

佐賀大学農学部 応用生物科学科

【2回目】 14:30～15:30
(講義名) 病気に強い豚を作るために
～免疫関連遺伝子の研究～
(講師) 和田 康彦 教授



オープンキャンパスに、ようこそ！

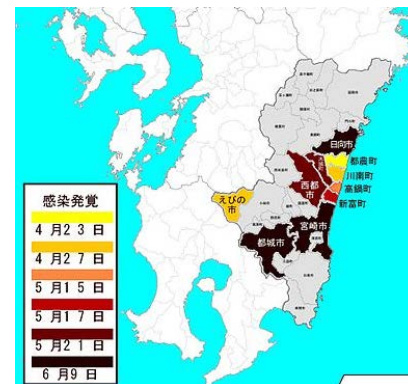
猛威をふるう家畜伝染病

2010年4月20日宮崎県は都農町の和牛3頭の口蹄疫感染の疑いを公表
7月4日までに292例の口蹄疫感染を確認

最終的に28万8643頭を殺処分

宮崎県内の牛の22%、豚の24%

**畜産関連の損失は1400億円
関連損失950億円**



アジアでの流行が収まらない口蹄疫

2011年2月 日本は口蹄疫 清浄国に復帰

平成26年7月23日午前、韓国慶尚北道の養豚場において、口蹄疫(血清型O型)が発生

2014年7月28日13時00分現在

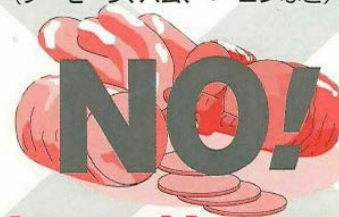
韓国における口蹄疫の発生状況
(2014年7月23日～、O型)



韓国へ旅行される皆様へ

家畜の悪性伝染病(口蹄疫)
が発生しています。

韓国からの生肉、肉製品
(ソーセージ、ハム、ベーコンなど)の



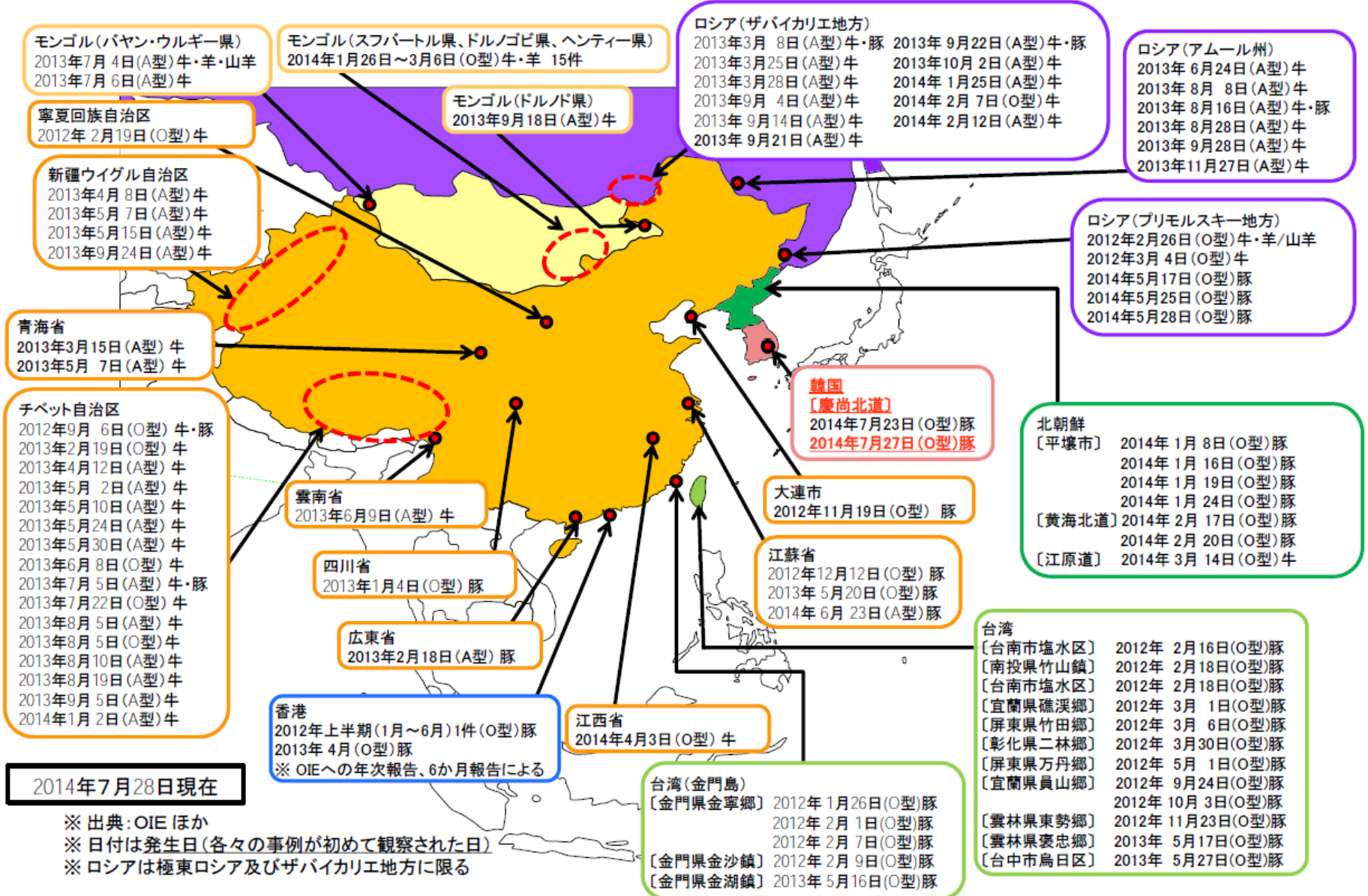
日本への持ちこみは、
禁止されています。

免税店 でお買い求めになったものでも
日本へ持っはいることができません。

お願い!

韓国において家畜を飼養している農場などへの立ち入りは避けてください。やむを得ず農場などの家畜関連施設へ立ち入られた方は、日本到着時に必ず動物検疫カウンターにお申し出ください。皆様のご協力をお願い致します。

中国、香港、台湾、韓国、北朝鮮、モンゴル、ロシアにおける口蹄疫の発生状況（2012年1月以降の発生）

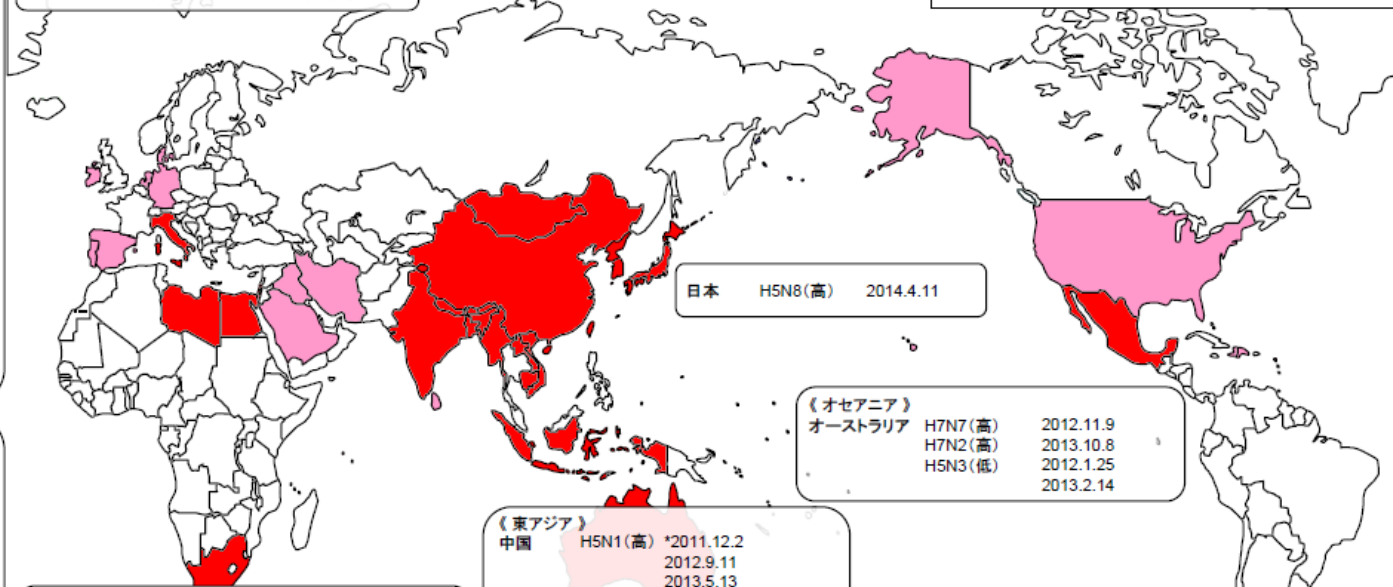


家きんの高病原性・低病原性鳥インフルエンザの発生状況(2012年以降)

高病原性発生地域 = ■
低病原性発生地域 = ■

※1 地図上の配色は家きんについて
※2 ()は病原性
※3 高病原性・低病原性併発地域は高病原性と表記

《ロシア・NIS諸国》
ロシア (高) (2012下期 野鳥のみ)



日本 H5N8(高) 2014.4.11

《オセアニア》
オーストラリア H7N7(高) 2012.11.9
H7N2(高) 2013.10.8
H5N3(低) 2012.1.25
2013.2.14

《東アジア》
中国 H5N1(高) *2011.12.2
2012.9.11
2013.5.13
2013.12.27
H5N2(高) 2013.12.21
H5N6(低) 2014.4.23
H7N9(低) 2013.4.4
香港 H5N1(高) *2011.12.17
(2013.1.25 野鳥のみ)
H7N9(低) 2014.1.27
台湾 H5N2(高) 2012.2.7
2012.11.17
2014.4.15
H5N1(高) 2012.7.7
H5N2(低) *2011.11.25
2012.11.12
2014.4.21
H5N3(低) 2013.7.3
韓国 H5N8(高) 2014.1.16
北朝鮮 H5N1(高) 2013.4.19
2014.3.21
モンゴル (高) (2012上期 野鳥のみ)

《南北アメリカ》
米国
ニューヨーク州 H5(低) 2012.1.20
2013.1.2
サウスダコタ州 H5N2(低) 2012.1.30
ペンシルバニア州 H5(低) 2013.2.1
H7N2(低) 2013.10.22
アーカンソー州 H7N7(低) 2013.6.6
ニュージャージー州 H5(低) 2014.2.11
デラウェア州 H7(低) 2014.4.2
カリフォルニア州 H5N8** (低) 2014.4.14
メキシコ H7N3(高) 2012.6.13
2013.1.3
H7N3(低) 2014.2.13
コアウイラ州(含14州) H5N2(低) 2012.1月、3-6月、8月、2013.1-6月
ドミニカ共和国 (低) 2012上・下期、2013上期
ハイチ共和国 (低) 2012上・下期、2013上期

