

## 論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻  
平成11年度博士課程 進学  
氏名 清水 佐良子  
指導教官 小野寺 節

論文題目: Genetic structural analysis of *Mhc* (*Coja*) class IIB genes in quail (*Coturnix japonica*)  
(ウズラの主要組織適合抗原複合体クラス IIB 遺伝子における構造解析に関する研究)

主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex : *Mhc*)は、免疫における自己-非自己の識別および T 細胞への抗原ペプチドの提示に関与し、免疫応答の誘導に深く関わる *Mhc* 抗原をコードする、多重遺伝子族からなる遺伝子領域である。ニワトリでは、すでにこの *Mhc* 領域のゲノム配列が決定されており、ニューカッスル病やマレック病などの病原体に対する感受性や経済形質に大きく寄与することが数多く報告されている。

ニワトリとの属間雑種やキメラ動物の作成が可能であるウズラにおいてもニワトリと同様にニューカッスル病に対する抵抗性ならびに感受性を有することがこの不活化ワクチンに対する抗体産生能の高低により選抜された系統 (H, L 系) から明らかにされた。この両系統のゲノム DNA を用いた *Mhc* 遺伝子の RFLP 解析では、系統間で大きく異なるバンドパターンが見られた。そこで、抗体産生能の高低に寄与する遺伝子は、*Mhc* クラス II 遺伝子である可能性が挙げられた。そこで本研究では、第一章において、H, L 両系統における *Mhc* クラス IIB 遺伝子(以下 *CojaCIIB* と示す)の多様性を明らかにした。さらに mRNA レベルにおける発現 *CojaCIIB* 遺伝子の解析の結果、系統特異的な発現遺伝子を有していることが示された。これら遺伝子の塩基配列から予測されるアミノ酸配列を比較したところ、ペプチド結合領域のアミノ酸残基が変異に富んでいた。抗原提示を受ける T 細胞の活性化は、抗原提示細胞の表面に発現する *Mhc* と外来抗原由来のペプチドの結合力に相関することから、H,L 系統特異的な発現 *CojaCIIB* 遺伝子の外来ペプチドに対する結合能の差異が、免疫応答能に影響を与える一因と考えられる。

そこで、第二章では、系統特異的である発現 *CojaCIIB* 遺伝子の特徴を明らかにすることを試みた。組織特異的な *CojaCIIB* mRNA 発現解析、さらに T 細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球(SRBC)免疫に対する抗体産生能および *CojaCIIB* mRNA の相対的発現量について系統間で比較した。*CojaCIIB* mRNA 発現は、組織分布、相対的発現量において共に系統間に顕著な差異は認められなかった。一方、SRBC 免疫実験では、H 系において抗 SRBC 抗体価、*CojaCIIB* mRNA の相対的発現レベルが共に L 系より極めて高いことが初めて証明された。この結果から、*CojaCIIB* mRNA の発現レベルが抗体産生能に相関していることが示唆された。最後に第三章では、まず第一章で明らかにされた各系統の多様性に富んだ *CojaCIIB* 遺伝子のゲノム内の位置を同定した。その結果、ニワトリにおいて RNA レベルで優位に発現が高く多型性に富み抗体産生能を決定すると数多く報告されている *Mhc major CIIB* 遺伝子が位置する領域に、両系統のウズラでは、各 2 つの遺伝子が存在していた。この各 2 つの遺伝子をウズラの *Coja major CIIB* 遺伝子とすると、両系統の *Coja major CIIB* 遺伝子は、系統特異的な *CojaCIIB* mRNA 発現遺伝子であった。さらに第二章の SRBC 免疫実験において各系統内で最も高い発現増加を示した遺伝子は、各系統の *Coja major CIIB* 遺伝子のひとつであり、かつ同じローカスに位置するアレルの関係にあることが明らかとなった。このことから、特に *Coja major CIIB* 遺伝子のハプロタイプが抗体産生能に相関することが示唆された。したがって、第二章で得られた結果を加味すると、*Coja major CIIB* 遺伝子の発現レベルそして、もしくは *Coja major CIIB* 遺伝子のローカスのアイソタイプが抗体産生能に寄与する可能性が挙げられた。*CojaCIIB* 遺伝子の発現は、最初に転写レベルで調節される。そこで、次に転写レベルで *CojaCIIB* 遺伝子の発現調節の一端を担うプロモーター領域を塩基配列レベルで比較解析するために、系統特異的な *Coja major CIIB* 遺伝子のゲノム構造を明らかにした。プロモーター領域と推定される *CojaCIIB* 遺伝子の 5' flanking 領域において、組織特異的、細胞特異的な遺伝子の転写誘導に重要である S, X, Y box と呼ばれるシークエンスモチーフは、すべての各系統特異的な *Coja major CIIB* 遺伝子に、高度に保存されていた。また *Mhc* クラス II 遺伝子の発現は IFN- $\gamma$  により誘導され、グルココルチコイドにより抑制されることが報告されている。プロモーター領域においても、ICS (interferon consensus sequence), GRE (glucocorticoid response element) が両系統において存在していた。さらに 3' 非翻訳領域についても解析を進めたところ、転写因子である NF- $\kappa$ B の binding site が全ての *Coja major CIIB* 遺伝子に認められた。また、poly(A)シグナルも存在しており、系統間で顕著な差異は見られなかった。

