

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008-2009
 課題番号：20780208
 研究課題名(和文) インターフェロン誘導性 GTP 結合蛋白質による生体防御システムの解析
 研究課題名(英文) Analysis of defense system regulated by interferon-induced GTP binding proteins

研究代表者
 浅野 淳 (ASANO ATSUSHI)
 鳥取大学・農学部・准教授
 研究者番号：90312404

研究成果の概要(和文)：細胞内において感染ウイルスの増殖を阻害すると考えられている GTP 結合タンパク質(GBP)群について、ニワトリ GBP2 および GBP3 の遺伝子を同定した。これらの遺伝子はともにインターフェロン (IFN β 、 γ 、 λ) によって発現が増強された。また、ニワトリ GBP2 蛋白質は抗ウイルス GTP 結合タンパク質 Mx と同様に細胞質内に広く点在した。ニワトリ GBP2 蛋白質は、ウイルス増殖抑制作用を有するヒト GBP1 蛋白質と最も相同性が高く、同様の作用を有することが推測される。

研究成果の概要(英文)：Interferon (IFN)-induced GTP binding proteins (GBPs) were thought to play a part in inhibition of amplification of infected viruses in animal. I identified two novel GBP genes, GBP2 and GBP3, of the chicken. The mRNA of these genes was induced by various IFNs such as IFN β , IFN γ and IFN λ . Chicken GBP2 protein was located in the cytoplasm, which is similar to Mx, one of the antiviral GTP binding protein. Chicken GBP2 has the highest homology to human GBP1, which is an antiviral GBP, suggesting its antiviral property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：ニワトリ、インターフェロン、IFN 誘導性 GTP 結合蛋白質群

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原性微生物による感染症は、抗生物質やワクチンの普及、公衆衛生の発展により 20 世紀後半までには激減した。ところが近年、

新興感染症がたびたび発生・蔓延している。その結果、家畜生産性に重大な影響が表れており、さらに人獣共通感染症による人への健康問題が顕在化している。特に、ニワトリなどの鳥類を介した新型インフルエンザウイ

ルスの伝播は世界的に深刻な問題となっている。したがって、抗生物質やワクチン開発を含めた包括的な感染症対策が求められている。そのためには、ニワトリなどの宿主動物における感染防御機構の総合的な理解が必須である。

(2) 動物においてウイルスが侵入すると、感染細胞内ではウイルス由来 RNA がセンサー蛋白質(RIG-I, MDA5)やレセプター(TLR3)によって認識され、そのシグナル伝達により I 型(α/β)および III 型(λ)IFN が速やかに産生される。これらの IFN は周囲の細胞を刺激して、数百個の遺伝子発現を増強させる(J. Leukoc. Biol. 69: 912-920, 2001)。この刺激を受けて細胞はいわゆる「抗ウイルス状態」となり、侵入ウイルスの増殖が抑制される。この抗ウイルス状態には IFN 誘導性遺伝子産物が自然免疫担当分子として、侵入したウイルスの増殖抑制・排除に寄与していると考えられる。「抗ウイルス状態」は IFN が発見された 1950 年代からよく知られている現象であるにも関わらず、IFN 誘導性遺伝子産物の多くは現在でも機能や作用機序が明らかになっていない(図 1)。従って、これらの遺伝子産物の機能を明らかにすることは「抗ウイルス状態」の実態を解明し、感染防御機構を知る上で重要である。

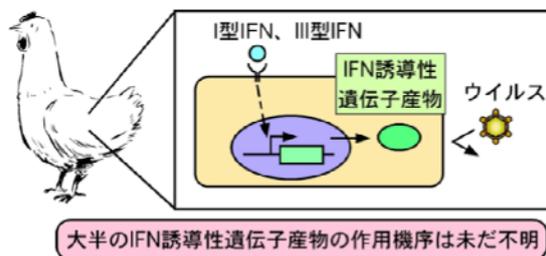


図 1

(3) IFN 誘導性遺伝子のうち、*Mx1* は GTP 結合蛋白質をコードしているが、この遺伝子は実験用近交系マウスでは欠損しており、そのためインフルエンザウイルス感染に対して著しく感受性を示す。一方、*Mx1* トランスジェニックマウスは感染抵抗性となる (Cell 62: 51-61, 1990)。

(4) 最近 *Mx* と近縁の、GTP 分解酵素活性を有する IFN 誘導性 GTP 結合蛋白質が発見されている。(Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 22: 559-589, 2006)。その一種である GBP (Guanylate Binding Protein) 蛋白質ファミリーには *Mx* と同様に抗ウイルス活性を示すことが明らかになりつつある。さらに *Mx* や GBP などの IFN 誘導性 GTP 結合蛋白質は、細胞増殖の抑制に関与しているとの報告があり、これらの蛋白質の未知の感染防御機能や抗腫瘍作用などの生理的機能が推測され

る。しかし IFN 誘導性 GTP 結合蛋白質の多くは、GTP 分解酵素活性と抗ウイルス活性との関連性など、機能と作用機序について不明な点が多い。

2. 研究の目的

IFN シグナルを介した自然免疫系、とくに宿主細胞における「抗ウイルス状態」の機構の一端を解明するために、*Mx* や GBP 蛋白質ファミリーを含めた IFN 誘導性 GTP 結合蛋白質群の抗ウイルス活性などの機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ細胞の培養

