

学 位 論 文 題 名

ヒト MHC クラス I 遺伝子、*HLA-G* の遺伝的多型性の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

ヒトMHCクラスI抗原の遺伝子の1つである*HLA-G*は胎盤のcytotrophoblastと絨毛癌細胞株に発現し、妊娠維持機構に何らかの役割を担っている可能性があると考えられている。*HLA-G* 遺伝子として、Geraghtyら(1987年)により*HLA-G* ゲノムクローン（以下、*HLA-G*(Orr)とす）が報告されている。また、絨毛癌細胞株BeWoから*HLA-G*(Orr)と相同なcDNA（BeWoG7）がクローニングされている。BeWoG7のcDNAがコードするアミノ酸配列は*HLA-G*(Orr)と同一であるが、塩基配列の相同性は98.2%であり、完全には一致していない。。従来より*HLA-G*は monomorphicとされてきたが、アミノ酸配列が推定できたのは*HLA-G*(Orr)とBeWoG7の2つのみであり、抗原性として monomorphismを確立するためには、より多数の*HLA-G*クローンについての解析が必要である。また、*HLA-G*(Orr)とBeWoG7の遺伝的関係は明らかではない。このため本研究では、*HLA-G*の遺伝的多型性の有無の検討を目的として、ゲノムDNAライブラリーより*HLA-G*領域の遺伝子を新たにクローニングし、その塩基配列解析を行なった。さらに、ヒト細胞ゲノムDNAについてPCR/SSCP法を用いて*HLA-G*の多型性の有無について解析した。

試料と方法

1. サザン・ハイブリダイゼーション

正期産正常胎盤より抽出した高分子DNAを、制限酵素*Eco*RI、*Xba*I、*Hind*IIIで消化後電気泳動し、ニトロセルロース膜へトランスファーした。プローブには、*HLA-G*に特有と思われる3'非翻訳領域の*Pvu*II/*Hinf*I断片を用いた。

2. ノーザン・ハイブリダイゼーション

絨毛癌細胞株JEG-3、JARおよび子宮頸癌細胞株HeLaから抽出したポリ(A)⁺-R

NA をホルムアルデヒド変性条件下で電気泳動し、ニトロセルロース膜にトランスファーし、上述のプロープを用いてハイブリダイゼーションを行なった。また、このメンブランをHLAクラスIのフレーム・ワークにハイブリダイズする HLA-B7をプロープとしてハイブリダイゼーションを行なった。

3. ゲノムライブラリーの作成とクローニング

胎盤ゲノムDNAを制限酵素EcoRIで完全消化し、 λ ZAPIIのEcoRI部位に挿入して部分的ライブラリーを作成した。PvuII/HinfI断片のプロープを用いたブラークハイブリダイゼーションを行ない、450,000個のファージから1個の陽性クローンを得て、これを7.0Eと命名した。

4. 塩基配列の解析

7.0Eをプラスミドにサブクローニングし、ダイデオキシ法を用いて塩基配列を決定した。シークエンスプライマーには、ベクターに相補的なプライマーまたは既知の遺伝子配列に基づいて設計したプライマーを用いた。

5. PCR/SSCP (Polymerase Chain Reaction/Single Strand Conformation Polymorphism) 法

Epstein-BarrウイルスでトランスフォームされたヒトBリンパ芽球細胞株より抽出した高分子ゲノム DNAについて、5'末端を放射性標識したプライマーを用いて3'非翻訳領域の237bpの断片をPCRで増幅した。PCR産物をホルムアミド色素溶液で希釈し、熱変性後、ポリアクリルアミドゲル中で泳動した。

