

機関番号：63801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710204

研究課題名 (和文) 創薬ターゲットとしてのトリインフルエンザ抵抗性分子の同定

研究課題名 (英文) Identification of the genetic factor against influenza virus infection in the chicken MHC region.

研究代表者

細道 一善 (HOSOMICHI KAZUYOSHI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：50420948

研究成果の概要 (和文)：ニワトリ MHC 領域はトリインフルエンザ抵抗性との関連性から抵抗性を規定する遺伝子が存在する可能性が考えられる。本研究では感受性 MHC ハプロタイプ B13 と抵抗性 B21 の MHC 領域 220kb のリシークエンスを行い、両ハプロタイプ間の多様性を明らかにすることでトリインフルエンザ抵抗性遺伝子を同定、その機能を明らかにすることを目的とした。MHC 領域に含まれるアミノ酸変異を伴う非同義置換の SNP を検索したところ、17 遺伝子がトリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子の候補として絞り込まれた。これらのうち、機能的ドメインとしてのアミノ酸変異を精査したところ、TRIM27.2 の SPRY ドメインにおいて 3 ヶ所のアミノ酸置換が認められた。

研究成果の概要 (英文)：The chicken MHC (MHC-B) is one of the research interests because of the strong associations with avian influenza virus infection identified in particular MHC-B haplotypes. Because sequence data of MHC-B haplotypes have been lacking, efforts to systematically resolve which genes within the MHC-B region contribute to well-defined MHC-B-associated disease responses was hampering. To identify the genetic factor against influenza virus infection in the MHC-B region, we determined the complete genomic sequence of 2 MHC-B haplotypes across a region of 220 kb encompassing 34 gene loci ranging from KIFC1 to C4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ニワトリ、MHC、ゲノム、多様性、SNP、トリインフルエンザ

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症を治療し、健康状態を取り戻すために必要なことは、単純にウイルス分

子を排除することである。有効な抗ウイルス剤が存在する場合を除き、これらの排除は基本的に本来備わっている免疫系の働きによる

ものであるため、これを補助する治療法が有効である。しかしながら、感染に対する抵抗力、症状の個人差が存在することに加え、ウイルスによっては根本的な治療法が確立されていないものも多く存在する。そのウイルス感染および発症を抑える機能をもつタンパク質を同定することは将来的にゲノム創薬としての応用が期待できる。

近年感染報告が増大しているトリインフルエンザ(強病原性H5N1型)はヒトに直接感染する可能性は低い、変異することにより新型ヒトインフルエンザとして世界的な大流行(パンデミック)が起こる可能性も考えられ、根本的な治療法も確立されていないことから、新たな治療法を見出す必要がある重要な感染症の一つである。現在、トリインフルエンザによる被害の多くは産業として飼育されているニワトリにおけるものであるが、そのMHCハプロタイプとの関連が報告されている。すなわち、強病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスに感染したニワトリのうち、*B13*ハプロタイプのホモおよびヘテロ接合体200個体の生存率は約1%であったのに対し、*B21*ハプロタイプのホモおよびヘテロ接合体300個体における生存率は約98%であり(Kalaya *et al*, 2006)、生存率とMHCハプロタイプとの関連は極めて強い。よってMHC領域にトリインフルエンザウイルス抵抗性の主働遺伝子が存在すると考えられる。

トリインフルエンザ以外にもニワトリMHCは1970年代より、マレック病、ラウス肉腫、家禽コレラなどの疾病に対する抵抗性と関連することが報告されている。しかし、ニワトリMHC領域のゲノム構造は1999年にすでに解読されているにもかかわらず、それらの報告から30年以上経った現在においても未だこれらの原因遺伝子は同定されていない。これはニワトリのMHC領域がかなり