《西アジア》
イラク (低) 2012.1-5月、7-12月、2013.1-6月
イスラエル H5N1(高) 2012.3.7
H5(高) (2012.3.13 猫)
パレスチナ (低) 2012.1月、5月、6月
サウジアラビア (低) 2012下期

《東南アジア》
ベトナム H5N1(高) *2006.12.6
2013.10.7
H7(低) 2013.1.15
ラオス H5N6(高) 2014.3.13
インドネシア H5N1(高) 継続発生中
カンボジア H5N1(高) 2012.5.27
2013.1.9
2013.8.12
2014.2.7
ミャンマー H5N1(高) 2012.2.20

《ヨーロッパ》
イタリア H7N7(高) 2013.8.10
H5(低) 2012上・下期、2013上期
H5N2, H7(低) 2012上・下期
H7N2(低) 2012上期
(低) 2012下期
オランダ H5N2(低) 2012.3.17
2014.3.12
H7N7(低) 2012.8.9
2013.3.11
2013.3.15
2013.5.31
2013.7.31
H5N3(低) 2013.11.27
H5N1(低) 2014.2.26
H5(低) 2012.12.18
ドイツ H7N7(低) 2013.11.13
2013.5.15
H5N3(低) 2013.12.2
H5N1(低) 2014.3.9
H5N2(低) 2012.3.17
H7(高) (2012.12.14 野鳥のみ)
デンマーク H7N7(低) 2013.5.31
H7N1(低) 2013.5.9
スペイン H7
ポルトガル H7

《アフリカ》
エジプト H5N1(高) 継続発生中
南アフリカ H5N2(高) *2011.2.1
H5N2(低) 2012.1.13
2012.6.1
H7N1(低) 2012.2.24
2013.10.20
H7N7(低) 2013.2.28
H7(低) 2013.7.30
サント・プリンス* (低) 2012上・下期
リビア H5N1(高) 2014.3.4

《南アジア》
インド H5N1(高) (*2011.10.30 野鳥のみ)
2012.1.3
2012.10.12
2013.2.27
2013.7.30
(2014.1.31 野鳥のみ)
パキスタン H5N1(高) *2007.2.5
イラン (低) 2012上・下期、2013上期
ネパール H5N1(高) *2011.11.10
2012.8.27
2014.2.13
(低) 2012上・下期、2013上期
ブータン H5N1(高) *2011.12.30
スリランカ H5N2(低) 2012.1.20

※1 更新点: 台湾における低病原性鳥インフルエンザ(H5N2)の発生
※2 本図は発生の有無を示したもので、その後の清浄性確認については記載していない
※3 日付は発生日または検体回収日に基づく

※4 *は初発が2011年以前であるが2012年以降も発生のあるものを示す
※5 **は日本で発生した高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N8)とは、遺伝的に異なる系統であると考えられる。
出典: OIE WAHID 及び FAO等

2014年5月19日現在

口蹄疫発生のお知らせ!!

現在中国、ロシア、モンゴル、台湾などにおいて
動物の悪性伝染病（口蹄疫）
が発生しています。

注意!

中国、ロシア、モンゴル、台湾などからの
生肉、ハム、ソーセージ、ベーコンなどの
肉製品の日本への持ちこみは、**禁止**されています。

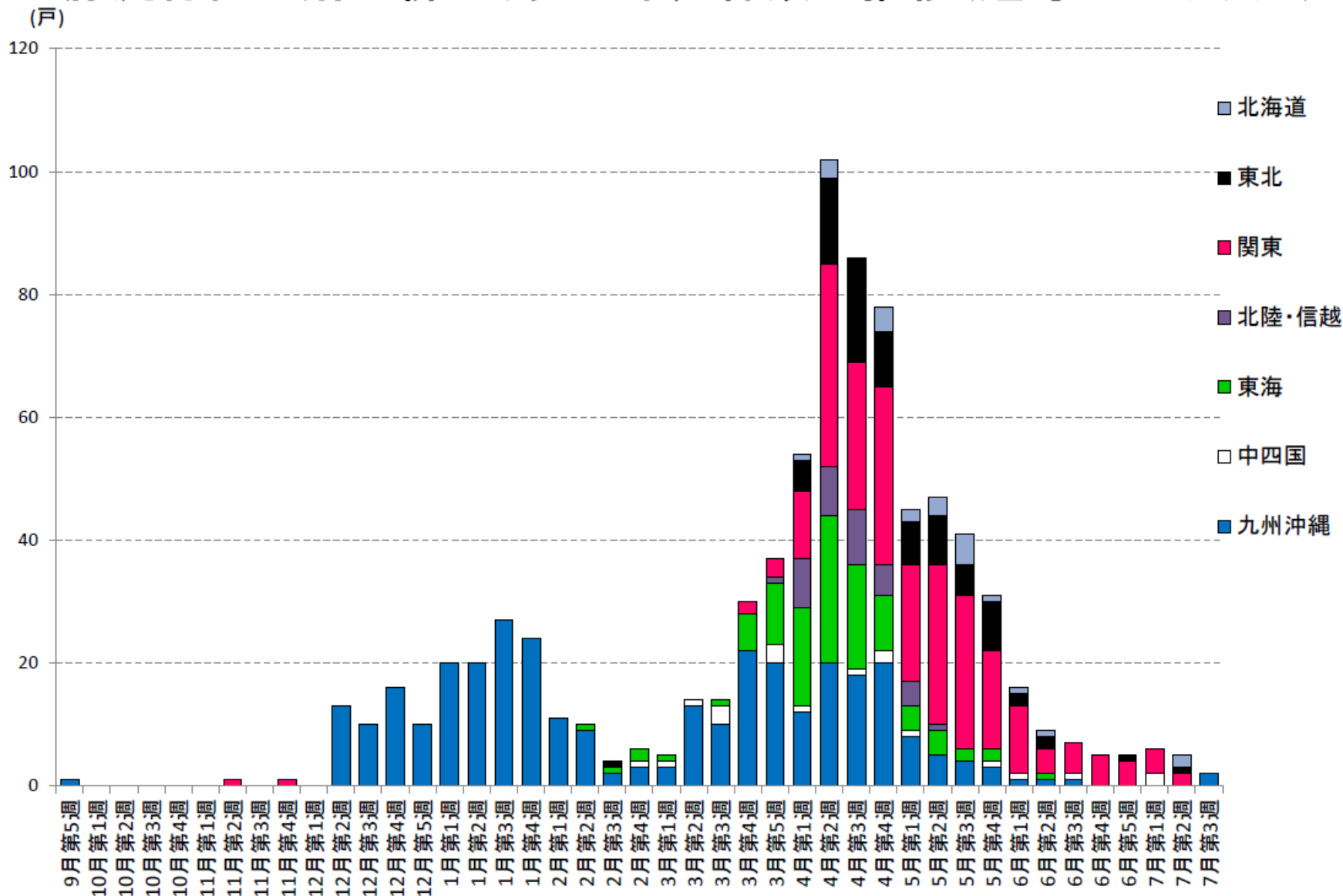
お願い

中国、ロシア、モンゴル、台湾などにおいて家畜を飼
養している農場などへの立ち入りは避けて下さい。
やむを得ず農場などの家畜関連施設へ立ち入られた方
には、日本到着時に履き物の消毒をお願いしています
ので、必ず動物検疫カウンターにお申し出下さい。
また、帰国直後には家畜に接することのないようお気
を付け下さい。

皆様のご協力をお願いいたします。



豚流行性下痢の新たな発生確定件数の推移(週毎・ブロック別)



※発生戸数は7月27日までの数値

家畜伝染病の流行の原因

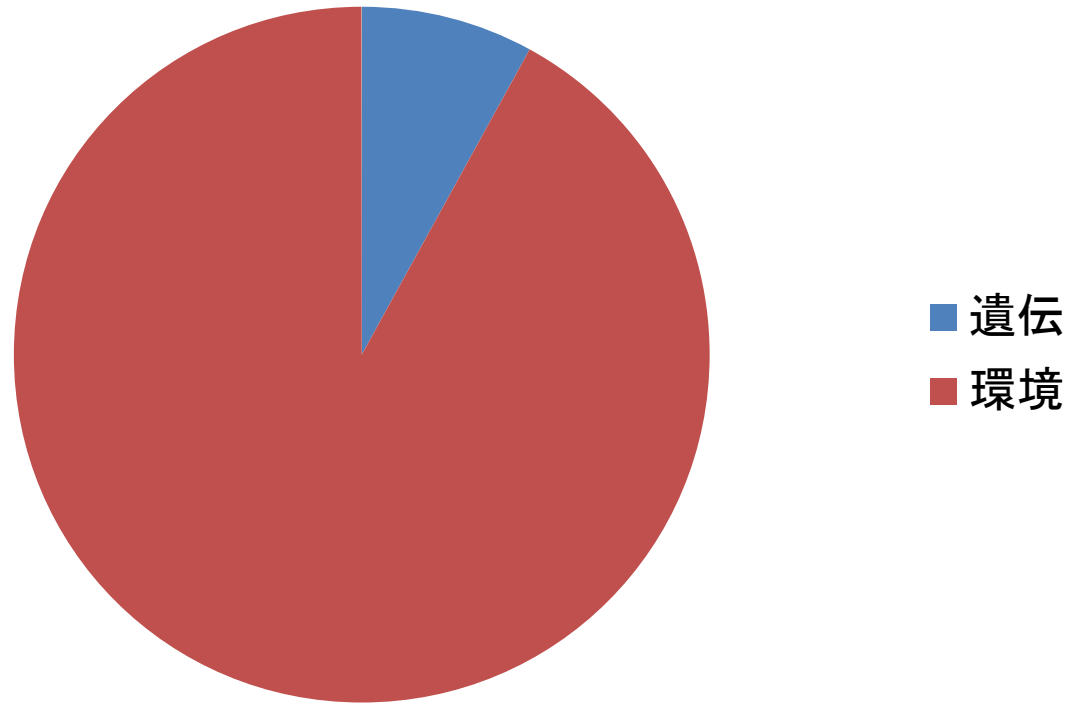
- 海外、特にアジア地域との人の交流の活発化
- 海外、特にアジア地域からの飼料や敷料の輸入
- 生産効率重視の育種改良による、抗病性の低下