結果

1. HLA-G特異的なプロープの選択

HLA-Gの3'非翻訳領域のPvuII/HinfI断片のプロープとしての妥当性を検討するため、胎盤ゲノムDNAのサザン・ハイブリダイゼーションを行なった。HindIII消化DNAとは約6kb、XbaI消化DNAとは約5kbのDNA断片とそれぞれ単独にハイブリダイズし、既報のHLA-G(Orr)の制限酵素地図と一致することを確認した。また、EcoRI消化DNAとは約7kbのハイブリダイゼーションバンドを示した。ノーザン・ハイブリダイゼーション法では従来の報告と同様に、JEG-3で約1.3kbのバンドを検出した。また HLA-B7をプロープに用いたときにはHeLa、JEG-3で既知の報告と同様の約1.4kbのバンドを検出した。以上より、PvuII/HinfIプロープは特異的にHLA-Gとハイブリダイズすることを確認した。

2. クローン7.0Eの制限酵素地図

クローン7.0Eの制限酵素地図はHLA-G(Orr)のクローンと、1個の*Pst*I切断部位を除き、*Hind*III, *Eco*RI, *Xba*I, *Pst*I制限酵素切断部位で一致していた。

3. クローン7.0Eの塩基配列

クローン7.0Eの3,640bpについて塩基配列を解析した結果、予想されるエクソン、イントロン構造はHLA-G(Orr)のそれと同様で、アミノ酸配列は完全にHLA-G(Orr)と一致していた。5'調節領域のCCAATボックス、TCTAAAボックス、3'非翻訳領域のポリ A付加シグナル、AATAAAはいずれも保存されていた。イントロン・エクソンジャンクションのGT/AG配列に変異はなかった。また、HLA-G(Orr)と比較し、全体で置換が32塩基（そのうちコード領域では5塩基の同義置換）、挿入が5箇所で合計18塩基（そのうち3'非翻訳領域に連続した14塩基の挿入）が認められた。

他方、BeWoG7と7.0Eを比較すると、2塩基の同義置換と3'非翻訳領域での1塩基置換が見いだされたのみであった。BeWoのcDNAクローンに相当する塩基配列合計 1,293bpについて比較すると、7.0Eは HLA-G(Orr)と98.3%の相同性を持ち、BeWoとは 99.8%でより高い相同性を示した。なお既知の塩基配列からHLA-G(Orr)はBeWoと98.2%の相同性を有する。本研究で得られたゲノムクローン7.0EはcDNAクローンBeWoG7のゲノムDNAに相当すると考えられた。

4. ゲノム DNAのPCR/SSCP法による解析

7.0EおよびBeWoG7に存在した3'非翻訳領域の14塩基の挿入部位を挟むDNA断片をPCRで増幅し、SSCP法で解析した。HLAハプロタイプの明かな31検体を含む35検体の細胞株で、7.0Eに相当するバンドは33検体(94%)に、HLA-G(Orr)に相当するバンドは29検体(83%)に認められた。7.0E,HLA-G(Orr)ともに陽性は27検体(77%),7.0Eのみ陽性は 6検体(17%)、HLA-G(Orr)のみ陽性は2検体(6%)に認められた。

なお、試料LD,7565,Rajiでは、HLA-G(Orr)と移動度が異なるバンドが検出され、HLA-G(Orr)にmicroheterogeneityが存在することが明らかとなった。これら3検体は同様の移動度を示した。7.0Eにはmicroheterogeneityは検出されなかった。

なお、HLA-GとHLA-A対立遺伝子との相関については、HLA-G(Orr)のmicroheterogeneityがHLA-A3の抗原を持つ個体にのみ検出されたこと以外に特記すべきことはなかった。

考察

HLA-G遺伝子はmonomorphicとされており、HLA-G(Orr)の配列のみがHLA-G遺伝子として従来から承認されてきた。その後、BeWoからcDNAがクローニングされその塩基配列が報告されたが、コードするアミノ酸配列はHLA-G(Orr)のそれと一致していた。しかし、BeWoG7の3'非翻訳領域には14塩基の挿入があり遺伝子構造上は微妙な違いが存在し、HLA-G(Orr)との遺伝的關係については明らかにされていなかった。また、HLA-Gに特異的な抗体が存在しないためにHLA-Gの多型に関する確実な情報が得られていなかった。

