

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ムハマド・アティフ・ザフル

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、エンベロープを有し、プラス 1 本鎖をゲノムに持つ。フラビウイルス科、ペスチウイルス属に分類され、ペスチウイルス属の中では最も研究が進んでいるウイルスである。また、ヒトの C 型肝炎増殖のモデルとしての研究も進められている。BVDV のゲノムは単一のポリ蛋白をコードしており、このポリ蛋白がウイルス由来ないしは細胞由来蛋白分解酵素によって、機能を有する蛋白に開裂する。開裂蛋白の名称と順序は、アミノ末端から N^{pro}、C、E^{rns}、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B である。非構造蛋白 5A (NS5A) は 56-58 kDa のリン酸化された亜鉛結合性蛋白で、ウイルス複製に必須である。しかし、BVDV の病原性発現における NS5A の機能は全く知られていない。NS5A に酵素活性は認められないため、恐らく宿主細胞因子との相互作用により病原性に関与していると考えられる。従って、NS5A の機能を解明することにより、BVDV の増殖や病原性発現メカニズムが明かとなることが期待される。

NS5A の研究を行うためには、特異的抗血清を用いることが必須である。このため、第 1 章では、BVDV NS5A に対するモノクローナル抗体 (MAb) を作成した。NS5A をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白として大腸菌を用いて発現させ、マウスを免疫した。2 種の MAb が得られ、両抗体とも NS5A のアミノ末端領域を認識していた。このうち、MAb 1H12 は BVDV 野外株の遺伝子型 1 および 2 を共に検出することに成功した。この抗体を用いることで、ウイルス感染細胞において感染後 12~60 時間の期間 NS5A が検出された。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、NS5A は NS3 と共に、感染細胞の小胞体膜に局在した。

第 2 章では、NS5A のリン酸化に関与する酵素の同定を行った。いくつかの宿主リン酸化酵素、例えばプロテインキナーゼ A (PKA)、カゼインキナーゼ I (CKI)、CKII、MAPK および MEK 関連酵素群は、その候補と考えられている。しかし、どの酵素が主要な働きをするのかは知られていない。そこで、第 1 章で構築した GST 融合 NS5A を基質とし、3 種のリン酸化酵素 (PKA、CKII、MAPK 関連酵素群の一つである *cdc2*) による *in vitro* リ

ン酸化反応を行った。この結果、PKA と CKII は NS5A をリン酸化出来なかったが、cdc2 によるリン酸化が認められた。また、リン酸化部位と考えられるアミノ酸を変異させた NS5A は cdc2 によるリン酸化が認められなかった。即ち、BVDV NS5A が宿主細胞のリン酸化酵素である cdc2 によってリン酸化されることを、初めて明らかとした。

第 3 章では、NS5A と結合する宿主因子を探索した。NS5A のアミノ末端領域をベイトとし、イースト 2 ハイブリッド法を用いたスクリーニングを行った結果、牛腎臓由来継代細胞である MDBK 細胞の cDNA ライブラリーから NIBP (NIK and IKK- β binding protein) と呼ばれる因子を同定することが出来た。NIBP は NF- κ B シグナル伝達に関与する因子である。NS5A と NIBP の相互作用は、GST プルダウン法、免疫沈降法、共焦点レーザー顕微鏡観察によって確認された。さらに、NIBP の欠損変異体を作成することにより、アミノ酸領域の 597 から 623 の領域が NS5A との結合に関与していることも明らかとした。また、NS5A の過剰発現により TNF- α による NF- κ B の活性化が阻害されること、ウイルス感染細胞において NIBP を siRNA によって抑制した結果、ウイルス増殖が増加することも明らかとなった。これは、NS5A が細胞因子の NIBP と結合することにより、ウイルスの増殖や病原性発現に影響を与えていることを示唆していると考えられ、BVDV はもとより類似ウイルスでも初めての知見である。

以上本論文は、特異的抗体作成やウイルス非構造蛋白と細胞因子の相互作用を明らかとすることで、BVDV 感染細胞におけるウイルス増殖とその結果である細胞異常、即ち病原性発現メカニズム解明に道を開いたものであり、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。