病気に強い家畜を作ろう！

通常の選抜育種では 抗病性を改良することはむずかしい

同一品種内での抗病性に関与する要因



病気に強い家畜の品種



桃園種

台湾の代表的な品種。

顔面や体側に大きなしわがあるのが特徴。

抗病性が高く豚コレラにかかりにくい。



ブラーマン

アメリカ南部においてインド産のさまざまな品種とアメリカ野牛との交雑によって成立した肉用品種。

ダニ熱に対する抵抗性、耐暑性、耐乾性をそなえ、粗悪な飼料条件に耐える。

病気に強い品種が存在する



何らかの抗病性についての遺伝的な機構が存在



しかし、家畜の免疫機構は、
今だに十分わかっていない



免疫関連の遺伝子についての
基礎的な研究が必要

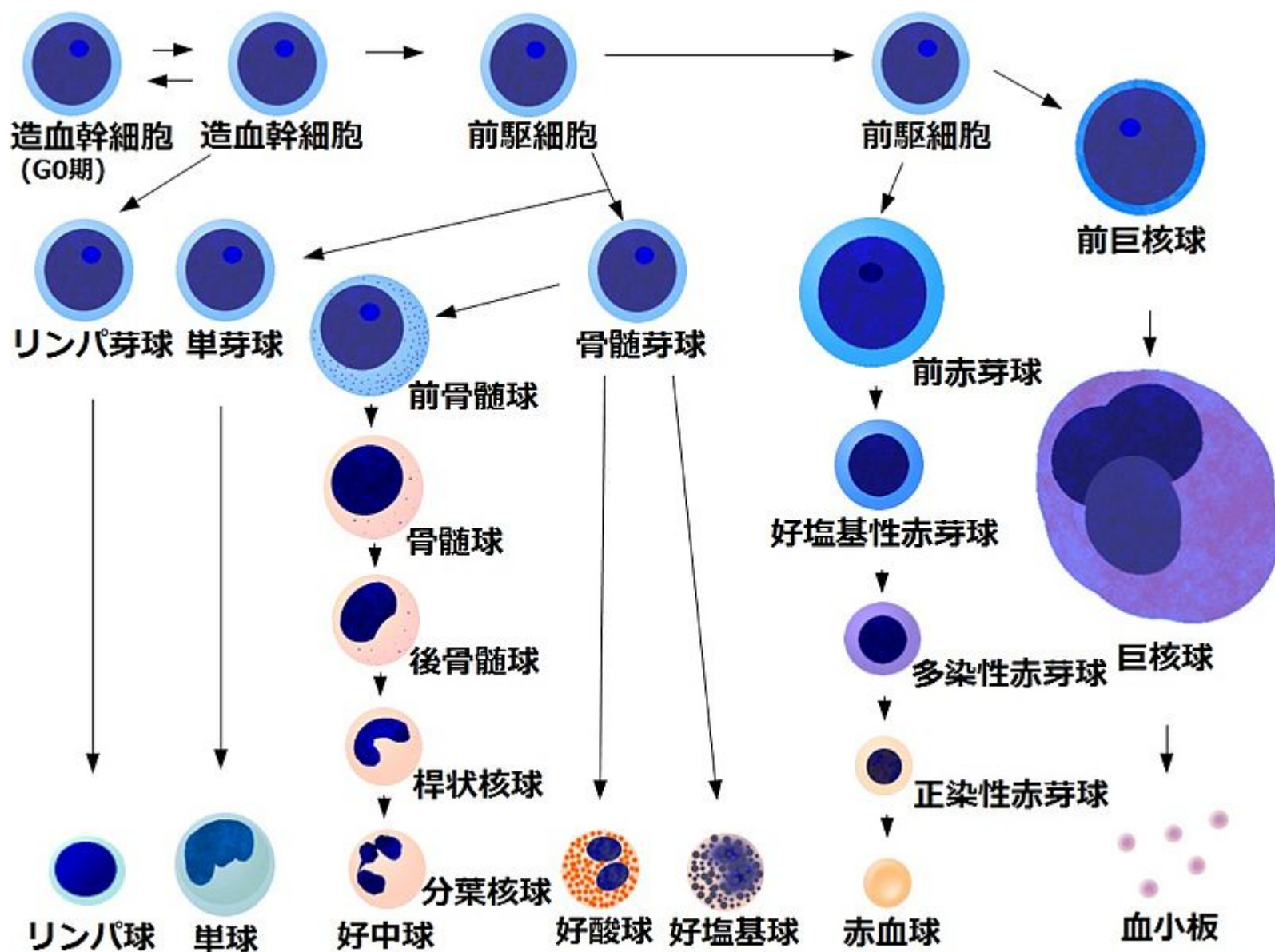
免疫とは

- 免疫とは
 - 病原体などの非自己物質やがん細胞などの異常な細胞を認識して殺滅する生体防御反応
- 表面(上皮)による防御
 - 機械的、化学的、生物学的
- 自然免疫
 - 病原体の種類に関わらず発動される
- 獲得免疫
 - 個々の病原体特異的に発動される
- 注意
 - 自然免疫、獲得免疫という分類は免疫学上での便宜的なもの
 - 実際には自然免疫と獲得免疫は複雑に相互作用をしている

自然免疫

- 自然免疫とは
 - 先天的、非特異的、効力を発動するまで短時間
- 体液性
 - 炎症
 - 発赤、疼痛、熱感、腫脹
 - 補体
- 細胞性
 - 顆粒球(好中球、好塩基球、好酸球)
 - マクロファージ
 - 樹状細胞
 - NK細胞

造血幹細胞とその細胞系譜

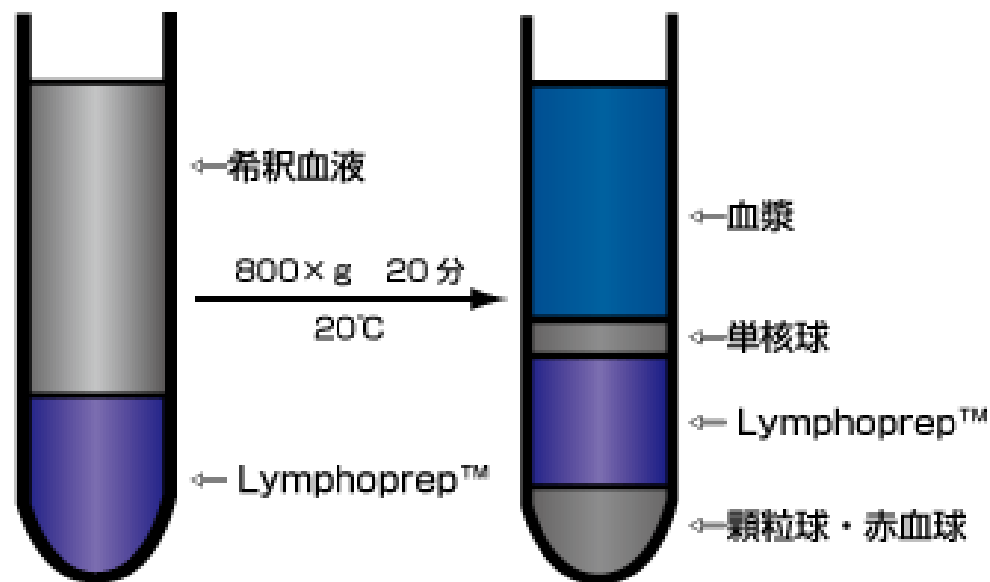


真空採血管





血球分離溶液Lymphoprep™を用いた 単核球の分離



採取したブタの単核球



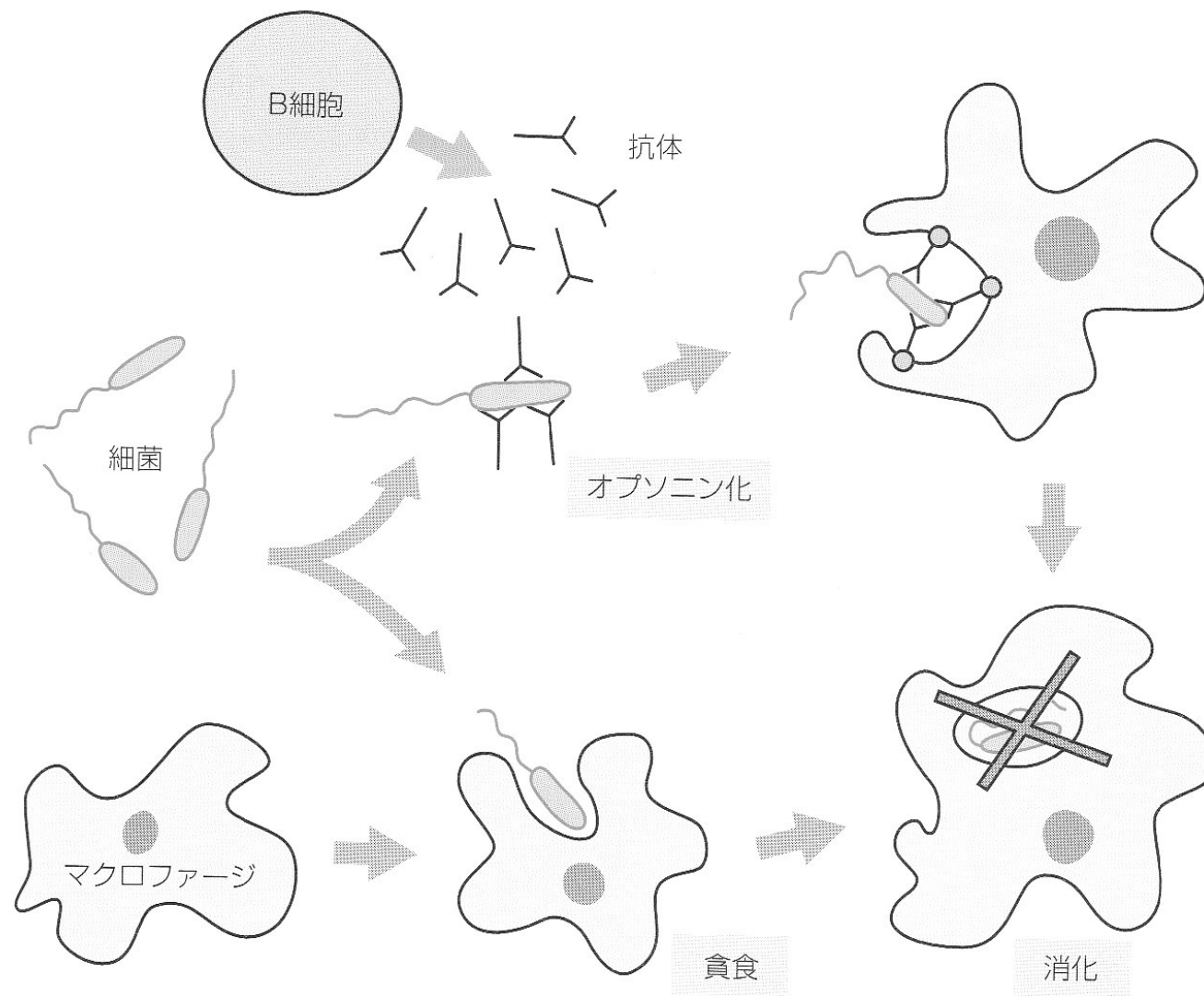
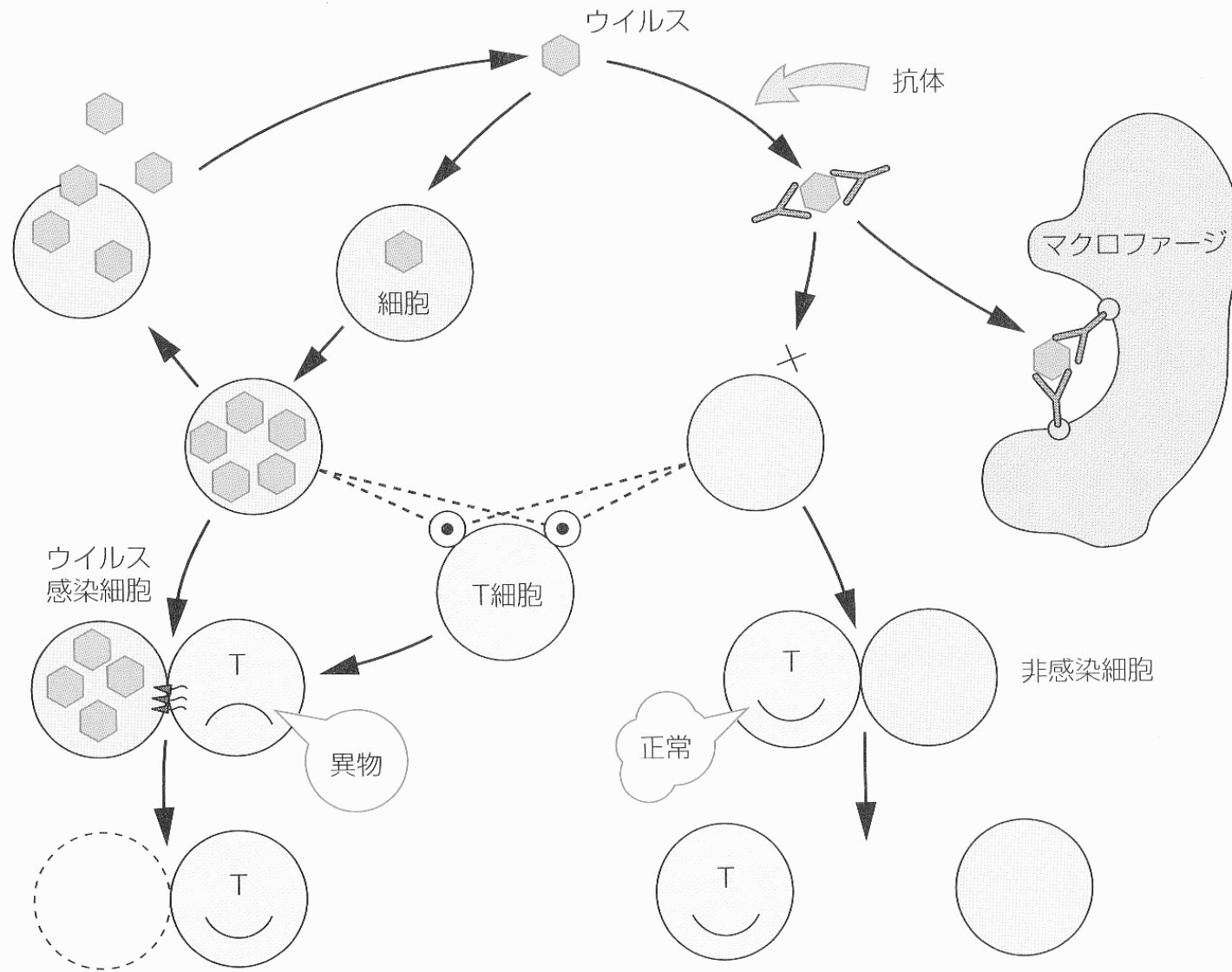


