

Polymorphic study of the porcine antiviral *MX* genes

(ブタにおけるウイルス抵抗性 *MX* 遺伝子の多型に関する研究)

学位論文内容の要旨

ウイルスや細菌などの病原体が引き起こす感染症は、家畜の生産性を低下させるとともに、家畜を介してヒトに感染し生命を脅かすことにより、社会問題となっている。これら感染症に対して、生体は獲得免疫系と自然免疫系の2つの防御機構を備えている。獲得免疫系は各病原体に特異的で強力であるが、発動するまでに約2週間を要する。一方、自然免疫系は病原体の侵入を感知し排除するために、生体が本来備えている機構である。自然免疫系の中で、インターフェロン(IFN)によるウイルス感染防御機構は、最も解明が進んでいる。IFNにより発現が誘導される因子の一つに、MXタンパク質がある。MXは哺乳類、鳥類、魚類などに幅広く存在し、おもにRNAウイルスに対して増殖抑制能力を持つ。

IFN誘導遺伝子群のプロモーター領域には、転写を促進するための配列である Interferon stimulating response element (ISRE)の存在が確認されている。MX遺伝子プロモーター領域にもISREの存在が確認されている。ヒトMXAプロモーター領域ではISRE近傍に存在する1塩基置換がプロモーター活性に大きく影響し、その変異とC型肝炎患者のIFN投与治療効果と高い相関があるという報告がなされている。

ブタには、MX1とMX2の2つのアイソフォームをコードする遺伝子が確認されている。これまでに、ブタMX1タンパク質はインフルエンザウイルスや水疱性口内炎ウイルス(VSV)に対して抗ウイルス活性を示すこと、および最終エクソン内にフレームシフトを引き起こす大きなアミノ酸変異の存在することが報告されている。さらに、MX1遺伝子プロモーター領域にはISREおよびGCboxといった重要配列が存在することも報告されている。しかし、その多型に関する報告はない。一方、MX2遺伝子においては、ゲノム全長の塩基配列が報告されているものの、プロモーター領域の特定、翻訳領域内のアミノ酸多型、抗ウイルス活性および細胞内局在などに関する知見は全くない。そこで本研究は、ブタMX1とMX2遺伝子プロモーター領域の多型と機能解析を行い、次にMX2翻訳領域に関して多型と機能解析を行うことにより、ブタ抗病性育

種のための基礎的知見を得ることを目的とした。

ブタ 15 品種由来 21 個体の *MX1* プロモーター領域 332bp を PCR により増幅した。塩基配列を決定することで、ISRE や GCbox などの重要領域を特定した。*MX1* プロモーター領域には、15 箇所塩基置換が検出された。さらに、3 箇所 6 塩基、22 塩基、9 塩基の挿入変異が観察された。それらの変異に基づき、ブタ *MX1* プロモーター領域は 9 種類のゲノタイプに分類された。挿入変異を伴う 3 種類のゲノタイプは、アジア由来品種にのみ観察された。プロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、培養細胞に導入 IFN 添加後プロモーター活性を定量した結果、9 ゲノタイプはいずれも IFN 応答性を示した。しかし、ゲノタイプ間で活性に有意差は認められなかった。

同様に、ブタ *MX2* プロモーター領域 342bp を PCR により増幅し塩基配列を決定して、重要領域を特定した。*MX2* プロモーター領域には、4 箇所塩基置換と 1 箇所塩基欠損が観察された。これらの変異により、ブタ *MX2* プロモーターは 6 種類のゲノタイプに分類された。品種間で各ゲノタイプの特徴的な分布は認められなかった。IFN 添加後プロモーター活性を測定したところ、IFN 応答性を示すとともに、6 ゲノタイプ間でプロモーター活性に違いがあった ($P < 0.05$)。97 番地の 1 塩基欠損のゲノタイプの場合最も高い活性を示し、274 番地の A から C への置換のゲノタイプ場合最も低い活性を示した。97 番地は重要配列 Sp1 内に、274 番地は GCbox および Sp1 内に位置していた。

最後に、ブタ 7 品種 17 個体の白血球細胞から total RNA を抽出した後、RT-PCR で *Mx2* cDNA をクローニングし、塩基配列 2190-bp を決定した。その結果、30 箇所塩基置換が検出され、11 箇所においてアミノ酸置換を伴っていた。それらの変異に基づき、ブタ *MX2* 遺伝子は 8 種類のゲノタイプに分類された。そのうち、3 種類のゲノタイプについて VSV を用いた *in vitro* 感染実験を行ったところ、1 種類のゲノタイプのみ抗ウイルス活性を示した。アミノ酸配列の比較から、376 番地の Gly と Try、あるいは 514 番地の Gly と Arg のいずれかの置換が、抗ウイルス活性に差異をもたらしているものと推察された。また、抗ウイルス活性を示したゲノタイプは、アジア由来品種のみに観察された。ブタ *MX1* および *MX2* の細胞内局在を調べたところ、両者ともに細胞質に局在した。しかし、*MX1* は全体に均一に、*MX2* は顆粒状に観察された。

以上のように、本研究において初めてブタ *MX2* 遺伝子のプロモーター領域と翻訳領域に多型が存在し、ともに機能的差異を示すことが示された。今後、これら *MX2* 遺伝子多型がブタの抗病性育種に応用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 教 授 小 林 泰 男
副 査 准教授 鈴 木 啓 太
副 査 助 教 米 田 明 弘

