



Title	哺乳動物自然免疫因子における抗ウイルス能の遺伝的制御および初期胚発生に果たす役割の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐々木, 恵亮
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第11385号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/55782
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Keisuke_Sasaki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 佐々木 恵亮

哺乳動物自然免疫因子における抗ウイルス能の遺伝的制御および 初期胚発生に果たす役割の解明

自然免疫系は、病原体感染に対して外来異物を認識し排除する一連の機構であり、生体の恒常性維持に不可欠な役割を果たしている。また、自然免疫系による炎症反応はインターフェロンや炎症性サイトカインといったサイトカイン類の産生を促し、その機能は抗病原体排除のみに限定されず、受精時の卵母細胞精子間における同種異個体認識（アロ認識）も含めた幅広い生命現象に関与している可能性も考えられるが、その実態は不明である。そこで本研究では、家畜および実験動物における自然免疫関連遺伝子の抗ウイルス能に関する解析、並びに、卵母細胞および初期胚における自然免疫関連因子を解析による初期胚発生への自然免疫系の関与を明らかにすることを目的とした。

(1) ブタにおける自然免疫関連遺伝子 *MX2* の一塩基多型と抗ウイルス活性との関係

MX 遺伝子は脊椎動物に広く保存されており、*MX* 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*) 等の RNA ウイルスの増殖を抑制する重要な自然免疫因子の一つである。一方、遺伝的に統一されていない家畜は、ゲノム上に多数の一塩基多型 (SNPs) を有することが知られている。ブタ *MX2* は、インフルエンザウイルスの増殖を抑制するが、*MX2* における SNPs と抗ウイルス活性との関係は明らかでない。そこで、初めに 7 品種計 17 頭のブタを用いて *MX2* 遺伝子について多型解析を実施したところ、翻訳領域内に 30 個の SNPs が確認され、そのうちの 11 個がアミノ酸置換を伴う SNPs であった。これら 11 箇所のアミノ酸置換に基づいてブタ *MX2* を 8 つのアリル (A1–A8) に分類した。続いて、同定した各アリルの *MX2* を発現するマウス 3T3 細胞に組換え *VSV* を感染させたところ、A6 および A7 の *MX2* において抗ウイルス活性が認められた。このことから、A6 および A7 の *MX2* に特異的な 514 番地アミノ酸におけるグリシンからアルギニンへの置換が抗 *VSV* 活性獲得に寄与することが明らかとなった。また、タンパク質立体構造モデルを解析した結果、514 番地における置換がアミノ酸残基の側鎖パターンに変化をもたらすことが予測された。さらに、514 番地アミノ酸を簡易に識別するミスマッチ PCR-RFLP 法を構築することで、*VSV* 抵抗性 *MX2* の同定が可能となった。

(2) マウス卵母細胞における自然免疫因子パターン認識受容体の発現

自然免疫系において、パターン認識受容体 (PRRs) は病原体認識という重要な役割を担うことが知られており、体細胞における知見は多く得られている。一方、受精時には、異個体関係に雌雄の生殖細胞が融合し次世代を担う受精卵が構築されるが、哺乳動物の卵母細胞および初期胚における自然免疫関連因子を調べた知見は一切ない。そこで本項では、マウス卵母細胞および初期胚における自然免疫因子 PRRs の mRNA およびタンパク質発現解析を行った。受精前のマウス卵母細胞について、PRRs の発現を RT-PCR によって解析したところ、*Nlrp3*、*Rig-i* および *Tlr9* mRNA の発現が認められた。また、それら PRRs について下流のシグナル分子である *Asc*、*Casp1*、*Ddx60* および *Mavs* の mRNA 発現

も確認した。これらの中から RIG-I および TLR9 に着目し、qPCR によって着床前の胚盤胞期胚までの mRNA 発現レベルを解析したところ、*Rig-i* および *Tlr9* の双方において受精前後の卵母細胞および初期胚においては高いレベルの発現が認められ、2 細胞期以降に発現レベルが低下することを見出した。さらに、免疫染色により RIG-I および TLR9 の局在を観察したところ、双方とも着床前の全発生ステージで割球の細胞質において発現することが明らかになった。

(3) マウス初期胚発生における RIG-I を介した抗ウイルス応答の検証

前項では、生殖細胞および初期胚における自然免疫関連因子の存在を明らかにした。本項では、とくに RNA センサーとして機能する RIG-I に注目し、卵母細胞内で外来 RNA の刺激に対する RIG-I の応答性を検証した。マウス卵母細胞および初期胚に対して組換え VSV の感染および RIG-I アゴニストの注入を行った。その後、体外発生率を調べ、RIG-I を介した抗ウイルス応答関連遺伝子の遺伝子発現を解析し、その応答性を評価した。卵丘細胞卵子複合体 (COCs) への組換え VSV の感染によって体外発生率が有意に低下し、感染胚において *Rig-i*、*Il1b* および *Il6* mRNA の発現レベルが上昇した。しかしながら、卵丘細胞を除去した裸化卵子 (DOs) に組換え VSV を感染させたところ、初期胚の体外発生率は有意に上昇し、*Il6* mRNA 発現の増加もみられた。さらに、2 細胞期胚への組換え VSV 感染を行ったところ、体外発生率に変化は認められなかった。DOs への RIG-I アゴニストである poly(I:C) を受精前卵母細胞にマイクロインジェクションし、体外受精を行ったところ、体外発生率は上昇する傾向がみられた。また、ウイルス感染卵丘細胞と非感染 DOs との共培養を行い、その後の初期胚の体外発生率を調べたところ、COCs 感染実験と同様に体外発生率が有意に低下した。同時に、ウイルス感染処理を行った卵丘細胞において *Rig-i*、*Ifnb*、*Il1b*、*Il6* および *Tnf* mRNA の発現レベルの上昇を確認した。これらのことから、卵母細胞から 2 細胞期胚までのステージでは RIG-I を介したウイルス応答性が認められ、2 細胞期以降の初期胚発生では RIG-I を介した抗ウイルス応答は発動しないことが推察された。また、排卵直後の未受精卵母細胞では、ウイルス感染に対し卵丘細胞からのサイトカイン類が産生され、それが初期胚の細胞死を誘導していることが強く示唆された。

以上本研究をまとめると、まず、ブタにおいて MX2 の 514 番地アミノ酸に相当する SNP が VSV への抗ウイルス活性に関与することが示された。次に、マウス卵母細胞および初期胚は広く PRRs 等の自然免疫関連因子を発現することが明らかとなった。最後に、2 細胞期以降の初期胚においては VSV に対する抗ウイルス応答を示さなかったため、卵母細胞および初期胚に発現する RIG-I や TLR9 といった PRRs 分子は感染ウイルスの増殖抑制に寄与しないものの、卵丘細胞を除去した裸化卵子の状態での感染は胚発生率を向上させたことから、通常の初期胚発生でも RIG-I を介した外来 RNA 認識の過程が発生促進に寄与している可能性が示された。また、通常の体細胞である卵丘細胞とともに組換え VSV を感染させた場合、感染卵丘細胞から放出されるサイトカインを卵母細胞が受容し、その後の初期胚の細胞死が誘導されることが判明した。以上の結果から、卵母細胞における RIG-I を介した自然免疫応答は、通常の体細胞にみられる細胞死誘導とは別に、受精後の初期胚発生進行を促す役割を果たしている可能性が示された。