

氏名(本(国)籍)	両 角 岳 哉(長野県)
推 薦 教 員	岩手大学 教授 居在家 義 昭
学 位 の 種 類	博士(獣医)
学 位 記 番 号	獣医博乙第98号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 目	ブタにおける抗インフルエンザウイルス活性に関与する Mx および TLR 遺伝子群の多型と機能の解析
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 居在家 義 昭 副査 帯広畜産大学 教 授 鈴 木 宏 志 副査 岩 手 大 学 教 授 重 茂 克 彦 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 杉 山 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

動物は病原体の侵入、定着、増殖などに対して、侵入の探知、定着の阻害、増殖の阻止などを行う分子レベルの感染防御機構を有しており、インフルエンザ A ウイルスの感染に対してもウイルスの認識や増殖の阻止といった抗ウイルス活性に関連する遺伝子が複数存在する。インフルエンザ A ウイルスの遺伝子再集合体産生の役割を果たしているブタにおいて、このような抗インフルエンザ A ウイルス活性に関与する遺伝子における多型を検出し、その多型が機能におよぼす影響を解析することで抗ウイルス活性の高いブタの育種が可能となれば、新型インフルエンザ A ウイルス出現のリスクを下げる一助になると考えられる。そこで本研究では、ブタにおいてインフルエンザ A ウイルス増殖抑制能が示唆される *Mx1* と *Mx2* 遺伝子、およびインフルエンザ A ウイルス認識が示唆される *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* 遺伝子について多型の検索と機能の解析を行った。

最初に、ブタ *Mx1* のゲノム全体を保持する BAC クローンを単離するために、エキソン 14 を増幅するプライマーセットを用いてブタ BAC ライブラリーの PCR スクリーニングを行い、0313D07 と 0935E04 の 2 つの BAC クローンを単離した。これら 2 つの BAC クローンにはエキソン 3 も含まれることが PCR によって確認され、*Mx1* の蛋白質をコードする読み枠 (open reading frame, ORF) を含むことが示唆された。さらに、BAC DNA を鋳型にして増幅したエキソン 14 の塩基配列を決定し、データベースに登録されていた cDNA の塩基配列 (Accession No., M65087) と比較した。0313D07 由来の PCR 産物は、コード配列 (coding sequence, CDS) における位置で塩基配列番地 2064-2074 にあたる GGCGCCGGCTC の 11-bp が欠失していた。この 11-bp 欠失配列には制限酵素 *NarI* と *NaeI* の認識配列が含まれていた。11-bp 欠失型配列の 3 つのアレルが存在することが明らかとなった。3 つのアレルの 15 品種 341 頭のブタにおける分布を PCR-RFLP と確認のためのシーケンシングによって決定した。通常型である *Mx1⁺* は全ての品種において高頻度で確認されたが、一塩基変異型の *Mx1⁺* と 11-bp 欠失型の *Mx1⁻* の分布には偏りが見られた。

Mx1^hは梅山豚を含む東洋系品種にしか検出されず、*Mx1*^oはランドレースやデュロック、ハンプシャーに見られ、特にランドレースでは調査した87頭中64頭が保持していた。

次に、*Mx* 遺伝子は様々な生物で2~3 遺伝子座が存在するが、全長の報告されていたブタ *Mx1* と異なり、ブタ *Mx2* は部分的な塩基配列が報告されていただけであった。このようなブタ *Mx2* について、初めて全長 cDNA を単離し、さらにそのゲノム塩基配列の決定により、ブタ *Mx2* が *Mx1* の上流に同一転写方向で隣接していることを明らかにした。また IFN 刺激によってブタ *Mx2* の mRNA と蛋白質発現が強力に誘導される一方で、IFN 非刺激下でも様々な組織で mRNA が構成的に発現していること、蛋白質が核膜周辺に局在していることも明らかにした。さらに、強制発現させたブタ *Mx2* は、弱いながらもインフルエンザ A ウイルス増殖抑制能を示し、抗ウイルス活性を保持していることが明らかとなった。

