

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380170
 研究課題名（和文）ウシにおけるウイルス抵抗性Mx遺伝子のスプライシング変異による特異的感染防御機構
 研究課題名（英文）Specific defensive mechanism by alternative splicing variation of bovine virus-resistant Mx gene
 研究代表者 渡辺 智正(WATANABE TOMOMASA)
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：10100174

研究成果の概要：

わが国においても、家畜に様々な感染症が発生し、社会を震撼させている。生体には病原体に対して防御機構が備わっており、この防御力には経験的に個体差のあることが知られている。抗病性に関わるMx遺伝子の解析中に、ウシMx1遺伝子は通常のMx1mRNAの他に、スプライシング変異によりエクソン1から3が転写されないで、代わりにエクソン3'(イントロン3内の配列)に置き換わったMx1BmRNAを産生するという、特異的な機構により防御している可能性が示唆された。分子的にMx1タンパク質の最初の24アミノ酸が、Mx1Bでは異なる27アミノ酸に置換していた。細胞質で増殖する水疱性口内炎ウイルスを用いた感染実験の結果、Mx1はその増殖を抑制したが、Mx1Bは抑制しなかった。原因として、Mx1Bには特異的配列27アミノ酸中に核移行シグナルが存在していることが示唆された。したがって、ウシMx1は細胞内局在を変えることで核および細胞質で増殖する各種ウイルスに対して巧みに防御する機構を有することが推測された。そこで、ウシ各種品種(ホルスタイン・黒毛和種を含めたヨーロッパ系7品種とインド牛起源のブラーマン種)および水牛のMx1Bアミノ酸を調べたところ、全て同じ配列で高い保存性を示した。このことから、ウシ科反芻動物においてMx1Bは重要な機能を果たしていることが示唆された。しかし、同じ反芻動物であるヒツジとヤギについては、ともにMx1BmRNAの発現は確認できたが、アミノ酸に置き換わることないmRNAと推定された。したがって、Mx1Bは反芻動物全般に渡って機能的なタンパク質として合成されるとは考えられなかった。さらに、同じ偶蹄目のブタでは、Mx1BmRNAの発現は全く確認されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野： 農 学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード： 遺 伝

1．研究開始当初の背景

わが国においても、ウシ口蹄疫、BSE(狂牛病)、トリインフルエンザウイルス症など様々な感染症が家畜に発生し、畜産業界に多大な損失を与えたのみならず、社会を震撼させている。一方、生体には病原体に対して防御機構が備わっており、この防御力には個体差のあることが知られている。研究の進んでいる実験動物のマウスにおいては、抗病性 Mx 遺伝子の多型が各種ウイルスに対して抵抗性・感受性などの差異をもたらすことが解明されており、これが家畜に応用された場合抗病性育種が実現されることが期待される。

2．研究の目的

免疫には抗体産生を中心とする獲得免疫と、生体が本来有し即座に反応できるとともに病原体に幅広く対応する自然免疫がある。Mx は、自然免疫系の代表的な抗病性遺伝子の一つである。Mx 遺伝子の解析中に、ウシ Mx1 は通常の mRNA の他に、スプライシング変異によりエクソン 1 から 3 が転写されない代わりに、イントロン 3 内の配列をエクソン 3 に置き換った Mx1BmRNA を産生するという、特異的な機構により防御している可能性が示唆された。このウシ Mx1 による特異的感染防御機構の詳細を解明することを本研究の目的とした。

3．研究の方法

ウシ各種品種(ホルスタイン・黒毛和種を含めたヨーロッパ系 7 品種と、インド牛起源とされるブラーマン種)、水牛、ヒツジ、ヤギ、およびブタの血液から Mx1BmRNA の発現を RT-PCR により確認するとともに、cDNA の塩基配列を決定した。cDNA を発現ベクターに組み込んだ後、培養細胞に遺伝子導入し、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を用いた感染実験を行なった。

4．研究成果

塩基配列を決定した結果、分子的に Mx1 タンパク質の最初の 24 アミノ酸が、Mx1B では異なる 27 アミノ酸に置換していた。細胞質で増殖するウイルスの一つである VSV を用いた感染実験の結果、Mx1 はその増殖を抑制したが、Mx1B は抑制しなかった。原因として、Mx1B には特異的配列中に核移行シグナルが存在していることが示唆された。GFP 蛍光を tag として細胞内局在を調べてみたところ、Mx1 は細胞質に、Mx1B はおもに核に局在していた。したがって、核に局在する Mx1B は、細胞質で増殖する VSV を抑制することができないと示唆された。このことから、ウシ Mx1 は一つの遺伝子ながら、細胞内局在を変えることで核および細胞質で増殖する各種ウイルスに対して巧みに防御する機構を持つことが推測された。

