

学位論文題名

Polymorphisms and Antiviral Activity of
the Mx and PKR in the Chicken

(ニワトリにおける Mx と PKR の多様性と抗ウイルス活性)

学位論文内容の要旨

動物・宿主細胞には特異的な遺伝子発現により、感染ウイルスの増殖を抑制する機構があることが知られている。Mx と PKR はインターフェロン(IFN)刺激によって発現し、RNA ウィルスに対する抵抗性作用を示す。また、様々な種から Mx と PKR 遺伝子がクローニングされ、その coding 領域が解析されている。とくにヒトとマウスでは解析が進み、抗ウイルス作用を持つ抵抗性 Mx 遺伝子と PKR 遺伝子の存在が報告されている。ヒトとマウスの場合、人為突然変異 Mx を用いてウイルス感染実験を行った結果、一つのアミノ酸置換によってウイルス増殖抑制能が変化したことが報告されている。このように Mx 遺伝子には、ウイルス増殖抑制にかかわる領域が存在すると考えられる。PKR はわずかではあるがほとんどの細胞に存在し、IFN により発現がさらに増強される。ヒトとマウスの PKR を解析した結果、N 末端側には dsRNA 結合蛋白の特徴である dsRNA 結合ドメイン(DRBD)が 2 箇所、C 末端側には多くのセリン/スレオニンキナーゼを含んでいることが知られている。多くのウイルスが PKR を不活化する断片をコードすると共に、多数の感染実験結果から、細胞レベルの感染防御に対して PKR は重要な役割を果たすことが予測されている。しかし、ウイルスと PKR の相互作用に関してはまだそのメカニズムははっきりとは解明されていない。

自然界でウイルスの主な中間宿主と知られているニワトリの場合、ドイツの研究グループから白色レグホン種を用いてすでに Mx 遺伝子のクローニングと塩基配列が報告されているものの、抗ウイルス活性のない感受性タイプであった。また、ニワトリ PKR に関してはまだその構造や詳しい機能解析がなされていない。本研究は、ニワトリにおいて Mx および PKR 遺伝子の多型と発現、ウイルス増殖抑制能の解析を目的として行った。

第一章では、白色レグホン種を含む多数の品種におけるニワトリ Mx 遺伝子の検索を行い、多様性の有無と RNA ウィルス感染に対する増殖抑制活性を調べた。すなわち、合計で 15 品種のニワトリを用いて 11 日令の胎子から繊維芽細胞を初代培養し、IFN 誘導剤の poly (I)/(C)で刺激した後 total RNA を抽出した。次に RACE 法と RT-PCR により全長 Mx cDNA をクローニングし coding 領域の塩基配列を決定し、文献の感受性タイプの白色レグホン種と比較した。その結果、品種によって 10 から 18 箇所の塩基置換が検出され、そのうち 6 から 12 箇所においてア

ミノ酸置換を伴うことが認められ、品種による多様性がきわめて高いことが明らかになった。さらに、シーケンス結果から文献の感受性タイプの白色レグホン種と遺伝的距離がかなり遠いと推定されたいくつかの品種の *Mx* 遺伝子を、機能欠損により *Mx* を発現しないマウス BALB/3T3 (3T3)細胞に導入発現させた。それらの導入培養細胞を用いて組換え GFP 遺伝子を持つ水泡性口内炎ウイルス(VSV)による感染実験を行い、感染細胞数を蛍光顕微鏡下で計測したところ、シャモを含む 5 品種の *Mx* 遺伝子はコントロールより明らかに抗ウイルス作用が高かった。一方ナゴヤ種を含む 2 品種の *Mx* 遺伝子は抗ウイルス作用がコントロールと同様低かった。また、インフルエンザウイルス(H5N1)を用いた感染実験の結果、VSV と同様な抗ウイルス活性の多様性を示した。したがって、ニワトリにおいてウイルス感染に対する抵抗性タイプの *Mx* 遺伝子が存在することが初めて見出された。これらの結果から、ニワトリの *Mx* 遺伝子は品種間において多様性があり、その中で機能的な抵抗性タイプが存在することが明らかにされた。さらに、抵抗性タイプ品種の *Mx* タンパクのアミノ酸配列を他の感受性タイプと比較検討したところ、抵抗性タイプあるいは感受性タイプにのみ共通して存在する特異的なアミノ酸置換が見出された。すなわち、631 番のアミノ酸が Asn である場合は抵抗性、Ser である場合は感受性を示すことが確認された。