図 1-1 細菌の感染への対応

顆粒球，マクロファージや樹状細胞は，細菌などの異物を貪食して殺す．侵入してきた細菌に特異的に結合する抗体（antibody）が存在すると，抗体が細菌に結合し（これをオプソニン化と呼ぶ），より速やかに貪食される

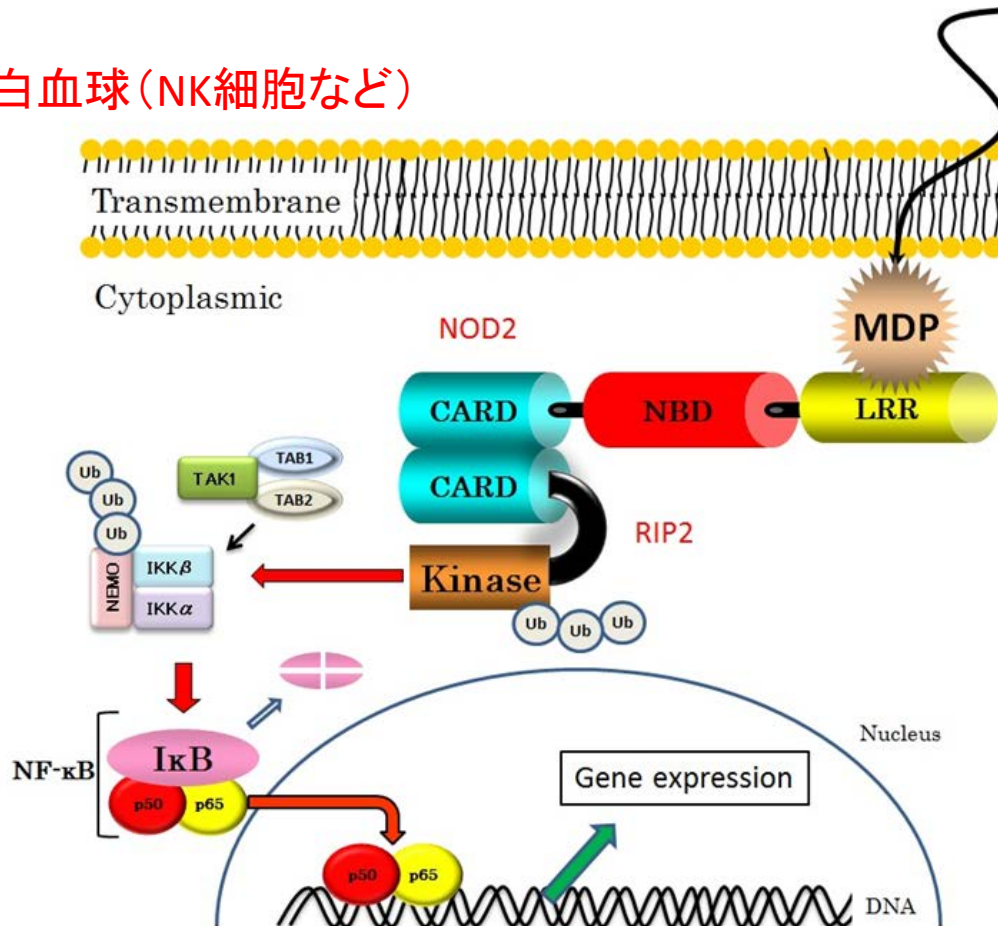
図1-3 ウイルス感染への対応



Nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2)

- ・ NOD2は、細菌の表面構造であるペプチドグリカンを構成するムラミルジペプチド (MDP) によって活性化し、免疫反応を起こす。

白血球(NK細胞など)



- ・ NOD2は、腸内のパネート細胞や単球、マクロファージに発現

- ・ NOD2は、細胞膜に結合した状態で細胞質基質に局在

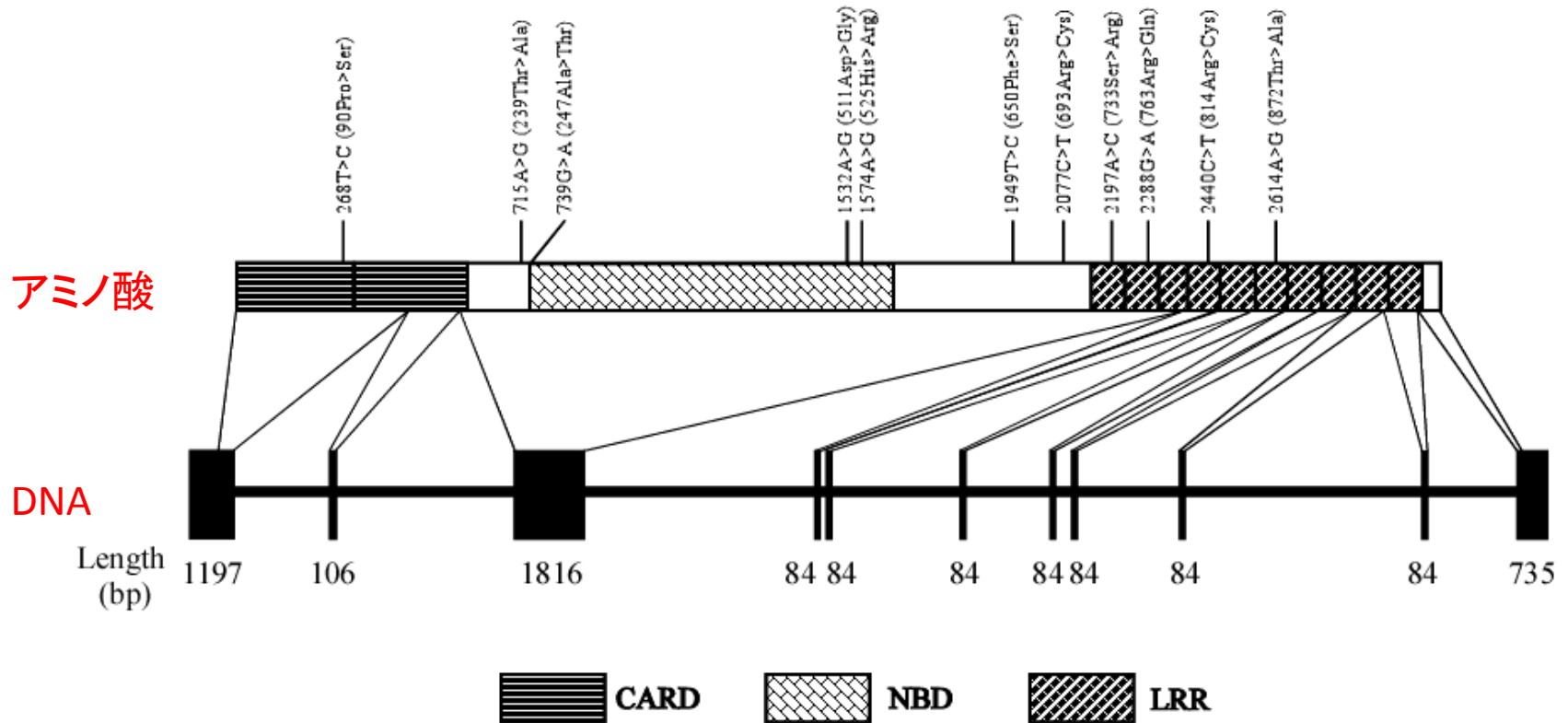
- ・ NOD2が、MDPを認識することにより、NF-κBが活性化する経路が動いて、TNFなどの炎症性サイトカイン遺伝子が活性化

