

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加藤 健太郎

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。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マレック病ウイルス(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が行われた。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

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。この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、その第一歩として世界に先駆けて 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  $\alpha$  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 $\delta$ (EF-1 $\delta$ ) の過リン酸化

EBV に関しては、 $\gamma$  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  $\delta$  (EF-1  $\delta$ ) 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、 $\alpha$ 、 $\beta$  ヘルペスウイルスのプロテインキナーゼにより EF-1  $\delta$  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  $\delta$  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。

以上本論文は、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。よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)論文として価値あるものと認めた。