

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21405034
 研究課題名（和文）野生水禽や遺伝的抵抗鶏は何故マレック病を発症しないか：抵抗性因子と分子機序の解明
 研究課題名（英文）Identification and characterization of factors involved in the resistance to Marek's disease in chickens and wild waterfowls
 研究代表者
 大橋 和彦（OHASHI KAZUHIKO）
 北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
 研究者番号：90250498

研究成果の概要（和文）：マレック病（MD）に対する抵抗性の分子機構を明らかにするために、マガンなど野生水禽や遺伝的抵抗性鶏における免疫関連因子であり、感染防御に重要であると考えられているインターフェロン γ （IFN γ ）の発現調節機構を、ルシフェラーゼアッセイを用いて解析・比較した。その結果、マガンでは、MD ウイルス蛋白である Meq による IFN γ 発現抑制が鶏よりも強く起こり、このことが、MD に対する抵抗性に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To study the molecular mechanism(s) for the natural resistance to Marek's disease (MD) in wild waterfowls and genetically resistant lines of chickens, the regulatory mechanisms of the expression of interferon γ (IFN γ), which plays an important role in the cell-mediated immunity against MD virus (MDV), were analyzed by using the conventional luciferase reporter assay system. The promoter activity was more strongly repressed in white-fronted geese than chickens when Meq, an MDV oncoprotein, was co-expressed. This result suggests that, in white-fronted geese, reduced expression of IFN γ by Meq at early after MDV infection could result in the lower degree of T cell activation (activated T cells are targets for MDV) to reduce the chances for the birds to develop MD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野： 獣医学
 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： マレック病、マレック病ウイルス、インターフェロン γ

1. 研究開始当初の背景

マレック病ウイルス（MDV）は、鶏に悪性リンパ腫を引き起こし、養鶏業界に甚大な被害をもたらしてきたが、非病原性 MDV をワクチンとして用いることで、現在ではほぼ完全に制圧されている。しかし依然として MDV

の腫瘍化・ワクチンの防御機構については解明されていない。さらに近年、世界各地でワクチン接種鶏でもマレック病（MD）が発生し、野外における MDV の強毒化（病原性進化）が報告されている。このような MDV の強毒化が進行すれば、今後現行のワクチンが効力を失

う可能性があり、MDV の病態を明らかにして新規防除法を樹立することが急務となっている。また MDV は感染鶏に重度の免疫抑制を引き起こし、他の種々の疾病を増悪する因子としても重要であり、MD の予防は、他の疾病の制御にも重要である。

MDV の病態にはウイルスの病原性因子および宿主因子が関与する。ウイルスの病原性因子では、MDV 発癌遺伝子である *meq* 遺伝子がコードする蛋白が転写因子として細胞の癌化(形質転換)に重要な役割を果たしていることが示されている。一方、宿主因子としては、宿主の免疫応答に関わる炎症性サイトカイン (IFN- γ や TNF α など)、NK 細胞レセプターや T 細胞表面機能性分子 (CD80 や PD-1 など)、癌抑制蛋白 p53 などの関与が示唆されているが、その詳細な分子機構については判明していない。

MDV は自然宿主である鶏やウズラに疾病を引き起こすが、鶏では MD 発症に対する遺伝的抵抗性が知られている。そして近年の鶏ゲノム解析により、その抵抗性は B 遺伝子座 (B locus, B²¹ ハプロタイプは抵抗性であり、B¹⁹ ハプロタイプは感受性) に存在する MHC class I や II 遺伝子などの遺伝子群により支配されていることが示唆されている (B-F や B-L 領域)。そこでこれらの遺伝子群から MD 抵抗性に関わる遺伝子を同定し、その抵抗性の分子機構を明らかにすることができれば、抗病性鶏の選抜や作成が可能となり、より効率的な MD の予防が可能となる。

また MDV は鶏以外にも七面鳥や他の目の野鳥からも分離されている。しかし鳥の種により MDV の病原性は異なり、発症せず不顕性感染が維持される場合もあり、例えばアヒルは MDV 感染感受性にも関わらず、MD を発症しないことが示されている。さらに申請者は MDV 分子疫学調査 (平成 15~17 年度、基盤研究 B・課題番号 13556045) を行い、ロシアから日本に飛来するマガン、ヒシクイやマガモなどの野生水禽が高率に強毒 MDV に感染していることを示したが、現在までこれらの水禽で MD による大量死や個体数の減少などは報告されていない。このことは、これらの野生水禽が MD に対して自然抵抗性を持っていることを示唆している。以上より、いくつかの種の野生水禽でも、遺伝的抵抗性を有する鶏と同様に、MD 発症抵抗性を有している可能性がある。そしてその抵抗性を規定する因子 (例えば B 遺伝子座相同領域) を同定して分子機構を解明することにより、それらの抵抗性因子を導入した新規の抗病性鶏の作成が可能になると考えられる。

