

氏 名 (本籍)	寺 崎 香 織 (長崎県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第254号
学 位 授 与 年 月 日	平成20年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Molecular Biological Studies on the Virulence Factor of Infectious Bursal Disease Virus (伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの病原性決定因子に 関する分子生物学的研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人 副査 帯広畜産大学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 石 黒 直 隆 副査 鳥 取 大 学 教 授 山 口 剛 士

論 文 の 内 容 の 要 旨

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) は、ファブリキウス嚢の炎症性病変を特徴とするウイルス性疾患で、IBDVウイルス (IBDV) を病原とする。IBDVは致死率の低い従来型および致死感染を起こす超強毒型に分類される。しかし、これらの病原性の違いや致死の病原性発現機構は不明であり、野生型病原株を弱毒化することなく増殖できる培養細胞もこれまで報告されていない。IBDVは鶏のB細胞に選択的に感染し、ファブリキウス嚢を中心とした免疫組織を破壊する。病変の形成にはB細胞のネクロシスおよびアポトーシスの関連が示唆されているが、ウイルス感染による細胞死誘導のメカニズムは不明である。近年、IBDVの非構造タンパク質であるVP5の感染細胞細胞膜への蓄積による膜透過性の亢進およびアポトーシスの誘導への関与が報告され、IBDVの病原性因子として注目されている。しかし、その細胞傷害性発現のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、超強毒型IBDVの致死感染とその病原性発現におけるVP5の機能および細胞傷害性発現メカニズムの解明を目的とし、以下の4つの研究を行った。

第1章では、DT40細胞についてIBDV野生型病原株の増殖性を検討し、in vitroでの性状解析における有用性を検討した。超強毒型および従来型IBDVの野生型病原株は、通常培養細胞への馴化過程で発育鶏卵漿尿膜での継代を必要とするが、DT40細胞ではこのような過程を経ることなく良好に増殖した。DT40細胞継代株について、IBDVの病原性に関与するVP2アミノ酸可変領域の塩基配列を解読した結果、株間で共通のアミノ酸変異は予測されな

かった。これらの結果から、DT40細胞がIBDV病原株の効率的分離とin vitroでの解析に有用なことが示唆された。

第2章では、VP5の細胞膜への移行に必要なアミノ酸領域を特定するため、VP5の様々な欠損体をGFPとの融合タンパク質として細胞内で発現させ、その局在を観察した。その結果、132から138番目のアミノ酸領域がVP5の細胞膜への移行に必須であることが明らかになった。また、このアミノ酸領域には以前に膜貫通領域であることが予測されていた疎水性アミノ酸領域は含まれておらず、VP5が膜貫通型タンパク質ではない可能性が示唆された。

第3章では、VP5の感染細胞内における機能解明の手がかりとして、IBDV感染鶏胚線維芽細胞内におけるVP5の局在を解析した。VP5および様々な細胞内小器官に対する抗体を用いた蛍光染色法による解析で、IBDV感染初期にVP5がオートファゴソームに局在していることが示唆された。また、阻害剤を用いた実験により、VP5の細胞膜への輸送はゴルジ体ではなく、オートファゴソームを経由している可能性が示唆された。

第4章では、VP5とIBDV超強毒型株の病原性との関連を検討するため、病原性の異なる超強毒株および従来株由来のVP5を培養細胞内で一過性発現させ、発現細胞の形態的变化を比較した。VP5陽性細胞の生細胞での観察を行うため、VP5と独立してGFPを発現するプラスミドを構築し実験に用いた。その結果、形態的变化に明らかな違いは認められなかったものの、超強毒型株由来VP5発現細胞では、従来型株由来VP5発現細胞と比較して、GFP蛍光の著しい減弱が観察された。この蛍光の減弱はVP5の細胞膜への移行阻害により観察されなくなった。これまでに、VP5の細胞膜への蓄積が細胞融解やアポトーシスの誘導を引き起こすことが報告されており、超強毒型株由来VP5と従来型株由来VP5では、細胞傷害性が異なる事が推察された。

