

## 2021 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| 研究課題  | 牛ヘルペスウイルス 4 型蛋白質による宿主蛋白質分解機構の解明  |
| キーワード | ①牛ヘルペスウイルス、②免疫回避、③ユビキチン・プロテアソーム系 |

### 研究者の所属・氏名等

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| フリガナ<br>氏名                  | マエダ マリカ<br>前田 まりか  |
| 配付時の所属先・職位等<br>(令和3年4月1日現在) | 日本獣医生命科学大学 獣医学部 ポストドクター  |
| 現在の所属先・職位等<br>(令和4年7月1日現在)  | 東京農業大学 農学部 嘱託助教  |
| プロフィール                      | 2010年に日本獣医生命科学大学を卒業・獣医師免許を取得後、2019年まで山形県農業共済組合の家畜診療所で産業動物臨床に従事しました。その間、日本獣医生命科学大学大学院に社会人研究生として在籍し、2020年に乳牛の潜在性ルーメンアシドーシスに関する研究で博士号を取得しました。2020年に日本獣医生命科学大学 ポストドクターに就任し、現在は東京農業大学で産業動物の生産性向上を目指した調査研究に取り組んでいます。 |

### 1. 研究の概要

症状が顕在性で致死的な家畜伝染病の診断・防疫技術が発達した現代において、さらなる家畜の生産性向上のためには、症状が潜在的ではあるが、長期にわたり経済的損失を生み出す消耗性疾病の原因究明と対策が必要である。

本研究の対象である牛ヘルペスウイルス 4 型 (BHV-4) は、単独での病原性は低いとされているが、持続感染により他の感染症の増悪因子として様々な感染性疾患の下地となっている可能性がある。しかし、特定の疾病との関係については不明の点が多い。ヘルペスウイルスのように持続感染するウイルスは、様々なメカニズムで宿主の免疫から回避していることが明らかにされている。本研究は、「BHV-4 の宿主免疫からの回避機構を解明する」ことを目的とし、牛の生産性に負の影響を与える新たな因子の特定と、生産性向上への寄与を目指して行った。

### 2. 研究の動機、目的

近年の酪農において、乳用牛の供用年数は年々短縮している。乳牛の生産寿命を縮める原因の大部分を、疾病による死亡、乳房炎などの乳器障害、生殖器病やホルモン異常による繁殖障害が占めている。今後、国内の生乳生産基盤の強化には、乳用牛を新たに増頭するだけでなく、現在飼養している牛の生産性を最大限に高め生産寿命を延ばすことが課題である。そのためには、淘汰につながる乳器障害や繁殖障害の発生防止が非常に重要となる。BHV-4 とこれらの疾患の関連性を明らかにすることで、乳用牛の生産性向上に貢献できるのではと考え、本研究を計画・遂行するに至った。

BHV-4 と近縁のカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) は、ユビキチン・プロテアソーム系と呼ばれる細胞内の蛋白質代謝システムを利用することで、宿主の免疫関連膜蛋白質である MHC クラス I 分子の分解を促進し、宿主免疫から回避していることが報告されている (Ohmura-

Hoshino M, *et al.*, *J. Biochem.*, **140**(2): 147-154, 2006)。ユビキチン・プロテアソーム系による蛋白質分解には、E1, E2, E3 という 3 つの酵素が関与し、標的蛋白質に鎖状に付加されたポリユビキチン鎖が目印となってプロテアソームに運ばれ、標的蛋白質が分解される。これまでに我々のチームは、BHV-4に感染した細胞ではMHCクラス I 分子の発現が低下すること、そして BHV-4 には KSHV のウイルス蛋白質と相動性の高い Bo4、Bo5 蛋白質が存在することを明らかにした。そこで、本研究では Bo4 および Bo5 蛋白質が E3 ユビキチンリガーゼとして働き、MHC クラス I 分子を標的としてその分解を促進しているのではないかと仮説を立て、これを検証する実験を行った。

### 3. 研究の結果

#### ①Bo4、Bo5 蛋白質による自己ユビキチン化

Bo4 および Bo5 遺伝子のクローニングを行い、蛋白質の安定性を高めるためにタグ蛋白質との融合遺伝子を作成した。先行実験ではウシ由来である MDBK 細胞やウシ末梢血リンパ球への遺伝子導入が非常に困難であったが、本研究ではリポフェクション法による遺伝子導入効率が高い牛子宮内膜由来培養細胞 BE-1 (Shiokawa M, *et al.*, *Sci. Rep.*, **11**:16207, 2021) の提供を受け、この細胞に融合遺伝子を導入して蛋白質の発現を確認した。Bo4 および Bo5 蛋白質はポリユビキチン鎖の付加したバンドとして検出されたことから、これらが自己ユビキチン化能を持つことが示された。E3 ユビキチンリガーゼは、基質だけでなく自己にもユビキチン鎖を付加する自己ユビキチン化能を示す。このことから、Bo4 および Bo5 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つことが明らかになった。