そこで本研究では、世界各地に分布するこれらの野生水禽より血液材料を採取して、自然抵抗性に関与する B 遺伝子座を中心にそのゲノム解析を行い、野生水禽における MD

抵抗性に寄与する遺伝子群 (候補) を選抜してその機能を明らかにすることを目的として行った。

2. 研究の目的

本研究では、ロシア極東地区にて、MD に対して抵抗性を持つと考えられる野生水禽のゲノム材料を採集して、それらの免疫関連遺伝子の解析を行い、鶏のものとの比較を行う。特にマレック病の病態に重要なサイトカイン遺伝子 (IFN- γ など) の発現制御配列を各野生水禽種や鶏など家禽で (多型) 解析して、その発現制御の相違を解析し、MD 抵抗性における役割を解明する。同様に、MD に対して遺伝的抵抗性を示す系統 (B21 など) についても解析を行う。

MDV は、近年、野外において強毒化の傾向を示しているため、家禽や野生水禽において検出される MDV の分子疫学調査を実施して、MDV のウイルス遺伝子変化のモニタリングを行う。

以上の研究を実施して、MD に対する宿主抵抗性の分子機構を明らかにして、MDV 強毒株に対する新規防除法の開発への応用を目指した基礎的情報を取得する。

3. 研究の方法

ロシア極東地区 (チェコト自治区およびカムチャツカ半島) や北海道宮島沼で捕獲したマガンやヒシクイ、北海道帯広地区などで捕獲したマガモなどカモ類、および日本各地の養鶏場で採取した鶏や遺伝的系統鶏 (B19 や B21, 日生研より分与) から常法により、ゲノム材料を採取して研究に用いた。MD の病態形成や感染防御に重要な役割を果たすと考えられている免疫関連因子、特に IFN- γ 遺伝子について、ゲノム解析を行い、各種鳥類種間での比較を行った。また IFN- γ 遺伝子の発現制御配列 (IFN- γ 遺伝子 ORF の上流約 500bp) についても同様に解析して比較を行った。次にマガンや家禽の IFN- γ 遺伝子の発現制御配列のクローニングを行い、ルシフェラーゼアッセイにより、それぞれの発現制御配列 (プロモーター) の鶏由来株化細胞における転写活性を解析・比較した。MD に対する自然抵抗性に関与すると考えられているナチュラル・キラー (NK) 細胞の機能の比較を行うために、NK 細胞レセプターについても、その発現制御配列のクローニングを行い、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を比較した。

MDV の野外における強毒化をモニタリングするために、上記鳥類種 (マガン、カモ類、鶏など) から血液あるいは羽材料を採取し、我々が樹立した MDV 分子診断法 (*meq* 遺伝子特異的 PCR 法) により、*meq* 遺伝子の検出を行い、さらに得られた遺伝子断片については、それらの塩基配列を決定して、従来報告され

ている遺伝子配列との比較を行った。

4. 研究成果

IFN γ 遺伝子プロモーター領域のヒトやマウスなどの哺乳類や鶏での塩基配列は報告されているが、マガンなどのカモ科の動物に関しては不明である。本研究ではマガン、ヒシクイにおける *IFN γ* 遺伝子プロモーター領域の転写開始点から上流 370bp、翻訳開始点から上流 498bp までの塩基配列を決定した。また、MD 感受性鶏である B19 系統鶏、MD 抵抗性鶏である B21 系統鶏、野外鶏およびマガモについても配列を決定して比較を行った。その結果、マガンとヒシクイでは塩基配列は一致した。B19 系統鶏、B21 系統鶏および野外鶏を比較したところ 1 塩基、又は 2 塩基の違いしか見られなかったが(相同性は 99.6~99.7%)、マガンと鶏を比較したところ相同性は約 85.9%であった。また、マガンとカモを比較したところ相同性は約 95.6%であった。配列に採取した地域間での差はみられなかった。