次に、ウシ各種品種(ホルスタイン、ヘレフォード、ジャージー、エアシャー、アンガス、黒毛和種、日本短角種、ブラーマン)および水牛において、Mx1B特異的27アミノ酸に変異が存在するか調べた。その結果、全て同じアミノ酸配列を示し、きわめて高い保存性であることが実証された。しかし、同じ反芻動物でありながら、属する科が異なるヒツジとヤギにおいては、ともにMx1BmRNAの発現は確認できたもののアミノ酸に置き換わることないmRNAと推定された。さらに、同じ偶蹄目のブタにおいては、Mx1BmRNAの発現そのもの自体が確認できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Yamada, Nakatsu, Onogi, Takasuga, Sugimoto, Ueda, Watanabe. Structural and functional analysis of the bovine Mx1 promoter. J. Interferon Cytokine Res. In press, 2009. 査読有

Morozumi, Naito, Lan, Nakajima, Mitsuhashi, Mikawa, Hayashi, Awata, Uenishi, Nagata, Watanabe, Hamasima,. Molecular cloning and characterization of porcine Mx2 gene. Molecular Immunology 46: 858-865, 2009. 査読有

Maeda, Murata, Takashima, Kariwa, Watanabe, Kurane, Maeda. A PCR-based protocol for the generation of a recombinant West Nile virus. Virus Res. In press, 2009. 査読有

Pullop, Noda, Morozumi, Hamasima, Kobayashi, Ueda, Watanabe. Polymorphic study of the promoter region in porcine antiviral Mx1 and Mx2 genes. Animal Genetics 39: 22-27, 2008. 査読有

Nakajima, Morozumi, Tsukamoto, Watanabe, Plastow, Mitsuhashi. A naturally occurring variant of porcine Mx1 is associated with increased susceptibility to influenza virus in vitro. Biochemical Genetics 45: 59-67, 2007. 査読有

Baviker, Nakatsu, Yamada, Yoneda, Takada, Ueda, Hata, Watanabe. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. Immunogenetics 59: 59-67, 2007. 査読有

Watanabe. Polymorphisms of the chicken antiviral Mx gene (Review). Cytogenetics Genome Res. 117: 370-375, 2007. 査読無

[学会発表](計 7 件)

二宮彰紀、米田明弘、パロップ、高松荘、渡辺智正 ヤギおよびヒツジのウイルス抵抗性遺伝子 Mx に関する研究、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 27 日、日本大学、藤沢市

パロップ、野田哲男、両角岳哉、米田明弘、浜島紀之、小林栄治、上田純治、渡辺智正 ブタ Mx 遺伝子プロモーターと cDNA 多型に関する研究、日本畜産学会第 109 回大会、2008 年 3 月 27 日、常磐大学、水戸市

米田明弘、山田晃嗣、渡辺智正 ウシ Mx1 および Mx2 の抗ウイルス活性と細胞内局在、日本畜産学会第 108 回大会、

2007年9月27日、岡山大学、岡山市

パロップ、野田哲男、小林栄治、両角岳哉、浜島紀之、上西博英、井出華子、今枝紀明、渡辺智正 ブタ Mx1 および Mx2 遺伝子のプロモーターの多型に関する研究、日本畜産学会第107回大会、2007年3月27日、麻布大学、相模原市

パロップ、野田哲男、両角岳哉、浜島紀之、小林栄治、上田純治、渡辺智正 ブタ Mx 遺伝子プロモーターと cDNA 多型に関する研究、日本畜産学会第106回大会、2006年3月31日、九州大学、福岡市

五味花子、中津祐一郎、山田晃嗣、坂本晃子、大江美香、大和修、上田純治、渡辺智正 イヌにおけるウイルス抵抗性 Mx1 および Mx2 遺伝子の解析、日本畜産学会第106回大会、2006年3月31日、九州大学、福岡市

山田晃嗣、渡辺智正 ウシにおける抗病性遺伝子 Mx1 のプロモーター解析、日本畜産学会第106回大会、2006年3月29日、九州大学、福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 智正 (WATANABE TOMOMASA)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：10100174

(2)研究分担者

前田 秋彦 (MAEDA AKIHIKO)
北海道大学・大学院獣医学研究科
・ 准教授
研究者番号：70333359

鈴木 啓太 (SUZUKI KEITA)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学
センター・准教授
研究者番号：60261335

上田純治 (UEDA JUNNJI)
酪農学園大学・酪農学部・教授
研究者番号：50002374

山田 豊 (YAMADA YUTAKA)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：80418607

米田 明弘 (YONEDA AKIHIRO)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00451419

(3)連携研究者

なし