- ・ カスケード時には、NOD2は重合体を形成

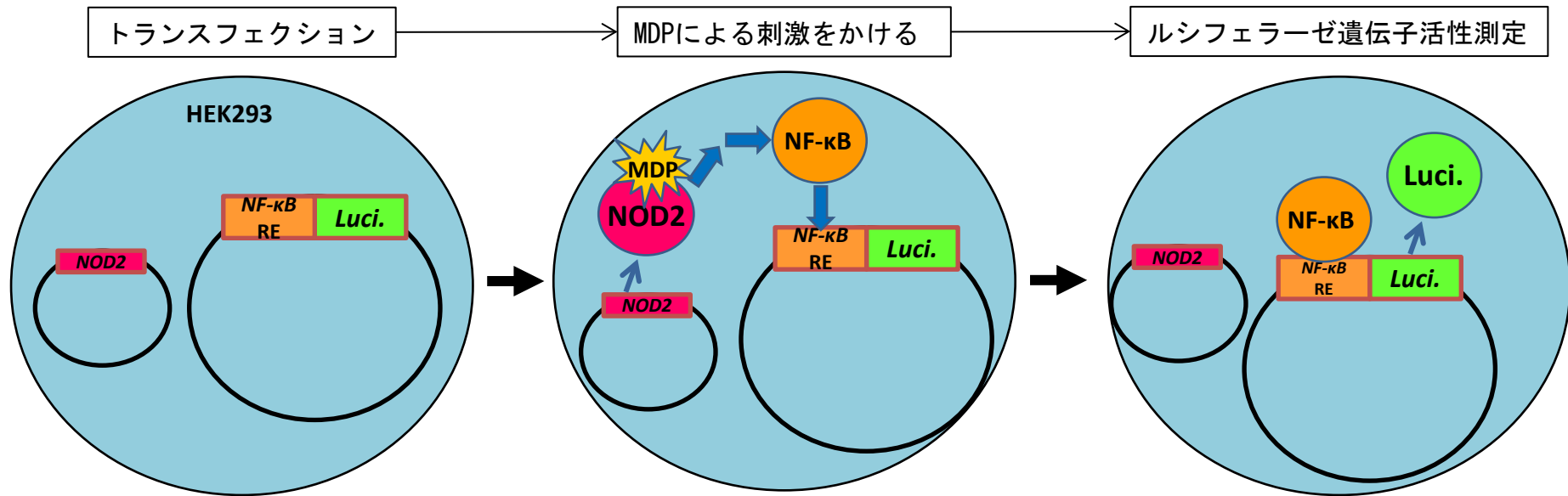
研究手順

- ブタの各品種で*NOD2*遺伝子領域の塩基配列を決定
- 品種間の塩基配列の差異の調査(1塩基置換 SNP)
- 塩基配列の異なる*NOD2*遺伝子を組み込んだ発現ベクターの作成
- ルシフェラーゼアッセイによる*NOD2*遺伝子の転写効率の測定

ブタ *NOD2* の11個のDNA多型の位置



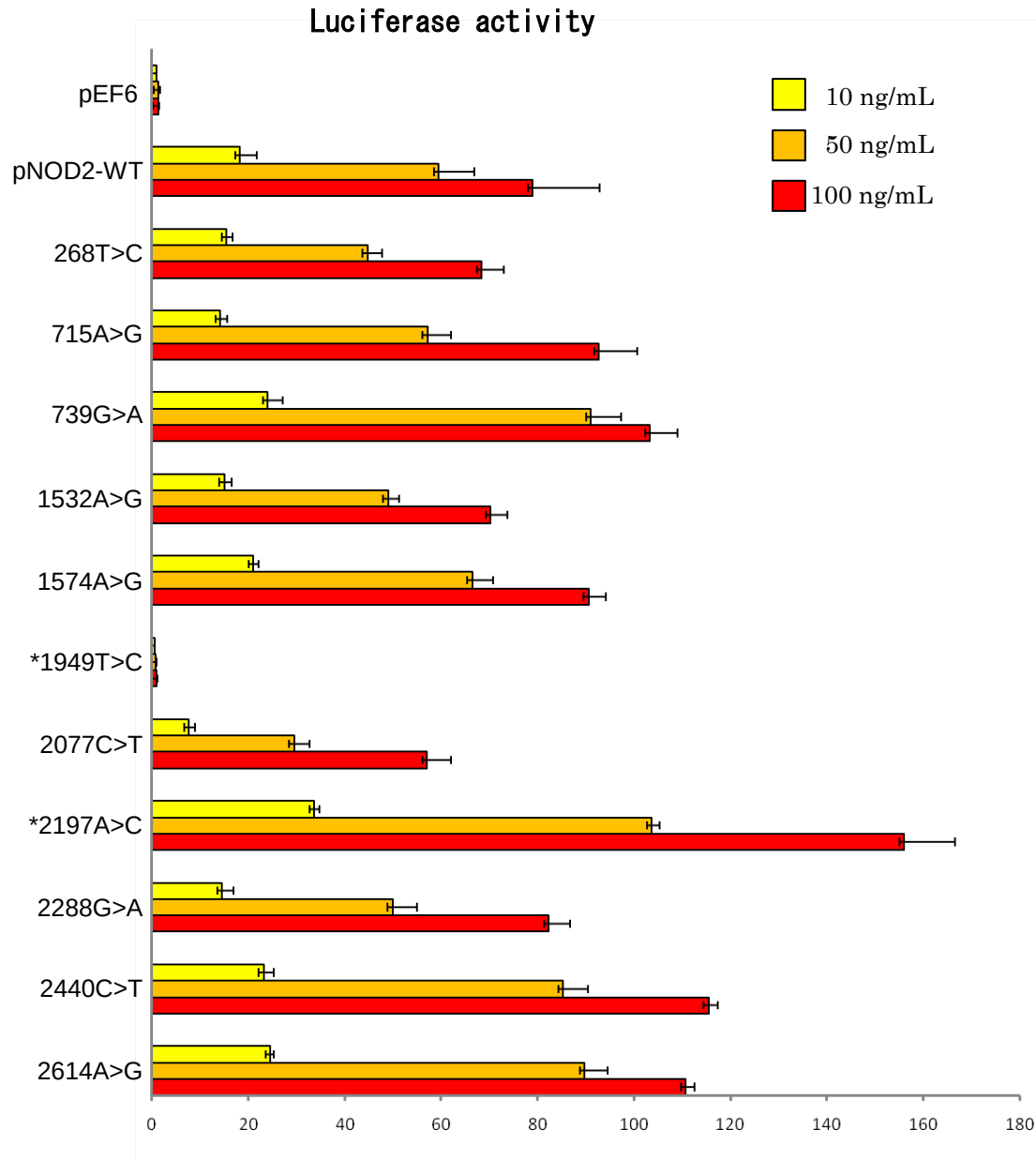
《ルシフェラーゼレポーターアッセイ》



ルシフェリン（基質）の添加による発光を計測

計測したホタルルシフェラーゼ活性値は、
チミジンキナーゼ応答配列接続ウミシイタケルシフェラーゼ活性により補正

【*NOD2* 各多型によるNF- κ B活性】



*NOD2*遺伝子を乗せていないベクター (pEF6) のルシフェラーゼ活性への相対値

・ 1949T>Cの置換により、MDPに対するブタ*NOD2*のNF- κ B活性が完全に喪失

・ 2197A>Cの置換により、活性が有意に上昇

・ ウェスタンブロットにより、1949C *NOD2* アレルも正常な分子量のタンパクを発現していることを確認

Influence of polymorphisms in porcine NOD2 on ligand recognition

Kosuke Jozaki^a, Hiroki Shinkai^{b,c}, Maiko Tanaka-Matsuda^{b,c}, Takeya Morozumi^{b,c}, Toshimi Matsumoto^{b,c}, Daisuke Toki^{b,c}, Naohiko Okumura^{b,c}, Tomoko Eguchi-Ogawa^{b,d}, Chihiro Kojima-Shibata^e, Hiroshi Kadowaki^e, Eisaku Suzuki^e, Yasuhiko Wada^f, Hirohide Uenishi^{b,d}  

[+ Show more](#)

DOI: 10.1016/j.molimm.2009.09.030

 [Get rights and content](#)

Abstract

Nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2) is a cytosolic pattern recognition receptor (PRR) that responds to muramyl dipeptide (MDP), a component of peptidoglycans of Gram positive and negative bacteria. NOD2 is involved in the modulation of signaling pathways for other PRRs, such as Toll-like receptors. Polymorphisms in NOD2 may evoke bowel disorders, and human Crohn's disease is significantly correlated with mis-sense insertion of the *NOD2* gene. Such polymorphisms affecting ligand recognition in the *NOD2* gene may also influence bowel flora in livestock, which is compromised by bowel diseases such as diarrhea. We investigated the functional variance of mis-sense polymorphisms in ligand recognition by porcine NOD2. The 1949T>C polymorphism, located in the region encoding the hinge domain of the molecule, notably diminished the functional response of porcine NOD2 to MDP. By comparison, the 2197A>C polymorphism, localized in the region corresponding to leucine-rich repeats, significantly augmented the response of porcine NOD2 to the ligand. The 1949C allele was rare among pig breeds, suggesting that this mutation is a disadvantage to pigs in their immune response to microbes. The 2197C allele, in contrast, was widely distributed among Western breeds and is most likely to be derived from wild boars in Asia. This is the first report of a causal relationship between molecular function and polymorphisms in PRRs in non-primate, non-rodent mammals. These findings suggest that the 2197C allele might confer an immune response advantage in modern pig breeds and may be a useful marker for breeding aimed at disease resistance in pigs.

