

博士論文

鳥類の宿主免疫応答機構の解析

(要約)

令和4年3月

広島大学大学院統合生命科学研究科

食品生命科学プログラム/

ゲノム編集先端人材育成プログラム

市川健之助

ゲノム編集技術の台頭により、近年、生命科学は目覚ましく発展している。我々の主要なタンパク源であるニワトリにおいても、基礎・応用研究の双方において、本技術は積極的に活用されている。いわば現代は鳥類の遺伝子改変の黎明期である。

家禽を高効率に生産する上で、ウイルス性疾病の制圧は必要不可欠である。特に高病原性鳥インフルエンザウイルス (highly pathogenic avian influenza virus; HPAIV) は、ニワトリに対して極めて高い致死性を示す他、人獣共通感染症の要因としても重要なウイルスである。我が国では、HPAIV に感染した家禽が確認された際に、その発生源の家禽全てに対して殺処分が敢行されている。そのため、HPAIV の蔓延は養鶏業界に極めて重大な経済的損失をもたらす。したがって、ゲノム編集技術により、抗 HPAIV 耐性もしくは無感染・無排出を獲得した遺伝子改変ニワトリの作出は、極めて産業的価値の高い課題である。

本遺伝子改変ニワトリを作出するためには、まず、ニワトリの宿主免疫応答機構に関する基礎的な知見が求められる。そこで本研究では当該機構に着目した以下の解析を行なった。

研究 1: ニワトリ内在性プロモーターを利用した duck RIG-I の発現系の確立

序論

マガモ等の水禽類は、AIV の自然宿主であり、一般に AIV に対して高い抵抗性を有する。一方、AIV は時にニワトリに対して重篤な病原性を示す。この AIV に対する病原性の差異は、ニワトリが進化的に欠損しているパターン認識受容体、Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) の有無に起因することが、これまでの研究により示唆されている。そこで本研究では、アヒルから単離された duck RIG-I をニワトリにおいて免疫応答依存的に機能させる発現系の確立を試みた。具体的には、免疫応答因子の一種である *Mx* の 3' 領域に、T2A 配列を付与した *duck RIG-I* を、precise integration into target chromosome (PITCh) システムを介して knock in したのち、本発現系の有効性を評価した。

材料及び方法

(1) *duck RIG-I* knock in DF-1 細胞の樹立

5' 末端に T2A 配列を付与した *duck RIG-I* を有するドナーベクター、および *Mx* とドナーベクターをそれぞれ標的にした 2 種類の gRNA ベクターの計 3 種を DF-1 細胞に共導入した。薬剤選択ののち、限界希釈法により DF-1 細胞をクローニングし、各クローンの遺伝子型を評価した。

(2) 導入した *duck RIG-I* の発現解析

Mx プロモーターの制御下にある *duck RIG-I* の発現パターンを明らかにするため、12-well plate に播種した DF-1 細胞に対して刺激試験を行なった。本試験では、poly (I:C)、及び IFN-β をリガン ドとして使用し、RT-qPCR により *duck RIG-I* の発現量を定量した。

(3) *duck RIG-I* の機能解析

12-well plate に播種した DF-1 細胞に対して、poly (I:C) を用いた刺激試験を行なったのち、宿主 免疫応答関連因子の発現量を、野生型 (WT) – knock in DF-1 間で比較することにより、導入し た *duck RIG-I* の機能を評価した。本解析では、*IFN-β*、*OASL*、*IRF7* を標的とし、RT-qPCR により当 該因子の発現量を定量した。

結果と考察

(1) *duck RIG-I* knock in DF-1 細胞の樹立

ホモ、ならびにヘテロ接合型の *duck RIG-I* knock in DF-1 細胞がそれぞれ得られた。挿入部位 を標的にしたシーケンス解析により、両接合型の DF-1 細胞は共に適切に *duck RIG-I* が挿入さ れていることが確認された。

(2) 導入した *duck RIG-I* の発現解析

duck RIG-I は IFN-β の濃度依存的に発現が上昇することが明らかになった。加えて、ホモ接合 型の DF-1 細胞はヘテロ接合型と比較して、約 2 倍量の *duck RIG-I* を発現したことから、遺伝子 型と一致した発現パターンが確認された。また、poly (I:C) を使用した発現解析においても、濃 度、ならびに遺伝子型依存的な *duck RIG-I* の発現上昇が見られた