最後に、細胞内小胞においてインフルエンザ A ウイルスのゲノム RNA を認識すると思われるブタの *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* について、cDNA の単離と多型の検索、および多型の機能への影響について検討した。多型検索では、細胞表面に局在するブタ *TLR* と比較して、ブタの *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* におけるアミノ酸置換を伴う変異は数が少なく、多様性の獲得よりも機能維持への選択圧の方が高い可能性が示唆された。リポーターアッセイを用いた機能解析では、核酸誘導体である CL075 や CL097 等の *TLR8* による認識が示され、また *TLR3* のリガンド認識領域による polyI:C 認識がキメラ *TLR3* を用いて確認された。*TLR3* のリガンド認識領域に検出されたアミノ酸置換を伴う変異および *TLR8* に検出されたアミノ酸置換を伴う変異は、それぞれ polyI:C と CL075 認識によるシグナル伝達に影響をおよぼさないことが明らかとなった。

以上の結果、本研究において *Mx1* に検出した 11-bp 欠失の排除並びに *Mx2* にインフルエンザウイルス増殖抑制能を観察したことで、抗病性育種の可能性が開かれた。*TLR3* と *TLR8* に検出された多型は機能に影響をおよぼさなかったことから、*TLR7* を含むこれらの *TLR* の多型は、多様性の獲得よりも認識対象を変化させないための機能維持の選択圧下にある可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

インフルエンザ A ウイルスなどの病原体の感染に対して、ブタを含む宿主側は、自然免疫や獲得免疫などの分子レベルの感染防御機構を駆使して対抗している。そこで、申請者は、ブタにおいてインフルエンザ A ウイルス増殖抑制能を示す *Mx* 遺伝子群、およびインフルエンザ A ウイルス認識能を示す *TLR* 遺伝子群について多型の検索と機能の解析を実施した。ブタ *Mx1* 遺伝子の翻訳領域 3'側において多型検索を行った結果、11-bp を欠失しているアレル (11-bp 欠失型) を検出した。この 11-bp 欠失は、全ての品種に共通して検出されたアレル (通常型) と比較してアミノ酸の変化が予想され、それによる機能への影響が示唆された。この 11-bp 欠失型が、どのような頻度でどのような品種に分布しているのかを明らかにするため、PCR-RFLP を開発した。その結果、11-bp 欠失型は西洋商業品種に偏って分布しており、特にランドレース種において高頻度で保持されていることが明らかになった。ブタにおいても *Mx1* の他に *Mx2* 遺伝子の存在が示唆されていたが、塩基配列とし

ては 5'側の欠失した部分的な cDNA が報告されていたのみであった。本研究では、ブタ *Mx2* について、2136-bp の翻訳領域を含む cDNA を初めて単離した。さらにブタ *Mx2* の mRNA と蛋白質の発現が、IFN 刺激によって強力に誘導されることを RT-PCR と抗ブタ *Mx2* ペプチド抗血清を用いたウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色で明らかにした。一方で、*Mx2* は IFN 非刺激状態でも mRNA と蛋白質の構成的な発現を示した。ブタ *Mx2* の抗ウイルス活性を検討するために、ブタ *Mx2* を強制発現させたマウス 3T3 細胞にインフルエンザ A ウイルスを感染させ、産生された子孫ウイルス量を検討した。その結果、ブタ *Mx2* は Mx 非導入細胞と比較して子孫ウイルス量を半分程度に抑制することを明らかにした。次に、ブタにおけるウイルス由来 RNA 認識レセプター *TLR3*、*TLR7* および *TLR8* について多型を検出し、*TLR8* のアミノ酸置換を伴う多型全てと *TLR3* の一部の変異について、その機能への影響を特定のリガンドを用いた解析を行ったが、これらの多型が機能に影響をおよぼさないことを明らかにした。

以上の結果、本研究において *Mx1* に検出した 11-bp 欠失の排除並びに *Mx2* にインフルエンザウイルス増殖抑制能を観察したことで、抗病性育種の可能性が開かれた。*TLR3* と *TLR8* に検出された多型は機能に影響をおよぼさなかったことから、*TLR7* を含むこれらの TLR の多型は、多様性の獲得よりも認識対象を変化させないための機能維持の選択圧下にある可能性が示唆された。