#### ②Bo4、Bo5 遺伝子導入細胞における MHC クラス I 分子の発現低下

Bo4 および Bo5 遺伝子を発現させた細胞における MHC クラス I の発現強度を解析した(写真)。Bo4 を発現させた細胞では、MHC クラス I の発現は低下しなかった。一方、Bo5 を発現させた細胞では、MHC クラス I の発現が低下していた (図 1)。

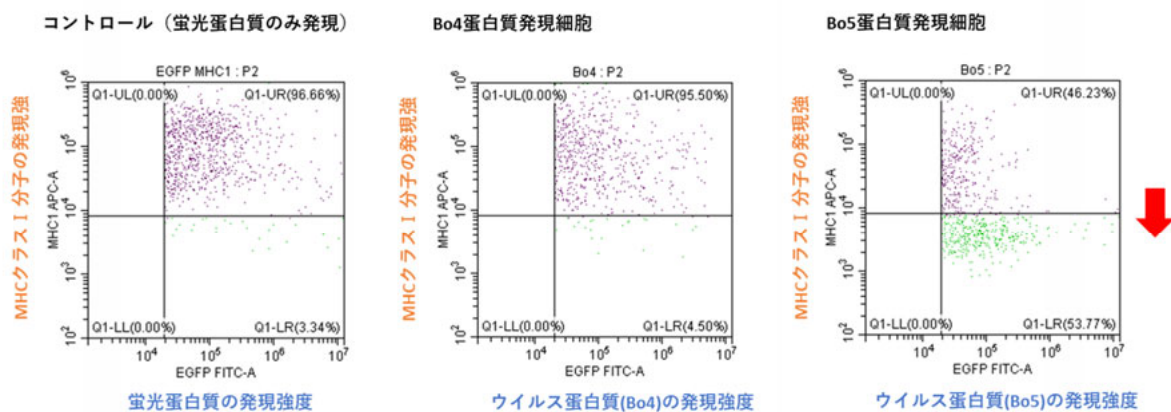


図1. ウイルス蛋白質によるMHCクラス I 分子への影響

これらの結果から、Bo4 および Bo5 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼとして働き、Bo5 においては MHC クラス I 分子をユビキチン化することで分解を促し、宿主免疫からの回避に役立っている可能性が示唆された。しかし、本研究では、MHC クラス I 分子が実際にユビキチン化されていることを直接的に証明することはできなかった。今後は、近年のユビキチン研究で用いられている最先端の解析手法を試み、Bo4 および Bo5 蛋白質の基質同定を行うとともに、これらの蛋白質の酵素活性部位の同定を行いたい。

#### 4. 研究者としてのこれからの展望

本研究で得られた結果は、BHV-4 が宿主免疫を回避するメカニズム解明への道筋を得る有意義なものとなった。今後も、症状が顕在化しないためにこれまで見落とされていた消耗性疾病の原因究明と対策につながる研究を継続していきたい。

近年、家畜の多頭化や農場の大規模化に伴い疾病の発生規模も大きくなっており、今後ますます疾病予防の重要性が高まると考えられる。家畜の健康を守ることは、生産性の向上や農家の収益性アップだけでなく、アニマルウェルフェア、そして安心・安全な畜産物の提供につながる。私は今後、研究者として、これまでの臨床経験をもとに畜産現場のニーズに即した研究を設計・実践し、現場に還元していくことでワンヘルス（動物とヒトの健康は一つ）に貢献していきたいと考えている。

#### 5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は本研究をご支援いただき、誠にありがとうございました。本研究へのご理解、ご期待いただきましたこと、奨励金を賜りましたことに心より感謝申し上げます。

私はこれまで産業動物の診療現場で働く中で、生産農家の方々が直面する問題を一緒に解決していきたいと常に感じていました。フィールドを研究に移した現在でも、その志は変わりません。研究の道を歩み始めてまだ日が浅く、出産・育児というライフイベントを挟んでの挑戦でしたが、本奨励金のご支援により研究を進めることができました。これからも畜産現場のニーズに即した研究で少しでも現場に還元できるよう、研究活動に邁進していきたいと存じます。今後も若手・女性研究者の活躍のためご支援を頂きますようお願い申し上げます。

