

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 銀庭

チンパンジーはヒトとの遺伝子的類似性が 98.6%で最もヒトに近い動物であり、また C 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス感染によりヒトと類似した免疫反応を示すため、これらの感染症のモデルとして用いられている。主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) クラス II 分子は抗原提示細胞 (樹状細胞、B 細胞、マクロファージ、単球、T 細胞の一部など) の表面のみに存在し、生体が免疫機能を果たすのに重要な役割を担っている。MHC クラス II 領域は非常に多型性に富む一群の遺伝子座からなり、それら遺伝子機能の解明は、きわめて大きな意義をもつ。チンパンジー個体が持つ MHC class II 遺伝子のタイピングは日本で飼育されているチンパンジーコロニーの MHC クラス II 遺伝子の多型性を維持するには必須であり、またチンパンジーを用いた HCV ワクチンの開発における基礎データとしても有用である。従って、本研究ではチンパンジーにおけるゲノムの DNA 塩基配列に基づいた各 MHC class II 遺伝子の有用な検索法の確立と遺伝子解析を目的としている。本論文は下記の 3 章からなる。

第 1 章：チンパンジー (*Pan troglodytes*) の MHC class II DPB1 遺伝子に関する解析

チンパンジー-DPB1 の cDNA 塩基配列からチンパンジーゲノム DNA のイントロン 1 及び 2 を含む断片を増幅するプライマーを作成し、エクソン 1 からエクソン 3 までの約 8kb のチンパンジーゲノム DNA の塩基配列を決定した。得られたチンパンジー-DPB1 遺伝子のイントロン 1 及び 2 の塩基配列から新たなプライマーを作成し、エクソン 2 全長を検索するダイレクトシーケンス法や遺伝子クローニングが可能になった。遺伝子の解析を行った結果、22 頭において新たな対立遺伝子である Patr-DPB1*29 を含め 7 つの対立遺伝子が検出された。系統的検索の結果、チンパンジー-DPB1 遺伝子は他のチンパンジー-MHC クラス II 遺伝子より突然変異が多く蓄積されており、また配列モチーフの交換などにより遺伝的多型性を獲得し、種特異的な進化を遂げてきたのではないかと考えられた。

- 第 2 章：PCR 法を用いたチンパンジー (*Pan troglodytes*) の MHC class II DQB1 遺伝子の解析

本章では、チンパンジー-DQB1 遺伝子について PCR-RFLP 法及び遺伝子クローニング法により塩基配列の決定を行なった。結果として、これらの方法はチンパンジー-DQB1 遺伝子の決定に有効であった。特に、制限酵素を用いた PCR-RFLP 法は各個体の lineage の識別に有用であった。今回 25 頭のチンパンジーを解析した結果 2 つの新規対立遺伝子を含めた 6 つの対立遺伝子が同定された。さらに、それらの塩基配列と近縁動物種の DQB1 遺伝子の塩基配列から系統解析を行なったところ、DQB1 遺伝子は lineage 特異的な性質を有していたことが示された。

第 3 章：チンパンジー-MHC class II DRB1 (Patr-DRB1) 遺伝子の識別と遺伝子解析

本章ではチンパンジー-DRB1 遺伝子の検出法として 3 段階 PCR 法を基盤とする方法を確立した。まず、各個体のゲノム DNA に対し、DRB-E1+及び DRB-E3-プライマーを用いて PCR を行い、各個体が持っている *02 lineage を確認した。次に、各個体のゲノム DNA に対してエクソン 2 全長を含む 620bp の遺伝子断片を増幅し、その PCR 産物の塩基配列を決定した。最後にイントロン 2 に存在する lineage 特異的な構成を持つマイクロサテライト領域を増幅する新たなプライマーを作成し、その PCR 産物の解析を行なった。その結果、チンパンジー-DR 領域には DRB1 遺伝子と類似した構造を持つ擬似遺伝子などが存在するが、DRB1 対立遺伝子のみの選別が可能になった。23 頭のチンパンシーにおいて新規対立遺伝子 2 つを含む 9 個の対立遺伝子を同定した。その塩基配列、アミノ酸配列、系統樹の分析の結果、シート構造の部分は安定した lineage 特異的なモチーフを示し、ヘリックス構造の部分に変異が集中していることが分かった。今回見つかった 2 つの新規対立遺伝子の遺伝子置換もヘリックス構造の部分で起きていた。さらに、本章で明らかになったチンパンジー-DRB1 遺伝子におけるマイクロサテライトは各 Patr-DRB1 起源やマイクロサテライトの進化を解析する上で基礎資料として活用できると考えられた。

本論文はチンパンジー-MHC クラス II 遺伝子の特性に合わせた検索法を確立することに成功し、効率的に DPB1, DQB1 及び DRB1 遺伝子の対立遺伝子を検索している。これらの成果は、日本にいるチンパンジーの適切な繁殖維持や霊長類の MHC 分子に対する理解及び研究資源としてのチンパンジーの意義を高めるものであり、獣医学領域での貢献が多岐である。よって、審査委員一同、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。