広範囲に強い連鎖不平衡をもつという特徴に起因する。過去においては強い連鎖不平衡のため、交配による組換え個体の作出が困難であったこと、また、ニワトリのゲノム配列が決定された現在においては、この領域の多型情報が極めて不足していることが、領域全体が候補領域でありながら、そこに含まれる遺伝子から責任遺伝子を絞り込むことが不可能である理由と考えられる。実際、公共のデータベースであるNCBIのdbSNPに登録されているニワトリ全ゲノムの一塩基多型(SNP)数は3,281,766個であるが、MHC領域が位置する第16番染色体におけるその数は塩基配列決定の難しさもあり、1,294個とかなり少ない。

よってトリインフルエンザ抵抗性遺伝子の同定のためにはニワトリMHC領域におけるSNPならびに挿入欠失(Insertion deletion: Indel)の多型情報を整理し、関連解析に用いるマーカーの開発が必要である。申請者はこれまでにトリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子の同定を目標として、関連するMHC領域の主要な領域(59kb)の多型性を明らかにし、関連解析に用いるSNPマーカーを開発した。さらにこのSNPマーカーによる原因遺伝子同定システムの評価として、MHC連鎖疾患であるマレック病の原因遺伝子を検索し、その絞り込みに成功した(Hosomichi *et al*, 2008)。よって、解析領域を広げ、これを発展させた関連解析でトリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子を同定できる可能性は高い。

インフルエンザウイルス抵抗性遺伝子産物を薬物にするには、抵抗性分子そのものを投与することで可能と考えられる。しかし、その多くのタンパク質は胃や血液中で分解されるため治療薬として実用化するには、非タンパク低分子で、そのタンパク質と同じ働きをする化合物の作出が必要である。

本研究計画の成果からインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子が同定され、機能が解明されれば、タンパク質の機能とネットワークに対応する形で、理論的に目指す化合物のデザインが可能になるものと考えられ、これが実現すれば国際競争力のある優れた医薬品の開発が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究ではニワトリ MHC 領域のリシーケンスと関連解析により、これまでの知見の中で最も関連性が強いニワトリ MHC 領域に存在するトリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子を同定し、その機能および遺伝子ネットワークを明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究ではこれまでの知見の中で最も関連性が強いニワトリ MHC 領域に存在するトリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子を同定し、その機能予測を行った。

(1)ニワトリ MHC 領域のリシーケンスによる多型情報の整理ならびに SNP マーカーの開発

トリインフルエンザ抵抗性(B21)および感受性(B13およびB12)MHCハプロタイプのニワトリを含む14ハプロタイプのMHC領域のゲノム配列を決定した。配列決定のためのゲノムDNAはBeckman Research Institute、広島大学、名古屋大学鳥類バイオサイエンス研究センターからすでに提供を受け、その主要部分(59kb)については決定済みである(Hosomichi *et al*, 2008)。連鎖不平衡から推定されるMHC領域のハプロタイプブロックは前述の主要部分を含む200kbと予想しており、この領域に抵抗性遺伝子が存在していると考えられる。

塩基配列はロング PCR 法およびそのダイレクトシーケンス法にて決定する。すなわち、約 10kb を増幅し、隣り合うロング PCR

産物同士がそれぞれ 1kb オーバーラップし、目的領域をカバーするようにプライマーを設計した。KOD FX (TOYOBO)にてロング PCR 反応し、得られた増幅産物の塩基配列を 3130XL(ABI)にて決定した。得られた各ハプロタイプの塩基配列を ClustalW によりアライメントし、SNP を検出した。

(2)トリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子の同定

申請者はこれまで独自にニワトリ MHC 領域の SNP データベースを開発している。このデータベースにリシーケンスにより得られた SNP を加え、トリインフルエンザウイルス抵抗性候補 SNP を連鎖不平衡およびハプロタイプブロックを考慮して選択し(tagSNP)、これら tagSNP のタイピングを行った。

(3)トリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子の遺伝子オントロジーの解析

トリインフルエンザウイルス抵抗性遺伝子ならびに相互作用する遺伝子を BioGRID データベース(<http://www.thebiogrid.org/>)より検索し、ニワトリおよびヒトにおけるこれらの遺伝子ネットワークを検索した。