第二章では、ニワトリ *PKR* 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。さらに、VSV 感染に対する増殖抑制活性を調べた。7 品種のニワトリ胎子から繊維芽細胞を初代培養し、IFN 誘導剤の poly (I)/(C)で刺激した後、total RNA を抽出した。他種 *PKR* 遺伝子を比較検討し、ホモロジーの高い領域の塩基配列を基に作製したプライマーを用いて RACE と RT-PCR を行い、ニワトリの全長 *PKR* cDNA をクローニングした。その塩基配列を比較した結果、ニワトリ *PKR* は 550 アミノ酸からなるタンパク質であり、他の RNA 結合タンパク質及びキナーゼ群の特徴である二つの DRBD と多くのキナーゼドメインが保存されていることが確認された。また、品種において多型を示し、186 番、234 番、そして 507 番のアミノ酸において一つの塩基置換によってアミノ酸置換を伴うことが判明した。さらに、VSV 感染に対し感受性 *PKR* を持つマウス BALB/3T3 (3T3)細胞を用いてニワトリ *PKR* 遺伝子を導入発現させ、第一章と同じ方法で VSV 感染実験を行った結果、KS-3 (R507Q)以外の全てがコントロールより明らかに抗ウイルス作用が高かった。KS-3 の場合、全部で6つのクローンのうち3つは抵抗性を、また他の 3 つは感受性を示し、ウイルス感染に対し不安定な抗ウイルス活性を持つことが確認された。

本研究からニワトリの *Mx* と *PKR* には多型もしくは変異が存在し、抗ウイルス活性についても多様性が存在することが分かった。ヒト及びマウスの *Mx* 遺伝子の多型及び変異と抗ウイルス活性の研究結果と今回の結果を総合すると、*Mx* 遺伝子はその種内において系統もしくは品種間で多様な多型と変異を持っており、それが抗ウイルス活性の多様性を決定している因子の一つとなっていることが推察された。また、自然界において主な中間宿主であるニワトリには他のホ乳類が持っている機能的な *PKR* が保存されており、C-末端の一つのアミノ酸置換によって多様な抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安居院 高 志
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

Polymorphisms and Antiviral Activity of the Mx and PKR in the Chicken

(ニワトリにおける Mx と PKR の多様性と抗ウイルス活性)

Mx と double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) はインターフェロンによって発現されるウイルス抵抗性タンパク質である。両タンパク質についてはこれまでヒト、マウス及び一部の家畜についてはその一次構造が明らかにされ、その構造と抗ウイルス活性との関連が明らかにされているが、鳥類、特に家畜として重要なニワトリにおいては十分な研究がなされていない。本研究では、種々のニワトリ品種の Mx 及び PKR の一次構造と抗ウイルス活性の解析を行い、両者の関連について検討した。

まず 15 品種のニワトリ胎仔線維芽細胞から Mx 遺伝子をクローニングし一次構造を決定すると共に、これらの遺伝子を発現ベクターに組み込み、マウス BALB/3T3 (3T3) 細胞に導入し、組換え緑色蛍光色素遺伝子を持つ水疱性口内炎ウイルス (VSV) に対する抗ウイルス活性を測定した。その結果、ニワトリ Mx には品種によりアミノ酸配列に多様性が見られること、その中で特に 631 番のアミノ酸の多様性が抗ウイルス活性に深く関与していることを明らかにした。

ニワトリにおける PKR についてはこれまで全く報告がなく、ウイルス感染抵抗性における寄与はおろか、その存在すら明らかになっていない。Mx の場合と同様に 7 品種のニワトリ胎仔線維芽細胞から PKR 遺伝子をクローニングし一次構造を決定すると共に、3T3 細胞と組換え VSV を用い抗ウイルス活性を測定した。その結果、全ての品種から PKR 遺伝子をクローニングすることができ、更にその一次構造と抗ウイルス活性の測定結果から 507 番アミノ酸が Arg の場合強い抗ウイルス活性を示し、Gln の場合その抗ウイルス活性が減弱することを明らかにした。

以上のように申請者は、ニワトリにおいて Mx と PKR にはアミノ酸配列の多様性が存在し、そのアミノ酸の種類によって抗ウイルス活性に違いが見られることを明らかにした。これらの結果はニワトリのウイルス感染抵抗性の機構の解明に寄与す

るばかりでなく、ウイルス感染に強い品種の育成という実用面にも多大な貢献をしたと評価できる。よって、審査員一同は、申請者が博士（獣医学）の学位をうける資格を有すると認めた。