マガン、B19 系統鶏、B21 系統鶏および野外鶏の間で *IFN γ* 遺伝子プロモーターの塩基配列の多型が、その転写活性に与える影響を解析するために、まずマガン、B19 系統鶏、B21 系統鶏および野外鶏それぞれで同定した *IFN γ* 遺伝子プロモーター配列全てを組み込んだ pGL3-basic vector を DF-1 細胞に導入し、レポーターアッセイを行った。Student の *t* 検定を行ったが、*IFN γ* 遺伝子プロモーターのルシフェラーゼ活性値の比較で、B19 系統鶏、B21 系統鶏、および野外鶏の中で、マガンに対して有意差を示したものはなかった(図 1 左)。この結果から、定常状態において、プロモーターの塩基配列の多型がおよぼす *IFN γ* 遺伝子の発現量には大きな差はないと考えられた。

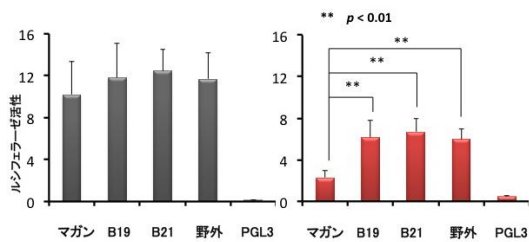


図1. マガンや鶏における*IFN γ* 遺伝子プロモーター活性の比較

次に細胞内に MDV の病原性に重要な転写因子である Meq を発現させ、*IFN γ* 遺伝子プロモーターに対する転写活性化能を評価した。マガン、B19 系統鶏、B21 系統鶏および野外鶏全てに対して Meq は、*IFN γ* 遺伝子の転写抑制に働くことが分かったが、鶏よりもマガンで、プロモーターの転写活性がより強く抑制されることが判明した(図 1 右)。また用いたプロモーター領域の 1~90bp の塩基配列の多型がこの Meq による転写抑制作用の差に関与

していることが示唆された。しかし鶏間では Meq による転写抑制能に差は見られなかった。このことは MDV の感染初期に MDV が Meq を発現させた場合、マガンでは *IFN γ* の発現量が鶏よりも抑えられる可能性を示唆している。その結果、マガンでは、MDV に対する通常の免疫応答よりも T 細胞の活性化が抑制され、MDV の標的である活性化 T 細胞の数が増えないため、活性化 T 細胞での感染率が下がり、発症に至らない可能性が推測される。またマガモとマガンの *IFN γ* プロモーター塩基配列の相同性から、マガモも Meq に対してマガンと近い反応を示す可能性が予測された。

B19 系統鶏と B21 系統鶏との間では、*IFN γ* 遺伝子プロモーターの転写活性に差が観られなかったため、抵抗性付加に関連しているとされる他の因子として *BNK* と *B-Iec* 遺伝子のプロモーターの転写活性を同様にルシフェラーゼアッセイにて比較した。その結果、両方の遺伝子で MD 抵抗性鶏である B21 系統鶏の方が、転写活性が低いことが分かった(図 2)。BNK は NK 細胞の抑制性レセプターと考えられているため、この結果から、B21 系統鶏において NK 細胞活性が B19 系統鶏よりも高いことに BNK が関与している可能性が示された。

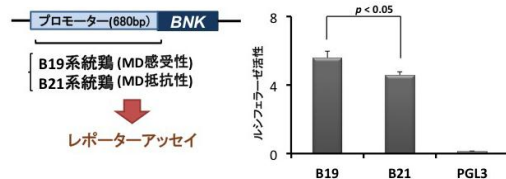


図2. MD抵抗性及び感受性鶏における*BNK*遺伝子プロモーター活性の比較

野生水禽や鶏における MDV の分子疫学調査を実施した。その結果、家禽において、従来より報告されている MDV の強毒化に伴う *meq* 遺伝子の多型が検出されたが、マガモなど野生水禽から検出された MDV では、これまで報告されている MDV 強毒株ではあったが、強毒化に伴うような遺伝子多型は検出されなかった。

今回の研究から、マガンと鶏の間における MDV に対する免疫応答の違いには *IFN γ* の転写活性化能の差が関与していること、一方、B19 系統と B21 系統鶏の間では *BNK* と *B-Iec* が関与している可能性が高いことが示された。今後、感染実験などによるより詳細な検討が必要である。さらに他にも鶏と異なる免疫機構が存在し、MD に対する免疫応答に関わっていることが考えられるため、マガンの免疫機構からの新しい防除法の開発のためにはさらなる分子機構の解明が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Murata, S., Konnai, S., & Ohashi, K. 2011. Analysis of transcriptional

