

学位論文題名

Polymorphic and functional analysis of bovine
and water buffalo antiviral *Mx2* genes

(ウシと水牛におけるウイルス抵抗性 *Mx2* 遺伝子の多型および機能解析)

学位論文内容の要旨

感染症の中でインフルエンザウイルスのように家畜を介してヒトに感染し、生命を脅かすとともに家畜の生産性にも影響を及ぼすことが社会問題となっている。自然免疫系は、それらウイルスの侵入を感知し排除するために生体が本来そなえているシステムで、感染防御において重要な役割を果たしている。自然免疫系の中でも、インターフェロン(IFN)によるウイルス感染防御システムは、解明が比較的進んでいる。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。また、その細胞内での局在の違いが、機能的差異を生ずることも報告されている。

ウシに関しては現在までに *Mx1* cDNA のクローニングと塩基配列が決定しており、染色体上の位置も確認されている。また、ウシ *Mx1* タンパク質は、様々なウイルスに対して増殖抑制能力を持つことが明らかにされている。さらに、ウシ個体がウイルスに感染しているかどうかを、*Mx1*mRNA あるいは *Mx1* タンパク質の発現量を利用して検査できるという報告もある。ウシ *Mx1* タンパク質は、他の動物より品種間でアミノ酸配列の保存性が高く、このことによりウシ進化過程において *Mx1* 遺伝子が重要な機能を果たしてきたことが示唆されている。しかし、もう一つのアイソフォームである *Mx2* 遺伝子については存在が確認されているにもかかわらず、多型および機能解析などの報告は全く行われてない。そこで本研究は、ウシ *Mx2* の多型解析と抗ウイルス活性の測定を行い、抗病性育種に役立てるための基礎的知見を得ることを目的とした。

最初に、ウシ 11 品種由来 16 頭と水牛 1 頭由来の *Mx2*cDNA を PCR により増幅した。PCR 産物である 2381bp の塩基配列を決定した結果、ウシ *Mx2* 翻訳領域において 17 箇所の塩基置換が検出された。そのうちアミノ酸置換は、302 と 354 番地の 2 箇所であった。302 番地において品種間で Gly と Ser の多型が観察された。しかし、354 番地のアミノ酸変異はデータベースのみが Ile で、本研究において調べた全ての個体は

Val であった。検出された塩基置換により、ウシ *Mx2*cDNA は 8 種類の genotypes に分類された。以上の結果により、ウシ *Mx2* にはアミノ酸変異が検出されたが、変異数がきわめて少ないことから、*Mx1* と同様に構造上保存性の高いことが確認された。一方、水牛 *Mx2*cDNA において 2400bp の塩基配列が決定され、ウシの配列と比較したところ 46 箇所の塩基置換と、そのうち 12 箇所でアミノ酸置換が認められた。また、5' 末端には 9bp の挿入変異も検出された。

次に、ウシ *Mx2* 遺伝子の機能解析を行った。354 番地のアミノ酸が Gly の *Mx2*cDNA と Ser である *Mx2*cDNA、および水牛の *Mx2*cDNA を 3T3 細胞に遺伝子導入して、組み換え水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いて感染実験を行った。その結果、全ての遺伝子導入細胞は、コントロールと比べウイルスの増殖を抑制した。したがって、ウシおよび水牛 *Mx2* は、抗ウイルス活性を有することが明らかになった。このことは、げっ歯類以外の哺乳動物ではきわめてまれなことであり、ウシにおいては 2 種類の *Mx1* および *Mx2* ともに抗ウイルス活性を持つことが示された。

Mx タンパク質には、その発現量によるウイルス抑制能力の違いも示唆されている。*Mx* 遺伝子などの IFN 誘導遺伝子群のプロモーターには、シグナル伝達により転写を促進するための配列である IFN 刺激応答配列 (ISRE) の存在が確認されている。近年、ヒト *MxA* 遺伝子プロモーターでは 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、そのことと C 型肝炎患者の IFN 投与による治療効果との間に高い相関があるという報告もなされている。そこで、ウシ *Mx2* 遺伝子プロモーター領域の多型について検討した。ウシ *Mx2* のプロモーター領域を確認するために、5' RACE を行ないその産物をシーケンスすることにより、転写開始点およびプロモーター領域を同定した。次にウシ 5 頭のゲノム DNA から PCR でプロモーター領域を増幅し、シーケンスを行なった。その結果、19 箇所で塩基置換が検出されたが、ISRE などの重要配列には変異は検出されなかった。また、水牛の *Mx2* のプロモーター領域の塩基配列を決定したところ、ウシと 56 箇所の塩基置換と 2 箇所の挿入変異が認められた。今後、これら塩基置換を示した *Mx2* 遺伝子間でプロモーター活性に差異が検出されるか検討する必要がある。

以上のように、本研究においてこれまで全く報告のなかったウシ *Mx2* 遺伝子に多型が存在し、それらがともに抗ウイルス活性を持つことを証明することができた。また、水牛においても初めて *Mx2* 遺伝子についての知見を得ることができ、今後ウシおよび水牛に関する抗病性育種にこれら遺伝子多型の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 辺 智 正

