

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20577

研究課題名（和文）Rabファミリー低分子量G蛋白質の遺伝子改変による越境性動物疾病抵抗性動物の開発

研究課題名（英文）Generation of transboundary animal diseases-resistant animals by genetic modification technologies to Rab-GTPases genes

研究代表者

小野 悦郎（ONO, Etsuro）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00160903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：越境性動物疾病に対する新たな制圧方法として、ウイルスの主要感染経路であるエンドサイトーシスに關するRabファミリー低分子量G蛋白質Rab5及びRab7をターゲットとした遺伝子改変技術により、越境性動物疾病に対する抗病性動物の開発を目的として、Rabファミリー低分子量G蛋白質 Rab5bの34番目のセリン(S)をアスパラギン(N)(Rab5b_S34N)に、Rab7aの22番目のスレオニン(T)をアスパラギン(N)(Rab7a_T22N)にそれぞれ置換した変異蛋白質及びその両方を発現するブタ腎細胞由来のSK-L細胞株を樹立し、これらにおいて、豚熱ウイルスの増殖が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

越境性動物疾病は、ワクチン対策では制圧することが極めて困難であるにもかかわらず、遺伝子改変技術による越境性動物疾病に対する抗病性動物の開発は、殆ど実施されていない。越境性動物疾病の制圧が、獣医畜産業界において、解決しなければならない緊急最重要課題の一つであることから、遺伝子改変技術による越境性動物疾病抵抗性動物の開発研究は、国際的にも極めて意義あるものである。本研究の成果は、抗病性動物の開発のみならず、多種類のウイルス感染に対して効果が期待される新規抗ウイルス剤の開発にも貢献することから、その成果は広く一般社会に還元できる。

研究成果の概要（英文）：Transboundary animal diseases such as Foot-and-mouth disease (FMD), Classical swine fever (CSF), African swine fever (ASF) and Highly pathogenic avian influenza (HPAI) are the most economically important disease of livestock industry worldwide. We hypothesized that animals with dominant negative mutants of Rab5b and Rab7a would be resistant to transboundary animal diseases. Here, we have tried to generate transboundary animal diseases-resistant animals using genetic modification technologies. Microminiature pig (MMP) embryonic fibroblast cell lines and a porcine kidney cell line (SK-L) expressing dominant negative mutants of Rab5b and Rab7a were established. These cell lines showed resistance against CSF virus infection. Although generation of animals expressing the dominant negative mutants was unsuccessful. It is, therefore, that the birth of transboundary animal diseases-resistant animals is expected, although the genetic modified animals were not generated in this time.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：越境性動物疾病 抗病性動物 遺伝子改変動物 Rabファミリー低分子量G蛋白質 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

代表的な越境性動物疾病である口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease:以下 FMD)、豚熱 (Classical Swine Fever:以下 CSF)、アフリカ豚熱 (African Swine Fever:以下 ASF) 及び高病原性鳥インフルエンザ (Highly Pathogenic Avian Influenza:以下 HPAI) の制圧は、我が国のみならず、世界的に見ても、獣医畜産業界において解決しなければならない緊急かつ最重要課題である。特に ASF は、感染豚に中和抗体が産生されないため有効なワクチンが存在せず、その開発も極めて困難である。遺伝子改変技術による抗病性動物の開発は、ワクチン開発が極めて困難な ASF や多くの抗原性の異なるウイルス株が存在する FMD や抗原変異が激しいインフルエンザや豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) 等のワクチン対策では動物に感染防御が成立しない感染症に対して有効な手段であると考えられている。しかし、抗病性の付与は容易ではなく、世界的にこの分野の研究は、あまり進展していなかったが、近年ゲノム編集技術が急展開し、PRRS ウイルスレセプターの CD163 をゲノム編集でノックアウトしたブタが PRRS に抵抗することが報告された。これまでの報告で、ウイルスの主要感染経路であるエンドサイトーシスに参与する Rab5 及び Rab7 の dominant negative mutant (Rab5_S34N 及び Rab7_T22N) が、ASF ウイルス (ASFV)、CSF ウイルス (CSFV)、FMD ウイルス (FMDV) 及びインフルエンザウイルス (IFV) の増殖を *in vitro* で抑制する (図 1) ことに着目し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N を発現するトランスジェニックマウス及びマイクロミニピッグ (MMP) 更にゲノム編集技術を用いて、マウスと MMP の Rab5 及び Rab7 に dominant negative mutation を導入した遺伝子改変動物を作製し、抗ウイルス作用について *in vivo* で検討する構想に至った。