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論文としての十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine *Mx1* gene
著 者 名 : Morozumi, T., Sumantri, C., Nakajima, E., Kobayashi, E., Asano, A., Oishi, T., Mitsuhashi, T., Watanabe, T. and Hamasima, N.
学術雑誌名 : Biochemical Genetics
巻・号・頁・発行年 : 39 (7-8): 251-260, 2001
- 2) 題 目 : Molecular cloning and characterization of porcine *Mx2* gene
著 者 名 : Morozumi, T., Naito, T., Lan, P. D., Nakajima, E., Mitsuhashi, T., Mikawa, S., Hayashi, T., Awata, T., Uenishi, H., Nagata, K., Watanabe, T. and Hamasima, N.
学術雑誌名 : Molecular Immunology
巻・号・頁・発行年 : 46 (5): 858-865, 2009
- 3) 題 目 : Polymorphism distribution and structural conservation in RNA-sensing Toll-like receptors 3, 7, and 8 in pigs
著 者 名 : Morozumi, T. and Uenishi, H.
学術雑誌名 : Biochimica et Biophysica Acta
巻・号・頁・発行年 : 1790 (4): 267-274, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Essential role of the yolk syncytial layer for the development of isolated blastoderms from medaka embryos
著 者 名 : Hyodo, M., Aoki, A., Ando, C., Katsumata, M., Nyui, S., Motegi, N., Morozumi, T. and Matsuhashi, M.
学術雑誌名 : Development, Growth & Differentiation
巻・号・頁・発行年 : 38 (4): 383-392, 1996

- 2) 題 目 : Characterization of developmental potential in isolated medaka blastomeres and cultured embryonic cells
著 者 名 : Hyodo, M., Katsumata, M., Takagi, S., Takada, T., Miyajima, S., Morozumi, T. and Matsuhashi, M.
学術雑誌名 : Journal of Marine Biotechnology
巻・号・頁・発行年 : 6 (1): 23-29, 1998

- 3) 題 目 : ブタ品種間に認められる *MC1R* 遺伝子及び *KIT* 遺伝子の多型
著 者 名 : 奥村直彦, 小林栄治, 鈴木秀昭, 両角岳哉, 濱島紀之, 三橋忠由
学術雑誌名 : 日本畜産学会報
巻・号・頁・発行年 : 71 (8): J222-J234, 2000

- 4) 題 目 : Structure of the pig sterol 14 α -demethylase (CYP51) gene and its expression in the testis and other tissues
著 者 名 : Kojima, M., Morozumi, T., Onishi, A. and Mitsuhashi, T.
学術雑誌名 : The Journal of Biochemistry
巻・号・頁・発行年 : 127 (5): 805-811, 2000

- 5) 題 目 : Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein
著 者 名 : Asano, A., Ko, J. H., Morozumi, T., Hamashima, N. and Watanabe, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 64 (12): 1085-1089, 2002

- 6) 題 目 : Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel
著 者 名 : Hamasima, N., Suzuki, H., Mikawa, A., Morozumi, T., Plastow, G. and Mitsuhashi, T.
学術雑誌名 : Animal Genetics
巻・号・頁・発行年 : 34 (3): 216-220, 2003

- 7) 題 目 : Cloning of six full-length cDNAs encoding pig cytochrome P450 enzymes and gene expression of these enzymes in the liver and kidney
著 者 名 : Kojima, M. and Morozumi, T.
学術雑誌名 : Journal of Health Science
巻・号・頁・発行年 : 50 (5): 518-529, 2004

- 8) 題 目 : Comparative analysis and development of microsatellite markers on swine (*Sus scrofa*) chromosome 1qter
著 者 名 : Mikawa, S., Shimanuki, S., Morozumi, T., Domukai, M., Shinkai, H., Uchida, Y., Mikawa, A., Miyake, M., Miyake, Y., Hayashi, N., Kusumoto, H., Uenishi, H., Hayashi, T. and Awata, T.
学術雑誌名 : Animal Genetics