学 位 論 文 題 名

Polymorphic study of the porcine antiviral *MX* genes

(ブタにおけるウイルス抵抗性 *MX* 遺伝子の多型に関する研究)

本論文は4章からなり、図 14、表 11、引用文献 90 を含む、総頁数 87 の英文論文であり、別に 1 編の参考論文が添えられている。

ウイルスや細菌などの病原体が引き起こす感染症は、家畜の生産性を低下させるとともに、家畜を介してヒトに感染し生命を脅かすことにより、社会問題となっている。これら感染症に対して、生体は獲得免疫系と自然免疫系の 2 つの防御機構を備えている。獲得免疫系は各病原体に特異的で強力であるが、発動するまでに約 2 週間を要する。一方、自然免疫系は病原体の侵入を感知し排除するために、生体が本来備えている機構である。自然免疫系の中で、インターフェロン (IFN) によるウイルス感染防御機構は、最も解明が進んでいる。IFN により発現が誘導される因子の一つに、MX タンパク質がある。MX は哺乳類、鳥類、魚類などに幅広く存在し、おもに RNA ウイルスに対して増殖抑制能力を持つ。MX 遺伝子のプロモーター領域には、転写を促進するための配列である Interferon stimulating response element (ISRE) の存在が確認されている。ヒト *MXA* プロモーター領域では ISRE 近傍に存在する 1 塩基置換がプロモーター活性に大きく影響し、その変異と C 型肝炎患者の IFN 投与治療効果と高い相関があるという報告がなされている。

ブタには、MX1 と MX2 の 2 つのアイソフォームをコードする遺伝子が確認されている。これまでに、ブタ MX1 タンパク質はインフルエンザウイルスや水疱性口内炎ウイルス (VSV) に対して抗ウイルス活性を示すこと、および最終エクソン内にフレームシフトを引き起こす大きなアミノ酸変異の存在することが報告されている。さらに、MX1 遺伝子のプロモーター領域には ISRE および GCbox といった重要配列が存在することも報告されている。しかし、その多型に関する報告はない。一方、MX2 遺伝子においては、ゲノム全長の塩基配列

が報告されているものの、プロモーター領域の特定、翻訳領域内のアミノ酸多型、抗ウイルス活性および細胞内局在などに関する知見は全くない。そこで本研究は、ブタ *MX1* と *MX2* 遺伝子のプロモーター領域の多型と機能解析を行い、次に *MX2* 翻訳領域に関して多型と機能解析を行うことにより、ブタ抗病性育種のための基礎的知見を得ることを目的とした。

ブタ 15 品種由来 21 個体の *MX1* プロモーター領域 332bp の塩基配列を決定することで、ISRE や GCbox などの重要領域を特定した。*MX1* プロモーター領域には、15 箇所塩基置換が検出された。さらに、3 箇所塩基置換、22 塩基、9 塩基の挿入変異が観察された。それらの変異に基づき、ブタ *MX1* プロモーター領域は 9 種類のゲノタイプに分類された。挿入変異を伴う 3 種類のゲノタイプは、アジア由来品種にのみ観察された。プロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、培養細胞に導入後 IFN 添加してプロモーター活性を定量した結果、9 ゲノタイプはいずれも IFN 応答性を示した。しかし、ゲノタイプ間で活性に有意差は認められなかった。

同様に、ブタ *MX2* プロモーター領域 342bp の塩基配列を決定して、重要領域を特定した。*MX2* プロモーター領域には、4 箇所塩基置換と 1 箇所塩基欠損が観察された。これらの変異により、ブタ *MX2* プロモーターは 6 種類のゲノタイプに分類された。品種間で各ゲノタイプの特徴的な分布は認められなかった。IFN 添加後プロモーター活性を測定したところ、IFN 応答性を示すとともに、6 ゲノタイプ間でプロモーター活性に違いがあった ($P < 0.05$)。97 番地の 1 塩基欠損のゲノタイプの場合最も高い活性を示し、274 番地の A から C への置換のゲノタイプ場合最も低い活性を示した。97 番地は重要配列 Sp1 内に、274 番地は GCbox および Sp1 内に位置していた。

最後に、ブタ 7 品種 17 個体から *MX2* cDNA をクローニングし、塩基配列 2190bp を決定した。その結果、30 箇所塩基置換が検出され、11 箇所においてアミノ酸置換を伴っていた。それらの変異に基づき、ブタ *MX2* 遺伝子は 8 種類のゲノタイプに分類された。そのうち、3 種類のゲノタイプについて VSV を用いた *in vitro* 感染実験を行ったところ、1 種類のゲノタイプのみ抗ウイルス活性を示した。アミノ酸配列の比較から、376 番地の Gly と Try、あるいは 514 番地の Gly と Arg のいずれかの置換が、抗ウイルス活性に差異をもたらしているものと推察された。また、抗ウイルス活性を示したゲノタイプは、アジア由来品種のみに観察された。ブタ *MX1* および *MX2* の細胞内局在を調べたところ、両者ともに細胞質に局在した。しかし、*MX1* は全体に均一に、*MX2* は顆粒状に観察された。

以上のように本論文は、初めてブタ *MX2* 遺伝子のプロモーターと翻訳領域に多型を検出し、ともに機能的差異のあることを明らかにすることにより、今後これら *MX2* 遺伝子多型がブタの抗病性育種に応用される可能性を示唆する貴重な知見を提供するものである。

よって、審査員一同は、パロップ タングトラクールサブが博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。