

学 位 論 文 題 名

Molecular Characterization and Antiviral Activity
Analysis of the Interferon-Inducible *Mx* Gene in Mice

（マウスにおけるインターフェロンで誘導される
抗ウイルス遺伝子 *Mx* に関する分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

ウイルス感染防御と感染からの回復には、生体の免疫機構が主要な役割を果たしている。その中には、特異的な宿主細胞遺伝子がウイルス抵抗性を支配している場合もある。*Mx* 遺伝子の発現によるNegative strand RNA virusに対する抵抗性の獲得はその代表的な例である。インターフェロン α/β で誘導されるマウス *Mx* 遺伝子は第16番染色体に存在し、*Mx* 1タンパクは核に、*Mx* 2タンパクは細胞質に局在する。実験用マウスのほとんど全ての代表的な系統は*Mx*1、*Mx*2 遺伝子ともに機能欠損タイプである。本研究では、まだ同定されていない野生マウス由来系統における*Mx*1、*Mx*2 遺伝子の発現、変異さらには機能解析を目的として行った。

野生マウス由来系統における*Mx*1の遺伝子型を明らかにするために、野生マウス由来系統のMOG日本産、SWN韓国産、CAST/Eiタイ産、NJLデンマーク産、BFM/2フランス産、PGN2カナダ産、SPRスペイン産、ZBNブルガリア産マウスを用いて、実験用近交系であるBALB/c、C57BL/6、CBA、SL/NiAと比較した。A2GとSL/NiAを除いて他の実験用近交系マウスでは*Mx* 1 遺伝子に変異があるため、ウイルス感染に対して抵抗性を示さず致死的であると報告されていた。すなわち、BALB/c、C57BL/6、C3H/Heなど代表的な実験用系統のマウスは全て機能欠損*Mx* 1 遺伝子を持つ。これまでの報告により抵抗性・感受性を支配している重要な領域であるエクソン10について塩基配列の決定により解析した。塩基配列決定の結果、SPRとZBNはSL/NiAと2つのアミノ酸置換を伴う塩基変異があった。他の野生マウス由来系統全てはSL/NiAと同じであった。この結果からほとんどの実験用マウスは*Mx*1⁻の欠損型であるのに対して、野生マウス由来系統の全ては*Mx*1⁺の抵抗性と考えられた。次に*Mx*1タンパクの発現を調べるために、3種類の野生系統(MOG、NJL、SPR)の腹腔内マクロファージを培養して、インターフェロン α/β で活性化後免疫蛍光染色を行っ

た。野生マウス由来系統における反応はMx1+のSL/NiAと同様、核が強く陽性に染色された。また、RT-PCR法に法においても上記3系統のマウスは、インターフェロン α/β で誘導した場合、誘導しない場合に比べMx1遺伝子の強い転写が確認された。

さらに、野生マウス由来系統はMx2+ 遺伝子を有し、それが正常発現していることを見出し、その機能解析を試みた。最初に、5'RACEと3' RACE法によってMx2 cDNAの全長をクローニングし、塩基配列を解析した。塩基配列決定の結果、NJLとSPRでは機能的なMx2タンパクを合成することが示唆された。また、実験用近交系マウスではこれまで考えられていた1366番のC(Cytosine)によるインサージョンではなく、1367番のA(Adenine)のインサージョンにより機能欠損が生ずることが判明した。次に、Mx2タンパクの発現を調べるために、3種類の野生マウス由来系統(MOG、NJL、SPR)の腹腔内マクロファージを培養して、インターフェロン α/β で活性化後免疫蛍光染色を行った。NJLとSPRでは核だけでなく細胞質も強く陽性に染色され、Mx2遺伝子が機能発現していることが確かめられた。VSVのin vitro感染実験では、Mx2遺伝子を発現させた3T3細胞は、VSVの感染に対して抵抗性を示した。

