

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山根 大典

牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類され、畜産経営上重要な病原体である。BVDVには細胞病原性(cp)および非細胞病原性(ncp)と生物学的性質の異なった2種類の生物型のウイルス株が存在し、ncp株が胎子に持続感染を起こすと、子牛体内でやがてcp株へと変異することによって致死的な粘膜病を引き起こすことが明らかとなっている。本論文では、cp株感染を中心にアポトーシスやインターフェロン(IFN)等の先天性免疫誘導メカニズム及びウイルス-宿主間の蛋白相互作用を解析することにより、宿主先天性免疫応答を介した細胞病原性発現メカニズムの解明を目指した。各章の要約は以下の通りである。

第一章においては、cp株感染細胞における外因系因子 $TNF\alpha$ によるアポトーシス誘導機構についての解析を行い、BVDVの細胞病原性においては $TNF\alpha$ の過剰発現がアポトーシス増強に関与していることを見出した。これまでアポトーシスは内因系経路のみが働いているとの報告があったが、外因系経路も細胞死の増強に関与していることが示された。続いて第二章においては、cp株感染細胞においては、ウイルスRNA複製量がncp株と比較して顕著であったことから、ウイルスRNA複製時に複製中間体として形成される2本鎖RNAがアポトーシスの引き金なのではないかと考え、cp株感染細胞におけるウイルス2本鎖RNのアポトーシス誘導における役割を解析した。cp株感染細胞から抽出したウイルス2本鎖RNAのみによってアポトーシスが誘導されることが示され、更に2本鎖RNAを認識することでアポトーシスを誘導する宿主因子であるOAS-1とPKR双方をRNAiによりノックダウンすると、アポトーシスが強く抑制されたことから、2本鎖RNA量がアポトーシス誘導の引き金として重要であることが強く示唆された。第三章においては、第一、第二章で得られた*in vitro*における知見が*in vivo*に反映されるかどうかを明らかにすることを旨とし、BVDV持続感染(PI)牛におけるウイルスRNAレベルと先天性免疫誘導との関係を調べた。PI牛より得られた脾臓内におけるウイルスRNA量と先天性免疫誘導因子の転写量やアポトーシス誘導レベルとの関係について回帰分析を行った結果、ウイルスRNA量とIFN誘導因子の誘導レベルとの間に有意な正の相関が認められ、更にウイルスRNA量が多い個体ほど顕著な臨床兆候が認められたことから、*in vivo*においてもウイルスRNA複製量が宿主の先天性免疫誘導や病態形成に重要であることが示唆された。第四章においてはBVDV感染における宿主のキナーゼシグナルの活性化状態についての解析を行い、cp株感染MDBK細胞においてextracellular signal-regulated kinase(ERK)のリン酸化による活性化が認められた。また、cp株感染細胞上清にERKリン酸化誘導能が認められたことから、cp株感染細胞は上清中にERK活性化因子を放出していることが示された。ERKリン酸化は過酸化水素の添加や血清除去によっても誘導され、一方で抗酸化物質である

N-acetylcysteine やグルタチオン処理によって抑制されたことから、上清中に放出された Reactive oxygen species による酸化ストレスが ERK リン酸化を誘導していることが示された。MDBK 細胞において ERK リン酸化は生存や増殖を促進することが認められたが、ERK シグナルは NF κ B を初めとする炎症シグナルを誘導することも知られていることから、ERK の異常な活性化は病態形成に繋がる可能性が考えられた。第五章では、BVDV 感染により MDBK 細胞及び BFM 細胞内において誘導される遺伝子発現について、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、ncp 株感染細胞においては遺伝子発現変化が殆どみられないのに対し、cp 株感染においては顕著な遺伝子発現誘導が両細胞において認められた。cp 株は両細胞において同様に細胞死を誘導するが、線維芽細胞である BFM 細胞においては、主に IFN 誘導因子や炎症性サイトカインの発現誘導が顕著に認められた。それに対し、上皮系細胞である MDBK 細胞においては小胞体ストレス関連因子の発現が特徴的にみられた一方で、IFN 応答は BFM と比較して遥かに弱いレベルであった。更に、免疫制御、アポトーシス、代謝、MAP キナーゼや転写因子等の mRNA についても、両細胞間において異なるパターンの発現誘導が見られ、細胞タイプ毎に異なるシグナル経路を介して細胞病原性が誘導されていることが示された。第六章においては BVDV と宿主蛋白との直接的な相互作用に焦点を当て、細胞病原性の指標となる NS3 蛋白の宿主因子との相互作用についての解析を行った。酵母 2 ハイブリッド法を用いてスクリーニングを行った結果、NS3 と結合する因子としてスフィンゴシンキナーゼ 1 (SphK1) を同定した。NS3 は SphK1 の酵素活性を著しく抑制することが示され、また SphK1 活性の抑制はウイルス複製の増強に繋がることが認められた。更に SphK1 の過剰発現によってアポトーシス誘導が弱まったことから、NS3 による SphK1 活性制御は効率的なウイルス複製に寄与するのみならず、細胞病原性発現にも深く関与していると考えられた。しかしながら、非開裂の NS2-3 も同様に SphK1 に結合、抑制したことから、ncp 株感染によっても同様に SphK1 活性が制御されていると考えられた。

以上本論文は、BVDV 感染により誘導されるアポトーシスやストレス経路等の細胞シグナル伝達の他、ウイルス蛋白による直接的な宿主蛋白の機能制御メカニズムを明らかとしたもので、学術上獣医学のみならず、医学にも貢献することが少なくない。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。