城崎君、山口大学医学部産婦人科 助教に着任



城崎幸介（じょうざき こうすけ／Kosuke Jozaki）

出身大学・卒業年 佐賀大学農学部 平成17年 卒業

所属学会・専門医などの資格

専門医・資格

- 農学博士

所属学会

- 日本エピジェネティクス研究会
- 日本生殖内分泌学会
- 日本繁殖生物学会

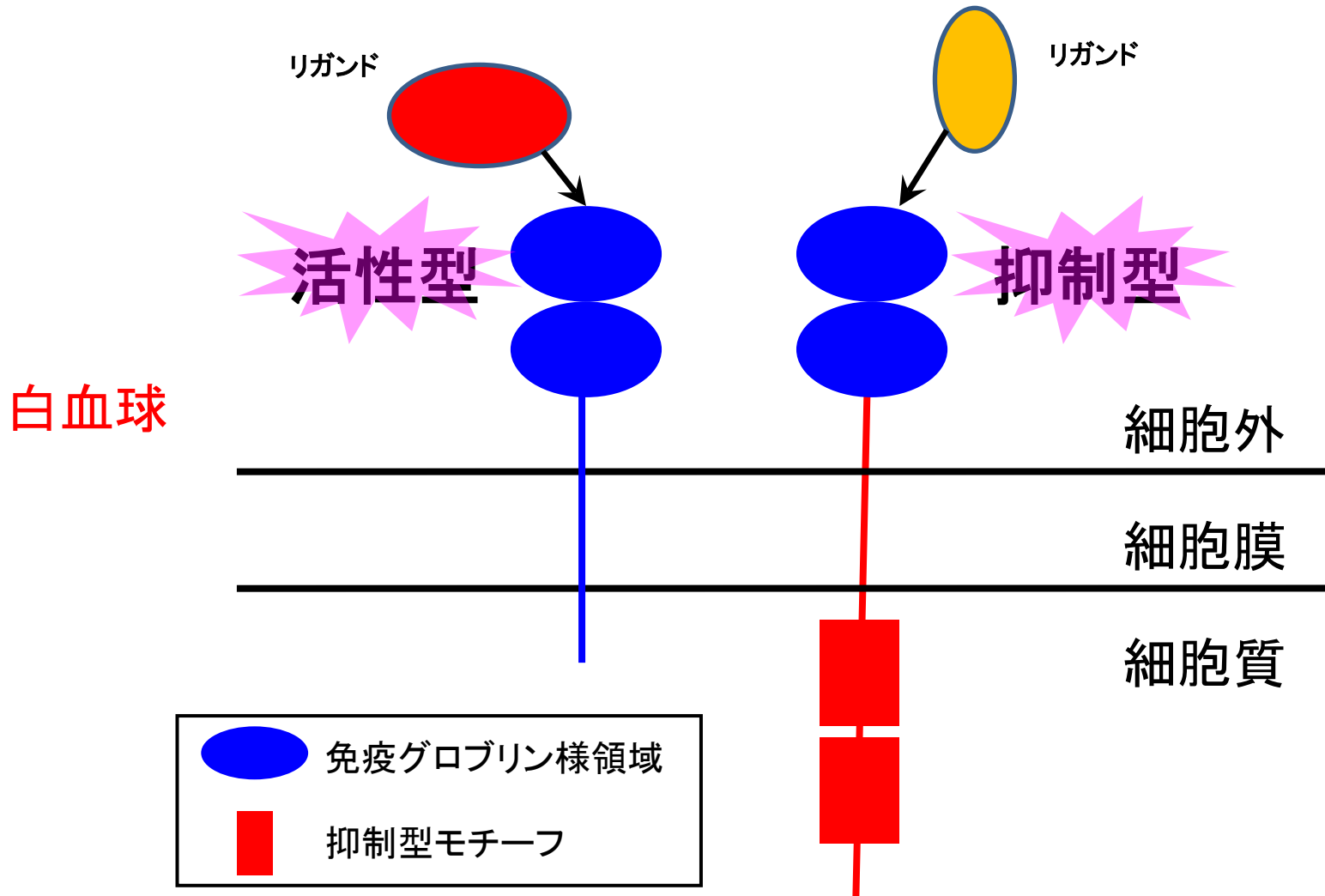
特に専門としている臨床・研究分野

エピジェネティクス

自己紹介

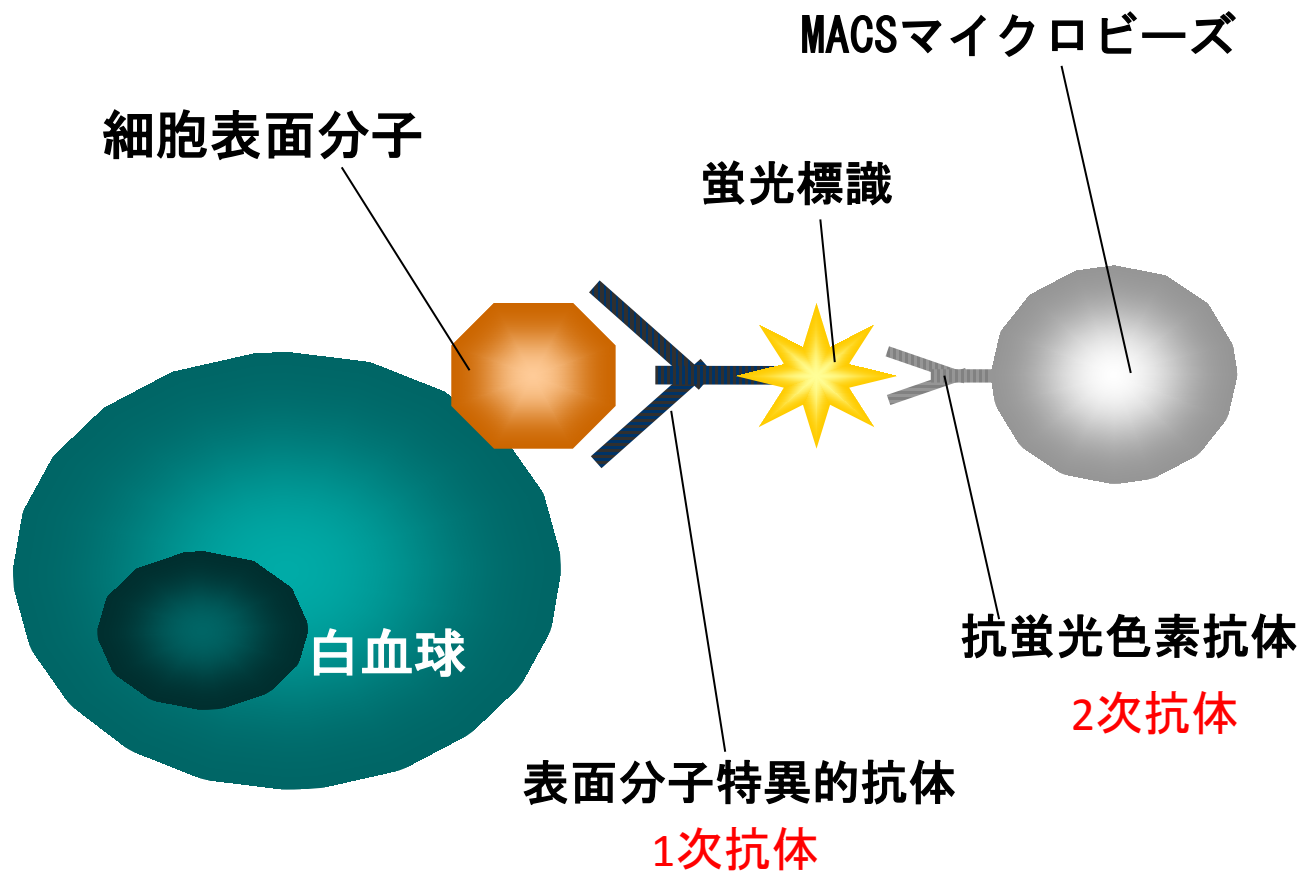
平成25年8月より着任しました。これまではブタの育種を目的とした免疫に関与した遺伝子について研究してきました。本研究室では、子宮内膜細胞について研究をしています。子宮内膜は約1か月のサイクルの中で目まぐるしい変化を起こし、着床時にはそのサイクルを止め胎児を育てる環境を整える。そのような生命のフシギに少しでもアプローチできればと日々思っております。

白血球受容体LILRの構造



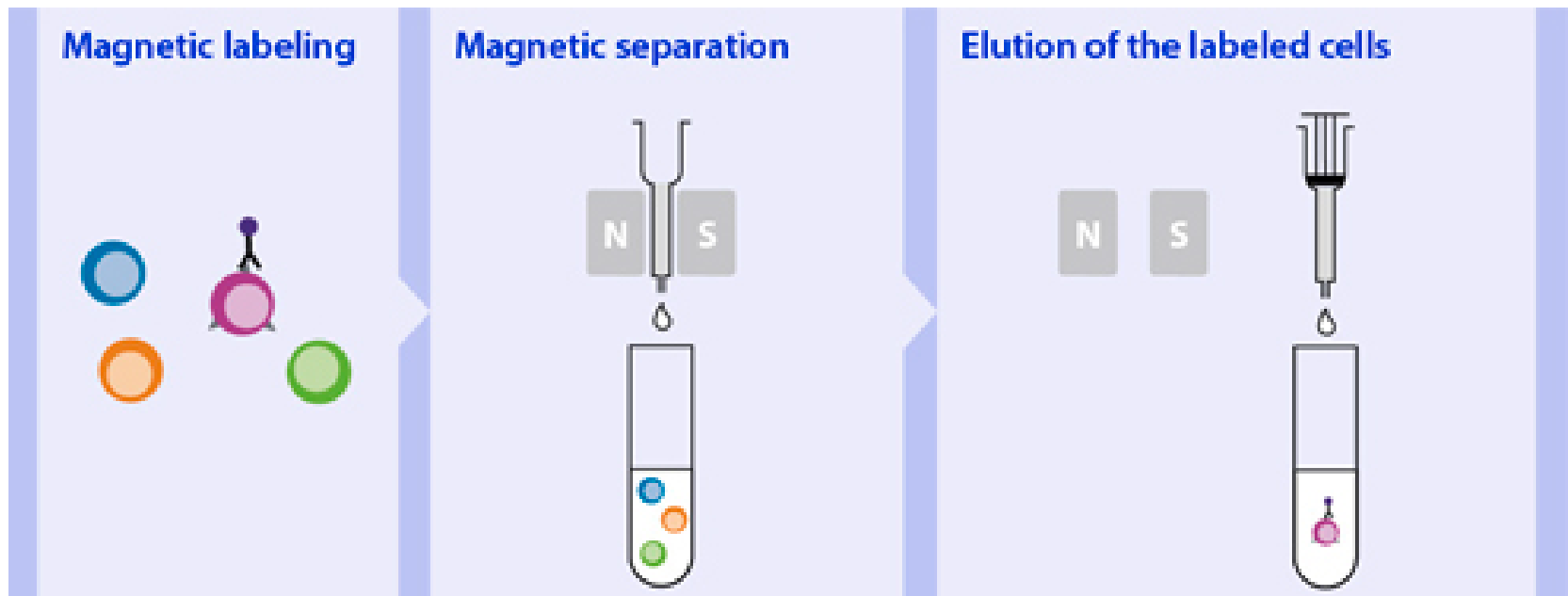
研究手順

- 抗体磁気分離による単球の分離
- フローサイトメトリーによる確認
- サルモネラ菌LPS(リポ多糖)を含む培地で単球を培養
- 単球を回収して、RNA抽出
- リアルタイムPCRで各遺伝子のmRNA発現量を測定