## 4. 研究成果

B13 および B21 の KIGC1~C4 遺伝子までの約 160kb の塩基配列を決定し、比較したところ、TRIM7.2 または LAO 遺伝子に過去に起きた組換え点が存在し、MHC ハプロタイプの遺伝的連鎖領域は少なくとも LAO~C4 遺伝子までの約 130kb に絞り込まれることを明らかにした。さらに、B13 と B21 間で比較し、この領域に含まれるアミノ酸変異を伴う非同義置換の SNP を検索したところ、LAO、TRIM7.1、TRIM39.2、TRIM27.2、TRIM39.1、TRIM27.1、GNB2L1、BTN1、B1ec2、TAPBP、BLB2、DMB1、DMB2、BF1、TAP1、TAP2 および BF2 の 17 遺伝子がトリインフルエン

ザウイルス抵抗性遺伝子の候補として絞り込まれた。これらのうち、機能的ドメインとしてのアミノ酸変異を精査したところ、TRIM27.2のSPRYドメインにおいて3ヶ所のアミノ酸置換が認められた。これらの変異はタンパク質の二次構造の $\alpha$ ヘリックスおよび $\beta$ シートを破壊する傾向があること、霊長類においてTRIM遺伝子の一つであるTRIM5 $\alpha$ はHIVウイルス感染と関連が報告されていることから、TRIM27.2のSPRYドメインはウイルス感染との関連する可能性が考えられた。

#### 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)

[雑誌論文] (計12件)

1. Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, Oka A, Suzuki Y, Homma Y, Sato S, Inoue I, Inoko H. Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A\*24:02: the same deletion observed in other A\*24 alleles and A\*23:01 allele. **Immunogenetics**. *In press*. 2011. 査読有
2. Shiina T, Kono A, Westphal N, Suzuki S, Hosomichi K, Kita YF, Roos C, Inoko H, Walter L. Comparative genome analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I B/C segments in primates elucidated by genomic sequencing in common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Immunogenetics**. *In press*. 2011. 査読有
3. Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shiota T, Tomoyasu Y, Maki K, Inoue I. Exome Resequencing Combined with Linkage Analysis Identifies Novel PTH1R Variants in Primary Failure of Tooth Eruption in Japanese. **J Bone Miner Res**. *In press*. 2011. 査読有
4. Ohta Y, Shiina T, Lohr RL, Hosomichi K, Pollin TI, Heist EJ, Suzuki S, Inoko H, Flajnik MF. Primordial Linkage of b2-Microglobulin to the MHC. **J Immunol**. 186(6):3563-71. 2011. 査読有
5. 細道一善, 井ノ上逸朗、全エクソンシーケンスによる希少疾患の原因遺伝子同定, **医学のあゆみ**, 236(6):565-570, 2011. 査読無
6. Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B\*51 and -A\*26. **Biochem Biophys Res Commun**. 401(4):533-7. 2010. 査読有
7. Nagahori K, Iwamoto S, Maruyama A, Suzuki S, Hosomichi K, Shiina T, Hara H, Yoshida Y, Hanzawa K. Basic characterization of 90 kDa heat shock protein genes HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1 and TRAP1 expressed in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Anim Sci J**. 81(4):513-8. 2010. 査読有
8. Cui TL, Nakaoka H, Akiyama K, Kamura H, Hosomichi K, Bae J, Cheong H, Shin H, Yada T, Inoue I. Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays. **Genet Mol Res**. 9(1):524-31. 2010. 査読有
9. 細道一善, 椎名隆、井ノ上逸朗、猪子英俊、次世代シーケンサーによるHLA領域のターゲットリシーケンス, **医学のあゆみ**, 233(13):1187-1191, 2010. 査読無
10. Goto RM, Wang Y, Taylor RL Jr, Wakenell PS, Hosomichi K, Shiina T, Blackmore CS, Briles WE, Miller MM. BG1 has a major role in MHC-linked resistance to malignant

lymphoma in the chicken. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 106:16740-5. 2009. 査読有