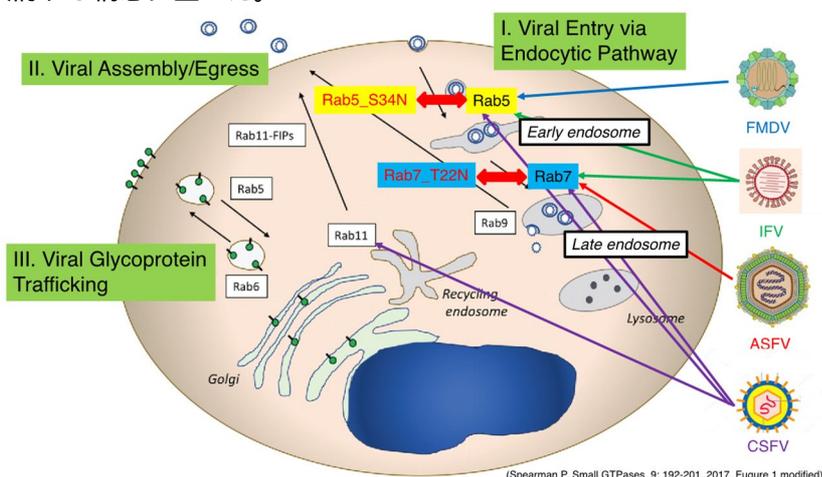


図 1. ウイルスの主要感染経路であるエンドサイトーシスにおける Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rab5 及び Rab7 の役割

2. 研究の目的

越境性動物疾病に対する新たな制圧方法として、ウイルスの主要感染経路であるエンドサイトーシスに参与する Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rab5 及び Rab7 をターゲットとした遺伝子改変技術により、越境性動物疾病に対する抗病性動物の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現プラスミドの構築

Rab5 の 34 番目のセリン (S) をアスパラギン (N) に、Rab7 の 22 番目のスレオニン (T) をアスパラギン (N) にそれぞれ置換した cDNA の人工合成を外部に委託し作製した。この cDNA を CAG プロモーター下で駆動させるプラスミドに挿入し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現プラスミドを構築した。また、Rab5_S34N と Rab7_T22N の両方を発現するプラスミドを構築した。

(2) Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現細胞の樹立

(1) で構築した Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現プラスミドを MMP の胎仔線維芽細胞 (MMPEF) 及びブタ腎細胞株 SK-L に transfection し、G418 で選択することで、Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N を恒常的に発現する細胞株を樹立した。発現された Rab5_S34N 及び Rab7_T22N は、抗 Rab5 抗体及び抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロッティングで確認した。

(3) Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニックマウスの作製

(1) で構築したプラスミドから調製した transgene を C57BL/6 の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親マウスに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニックマウス (Rab5_S34N-Tg マウス及び Rab7_T22N-Tg マウス) を作製した。transgene の発現は、(2) と同様にウエスタンブロッティングで確認した。

