HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11385号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55782
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Sasaki_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　　博　士（農学）　　氏名　佐々木　恵亮

審査担当者　主　査　准教授　川　原　　学
副　査　教　授　高　橋　昌　志
副　査　教　授　中　村　富美男
副　査　助　教　小　林　　謙

学 位 論 文 題 名

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

本論文は 5 章からなり，図 19，表 5，文献 159 を含む頁数 131 の和文論文であり，別に参考論文 2 編が添えられている。

自然免疫系は，外来異物の認識から排除までの一連の機構であり，生体の恒常性維持に不可欠な役割を果たしている。また，自然免疫系の炎症反応によりサイトカイン類の産生が促されることで抗病原体の排除に繋がる。一方，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）を考えた場合，自然免疫系の異物認識能がどのような機能を果たしているのかは非常に興味深い。しかし，生殖細胞および初期胚における自然免疫関連因子の動態に関してはほとんど調べられていない。そこで本研究では，哺乳動物における自然免疫関連遺伝子の抗ウイルス能発動機構の解明，ならびに，生殖細胞および初期胚における自然免疫連因子の発現解析を実施し，感染防御から初期胚発生までの幅広い視点で哺乳動物の自然免疫因子の機能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 タンパク質は水疱性口内炎ウイルス（VSV)などの RNA ウイルスの増殖を抑制する自然免疫因子の一つである。ブタ MX2 については，一塩基多型（SNPs)と VSV 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。これらに基づいてブタ MX2 を 8 つのアリル（A1-A8）に分類し各アリルの *MX2* を発現するマウス 3T3 細胞を作製した。これに組換え VSV を感染させたところ，514 番地アミノ酸がアルギニンの A6 および A7 由来 MX2 において抗ウイルス活性が認められたことから，この番地の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。

(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病原体認識のためにはパターン認識受容体（PRRs)が重要な役割を担う。これら分子の体細胞における知見は多く得られているものの，生殖細胞および初期胚での知見は全くない。そこで，マウス卵母細胞および初期胚における 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,RT-PCR によって代表的な 3 種の PRRs である *Nlrp3*, *Rig-i* および *Tlr9* mRNA の発現を確認した。さらに，RIG-I および TLR9 に着目し定量 PCR によって初期胚発生間での mRNA 発現動態を調べたところ，*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 タンパク質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中に発現することが判明した。

(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

マウス卵母細胞内で外来 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 mRNA 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への組換え VSV の感染を試したところ,体外発生率が有意に低下し,*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に組換え VSV を感染させたところ，体外発生率は有意に上昇し，*Il6* のみ発現レベルが上昇していた。裸化卵子への RIG-I アゴニストである poly(I:C)を受精前卵母細胞に顕微注入した後，体外受精を行ったところ，体外発生率は上昇した。これらの結果は，卵母細胞から 2 細胞期胚までのステージでは RIG-I 応答性を示し，2 細胞期以降の初期胚では RIG-I 応答能を欠如していることを示していると考えられた。

以上，本研究によってブタ MX2 が一塩基多型によりタンパク質立体構造に変化を来たし抗ウイルス能が変化すること，および，マウス卵母細胞と初期胚における RNA 感知タンパク質 RIG-I を介した自然免疫応答が初期胚発生間で体細胞系列の細胞とは異なる機能を有していることが示された。これらの研究結果は，哺乳動物における自然免疫因子の役割の多様性を実証するもので，免疫学的ならびに発生生物学的に極めて重要な知見と評価され将来的に家畜の抗病性育種や優良家畜の効率的増産に繋がる新技術開発に発展する可能性を示している。よって，審査員一同は，佐々木　恵亮が博士（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。