今回7.0Eをクローニングし塩基配列を決定したところ、7.0EはBeWoG7のゲノム遺伝子に相当するクローンであることがわかった。よってBeWoG7は正常な遺伝子であり、BeWoG7/7.0EはHLA-G座の対立遺伝子の1つと考えられる。3'非翻訳領域のPCR/SSCP法の解析の結果、HLA-Gは塩基配列のレベルでHLA-G(Orr)とBeWoG7/7.0Eの2つの対立遺伝子群に分類された。しかし、HLA-G(Orr)と7.0Eから翻訳されるアミノ酸配列が一致することは、HLA-Gの抗原性としてはmonomorphicであることを強く示唆している。今回の研究では3'非翻訳領域のPCR/SSCP解析を基にして多型の有無について検討を行なったが、今後 $\alpha 1$, $\alpha 2$ ドメインについて、HLA-Gのmonomorphismを解析する必要がある。

MHC抗原は著しい多型性を示し、この多型性がT細胞のMHC拘束性と自己寛容性に関わっている。HLA-Gはsemi-allograftである胎盤に発現しており、胎盤が細胞障害性T細胞の反応から免れるためには、HLA-Gがmonomorphicであることが重要であると思われる。よってPCR/SSCP解析の結果を基にして、多数のHLA-G対立遺伝子構造を解析することは、妊娠維持機構におけるHLA-Gの果たす役割を明らかにする上でも重要と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 吉 木 敬

ヒト MHC クラス I 抗原の遺伝子, HLA-G は胎盤の cytotrophoblast と絨毛癌細胞株に発現し, 妊娠維持機構に何らかの役割を担っている。HLA-G 遺伝子として, Geraghty ら (1987 年) により HLA-G ゲノムクローン (以下, HLA-G (Orr) とす) が報告され, 絨毛癌細胞株 BeWo から HLA-G (Orr) と相同な cDNA (BeWoG 7) がクローニングされている。BeWoG 7 の cDNA がコードするアミノ酸配列は HLA-G (Orr) と同一であるが, 塩基配列の相同性は 98.2% であり, 完全には一致していない。従来より HLA-G は monomorphic とされてきたが, アミノ酸配列が推定できたのは HLA-G (Orr) と BeWoG 7 の 2 つのみであり, 抗原性として monomorphism を確立するためには, より多数の HLA-G クローンについての解析が必要である。また, HLA-G (Orr) と BeWoG 7 の遺伝的関係は明らかでない。このため学位申請者は, HLA-G の遺伝的多型性の有無の検討を目的として, ゲノム DNA ライブラリーより HLA-G 領域の遺伝子を新たにクローニングし, その塩基配列解析を行った。さらに, ヒト細胞ゲノム DNA について PCR/SSCP 法を用いて HLA-G の多型性の有無について解析した。

最初に HLA-G の 3' 非翻訳領域の Pvu II/Hinf I 断片のプロープとしての妥当性を検討するため, 胎盤ゲノム DNA のサザン・ハイブリダイゼーションを行った。Hind III 消化 DNA とは約 6 kb, Xba I 消化 DNA とは約 5 kb の DNA 断片とそれぞれ単独にハイブリダイズし, 既報の HLA-G (Orr) の制限酵素地図と一致することを確認した。また, EcoR I 消化 DNA とは約 7 kb のハイブリダイゼーションバンドを示した。ノーザン・ハイブリダイゼーション法では従来の報告と同様に, 絨毛癌細胞株 JEG-3 で約 1.3 kb のバンドを検出した。また HLA-B7 をプロープに用いたときには HeLa, JEG-3 で既知の報告と同様の約 1.4 kb のバンドを検出した。以上より, Pvu II/Hinf I プロープは特異的に HLA-G とハイブリダイズすることを確認した。

胎盤ゲノム DNA を制限酵素 EcoR I で完全消化し, λ ZAP II の EcoR I 部位に挿入して部分的ライブラリーを作成した。Pvu II/Hinf I 断片のプロープを用いたブランクハイブリダ