① 胚由来初代培養線維芽細胞の分離と培養
ニワトリ (ホワイトレグホン) の 10 日胚を細切後、トリプシン消化して線維芽細胞を分離した。分離後の細胞は、培地に DMEM+10% ウシ胎児血清 (FBS) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件にて維持した。

② マクロファージ様細胞株 HD11 の培養

培地に IMDM+10%FBS を用いて 38°C、5% CO₂ の条件にて維持した。

③ 白血病リンパ腫由来細胞株 LSCC-RP9 の培養

培地に RPMI1640+10%FBS を用いて 37°C、5% CO₂ の条件にて維持した。

(2) ニワトリ GBP 遺伝子群および IFN ファミリー遺伝子に関する塩基配列検索

米国立生物工学情報センター (NCBI) が公開しているニワトリゲノム配列、遺伝子配列および Expression sequence tag (EST) データベースを用いて、BLAST 検索を行った。

(3) cDNA クローニング

培養細胞より total RNA を精製し、RT-PCR 法を用いて cDNA 断片を増幅した。また、遺伝子 cDNA の 5' 末端および 3' 末端断片は、それぞれ 5'-RACE 法および 3'-RACE 法を用いて増幅した。PCR 法に用いたプライマーは、遺伝子塩基配列検索の結果に基づき作製した。増幅した cDNA 断片は pGEM-T Easy ベクターと大腸菌 DH5 α 株を用いてクローニングした後、塩基配列を決定した。

(4) 大腸菌を用いた組換え IFN 蛋白質の発現と精製

クローニングしたニワトリ IFN β 、 γ および λ cDNA を HIs タグ融合蛋白質発現ベクター pET-28a に挿入後、大腸菌 RosettaII (DE3) 株に導入し、1 mM IPTG にて組換え蛋白質の発現を誘導した。組換え蛋白質の精製にはコバルトレジンを用いた。

③ニワトリ培養細胞を組換え IFN にて 6 時間刺激後、GBP 遺伝子群の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。その結果、GBP2(hmm98140)は白血球リンパ腫由来細胞株 LSCC-RP9 において、IFN β および γ 刺激による発現増強が認められた。一方、胚由来初代培養線維芽細胞およびマクロファージ様細胞株 HD11 では、発現を検出することはできなかった。また、GBP3(XM_414266)は、胚由来初代培養線維芽細胞において、IFN β 、 λ および γ 刺激による発現の増強が認められた(図4)。これらの結果から、本研究において同定された GBP2、GBP3 遺伝子は I 型および II 型の IFN によって誘導されることが示された。さらに、GBP3 遺伝子は IFN λ 刺激による発現上昇が見られたことから、GBP 遺伝子群は III 型 IFN によっても発現調節が行われている可能性が考えられた。

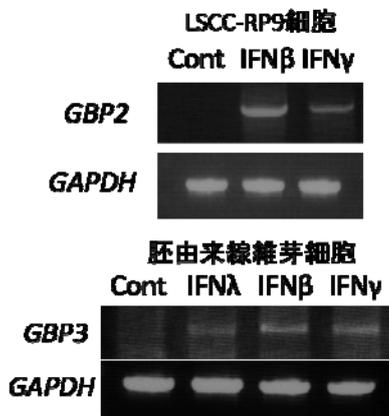


図4 GBP遺伝子発現に対するIFNの効果

(3)ニワトリ GBP2 蛋白質の細胞内局在

GFP-ニワトリ GBP2 融合蛋白質をマウス線維芽細胞株 NIH3T3 に発現させ、蛍光顕微鏡下で観察することにより、GBP2 蛋白質の細胞内における局在を検討した。GFP 蛋白質発現細胞、GFP-ニワトリ Mx 融合蛋白質発現細胞および GFP-ニワトリ GBP2 融合蛋白質発現細胞の蛍光像を図5に示す。

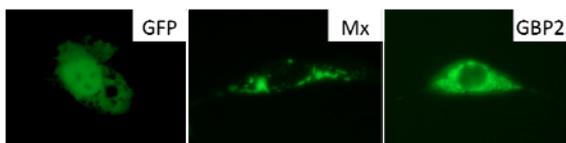


図5 GFP融合蛋白質発現細胞の蛍光観察像

蛍光観察像より、GFP-GBP2 蛋白質は GFP-Mx 蛋白質と同様に細胞内に広く点在することがわかった。ニワトリ Mx 蛋白質は、細胞質内に局在することにより、細胞内におけるウイルス増幅を抑制することが知られている。また、ヒト GBP-1 発現細胞では水疱性口炎ウイルス(VSV)や脳心筋炎ウイルス(EMCV)の増幅が抑制されたという報告(Virology 256,

8-14, 1999)がある。以上のことから、ニワトリ GBP2 蛋白質は、細胞質内に分布して Mx 蛋白質と同様の抗ウイルス効果をもたらすと推定された。

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)

[学会発表] (計2件)

(1) 増田康充、浅野 淳、山野好章：組換えニワトリインターフェロン λ タンパク質の抗ウイルス遺伝子誘導作用、第148回日本獣医学会(2009.9.25,鳥取)

(2) 増田康充、浅野 淳、神尾高志、北村直樹、澁谷 泉、山野好章：組換えニワトリインターフェロン λ タンパク質の精製、第146回日本獣医学会(2008.9.24,宮崎)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野 淳 (ASANO ATSUSHI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：90312404