最後に、野生マウス由来系統で正常発現しているMx2遺伝子の抗ウイルス作用をさらに検討するため、NJLとSPRのMx2 cDNAをVero細胞に導入発現させた細胞を用いてin vitro感染実験を行った。Mx2遺伝子を導入発現させたそれぞれの細胞にインフルエンザウイルスおよびハンタウイルスのHantaan virus (HTN 76-118)とSeoul virus (SR-11)を感染させた。ハンタウイルスの核タンパクを検出するためにWestern blotを行い、また上清中のウイルス感染価を測定した。Western blotの結果、Mx2遺伝子はハンタウイルスの増殖を抑制することが示された。感染価の結果では、NJLとSPRのMx2遺伝子を発現させたVero細胞はコントロールより高い抵抗性を持つことが確認された。インフルエンザウイルスの感染実験では、Mx2遺伝子を発現させたVero細胞においてもコントロールと差がなかった。

以上の結果から、野生マウス由来系統は、実験用マウスと異なり、全てMx1+であることが確認された。また、野生マウス由来系統のNJLとSPRを用いて機能的Mx2タンパクが合成されることを初めて明らかにした。実験用近交系マウスでは1367番のA(Adenine)のインサージョンにより機能欠損を生ずることが判明した。免疫蛍光染色結果、NJLとSPRは核だけでなく細胞質も強く陽性に染色され、Mx2遺伝子が正常発現していることを確認した。In vitro感染実験の結果、野生マウス由来系統のMx2遺伝子を導入発現させた細胞は高いウイルス抵抗性を持つことが実証された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 智 正

副 査 教 授 喜 田 宏

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 有 川 二 郎 (医学部)

学 位 論 文 題 名

Molecular Characterization and Antiviral Activity Analysis of the Interferon-Inducible *Mx* Gene in Mice

(マウスにおけるインターフェロンで誘導される
抗ウイルス遺伝子 *Mx* に関する分子生物学的研究)

ウイルス感染防御と感染からの回復には、生体の免疫機構が主要な役割を果たしている。その中には、特異的な宿主遺伝子がウイルス抵抗性を支配している場合がある。*Mx* 遺伝子の発現による RNA ウイルスに対する抵抗性の獲得はその代表的な例である。インターフェロン(IFN) α/β で誘導されるマウス *Mx* 遺伝子は第 16 染色体に存在し、*Mx* 1 タンパクは核に、*Mx* 2 は細胞質に局在する。実験用マウスのほとんど全ての系統は *Mx* 1、*Mx* 2 とともに変異があるため機能欠損となり、ウイルス感染に対して感受性と報告されている。本研究は、まだ同定されていない野生マウス由来系統における両遺伝子の発現および機能解析を目的として行った。

野生マウス由来系統における *Mx* 1 の遺伝子型を明らかにするために、MOG(日本産)、NJL(デンマーク産)、SPR(スペイン産)を含む計 8 種類の野生マウス由来系統を用いて、実験用マウスと比較した。塩基配列決定の結果、全ての野生系統は抵抗性の *Mx* 1 遺伝子を持つものと推定された。3 種類の野生マウス系統(MOG、NJL、SPR)の腹腔内マクロファージを培養して、IFN で活性化後、RT-PCR 法および免疫蛍光染色法において *Mx* 1 遺伝子の mRNA とタンパクの高い発現を確認した。

次に、野生マウス由来系統の *Mx* 2 遺伝子の構造と機能を解析した。最初に、RACE 法によって *Mx* 2 cDNA の全長をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、NJL と SPR は機能的な *Mx* 2 タンパクを合成することが示唆された。また、実験用マウスは、1367 番の Adenine の挿入の結果機能が欠損することが判明した。*Mx* 2 タンパクの発現を調べるために、3 種類の野生マウス系統のマクロファージを培養して、免疫蛍光染色を行った。NJL と SPR は *Mx* 2 遺伝子が正常に発現していることが確かめられた。さらに *Mx* 2 遺伝子の抗ウイルス作用を検討するために、NJL と SPR の *Mx* 2 cDNA を 3T3 細胞あるいは Vero 細胞に導入発現させ、*in vitro* 感染実験を行った。水疱性口炎ウイルスの感染実験では、*Mx* 2 遺伝子発現細胞は高い抵抗性を示した。ハンタウイルスに対しても増殖を抑制することが確認された。インフルエンザウイルスに対しては、コント

ロールと差がなかった。

以上のように、本論文は、野生マウス由来系統が実験用マウスと異なり、機能的 *Mx1*、*Mx2* 遺伝子を有し RNA ウイルスに対して抵抗性であることを明らかにしたものであり、獣医実験動物学への貢献は大である。よって、審査員一同は、陳喜慶氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。