イゼーションを行い、450,000個のファージから1個の陽性クローンを得て、申請者はこれを7.0Eと命名した。クローン7.0Eの制限酵素地図はHLA-G (Orr) のクローンと、1個のPst I 切断部位を除き、Hind III, EcoR I, Xba I, Pst I 制限酵素切断部位で一致していた。

クローン7.0Eの3,640bpについて塩基配列を解析した結果、予想されるエクソン、イントロン構造はHLA-G(Orr)と同様で、アミノ酸配列は完全にHLA-G (Orr) と一致していた。5'調節領域のCCAATボックス、TCTAAAボックス、3'非翻訳領域のポリA付加シグナル、AATAAAはいずれも保存されていた。イントロン・エクソンジャンクションのGT/AG配列に変異はなかった。また、HLA-G (Orr) と比較し、全体で置換が32塩基（そのうちコード領域では5塩基の同義置換）、挿入が5箇所で合計18塩基（そのうち3'非翻訳領域に連続した14塩基の挿入）が認められた。

他方、BeWoG 7と7.0Eを比較すると、2塩基の同義置換と3'非翻訳領域での1塩基置換が見いだされたのみであった。BeWoのcDNA クローンに相当する塩基配列合計1,293bpについて比較すると、7.0EはHLA-G (Orr) と98.3%の相同性を持ち、BeWoとは99.8%でより高い相同性を示した。従って、本研究で得られたゲノムクローン7.0EはcDNA クローン BeWoG 7のゲノムDNAに相当すると考えられた。

次いで、7.0EおよびBeWoG 7に存在した3'非翻訳領域の14塩基の挿入部位を挟む237bpのDNA断片をPCRで増幅し、SSCP法で解析した。HLAハプロタイプの明らかな31検体を含む35の細胞株で、7.0Eに相当するバンドは33検体（94%）に、HLA-G (Orr) に相当するバンドは29検体（83%）に認められた。7.0E、HLA-G (Orr) とともに陽性は27検体（77%）、7.0Eのみ陽性は6検体（17%）、HLA-G (Orr) のみ陽性は2検体（6%）であった。

なお、3細胞株LD, 7565, Rajiでは、HLA-G (Orr) とは移動度が異なるバンドが検出され、HLA-G (Orr) に microheterogeneity が存在することが明らかとなった。7.0Eには microheterogeneity は検出されなかった。

以上の研究成果をまとめると、1. 学位申請者は日本人の胎盤DNAライブラリーを作製し、HLA-Gに相当するクローン7.0Eを新たに得た。2. 7.0EはHLA-G (Orr) と比較して、3'非翻訳領域に14塩基の挿入を持ちBeWoG 7ゲノムDNAに相当すると考えられ、HLA-Gの遺伝的多型の1つであると申請者は推察した。3. PCR/SSCP解析による多型分析の結果、HLA-G (Orr) /7.0Eヘテロ接合体が77%、7.0Eのホモ接合体が17%、HLA-G (Orr) ホモ接合体が6%であった。HLA-G (Orr) にはSSCPで検出可能な多型が存在し、さらに2つの対立遺伝子群に分類されたが、7.0Eは検索した限りでは、全て同じSSCPパターンを示

した。しかし HLA-G 抗原は monomorphic であることが確認された。

口頭発表に際し、吉木教授より胎盤での HLA-G の発現時期、HLA-G に特異的な抗体の作製について、どのような細胞株で HLA-G が発現しているか、さらに PCR/SSCP 解析で、HLA-G (Orr) と 7.0E の homogenous なパターンを示す細胞株が多かったことの理由などについて、また西 教授より、PCR/SSCP 解析を多数の正常日本人を対象に施行することにより今回の解析結果をより明らかにし得ることが可能かどうか、SSCP による microheterogeneity 解析から予想されるのは塩基置換あるいは挿入と考えてよいのか、などの質問をそれぞれいただきました。学位申請者は的確な解答をなし得たものと判断されました。その後、吉木教授、西 教授には、それぞれ個別に面接試験の上、ご審査をいただき合格の判定を下させていただきます。

以上、玉置淳子の本研究は学位論文に値するものと判定されました。