景から非腫瘍原性株と腫瘍原性株の遺伝子構造の比較を通して、MDV の発癌性についての分子生物学的な考察が可能であると考えられる。その第一歩として、著者らのグループは世界に先駆けて MDV のゲノム解読に取り組み、この全塩基配列 (164,270bp) の決定に成功した。以下は著者自身がその過程で得た成果である。

MDV2 (ワクチン株) の *Bam*HI-G 及び W1 断片の約 4kbp の塩基配列を決定し、ヒト単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の UL25, UL26, UL26.5 に相同する遺伝子を世界で初めて同定した。その結果、MDV2 UL26 相同蛋白はカプシド形成時に働くウイルス特異的プロテアーゼであると示唆された。また、その領域から発現される転写産物の解析を行い、これらの遺伝子が実際に MDV2 感染細胞中で発現していることを明らかにした。次に、MDV2 の *Bam*HI-N, T2 及び *Eco*RI-H の約 10kbp の塩基配列を決定し、UL27, UL28, UL29 相同遺伝子を同定し、また、その転写産物を解析することにより、これらの遺伝子産物が MDV2 感染細胞中で発現していることを明らかにした。興味深いことに、MDV2 は他の α ヘルペスウイルスと異なり、UL28 と UL29 の間には UL 領域における複製開始点を持たないことが明らかになった。

第2章：マレック病ウイルス1型 (MDV1) ICP22 遺伝子産物の機能解析

MDV の遺伝子発現および潜伏感染からの再活性化を制御すると考えられる前初期遺伝子

産物の1つである ICP22 を鶏胚線維芽細胞において特異的かつ効率的に発現することに初めて成功した。次に、ICP22 とともに、同じく前初期遺伝子産物である ICP4、ICP27 の遺伝子発現制御能を検討した。MDV1 (強毒株) の ICP4、ICP22 が協調して同じく MDV1 の ICP27 プロモーターを活性化するのに対して、MDV2 の ICP27 プロモーター活性化能は極めて低いことを明らかにした。

第3章：Epstein-Barr ウイルス プロテインキナーゼ BGLF4 による宿主翻訳制御因子 elongation factor 1 δ (EF-1 δ) の過リン酸化

EBV に関しては、 γ ヘルペスウイルスである EBV のウイルス特異プロテインキナーゼ BGLF4 を発現・精製することにより、世界に先駆けてその活性を明らかにした。また、BGLF4 の宿主細胞側の標的として翻訳制御因子である elongation factor-1 δ (EF-1 δ) を同定した。ウイルスプロテインキナーゼはアミノ酸レベルで全ての亜科のヘルペスウイルスで保存されており、また、 α 、 β ヘルペスウイルスのプロテインキナーゼにより EF-1 δ がリン酸化されることが明らかになっている。以上より、EF-1 δ のリン酸化はヘルペスウイルスで普遍的に保存されている現象であり、そのリン酸化にはヘルペスウイルスで保存されているプロテインキナーゼが関与していることが示唆された。

第4章：Epstein-Barr ウイルス プロテインキナーゼ BGLF4 によるウイルス制御因子 EBNA-LP のリン酸化

第3章において EBV ウイルス特異プロテインキナーゼ BGLF4 の宿主細胞側基質の同定に成功したが、本章ではウイルス因子側の標的について検討したところ、BGLF4 が EBV 潜伏関連制御因子 EBNA-LP の機能的セリン残基 (Ser-35) をリン酸化することを明らかとした。EBNA-LP は、伝染性単核症等に由来する EBV の typeIII 潜伏感染細胞に発現するウイルス制御因子であるが、その潜伏再活性化期における発現および役割は全く不明であった。今回著者は、EBNA-LP が潜伏再活性化期の細胞においても発現していることを明らかにした。潜伏再活性化期にのみ発現する BGLF4 によって EBNA-LP の機能部位がリン酸化されること、また実際に EBNA-LP が潜伏再活性化期の細胞に発現するというこれらの知見は、EBNA-LP が潜伏期だけでなく、潜伏再活性化期において何らかの役割を果たしていることを強く示唆している。

第5章：宿主プロテインキナーゼ cdc2 は Epstein-Barr ウイルス制御因子 EBNA-LP の機能的リン酸化部位を標的とする

第4章で EBV プロテインキナーゼ BGLF4 のリン酸化部位として同定した EBNA-LP の Ser-35 は、宿主プロテインキナーゼである cdc-2 の標的コンセンサス配列中に存在していた。そこで、cdc-2 が Ser-35 をリン酸化するかを *in vitro* kinase assay にて解析したところ、cdc-2 が実際に Ser-35 をリン酸化することが明らかになった。つまり、BGLF4 と cdc-2 は EBNA-LP の同一セリン残基をリン酸化することが示唆された。

以上のことから、リンパ球好性腫瘍ヘルペスウイルスである MDV 及び、EBV 感染時において、ウイルス蛋白同士あるいは、宿主蛋白との相互作用は不可欠であり、ウイルス複製そのものがこれら蛋白間の相互作用の所産であることと考えられる。特に、ヘルペスウイルス感染細胞中での EF-1 δ のリン酸化は、全ての亜科および種のヘルペスウイルスで保存されている普遍的な現象であり、そのリン酸化にはヘルペスウイルスで保存されているプロテインキナーゼ (conserved herpesvirus protein kinase: CHPK) によって引き起こされていることを示している。また、CHPK である HSV-1 の UL13、BGLF4 と cdc-2 が EF-1 δ の同一セリン残基をリン酸化するという著者らの最新の知見と、BGLF4 と cdc-2 は EBNA-LP の同一セリン残基をリン酸化することという第4章の知見を考え併せると、CHPK が宿主プロテインキナーゼ cdc-2 と同一部位をリン酸化することが強く示唆される。さらに、著者はこれらの知見を裏付けるべく、実際に哺乳類細胞において BGLF4 と cdc-2 が EBNA-LP の同一セリン残基をリン酸化することという *in vivo* の証拠も得つつある。従って、以上の知見は CHPK の存在意義が「感染細胞中における cdc-2 の模倣」にあることを示すものである。

本研究で得られた結果は、ヘルペスウイルスは言うまでもなくリンパ球好性ウイルスあるいは腫瘍ウイルスを原因とする感染症に関わる普遍的な増殖機構、発癌機構、潜伏感染機構の解明、新しい抗ウイルス剤開発といった複数の重要課題に繋がることが期待される。