- (4) Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニック MMP の作製
 (3) と同様に、transgene を MMP の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニック MMP (Rab5_S34N-TgMMP 及び Rab7_T22N-TgMMP) を作製した。transgene の発現は、(2) と同様に確認した。
- (5) ゲノム編集技術によるマウスの Rab5 及び Rab7 への dominant negative mutation の導入
 Cas9 蛋白質、sgRNA (CRISPOR : [https:// http://crispor.tefor.net](https://http://crispor.tefor.net) で決定) 及び Rab5 の 34 番目の S を N に、Rab7 の 22 番目の T を N にそれぞれ置換するようにした合成 1 本鎖 DNA を C57BL/6 の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親マウスに受精卵を移植して、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 導入ゲノム編集マウス (Rab5_S34N マウス及び Rab7_T22N マウス) を作製した。変異の導入は、近傍の DNA を PCR で増幅し、塩基配列を調べることにより確認した。
- (6) ゲノム編集技術による MMP の Rab5 及び Rab7 への dominant negative mutation の導入
 (5) と同様の方法で MMP の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 導入ゲノム編集 MMP (Rab5_S34NMMP 及び Rab7_T22NMMP) を作製した。変異の導入は、(5) と同様に実施した。
- (7) Rab5_S34N/Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現細胞株のインフルエンザウイルス感染抵抗性の検討
 Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現細胞株に高病原性鳥 IFV 株を接種し、IFV に対する感染抵抗性について検討した。
- (8) Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現細胞株の豚熱ウイルス感染抵抗性の検討
 Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現細胞株に CSFV を接種し、CSFV に対する感染抵抗性について検討した。

4 . 研究成果

- (1) Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現 MMPEF のウイルス感染抵抗性
 Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現プラスミドを MMP の胎仔線維芽細胞 (MMPEF) に transfection し、G418 で選択することで、Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N を恒常的に発現する細胞株を樹立した。発現された Rab5_S34N 及び Rab7_T22N は、抗 Rab5 抗体及び抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロッティングで確認した。
 これら MMPEF 細胞株に、高病原性鳥 IFV 株を接種し、IFV に対する感染抵抗性について検討したが、対照の MMPEF に比べ、何の細胞株においても感染抵抗性に相違は認められなかった。
 一方、豚熱ウイルスに対する感染抵抗性の解析では、Rab7a_T22N 発現 MMPEF において最も強く、Rab5b_S34N 発現 MMPEF 及び Rab5b_S34N/Rab7a_T22N 発現 MMPEF においても若干の感染抵抗性が示された (図 2) 。

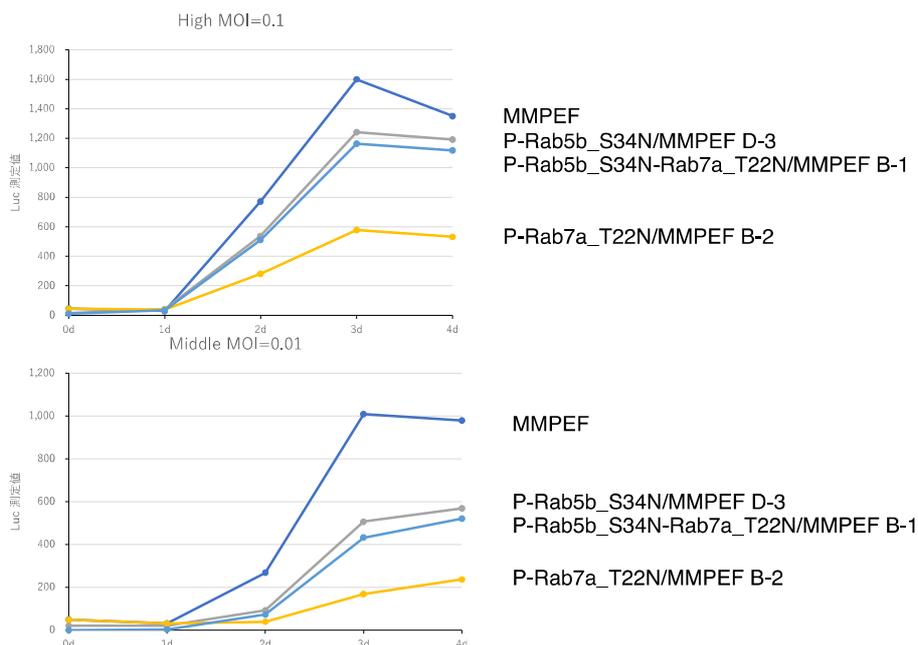


図 2 . MMPEF 細胞株における豚熱ウイルスに対する感染抵抗性

- (2) Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現 SK-L の豚熱ウイルス感染抵抗性
 Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現プラスミドを SK-L 細胞株に transfection し、Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N を恒常的に発現する細胞株を樹立した。発現された Rab5_S34N 及び Rab7_T22N は、抗 Rab5 抗体及び抗 Rab7 抗体によるウエスタンブロッティングで確認した。

