

審査の結果の要旨

氏名 ワラ アーシー

本論文は、*in vitro* および *in vivo* の牛白血病ウイルス (BLV) 感染におけるアルギニン残基のメチル化酵素である Protein Arginine *N*-Methyltransferase (PRMT) 5 の意義について述べられている。

BLV は、レトロウイルスに共通する *gag*, *pol*, *env* 遺伝子に加えて *env* と 3' 側の long terminal repeat (LTR) の間に pX 領域が存在することから、人類の難治疾患である成人 T 細胞白血病 (ATL) を惹起する成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV) と共にデルタレトロウイルスに分類される。BLV 感染牛は未発症健康、持続的リンパ球増多症、そして、5 年から 10 年の長い潜伏期間を経て悪性 B リンパ腫である地方病性牛白血病 (EBL) を発症する。しかし、EBL には有効な治療法はなく、一度発症すると必ず死の転帰をとることから畜産界に与える打撃は深刻である。近年、BLV は我が国だけでなく、世界的レベルで拡大しており、現在、EBL は国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病の一つに挙げられている。BLV は宿主細胞に感染すると、プロウイルスとして感染細胞の染色体 DNA に組み込まれ、BLV に対する抗体が陽転しても体内から排除されずに持続的に感染する。これまでに当研究室では、プロウイルス量が EBL の病態進行と相関すること、そして BLV 感染個体内でプロウイルス量の増減に伴って発現連動する新規宿主遺伝子の一つとして、PRMT をみいだした。

PRMT はファミリーを形成しており、現在は PRMT1-10 までの 10 種のタンパクが同定されている。その機能はアルギニン残基のメチル化である。主要な II 型 PRMT である PRMT5 は、遺伝子発現、転写、スプライシング、翻訳およびシグナル伝達に関与している事が知られている。近年、PRMT5 が発癌ウイルスである HTLV-1、Epstein-Barr ウイルス (EBV)、B 型肝炎ウイルス (HBV) およびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)、およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) の生活環を制御していることが報告されている。しかしながら、PRMT5 と BLV との関連性は未だ明らかになっていない。

本研究は、*in vitro* および *in vivo* の BLV 感染における PRMT5 の果たす役割について明らかにすることを目的とした。

最初に、*in vivo* の BLV 感染における PRMT 5 の発現レベルを調べた。BLV 非感染牛 (20 頭) および BLV 感染牛 (42 頭) の末梢血から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて PRMT5 遺伝子の mRNA レベルでの発現を解析した。同時に、DNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いてプロウイルス量を測定し、プロウイルス量が 10,000 コピー/10⁵ 細胞を超過した「BLV 高リスク牛」と、逆にそれ以下を示した「BLV 伝播低リスク牛」に分類した。その結果、PRMT5 は BLV 高リスク牛においてのみ、有意に強く発現していることが明らかとなった。次に、BLV を実験的に感染させた感受性牛 5 頭の RNA を用いたリアルタイム PCR により PRMT5

遺伝子の発現を調べたところ、感染後 3 週目の BLV プロウイルス量のピークに伴い、5 頭全てのウシで PRMT5 遺伝子の発現が増加した。さらに、発症と PRMT5 遺伝子発現の関連性を解析するため EBL 発症牛（20 頭）の RNA を抽出し、リアルタイム PCR により PRMT5 遺伝子発現を解析し、非感染牛および感染健康牛と比較したところ、EBL 発症牛の PRMT5 遺伝子の発現が有意に上昇していた。

続いて、*in vitro* の BLV 感染における PRMT5 は発現の意義を BLV 安定発現細胞株（FLK/BLV 細胞および PK15/pBLV-IF 細胞）を用いて解析した。まず、両細胞において PRMT5 発現を PRMT5 特異的 siRNA を用いてノックダウンすると、BLV *gag* および *tax* 遺伝子の mRNA レベルおよび BLVGag および Env の蛋白質レベルでの発現が有意に増加した。次に、PRMT5 阻害剤である CMP5 で両細胞を処理すると、BLVGag および Env 蛋白質の発現が有意に増加した。さらに、CMP5 の添加により両細胞において、Env 蛋白質の糖鎖（高マンノース型糖鎖や複合型糖鎖）の付加が観察された。同時に、CMP5 の添加により、Env 蛋白質の細胞質と細胞膜の局在には影響を及ぼさなかったが、Env 蛋白質の重要な機能であるシンシチウム形成能は低下した。さらに、BLV 感染 B リンパ腫細胞 KU-1 を CMP5 で処理すると、アポトーシス能の有意な上昇と細胞増殖の低下が認められた。

本研究において、PRMT5 の発現は、*in vivo* の BLV 感染固体において、感染直後の BLV プロウイルス量のピークに伴い一過性に増加後に正常レベルで維持され、高プロウイルスおよび発症のステージにおいて上昇することが明らかとなった。一方、*in vitro* の BLV 感染細胞において PRMT5 発現は BLV 遺伝子の発現を転写レベルおよび蛋白質レベルで負に制御していた。また、PRMT5 阻害剤による BLV 感染細胞の処理により、BLV Env 蛋白質の過剰な糖鎖付加とそれに伴うシンシチウム形成能の低下、さらに、リンパ腫細胞のアポトーシス能の上昇と細胞増殖の低下が認められた。以上の結果は、BLV 感染の初期において PRMT5 の発現は BLV プロウイルス量のピークに伴い増加することで感染の成立に寄与し、その後 BLV 遺伝子の発現を抑制することで潜伏化へと導き、最終的にアポトーシス能の抑制により癌化へと誘導する可能性が示された。また、PRMT5 の発現は BLV Env 蛋白質の糖鎖の付加を制御することでシンシチウム形成能を維持することで感染に寄与する可能性も示された。

なお、論文は広瀬一哉、松浦遼介、和田智史、竹嶋伸之輔、間陽子との共同研究であるが、論文提出者本人が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2093 字