

論文審査の結果の要旨

申請者氏名           しみず さよこ  
                              清水 佐良子

---

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、*Mhc* 領域のゲノム配列がすでに決定され、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な程近縁であると考えられてい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)から明らかにされている。これら H,L 系統はひとつの基礎集団(クローズドコロニー)から、各抗体産生能の高いおよび低い集団内で循環交配を行ない遺伝的純化を高めた選抜系で、両系統のゲノム DNA を用いた *Mhc* クラス IIB 遺伝子の RFLP 解析により、系統特異的なバンドパターンの存在が確認されている。

そこで、抗体産生能の高低に寄与する遺伝子を探るべくはじめの一步として、免疫応答誘導の最初の過程を担う *Mhc* クラス II 遺伝子を構造学的に解析し、抗体産生能との相関を明らかにすることを目的とした。なお、本研究では、*Mhc* クラス II 遺伝子の内、ニワトリにおいてよく解析が進められており、多型性に富むβ鎖をコードする *Mhc* クラス IIB 遺伝子(以下 *CojaCIIB* と示す)について解析を進めた。

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。両系統に存在する *CojaCIIB* 遺伝子を明らかにするために、ゲノム DNA および RNA を鋳型とし各遺伝子座に共通なプライマーを用いた PCR および RT-PCR を行ない、それらの塩基配列を決定した。得られたすべての遺伝子は、既知のニワトリ *Mhc* クラス IIB 遺伝子と比較して新奇なものであり、各遺伝子の命名は試験的に行なった。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(HL3,HL8,HL12)の発現が認められた。一方、L 系においては 10 種類(L2,HL3,L4,L5,L6,L7,HL8,L9,L10,HL11)のゲノム塩基配列の内、4 種類(L5,L6,L7,L10)の遺伝子の発現が認められた。したがって、両系統の *CojaCIIB* 遺伝子は共に多様性に富んでおり、系統間で遺伝子構成に大きな差異が存在することが明らかとなった。さらに、系統特異的な発現遺伝子は、予測されるアミノ酸配列に変換し比較したところ、ペプチド結合領域のアミノ酸残基が変異に富んでいた。つまり、各系統発現遺伝子と外来ペプチドとの結合能の差異が、免疫応答能に影響を与える一因と考えられる。

第二章では、この系統特異的な発現遺伝子の特徴を明らかにすることを試みた。はじめに *CojaCIIB* mRNA を用いた発現解析により、組織特異性の有無を確認した。その結果、末梢リンパ球、用いた臓器(胸腺、脾臓、ファブリキウス囊、肺、肝臓、腎臓)に発現が確認され、系

統間における発現分布および相対的発現量に顕著な差は認められなかった。次に、T 細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球(SRBC)を免疫する実験を行ない、抗体産生と *CojaCIIB* 遺伝子との関連性を検討することを目的として、免疫前後の各 *CojaCIIB* mRNA の相対的発現量を明らかにした。なお、*Mhc* クラス IIB mRNA の相対的発現量を経時的に算出する報告はこれまでにない。その結果、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証明された。さらに、*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。

第三章では、各系統の多様性に富んだ *CojaCIIB* 遺伝子のゲノム内の位置を long-PCR 法により同定した。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様性に富み、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、両系統のウズラには各 2 つずつの遺伝子座(*Coja* major CIIB)が存在していることを発見した。すなわち、H 系では<HL3-HL8>、L 系では<HL3-HL8>、<L5-L6>の各ハプロタイプであった。さらに 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(H 系-HL3、L 系-L5)は、各系統の *Coja* major CIIB 遺伝子の一つであり、かつアレルの関係にあることが明らかとなった。したがって、*Coja* major CIIB 遺伝子のハプロタイプが抗体産生能と相関することが示唆された。

つまり、第二章で示唆された知見と加味すると、*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る。そこで、*CojaCIIB* 遺伝子の発現調節の一端を担う近位プロモーター領域の塩基配列を比較解析したが、主要な転写調節因子は各ローカス間にて高度に保存されており、系統間における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、抗体産生能とハプロタイプとの相関に関しては、L 系のヘテロ *Coja* major CIIB に注目し家系内での F1 の発現タイプ、発現量の解析を試みた結果、<HL3-HL8>の発現レベルが<L5-L6>の発現下で減少することが観察された。さらなる解析が必要だが、<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高い。

本研究は、多様性に富んだ *CojaCIIB* 遺伝子が抗体産生能に寄与することを示し、さらにウズラの *CojaCIIB* 遺伝子はニワトリと比較して遺伝子座が多く、さらに遺伝子構成も異なることを初めて明らかにした。加えて、これまでニワトリにおいて考えられていた *Mhc* の多型が抗体産生レベルを決定するという見方以外に、*Mhc* の発現レベルが抗体産生レベルに相関するという新しい可能性を提案した。このような研究成果は、ウズラの免疫機構を解明する上で非常に有用であり、さらなる研究は養鶏などの産業面、野生鳥類の保護など環境面においても必要であると考えられる。したがって、審査員一同は、当人が農学博士の学位を取得するについて十分な資格を有するとの合意に達した。