

学 位 論 文 題 名

マレック病ウイルス ICP 4 ホモローグによる
ウイルス遺伝子発現の活性化

学位論文内容の要旨

マレック病の発病機構の解明のためには、感染ウイルスの活性化機構を明らかにするとともにそれらの知見に基づいて組織内のウイルス転写物の検出が求められる。マレック病ウイルス (MDV) については、ほとんどの遺伝子発現が抑制される潜伏感染から、ウイルス粒子形成を伴う崩壊感染まで、多様な感染形式が知られている。現在までに 28 の MDV 遺伝子が報告されたにもかかわらず、それらの感染を決定づけるウイルス側の因子は報告されていない。著者は、アルファヘルペスウイルス群でウイルス活性化の初期因子として知られているヒト単純ヘルペスウイルス ICP4 の MDV のホモローグ (MDV ICP4) に注目した。本研究は、MDV ICP4 の感染初期過程における MDV 遺伝子の活性化作用を明らかにするとともに、感染鶏内での検出を目的とする。

第一に、MDV ICP4 のオープンリーディングフレーム (ORF) を含んだプラスミド (pSV-ICP4S) を作出し、ハイモビリティグループ (HMG) 蛋白質とリポソームを用いた方法でマレック病腫瘍株化細胞 MDCC-MSB1 (MSB-1) にトランスフェクトすることにより、短時間のうちに MDV ICP4 を発現させた。その結果、腫瘍株化細胞に潜伏感染している MDV ゲノム上の MDV ICP4 の発現が促進された。一方、この MDV ICP4 の発現にもかかわらず、MDV の DNA ポリメラーゼ遺伝子については発現量の変化は認められず、pp38 についてはわずかな増加が認められたが、有意ではなかった。また、MDV ゲノムの細胞あたりのコピー数については、変化が認められなかった。これらの結果から、MDV ICP4 の発現は、それ自身の DNA ポリメラーゼによるゲノムの自律的複製を伴う全面的なウイルスの活性化にはいたらないことが示唆された。

磷酸化蛋白質 pp38 は、MD 腫瘍において発現が認められている数少ないウイルス抗原で、腫瘍化への関与が議論されてきた。また、その ORF の上流には ICP4 結合配列と 2 種の転写因子結合配列を含むプロモーター/エンハンサー領域が報告されており、MDV ICP4 によって活性化される可能性が指摘されてきた。しかしながら、MDV ICP4 をトランスフェクトした細胞において、pp38 の発現量は、わずかな増加にとどまった。著者は、pp38 の cDNA 解析とプライマー伸長解析によ

り、pp38のプロモーター/エンハンサー領域を同定し、さらに、cDNA上の翻訳領域からリコンビナント蛋白質を作出することにより、転写開始点の妥当性を確認した。これらの結果により確認された転写調節領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、pSV-ICP4と同時にMSB-1にトランスフェクトすることにより、MDV ICP4のpp38プロモーター/エンハンサー領域への直接の効果を検出した。これらの結果から、トランスフェクトされたMDV ICP4は、pp38プロモーター/エンハンサー領域を活性化することが示された。

上記の結果から、MDV ICP4は、少なくとも一部のウイルス遺伝子を活性化するが、最終的な活性化までには進行しないことが示唆された。このMDV ICP4の発現を感染鶏中で検出するため、ノーザンブロット解析により、MDV ICP4のORFの1 kb上流の0.55 kbのDNA断片から転写されたRNAをプローブとして選択した。この領域のdigoxigenin (DIG) 標識したcRNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーション (ISH) 法を行ったところ、92%のMDVに感染した鶏胚線維芽細胞 (CEF) と0.35%のMSB-1において陽性シグナルを検出した。同時にISH法を行った非感染CEFがISH陰性であったことと、MSB-1細胞における陽性シグナルの頻度が報告されている抗原陽性比率と一致することから、ISH陽性シグナルがMDV ICP4の転写を示すことが示唆された。続けて上記のDIG標識cRNAプローブを用いて感染鶏のパラフィン切片においてISH法を行ったところ、羽包上皮 (FFE) ならびに腎臓、肝臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経中に浸潤したリンパ様細胞においてMDV ICP4のmRNAの発現を検出した。これらの組織におけるMDV ICP4転写物の発現は、RT-PCR法によって確認された。

MDV ICP4トランスフェクション実験の結果から、MDV ICP4をプローブとしたISH法により崩壊感染細胞に加えて、崩壊感染の前段階と崩壊感染をおこさない細胞の一部が検出される可能性が示唆された。本研究では、崩壊感染が報告されているFFEに加えて、感染後の腫瘍の潜伏期においては崩壊感染の頻度が低いことが予想されるリンパ様細胞においてもMDV ICP4のmRNAの陽性細胞の存在が認められた。これらのリンパ様細胞中においては、MDV遺伝子群がMDV ICP4により部分的に活性化している可能性も示唆される。本研究で確立されたISH法を用いて、MDV遺伝子を活性化するMDV ICP4遺伝子および活性化される遺伝子群の発現を感染鶏内で観察することにより、MD発病に関する重要な知見を得る事が可能となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 藤 文 昭

副 査 教 授 板 倉 智 敏

副 査 助教授 桑 原 幹 典

副 査 教 授 林 正 信

学 位 論 文 題 名

マレック病ウイルス ICP 4 ホモログによる ウイルス遺伝子発現の活性化

申請者はマレック病の発症機構の解明のために、MDV ICP 4 によるMDV 遺伝子の活性化作用と ICP 4 の転写物の検出に関する研究を行った。

MDV ICP 4 のオープンリーディングフレームを含んだプラスミドを作出し、ハイモビリティグロブ蛋白質とリボソームを用いて、マレック病腫瘍株化細胞にトランスフェクトした。その結果潜伏感染しているMDVの ICP 4 の発現が促進された。一方でMDVのDNAポリメラーゼ遺伝子の発現量の変化は認められなかった。磷酸化蛋白質である pp38 は、マレック病腫瘍において発現している数少ないウイルス抗原で、腫瘍化への関与が示唆されてきた。MDV ICP 4 のトランスフェクションによって、pp38 遺伝子の発現量はわずかに増加したが、有意ではなかった。これらの結果から、MDV ICP 4 の発現は、自律的複製を伴う全面的なウイルスの活性化には至らないことが示唆された。

申請者は pp38 の cDNA 解析、プライマー伸長解析およびリコンビナント蛋白質を作出することにより、プロモーター／エンハンサー領域を同定した。さらにこの領域に対するMDV ICP 4 の促進作用をルシフェラーゼ発現プラスミドを用いて示した。

さらに感染鶏中のMDV ICP 4 の発現を検出するために、digoxigenin で標識した cRNA をプローブとして in situ ハイブリダイゼーション (ISH) を行った。感染鶏のバラフィン切片を用いて、羽包上皮、腎臓、腰仙骨神経叢および坐骨神経中に浸潤したリンパ様細胞に、MDV ICP 4 の mRNA を検出した。同様の ISH により、感染した鶏胚線維芽細胞中でも、その mRNA を検出することが出来た。

以上の知見はマレック病発症機構の解明に寄与する所が大であり、新たに開発された ISH の技術は、今後広く活用されることが期待されている。よって審査員一同は、遠藤大二氏が博士 (獣医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。