11. Kita YF, Hosomichi K, Kohara S, Itoh Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Torii R, Inoko H, Blancher A, Kulski JK, Shiina T. MHC class I A loci polymorphism and diversity in three Southeast Asian populations of cynomolgus macaque. **Immunogenetics.** 61(9):635-48. 2009. 査読有

12. Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Hosomichi K, Yawata M, Inoko H. HLA-A allele associations with viral MER9-LTR nucleotide sequences at two distinct loci within the MHC alpha block. **Immunogenetics.** 61(4):257-70. 2009. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. Hosomichi K, Shiina T, Genome sequencing of the major histocompatibility complex regions : comparative genomics from shark to man and re-sequencing of the entire HLA region., Beckman Research Institute Seminar Series, January 18, 2011, City of Hope Medical Center, Los Angeles, California

2. Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Suzuki S, Inoko H, Inoue I, Shiina T, Application of targeted resequencing methods to the MHC regions on chicken chromosome 16 (GGA16)., Plant & Animal Genome XIX Conference, January 15 - 19, 2011, Town & Country Convention Center, San Diego, California

3. Hosomichi K, Shiina T, Wang T, Suzuki S, Inoko H, InoueI, Re-sequencing of the entire HLA region for informative polymorphism detection and haplotype map construction, 60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (ASHG), November 2-6, 2010, Washington, DC

4. 細道一善, 椎名隆, 王婷, 鈴木進悟, 田平知子, 林健志, 猪子英俊, 井ノ上逸朗, 医学・医療への応用を目的としたHLA領域のリシーケンシング, 日本人類遺伝学会第55回大会, 2010年10月28-30日, 大宮ソニックシティーホール

5. 細道一善, 成田暁, 椎名隆, 猪子英俊, 井ノ上逸朗, 疾患ゲノム解明に向けた全エクソンおよびHLA領域ターゲットリシーケンス, 日本人類遺伝学会第55回大会 シンポジウム, 2010年10月28-30日, 大宮ソニックシティーホール

6. 細道一善, 椎名隆, 井ノ上逸朗, 猪子英俊, 次世代シーケンサーによるHLAハプロタイプのリシーケンス, 第19回 日本組織適合性学会大会 シンポジウム, 2010年9月17-19日, 東京大学 本郷キャンパス

7. Hosomichi K, Shiina T, Wang T, Suzuki S, Inoko H, InoueI, Re-sequencing of the human MHC region toward to biomedical application for various animal genomes, 9th IVIS International Veterinary Immunology Symposium, August 16-20, 2010, Tower Holl Funabori, Edogawa-ku, Tokyo

8. Hosomichi K, Shiina T, Wang T, Suzuki S, Inoko H, InoueI, Resequencing of the entire major histocompatibility complex regions to identify haplotype structure, 日本進化学会 2010年大会 国際ワークショップ, 2010年8月2日-5日, 東京工業大学 大岡山キャンパス

9. 細道一善, 椎名隆, 王婷, 河田寿子, 猪子英俊, 井ノ上逸朗, HLA領域のパーソナルゲノム解析法の開発, 日本人類遺伝学会 第54回大会, 2009年9月25日, グランドプリンスホテル高輪

10. 細道一善、猪子英俊、河田寿子、井ノ上逸朗、椎名隆, HLA領域のパーソナルゲノム解析法の開発, 第18回日本組織適合性学会大会, 2009年9月26日, 名古屋国際会議場
11. Hosomichi K, Shiina T, Wang T, Kawata H, Inoko H, Inoue I, Development of personal genome analysis method on the entire HLA region, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜
12. 細道一善, HLA領域のパーソナルゲノム解析法の開発と疾患関連解析への応用, 第4回バイオインフォマティクス研究者と医学研究者の交流会, 2009年11月20日, 東京大学柏キャンパス

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/inoue/inoue-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細道 一善 (HOSOMICHI KAZUYOSHI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教  
研究者番号：50420948