簡単であるが、各章での実験内容について以下に述べる。

第一章では、*CojaCIIB* 遺伝子の多様性解析および発現解析を行なった。

H, L 両系統に存在する *CojaCIIB* 遺伝子の遺伝子数を明らかにするために、ゲノム DNA および RNA を鋳型として、*CojaCIIB* 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 4 までの領域を遺伝子座共通に増幅させるプライマーを用いて、PCR および RT-PCR 解析を行ない、それらの塩基配列

を決定した。この結果、H系では4種類(HL3,HL8,HL11,HL12)の *CojaCIIB* 遺伝子のゲノム塩基配列が得られ、その内3種類の発現(HL3,HL8,HL12)が認められた。一方、L系においては10種類のゲノム塩基配列(L2,HL3,L4,L5,L6,L7,HL8,L9,L10,HL11)の内、4種類の遺伝子(L5,L6,L7,L10)の発現が認められた。そして、両系統で認められた発現遺伝子は、すべて系統特異的であった。したがって、H, L 系統における *CojaCIIB* 遺伝子の構成に大きな差異が存在することが明らかとなった

第二章では、発現 *CojaCIIB* 遺伝子の組織分布および SRBC 免疫による相対的発現量の変動について解析を行なった。

発現 *CojaCIIB* 遺伝子の組織分布および SRBC 免疫による相対的発現量の変動を明らかにするために、H, L 両系統から臓器(脾臓、胸腺、ファブリキウス嚢、肺、肝臓、腎臓)および末梢リンパ球由来の RNA を抽出し、各発現遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-PCR および ABI PRISM 7700 にて、*CojaCIIB* mRNA の発現解析を行った。その結果、両系統における発現 *CojaCIIB* 遺伝子は、末梢リンパ球や臓器全てに検出された。また、相対的な発現量に両系統間で顕著な差異は見られなかった。SRBC を用いた免疫実験では、二次免疫後、H系がL系より16倍高い抗SRBC抗体価を示した。これら抗体価と *CojaCIIB* mRNA の相対的発現量を比較した結果、1. 測定期間中における相対的発現量の変動は、両系統共に同様なパターンを示した  
2. H系における相対的発現量は、L系よりも7倍多かった。したがって、*CojaCIIB* 遺伝子の発現量が抗体産生能に相関することが示唆された。

第三章では、*CojaCIIB* 遺伝子のゲノム内の位置の決定を行なった。

ニワトリと他系統のウズラのゲノム塩基配列より、*Mhc major CIIB* 遺伝子が位置する *Tapasin-RING3* 領域、発現量が低く多型が乏しい *Mhc minor CIIB* 遺伝子が位置する *lectin-Tapasin* 領域、および *lectin-NKR* 領域をカバーするプライマーを用いて long-PCR を行ない、得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。その結果、*Mhc major CIIB* 遺伝子には、H系では1種類のハプロタイプ(HL3-HL8)、L系では2種類のハプロタイプ(HL3-HL8)と(L5-L6)が見い出された。また、*Mhc minor CIIB* 遺伝子には、HL11が両系統ともに見い出された。一方、両系統で異なる点は、*lectin-NKR* 領域において、L系のみ複数の *CojaCIIB* 遺伝子(L2,L4,L10)が認められたことであった。

本研究において、ニューカッスル病ウイルス不活化ワクチンに対する抗体産生能の高低により選抜されたウズラの *CojaCIIB* 遺伝子は多様性に富み、特に、*Coja major CIIB* 遺伝子がニワトリと同様に抗体産生能に強く寄与していることが示された。さらなる解析から、抗体産生能に対して *Coja major CIIB* 遺伝子の発現レベルとハプロタイプの2通りの相関性が示唆された。発現レベルに関しては、プロモーター領域に系統間で顕著な違いが認められなかったことから、免疫実験で観察された系統間での *CojaCIIB* mRNA の発現レベルの大きな差異を説明するには至らなかった。一方、ハプロタイプの相関性に関しては、ヘテロであるL系ウズラの *Coja major*

*CIIB* 遺伝子に注目し、2つのハプロタイプ (*HL3-HL8*)/ (*L5-L6*)が発現している L 系ウズラと (*L5-L6*) のみが発現している L 系ウズラの家系内での F1 の発現タイプ、発現量の解析を試みた。その結果、(*HL3-HL8*)の発現レベルが(*L5-L6*)の発現下で減少したことがみとめられた。さらなる解析が必要であるが、(*L5-L6*)のハプロタイプが抗体産生能の低下に寄与している可能性が挙げられた。本研究で得た研究成果は、ウズラの免疫機構を解明する上で非常に有用であると考えられる。