卷・号・頁・発行年：35 (6)：445-450, 2004

- 9) 題 目：Genomic structure of eight porcine chemokine receptors and intergene sharing of an exon between *CCR1* and *XCR1*
著 者 名：Shinkai, H., Morozumi, T., Toki, D., Eguchi-Ogawa, T., Muneta, Y., Awata, T. and Uenishi, H.
学術雑誌名：Gene
卷・号・頁・発行年：349 (11)：55-66, 2005
- 10) 題 目：Two quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosomes 1 and 7 affecting the number of vertebrae
著 者 名：Mikawa, S., Hayashi, T., Nii, M., Shimanuki, S., Morozumi, T. and Awata, T.
学術雑誌名：Journal of Animal Science
卷・号・頁・発行年：83 (10)：2247-2254, 2005
- 11) 題 目：Genomic structure and gene order of swine chromosome7q1.1→q1.2
著 者 名：Tanaka, M., Suzuki, K., Morozumi, T., Kobayashi, E., Matsumoto, T., Domukai, M., Eguchi-Ogawa, T., Shinkai, H., Awata, T. and Uenishi, H.
学術雑誌名：Animal Genetics
卷・号・頁・発行年：37 (1)：10-16, 2006
- 12) 題 目：Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (*TLR1*), *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, and *TLR6* genes
著 者 名：Shinkai, H., Tanaka, M., Morozumi, T., Eguchi-Ogawa, T., Okumura, N., Muneta, Y., Awata, T. and Uenishi, H.
学術雑誌名：Immunogenetics
卷・号・頁・発行年：58 (4)：324-330, 2006
- 13) 題 目：Analysis of the genomic structure of the porcine *CDI* gene cluster
著 者 名：Eguchi-Ogawa, T., Morozumi, T., Tanaka, M., Shinkai, H., Okumura, N., Suzuki, K., Awata, T. and Uenishi, H.
学術雑誌名：Genomics
卷・号・頁・発行年：89 (2)：248-261, 2007
- 14) 題 目：A naturally occurring variant of porcine *Mx1* associated with increased susceptibility to influenza virus *in vitro*
著 者 名：Nakajima, E., Morozumi, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Plastow, G. and Mitsuhashi, T.
学術雑誌名：Biochemical Genetics
卷・号・頁・発行年：45 (1-2)：11-24, 2007
- 15) 題 目：Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (NR6A1)
著 者 名：Mikawa, S., Morozumi, T., Shimanuki, S., Hayashi, T., Uenishi, H., Domukai, M., Okumura, N. and Awata, T.
学術雑誌名：Genome Research
卷・号・頁・発行年：17 (5)：586-593, 2007

- 16) 題 目 : Polymorphisms in the promoter region of the porcine antiviral *MX1* and *MX2* genes
著 者 名 : Tungtrakoolsab, P., Noda, T., Morozumi, T., Hamasima, N., Kobayashi, E., Ueda, J. and Watanabe, T.
学術雑誌名 : Animal Genetics
巻・号・頁・発行年 : 39 (1): 22-27, 2008
- 17) 題 目 : Differences in distribution of single nucleotide polymorphisms among intracellular pattern recognition receptors in pigs
著 者 名 : Kojima-Shibata, C., Shinkai, H., Morozumi, T., Jozaki, K., Toki, D., Matsumoto, T., Kadowaki, H., Suzuki, E. and Uenishi, H.
学術雑誌名 : Immunogenetics
巻・号・頁・発行年 : 61 (2): 153-160, 2009
- 18) 題 目 : Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR δ chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire
著 者 名 : Uenishi, H., Eguchi-Ogawa, T., Toki, D., Morozumi, T., Tanaka-Matsuda, M., Shinkai, H., Yamamoto, R. and Takagaki, Y.
学術雑誌名 : Molecular Immunology
巻・号・頁・発行年 : 46 (6): 1212-1221, 2009