副 査 教 授 服 部 昭 仁

副 査 准教授 山 田 豊

学 位 論 文 題 名

Polymorphic and functional analysis of bovine and water buffalo antiviral *Mx2* genes

(ウシと水牛におけるウイルス抵抗性 *Mx2* 遺伝子の多型および機能解析)

本論文は3章からなり、図11、表4、引用文献66を含む、総頁数65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。

感染症の中でインフルエンザウイルスのように家畜を介してヒトに感染し、生命を脅かすとともに家畜の生産性にも影響を及ぼすことが社会問題となっている。自然免疫系は、それらウイルスの侵入を感知し排除するために生体が本来そなえているシステムである。自然免疫系の中でも、インターフェロン(IFN)によるウイルス感染防御システムは、解明が比較的進んでいる。IFNにより発現が誘導される一つの因子に、*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、主にRNAウイルスに対して増殖抑制能力を持つ。また、その細胞内での局在の違いが、機能的差異を生ずることも報告されている。

ウシに関しては現在までに *Mx1* cDNA のクローニングと塩基配列が決定しており、染色体上の位置も確認されている。また、ウシ *Mx1* タンパク質は、様々なウイルスに対して増殖抑制能力を持つことが明らかにされている。さらに、ウシ個体がウイルスに感染しているかどうかを、*Mx1*mRNA あるいは *Mx1* タンパク質の発現量を利用して検査できるという報告もある。しかし、もう一つのアイソフォームである *Mx2* については存在が確認されているにもかかわらず、多型および機能解析などの報告は全く行われてない。そこで本研究では、ウシ *Mx2* の多型解析と抗ウイルス活性の測定を行い、将来抗病性育種に役立てるための基礎的知見を得ることを目的とした。

最初に、ウシ11品種由来16頭と水牛1頭由来の *Mx2*cDNA をPCRにより増幅した。PCR産物である2381bpの塩基配列を決定した結果、ウシ *Mx2* 翻訳領域において17箇

所の塩基置換が検出された。そのうちアミノ酸置換は、302 と 354 番地の 2 箇所であった。302 番地において品種間で Gly と Ser の多型が観察された。しかし、354 番地のアミノ酸変異はデータベースのみが Ile で、本研究において調べた全ての個体は Val であった。一方、水牛 *Mx2* cDNA において 2400bp の塩基配列が決定されたが、ウシの配列と比較したところ 46 塩基置換が検出され、そのうち 12 箇所でアミノ酸置換が認められた。以上の結果により、ウシ *Mx2* にはアミノ酸変異が検出されたが、置換数がきわめて少ないことから、*Mx1* と同様に構造上保存性の高いことが確認された。

次に、ウシ *Mx2* 遺伝子の機能解析を行った。354 番地のアミノ酸が Gly の *Mx2*cDNA と Ser である *Mx2*cDNA、および水牛の *Mx2*cDNA を 3T3 細胞に遺伝子導入して、組み換え水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いて感染実験を行った。その結果、全ての遺伝子導入細胞は、コントロールと比べウイルスの増殖を抑制した。したがって、ウシおよび水牛 *Mx2* は、抗ウイルス活性を有することが明らかになった。このことは、げっ歯類以外の哺乳動物ではきわめてまれに、ウシにおいては 2 種類の *Mx1* および *Mx2* ともに抗ウイルス活性を持つことが示された。

Mx タンパク質には、その発現量によるウイルス抑制能力の違いも示唆されている。*Mx* 遺伝子などの IFN 誘導遺伝子群のプロモーターには、シグナル伝達により転写を促進するための配列である IFN 刺激応答配列 (ISRE) の存在が確認されている。近年、ヒト *MxA* 遺伝子プロモーターでは 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、そのことと C 型肝炎患者の IFN 投与による治療効果との間に高い相関があるという報告もなされている。そこで、ウシ *Mx2* 遺伝子プロモーター領域の多型について検討した。ウシ 5 品種由来 9 頭のゲノム DNA から PCR でプロモーター領域を増幅し、シーケンスを行なった。その結果、19 箇所で塩基置換が検出されたが、ISRE などの重要配列には変異は検出されなかった。また、水牛の *Mx2* のプロモーター領域の塩基配列を決定したところ、ウシと 56 箇所の塩基置換と 2 箇所の挿入変異が認められた。今後これら塩基置換を示した *Mx2* 遺伝子間でプロモーター活性に差異が検出されることが待たれる。

以上のように、本研究はこれまで全く報告のなかったウシの *Mx2* 遺伝子に多型が存在し、それらが抗ウイルス活性を持つことを証明することができた。また、水牛においても初めて *Mx2* 遺伝子についての知見を得ることができ、今後ウシおよび水牛に関する抗病性育種にこれらの遺伝子多型の応用されることが期待される。

よって審査委員一同は、フセイン アハメド イル フセイン バビケールが博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。