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［全文の要約］
Author(s)	佐々木, 恵亮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/55783
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Sasaki_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博　士　論　文　要　約

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の病原体を認識し排除する機構であり，生体の恒常性維持に不可欠な役割を担う。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。本研究では，家畜および実験動物における自然免疫遺伝子の抗ウイルス機能に関する解析，並びに，卵母細胞および初期胚における自然免疫因子群の解析により，自然免疫系の広範な役割を解明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。これまでに，7 品種計 17 頭のブタを用いた *MX2* 遺伝子の多型解析により 11 箇所のアミノ酸置換が検出され、それに基づいてブタ *MX2* は 8 つのアリル (A1–A8) に分類されている。そこで初めに，同定した各ア

リルの *MX2* をマウス 3T3 細胞に遺伝子導入し，ブタ *MX2* mRNA を安定的に発現する細胞クローン株を構築した。これらの細胞クローン株に対して組換え 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のに対して，その他のアリルのブタ *MX2* を発現する細胞は抗ウイルス活性を示さなかった。また、先の多型解析の結果を照合すると，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検出されている。以上のことから，ブタ MX2 の 514 番地アミノ酸におけるアルギニンが,抗 VSV 活性獲得に寄与することが明らかとなった。また，SWISS MODEL により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。以上のことから，ブタ *MX2* 遺伝子において特定の SNP を用いた抗病性育種改良の可能性が示唆された。

(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，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することで全能性を有する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因子を調べた知見はほとんどない。そこで本項では，マウス卵母細胞および初期胚における PRRs の mRNA およびタンパク質発現解析を行った。初めに，RT-PCR によって受精前のマウス卵母細胞における PRRs の発現を解析したところ，*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 発現も確認できた。これらの中から RIG-I および TLR9 に着目し，定量 PCR 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で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。これらの結果から，マウスの卵母細胞および初期胚は一部の PRRs を発現することが明らかとなり，病原体感染時に炎症反応へと繋がる自然免疫応答を示す可能性が示唆された。

(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因子群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，RNA ウイルスである VSV の組換え体 (組換え VSV) の感染，および RIG-I アゴニストである poly(I:C)の注入を行った。その後，体外発生率を調べ，RIG-I 関連因子の遺伝子発現を解析することで抗ウイルス応答性を評価した。まず，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 発現の増加がみられたのみであった。以上のことから，卵丘細胞の存在によって，ウイルス感染胚の遺伝子発現様式と体外発生率が変化することが示された。続いて，卵丘細胞から卵母細胞への影響を解析するために，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* および炎症性サイトカイン遺伝子の発現レベルの上昇を確認した。さらに，受精前後の卵母細胞において，いくつかのサイトカインレセプターmRNA の発現が認められた。この結果から，ウイルス感染卵丘細胞がサイトカイン類を産生することで，初期胚の体外発生を阻害することが強く示唆された。

さらに，卵母細胞および初期胚自体の抗ウイルス応答を検討するため，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。続いて，RIG-I アゴ

ニストである poly(I:C)を DOs 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。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，体外発生を補助する可能性が示されたと同時に, 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。

以上本研究をまとめると，まず，ブタにおいて抗 VSV 遺伝子 *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。