(3) *duck RIG-I* の機能解析

knock in DF-1 細胞は WT と比べて、各種宿主免疫応答因子の発現量が有意に上昇することが 明らかになった。加えて、poly (I:C) 未刺激下では、WT と knock in DF-1 細胞間で各因子の発現 量に差異が見られなかったことから、導入した *duck RIG-I* は宿主免疫応答依存的に機能するこ とが示唆された。

研究 2: HPAIV 応答におけるニワトリ MDA5, LGP2 の機能解析

序論

RIG-I の欠損下にあるニワトリでは、内在性の RIG-I-like receptors (RLRs) である MDA5 およ び LGP2 の抗 AIV 応答における機能が注目されている。しかし、これまでの先行研究では、特に HPAIV 感染下における当該因子の機能は明らかになっていない。そこで、本研究では、clustered

regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) システムにより, MDA5, ならびに LGP2 を knock out (KO)した DF-1 細胞をそれぞれ樹立したのち, 本細胞を用いた機能解析を行なった.

材料及び方法

(1) MDA5 及び LGP2 を KO した DF-1 細胞の樹立

MDA5, LGP2 を標的ににした gRNA ベクターをそれぞれ作成し, CRISPR/Cas システムにより, 当該因子の KO を行なった.

(2) poly (I:C) を用いた刺激試験

本研究では, 短鎖 poly (I:C) (Low molecular weight; LMW, 平均の長さ; 0.2-1 kb), および長鎖 poly (I:C) (High molecular weight; HMW, 平均の長さ; 1.5-8 kb)を用いて, 12-well plate に播種した DF-1 細胞に対し刺激試験を行なった. その後, RT-qPCR により, 宿主免疫応答関連因子の発現解析を行なった.

(3) 感染実験

4 種の H5 亜型 HPAIV 株, Ck/Niigata, MusDK/Aomori, DK/Hyogo, Ck/Takeo を用いて感染実験を行なった. ここでは, MOI=1.2 に調整した各 HPAIV 株を 12-well plate に播種した DF-1 細胞に感染させた. 感染 6, 18 時間後に上清と細胞それぞれを回収した. 上清は感染価の測定に, 回収した細胞は *IFN-β* の発現解析にそれぞれ供試した.

結果と考察

(1) MDA5 及び LGP2 を KO した DF-1 細胞の樹立

各遺伝子のホモ KO (Δ) DF-1 細胞 (Δ MDA5 DF-1 細胞, および Δ LGP2 DF-1 細胞) がそれぞれ得られた.

(2) poly (I:C) を用いた刺激試験

WT DF-1 細胞と比較して, Δ MDA5, Δ LGP2 DF-1 細胞では, LMW および HMW 刺激下における *IFN-β* と *IRF7* の発現量が有意に抑制されることが明らかになった. このことから, MDA5, および LGP2 の KO 細胞は, 各因子が機能的に破壊されていることが明らかになった.

(3) 感染実験

感染 6 時間後では, MusDK/Aomori および Ck/Takeo において, KO DF-1 細胞において感染価が上昇した. また, DK/Hyogo においても感染価の上昇傾向が見られたが, 有意差は認められなかった. 感染 18 時間後にはその傾向が顕著になり, DK/Hyogo の感染下にある Δ MDA5 DF-1 細

胞を除き、全ての HPAIV 株において、KO DF-1 細胞における感染価の有意な上昇、あるいは上昇傾向が見られた。一方、感染 18 時間における *IFN-β* の発現量は、Ck/Takeo の感染下で、各 KO DF-1 細胞において有意に減少することが明らかになった。また、Ck/Niigata, DK/Hyogo においても、KO DF-1 細胞における *IFN-β* 発現の減少傾向が確認されたが、有意差は認められなかった。これらの結果から、HPAIV の感染下において、MDA5, LGP2 とともに、少なくとも感染価の抑制と IFN の発現応答に寄与することが示唆された。

総括

本研究では、パターン認識受容体である RIG-I, MDA5, LGP2 に着目し、特に感染初期における AIV に対する鳥類の宿主免疫応答機構の解明に着手した。本研究で得られた知見を基盤としながら、さらに研究を発展させることで、将来的に家禽のウイルス性疾患の制圧が達成されることを確信している。