

氏名	しん かい ひろ き 新 開 浩 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2587 号
学位授与の日付	平 成 18 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ブタにおける免疫細胞の局在と活性化に関わる遺伝子群の解析

論文調査委員 (主査) 教授 佐々木義之 教授 矢野秀雄 教授 久米新一

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、肺炎等の日和見感染症が養豚業において大きな問題となっており、抗病性を指標とした育種が求められている。ヒトで病原体の細胞膜、細胞壁および菌体外側面に由来する様々な構成成分を認識する Toll 様受容体 (*TLR*) 遺伝子群は、ブタにおいても同様の機能をもつことが予想され、抗病性の指標となる有望な候補遺伝子である。また、その発現パターンにより、白血球の種類や状態の分類が可能なケモカイン受容体 (*CCR*) 遺伝子群は、細菌やウイルス等に対する感染状態の診断および特定の白血球集団の機能解析を行うためのツールとして非常に重要である。本研究では、ブタにおけるこれらの遺伝子群の分子生物学的解析を行った。得られた成果の概要は以下の通りである。

- 1) *CCR* 遺伝子群の一つである *CCR7* (chemokine (C-C motif) receptor 7) は、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役として、特に重要である。ブタ *CCR7* 遺伝子の塩基配列と、そのゲノム構造および染色体上の位置を決定し、これらがヒトやマウスとの間で高度に保存されていることを明らかにした。また、ブタ末梢血単核球に対して Th1 (Type 1 T helper cells) 細胞への分化誘導を行ったところ、*CCR7* 遺伝子の発現量は大きく減少したことから、白血球の二次リンパ組織への移動および局在を制御する機能は、ブタにおいても保存されているものと推察された。
- 2) ブタ第13染色体 q21 上の *CCR* 遺伝子クラスター領域、516,013bp の塩基配列を完全解読し、この領域に、*CCR9*, *CXCR6* (chemokine (C-X-C motif) receptor 6), *XCR1* (chemokine (C motif) receptor 1), *CCR1*, *CCR3*, *CCR2*, *CCR5* および *CCRL2* (chemokine (C-C motif) receptor-like 2) の8種類の *CCR* 遺伝子が含まれていることを明らかにした。この領域の全体的なゲノム構造および染色体上の位置はヒトやマウスとの間で保存されていたが、個々の *CCR* 遺伝子の転写産物にはいくつかの相違が見られた。特に、ブタ *XCR1* および *CCR1* 遺伝子は、遺伝子間スプライシングによりエクソンを共有しており、これがブタ特有の現象であることを明らかにした。
- 3) *TLR* 遺伝子群のうち、既にクローニングされている *TLR2* (Toll-like receptor 2) および *TLR6* 遺伝子を除く、*TLR1*, *TLR4* および *TLR5* 遺伝子の塩基配列を決定した。また、マウスにおいてはクローニングされていない *TLR10* 遺伝子が、ヒトと同様に、ブタにも存在することを明らかにし、その塩基配列を決定した。さらに、これらの遺伝子のブタ臓器における発現を確認した。
- 4) ブタ *TLR1*, *TLR6* および *TLR10* 遺伝子が含まれる、173,804bp のゲノム領域を完全解読し、その構造がヒトとの間で高度に保存されていることを明らかにした。また、系統樹解析により、*TLR1*, *TLR6* および *TLR10* の間で、細胞外領域がそれぞれ異なる病原体の構成成分を認識すること、*TLR10* のシグナル伝達経路は *TLR1* および *TLR6* とは異なっていることが示唆された。さらに、この領域内に6個のマイクロサテライトマーカーを開発した。これは、将来、感染症と *TLR* 遺伝子群との関連を検討する際に有用となることを予測した。
- 5) *TLR* 遺伝子の多型について、11品種96頭のブタ DNA を用いて、*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* および *TLR6* 遺伝子における網羅的な塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) 検索を行い、それぞれ21, 11, 7, 13 および11個のアミノ酸置換を伴う SNP を検出した。この中にはアミノ酸の性質を大きく変化させるもの、西洋豚/東

西洋豚間でアレル頻度に偏りがあるものなど、機能に影響を与える可能性のあるものが多数存在していた。

### 論文審査の結果の要旨

ブタの生産現場においては、近年、肺炎等の日和見感染症が大きな問題となっており、抗病性を指標とした育種法の開発が期待されている。ヒトで病原体の細胞膜、細胞壁および菌体外側面に由来する様々な構成成分を認識する *TLR* 遺伝子群は、ブタにおいても同様の機能をもつことが予想され、抗病性の指標となる有望な候補遺伝子である。また、その発現パターンにより、白血球の種類や状態の分類が可能な *CCR* 遺伝子群は、細菌やウイルス等に対する感染状態の診断および特定の白血球集団の機能解析を行うためのツールとして非常に重要である。本研究では、抗病性育種のための基礎的知見を得る目的で、ブタにおけるこれらの遺伝子群の分子生物学的解析を行っている。得られた主要な成果は以下の通りである。

- 1) ブタ *CCR7* 遺伝子の塩基配列と、そのゲノム構造および染色体上の位置を決定し、これらがヒトやマウスとの間で高度に保存されていることを明らかにしている。また、*CCR7* 遺伝子の白血球の二次リンパ組織への移動および局在を制御する *CCR7* 遺伝子機能は、ブタにおいても保存されていることを示唆している。
- 2) ブタ第13染色体 q21 上の *CCR* 遺伝子クラスター領域、516,013bp の塩基配列を完全解読し、この領域に、*CCR9*, *CXCR6*, *XCR1*, *CCR1*, *CCR3*, *CCR2*, *CCR5* および *CCRL2* の8種類の *CCR* 遺伝子が含まれていることを明らかにしている。この領域の全体的なゲノム構造および染色体上の位置はヒトやマウスとの間で保存されていたが、ブタ *XCR1* および *CCR1* 遺伝子は、遺伝子間スプライシングによりエキソンを共有しており、これがブタ特有の現象であることを明らかにしている。
- 3) *TLR1*, *TLR4* および *TLR5* 遺伝子の塩基配列を決定し、マウスにおいてはクローニングされていない *TLR10* 遺伝子が、ヒトと同様に、ブタにも存在することを明らかにしている。
- 4) ブタ *TLR1*, *TLR6* および *TLR10* 遺伝子が含まれる、173,804bp のゲノム領域を完全解読し、その構造がヒトとの間で高度に保存されていることを明らかにしている。
- 5) *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* および *TLR6* 遺伝子における網羅的な SNP 検索を行い、それぞれ21, 11, 7, 13および11個のアミノ酸置換を伴う SNP を検出した。この中にはアミノ酸の性質を大きく変化させるもの、西洋豚／東洋豚間でアレル頻度に偏りがあるものなど、機能に影響を与える可能性のあるものが多数存在することを明らかにしている。

以上のように、ブタにおける *CCR* 遺伝子群および *TLR* 遺伝子群の遺伝子をクローニングし、それらの塩基配列構造を明らかにし、さらに *TLR* 遺伝子群に関しては、機能に影響を与える可能性のある多型を多数検出している。これらの知見は、これまで主に肉質および繁殖性を指標として改良されてきたブタにおいて、新たに抗病性を指標とした育種の可能性を示唆するものであり、動物遺伝学、家畜育種学並びに豚育種に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年12月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。