本研究では、DT40細胞がIBDVの病原株の解析に有用であることを示した。また、VP5が感染初期にオートファゴソームに局在することを明らかにした。オートファジーはこれまで、アポトーシスの抑制や誘導に関与していることが報告されており、IBDV感染初期におけるVP5によるアポトーシスの抑制にオートファジーが関与している可能性が示唆された。また、第二章および第三章の結果から、VP5が膜貫通型タンパク質でない可能性が示唆された。これまでVP5は、膜貫通タンパク質であることが予測され、イオンチャネル様の機能により膜透過性を変化させていることが推察されていた。しかし、本研究の結果から、VP5による膜透過性変化は別のメカニズムが関与していることが推察された。第四章では、VP5が、従来型および超強毒型株の病原性の違いに関与している可能性が示された。これらの成績から超強毒型IBDVの病原性発現メカニズムおよびVP5による細胞傷害性発現のメカニズムの一端を明らかにできた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、超強毒型IBDVの致死感染とその病原性発現におけるVP5の機能および細胞傷害性発現メカニズムの解明を目的とし、以下の4つの研究を行った。

第1章では、DT40細胞についてIBDV野生型病原株の増殖性を検討し、DT40細胞がIBDV病原株の効率的分離とin vitroでの解析に有用なことを示唆した。

第2章では、非構造蛋白質であるVP5の細胞膜への移行に必要なアミノ酸領域を特定した。VP5の様々な欠損体をGFPとの融合タンパク質として細胞内で発現させ、その局在を観察した。その結果、132から138番目のアミノ酸領域がVP5の細胞膜への移行に必須であることが明らかになった。また、VP5が膜貫通型タンパク質ではないことを示唆した。

第3章では、IBDV感染鶏胚線維芽細胞内におけるVP5の局在を解析した。IBDV感染初期にVP5がオートファゴソームに局在していることが示された。また、VP5の細胞膜への輸送はゴルジ体ではなく、オートファゴソームを経由している可能性を示唆した。

第4章では、VP5とIBDV超強毒型株の病原性との関連を検討するため、病原性の異なる超強毒株および従来株由来のVP5を培養細胞内で一過性発現させ、発現細胞の形態的变化を比較した。VP5と独立してGFPを発現するプラスミドを構築し実験に用いた。形態的变化に明らかな違いは認められなかったが、超強毒型株由来VP5発現細胞では、従来型株由来VP5発現細胞と比較して、GFP蛍光の著しい減弱が観察された。この蛍光の減弱はVP5の細胞膜への移行阻害により観察されなくなった。超強毒型株由来VP5と従来型株由来VP5では細胞傷害性がわかった。

以上の研究結果から、DT40細胞がIBDVの病原株の解析に有用であることを明らかにした。また、VP5が感染初期にオートファゴソームに局在することを明らかにした。IBDV感染初期におけるVP5によるアポトーシスの抑制にオートファジーが関与している可能性が示唆された。また、VP5が膜貫通型タンパク質でない可能性が示唆された。VP5が、従来型および超強毒型株の病原性の違いに関与している可能性が示された。

これらの成績は、超強毒型IBDVの病原性発現メカニズムおよびVP5による細胞傷害性発現、すなわち膜透過性変化およびアポトーシスの調節のメカニズムの解明に貢献するであろう。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目： Chicken B lymphoma DT40 cells as a useful tool for *in vitro* analysis of pathogenic infectious bursal disease virus
- 著 者 名： Terasaki, K., Hirayama, H., Kasanga, C. J., Maw, M. T., Ohya, K., Yamaguchi, T. and Fukushi, H.
- 学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science
- 巻・号・頁・発行年： 印刷中

既発表学術論文

- 1) 題 目： A practical tissue sampling method using ordinary paper for molecular detection of infectious bursal disease virus RNA by RT-PCR

著 者 名： Maw, M. T., Yamaguchi, T., Kasanga, C. J., Terasaki, K. and
Fukushi, H.

学術雑誌名： Avian Disease

巻・号・頁・発行年： 50 (4): 556-560, 2006

- 2) 題 目： Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of
infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to
2004

著 者 名： Yamaguchi, T., Kasanga, C. J., Terasaki, K., Maw, M. T., Ohya,
K. and Fukushi, H.

学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年： 69 (7): 733-738, 2007