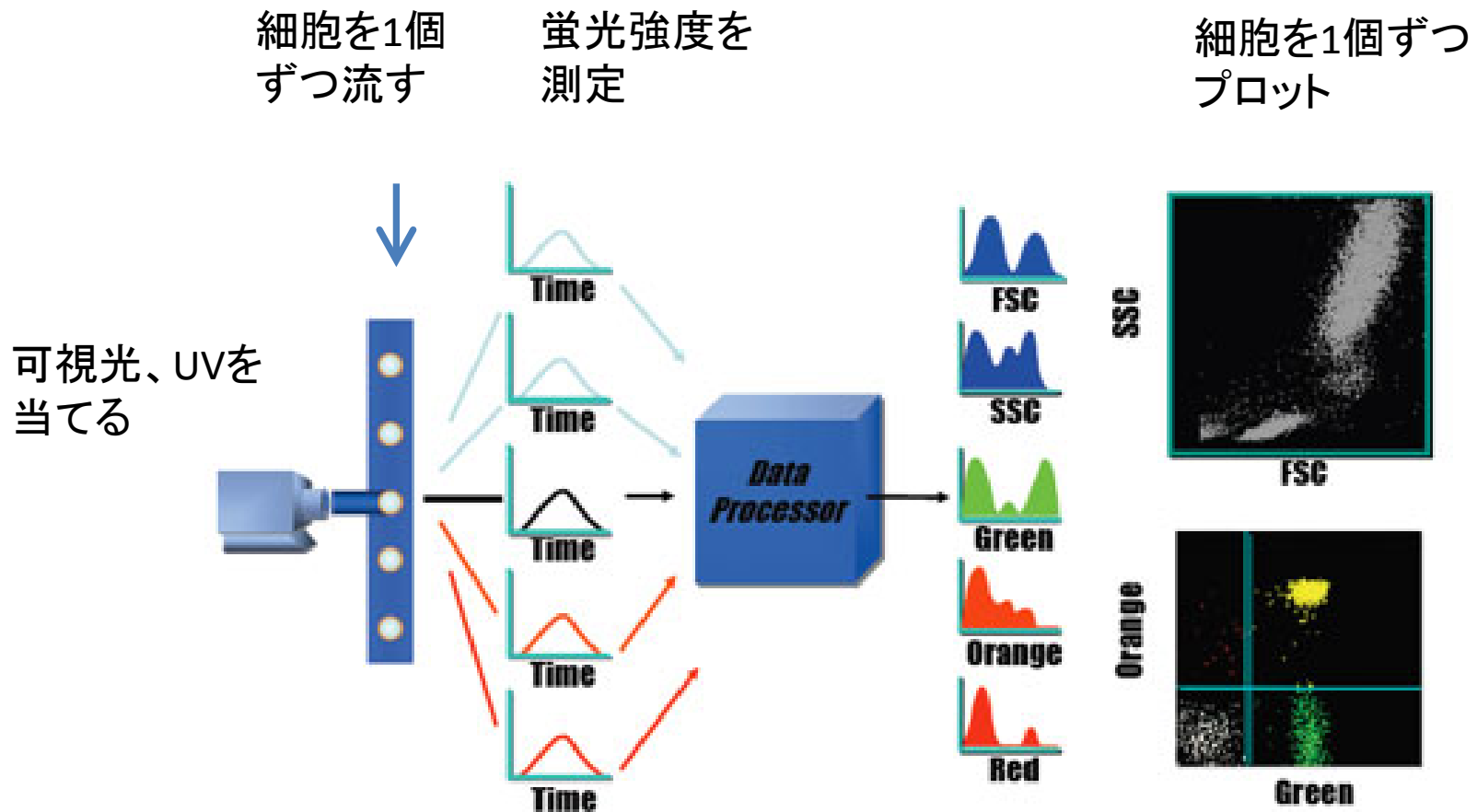


MACS抗体磁気分離の手順

- 単細胞懸濁液状態の細胞をMACS® MicroBeadsで磁気標識
- そのサンプルをMACS Separatorに設置したMACS Columnにアプライ
- 標識されていない細胞は素通りするのに対して、磁気標識された細胞はカラムに保持
- 素通り画分(フロースルー)は、非標識細胞フラクション
- 簡単な洗浄ステップの後、カラムを磁石から外し、磁気標識された細胞をカラムから溶出