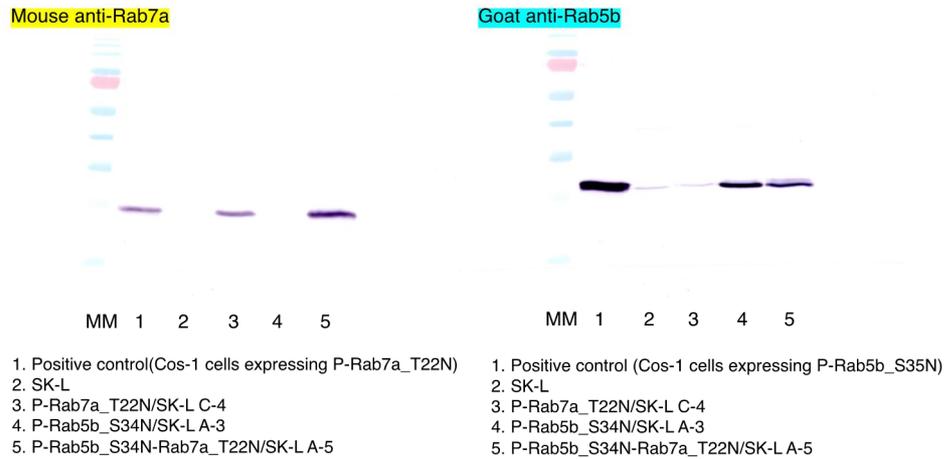


図3. Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現 SK-L 細胞株の樹立

これら SK-L 細胞株に、豚熱ウイルス株を接種し、豚熱ウイルスに対する感染抵抗性について検討した。その結果、すべての細胞株において豚熱ウイルスに対する感性抵抗性が示された。

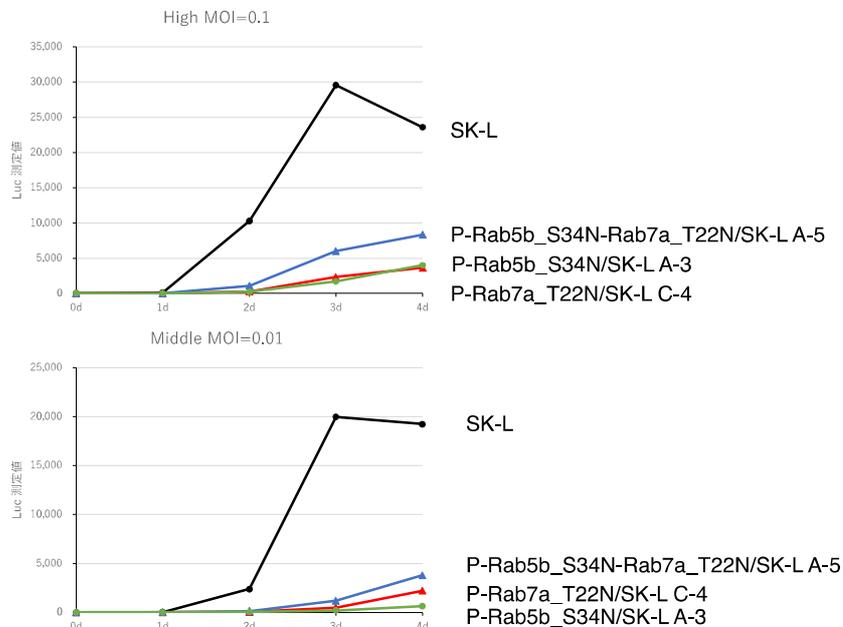


図4. SK-L 細胞株における豚熱ウイルスに対する感染抵抗性

(3) Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニックマウスの作製

Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現プラスミドから調製した transgene を C57BL/6 の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親マウスに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニックマウス (Rab5_S34N-Tg マウス及び Rab7_T22N-Tg マウス) の作製を試みた。Rab5b_S34N-Tg マウスの founder4 匹のうち、2 匹において transgene の後代への伝達が認められ、それぞれ系統化した。しかしながら、ウエスタンブロット解析では、各 Tg マウスにおいて、Rab5b_S34N の顕著な発現増強は認められなかった。