- activities of the Meq proteins present in highly virulent Marek's disease virus strains, RB1B and Md5. *Virus genes* 43: 66-71. 査読有り
- ② 大橋和彦, 松原綾子, 村田史郎, 今内覚. 2011. マガンなどの野生水禽の疾病抵抗性とマレック病ウイルスの分布. *J. Vet. Med.* 64: 21-26. 査読無し
- ③ Ikebuchi, R., Konnai, S., Shirai, T., Sunden, Y., Murata, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2011. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via PD-L1 blockade. *Vet. Res.* 42: 103. 査読有り
- ④ Shirai, T., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Suzuki, S., Sunden, Y., Onuma, M., Murata, S., & Ohashi, K. 2011. Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 462-467. 査読有り
- ⑤ Mori, A., Konnai, S., Yamada, S., Hidano, A., Murase Y., Ito, T., Takano, A., Kawabata, H., Onuma, M., & Ohashi, K. 2010. Two novel Salp15-like immunosuppressant genes from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Mol. Biol.* 19: 359-365. 査読有り
- ⑥ Kano, R., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Cytokine profiles in chickens infected with virulent and avirulent Marek's disease viruses: interferon-gamma is a key factor in the protection of Marek's disease by vaccination. *Microbiol. Immunol.* 53: 224-232. 査読有り
- ⑦ Kano, R., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Microarray analysis of host immune responses to Marek's disease virus infection in vaccinated chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 603-610. 査読有り
- ⑧ Yamada, S., Konnai, S., Imamura, S., Ito, T., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxinalpha and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine* 27: 5989-5997. 査読有り
- ⑨ Mingala, C. N., Konnai, S., Cruz, L. C., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp and riverine type water buffaloes responses. *Cytokine* 46: 273-282. 査読有り
- ⑩ Imamura, S., da Silva Vaz, I. Jr., Konnai, S., Yamada, S., Najajima, C., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp. Appl. Acarol.* 48:345-358. 査読有り
- ⑪ Mingala, C. N., Konnai, S., Venturina, A., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine. *Res. Vet. Sci.* 87: 213-217. 査読有り
- ⑫ Mingala, C. N., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2009. Classification of new BVDV isolates from Philippine water buffalo using the viral E2 region *J. Basic Microbiol.* 49: 495-500. 査読有り
- ⑬ Mekata, H., Konnai, S., Witola, W.H., Inoue, N., Onuma, M., and Ohashi, K. 2009. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect. Genet. Evol.* 9: 1301-1305. 査読有り
- [学会発表] (計6件)
- ① 村田史郎、伊勢崎政美、松山あゆ美、高崎紗蘭、今内覚、大橋和彦. マレック病ウイルス強毒株由来L-Meqによる *bcl-2* 遺伝子発現調節の比較. 第152回日本獣医学会学術集会 大阪府立大学(堺)、2011年9月20日
- ② 大橋和彦、村田史郎、伊勢崎政美、今内覚. 野鳥由来感染症の分子診断法の開発および疫学調査. 第53回日本生態学会学術集会 札幌コンベンションセンター(札幌)、2011年3月8日
- ③ 松原 綾子、村田史郎、加納里佳、橋口知幸、伊勢崎政美、河東あゆ美、小沼操、今内覚、大橋和彦. マガンおよび鶏における interferon- γ 遺伝子プロモーター活性の比較解析. 第150回 日本獣医学会学術集会 帯広畜産大学(帯広)、2010年9月18日
- ④ Matsubara, A., Murata, S., Kano, R., Hashiguchi, T., Isezaki, M., Kato, A., Onuma, M., Konnai, S., & Ohashi, K. Regulation of the interferon gamma expression by an oncoprotein of Marek's disease virus in wild waterfowls and chickens. 9th International Veterinary Immunology

symposium, Tokyo, Japan. August 16-20, 2010.

- ⑤ 大橋和彦、松原綾子、村田史郎、今内覚.
マガンなどの野生水禽の疾病抵抗性とマ
レック病ウイルスの分布. 第149回 日
本獣医学会学術集会 日本獣医生命科学
大学(武蔵野)、2010年3月28日
- ⑥ 加納里佳、今内覚、小沼操、大橋和彦.
弱毒および強毒マレック病ウイルス感染
鶏における免疫応答に関する研究. 第7
回サイトカイン研究会学術集会 とりぎ
ん文化会館(鳥取)、2009年9月24日

[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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI KAZUHIKO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：90250498

(2) 研究分担者

今内 覚 (KONNAI SATORU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40396304