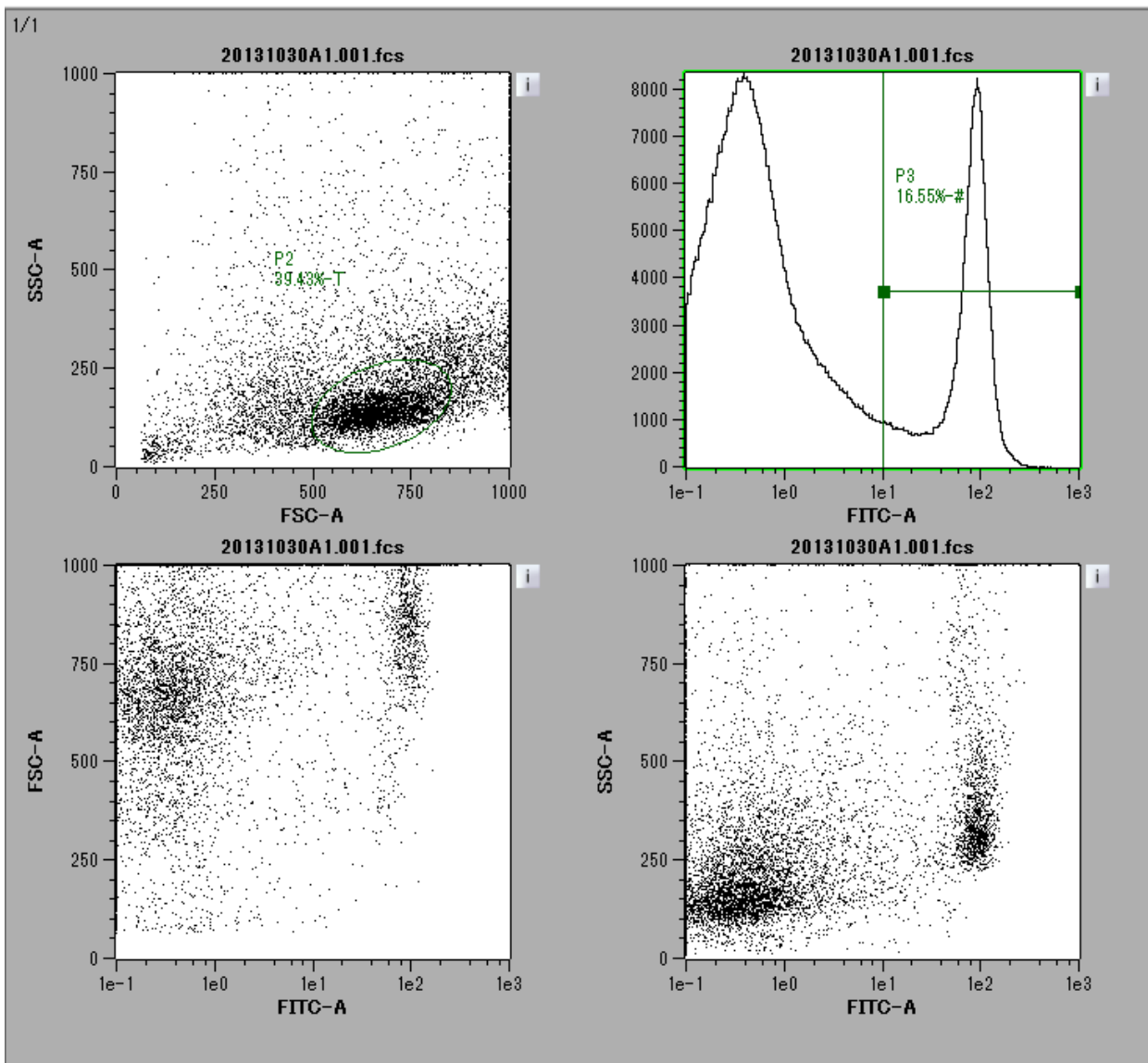


フローサイトメトリーの原理

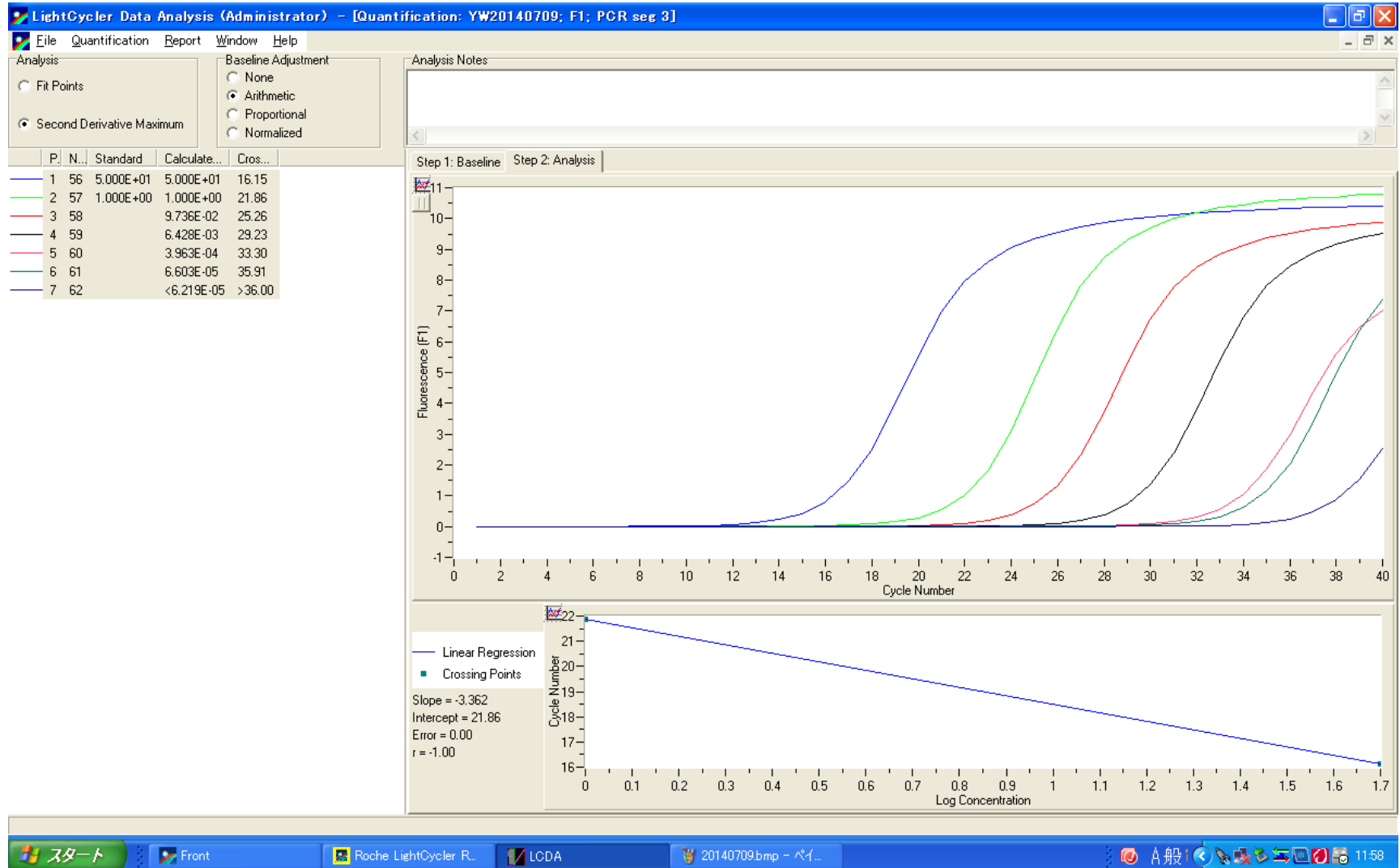


フローサイトメトリーの結果

ブタ 末梢血単核球 SWC3a 単球



リアルタイムPCRによる 遺伝子発現量の推定

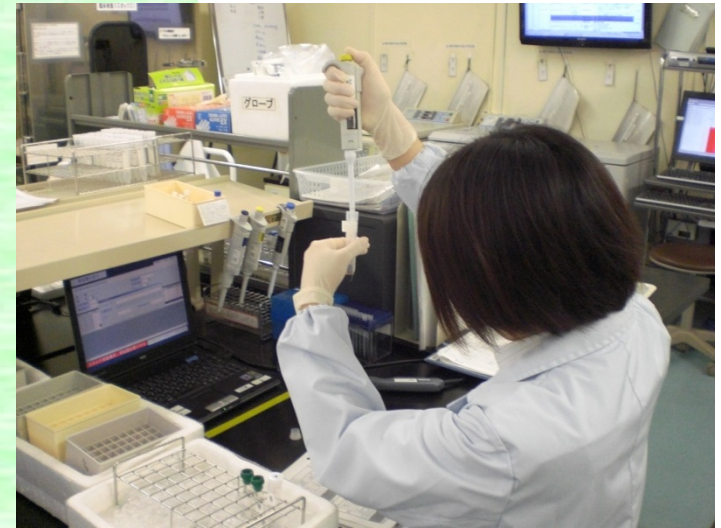


小原瑛子さん、農学研究科長賞を受賞



本研究室の小原瑛子さんが、農学研究科長賞を受賞されました。
おめでとうございます。

農学研究科長賞は農学研究科の各コースから成績最優秀者が選ばれることになって
小原瑛子さんは、GPA4.0(満点)という最高の成績で農学研究科長賞を受賞されました。
後輩の皆さんも、彼女を見習って、頑張ってくださいね！



陣内さん、現役で長崎県職員採用試験(大卒、畜産)に合格



本研究室4年生の陣内あさみさんが現役で難関の長崎県職員採用試験(大卒、畜産)に合格されました。
おめでとうございます。

後輩の諸君も陣内先輩を見習ってがんばりましょう！

仁田坂君、現役で大分県職員採用試験(大卒、畜産)に合格



本研究室4年生の仁田坂君が現役で難関の大分県職員採用試験(大卒、畜産)に合格されました。

おめでとうございます。

仁田坂君からのメッセージ:「畜産の公務員を目指すなら、講談社の新編
後輩の諸君も仁田坂先輩を見習ってがんばりましょう！」

最終更新年月日 2011年9月26日

ywada@cc.saga-u.ac.jp

[ホームページ](#)



佐賀大学農学部 生物生産学科 動物生産学分野 和田研究室

前田友香さん、現役で宮崎県職員採用試験(大卒、畜産)に合格



本研究室4年生の前田友香さんが現役で難関の宮崎県職員採用試験(大卒、畜産)に合格されました。

おめでとうございます。

後輩の諸君も前田先輩を見習ってがんばりましょう！

佐賀大学農学部 生物生産学科 動物生産学分野 和田研究室

松田絵理さん、現役で佐賀県職員採用試験(大卒、農政)に合格



本研究室4年生の松田絵理さんが現役で難関の佐賀県職員採用試験(大卒、農政)に合格されました。

おめでとうございます。

後輩の諸君も松田先輩を見習ってがんばりましょう！

最終更新年月日 2007年8月31日

ywada@cc.saga-u.ac.jp

[ホームページ](#)



最近の進学・就職先

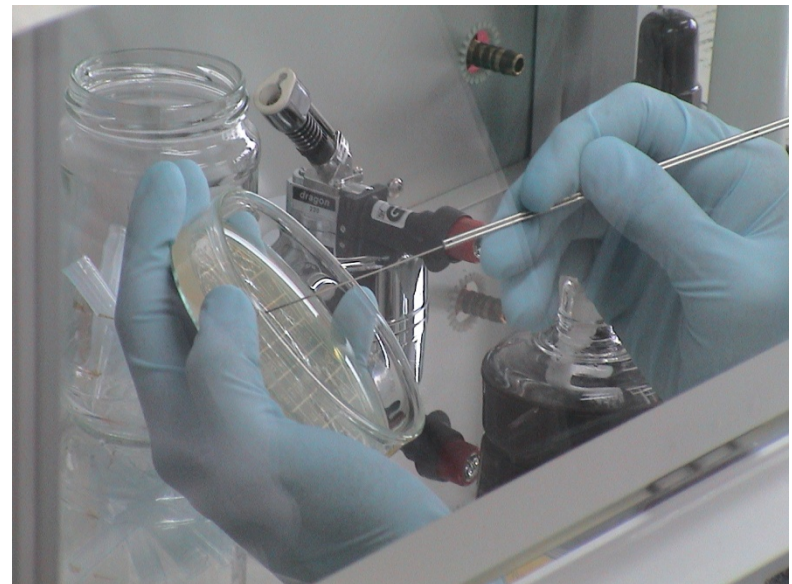
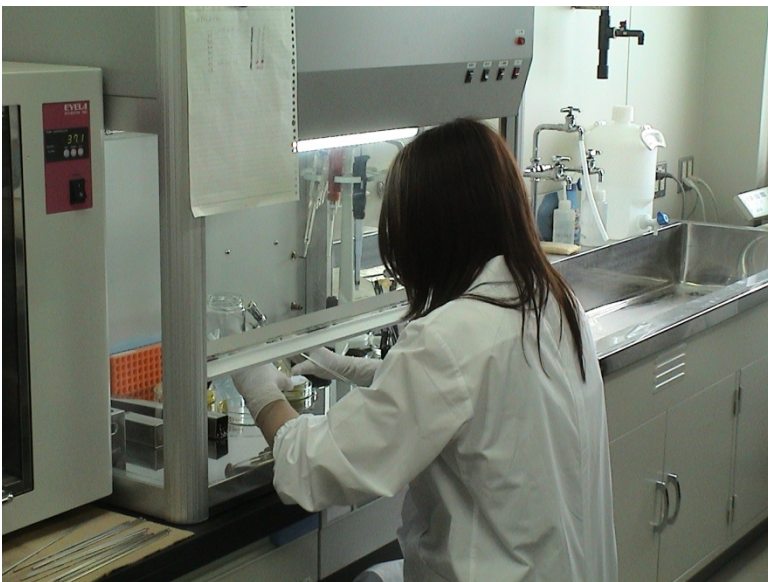
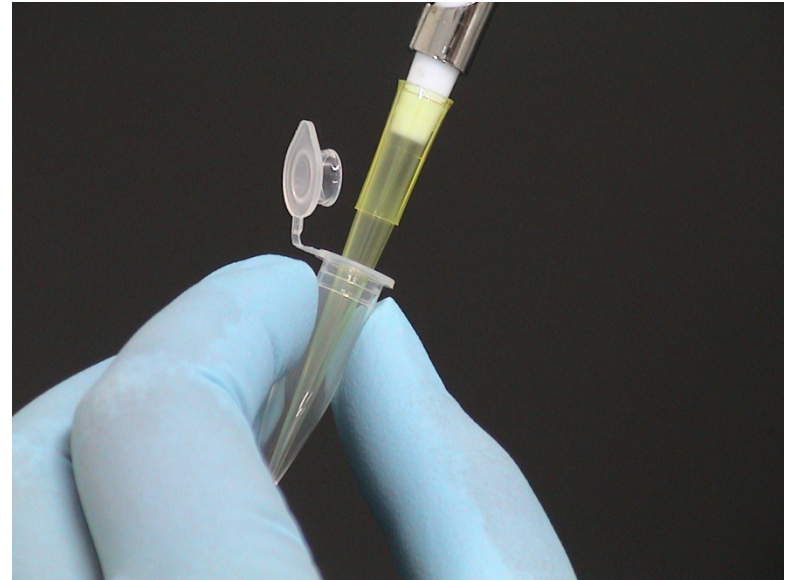
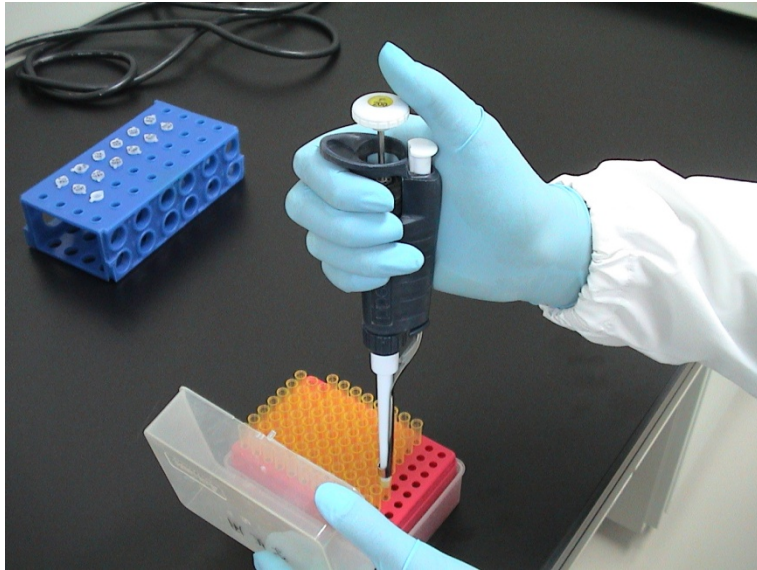
- 20年度
 - 地方公務員(宮崎県上級、畜産)、化学及び血清療法研究所、第一施設工業
- 21年度
 - 佐賀大学大学院(農学研究科、医学研究科)、国家公務員(畜産2種、動物検疫所)、(独)家畜改良センター、久留米市役所、関西酵素、ペットシティー
- 22年度
 - 大学院(佐賀大、北大、九大)、高木病院、福岡山王病院、極東ファティー
- 23年度
 - 地方公務員(大分県上級、畜産)、新日本科学、ヨコオ、グリーンライフ産業
- 24年度
 - サンコー、北九州市職員、オーク住吉産婦人科、セント・ルカ産婦人科
- 25年度
 - 地方公務員(長崎県上級、畜産)、雪印種苗、JA北九州くみあい飼料、山口大学医学部 助教



働く卒業生たち



3年生向け学生実験



研究室スナップ



研究室スナップ







入学試験、
がんばってね！！