一方、Rab7_T22N-Tg マウスの作製では、計 11 回のマイクロインジェクションにより、182 頭の産仔を得たが、Rab7a_T22N-Tg マウスは得られなかった。

(4) Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニック MMP の作製

採卵用 MMP10 頭から合計 70 個の受精卵を回収し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N の transgene を各 35 個の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 発現トランスジェニック MMP (Rab5_S34N-TgMMP 及び Rab7_T22N-TgMMP) の作製を試みたが、仮親ブタの不受胎が確認され、Rab5_S34N-TgMMP 及び Rab7_T22N-TgMMP を得ることは出来なかった。

(5) ゲノム編集技術によるマウスの Rab5 及び Rab7 への dominant negative mutation の導入

Cas9 蛋白質、sgRNA 及び Rab5 の 34 番目の S を N に、Rab7 の 22 番目の T を N にそれぞれ置換するようにした合成 1 本鎖 DNA を C57BL/6 の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親マウスに受精卵を移植して、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 導入ゲノム編集マウス(Rab5_S34N マウス及び Rab7_T22N マウス) の作製を試みた。変異の導入は、近傍の DNA を PCR で増幅し、塩基配列を調べることにより確認した。Rab5_S34N マウスの作製では、48 頭のマウスのうち 2 頭で Rab5b 遺伝子内に indel が認められたが、dominant negative mutation の導入は認められなかった。Rab5b 遺伝子内に indel が認められたマウスについては、それぞれ系統化した。一方、Rab7_T22N マウス作製では、51 頭のマウス産仔が得られたが、いかなる遺伝子改変も認められなかった。

- (6) ゲノム編集技術による MMP の Rab5 及び Rab7 への dominant negative mutation の導入
Cas9 蛋白質、sgRNA 及び Rab5 の 34 番目の S を N に、Rab7 の 22 番目の T を N にそれぞれ置換するようにした合成 1 本鎖 DNA を MMP の受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植し、Rab5_S34N 及び Rab7_T22N 導入ゲノム編集 MMP (Rab5_S34NMMP 及び Rab7_T22NMMP) の作製を試みた。Rab5_S34NMMP の作製では、採卵用 MMP11 頭から合計 73 個の受精卵を回収し、受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植したが、不受胎が確認された。一方、Rab7_T22NMMP の作製では、採卵用 MMP10 頭から合計 123 個の受精卵を回収し、受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親ブタに受精卵を移植し、1 頭の産仔が得られたが、出生直後に死亡した。死亡した産仔の遺伝子診断を実施したが、変異は認められなかった。

Rab5_S34N、Rab7_T22N 及び Rab5_S34N-Rab7_T22N 発現 MMPEF 及び SK-L 細胞株において、豚熱ウイルスに対する感染抵抗性が認められ、越境性動物疾病抵抗性動物開発の可能性が示唆された。しかしながら、これら dominant negative mutant を過剰発現するトランスジェニックマウス及び MMP を作製することが出来なかった。この結果は、これら dominant negative mutant の過剰発現が動物個体の発生に影響を及ぼす可能性を示唆するものかも知れない。

一方、ゲノム編集技術による dominant negative mutation の導入においても、目的の動物を得ることが出来なかった。このことは、標的アミノ酸が Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rab5 及び Rab7 の機能において、決定的な役割を果たしている可能性を示唆するものかも知れない。今後は、今回標的としたアミノ酸以外についても、in vivo での影響を検討する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大竹 正剛 (OTAKE Masayoshi) (90605677)	静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター 養豚・養鶏・上席研究員 (83810)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関