

学位論文題名

ラットの新しい主要組織適合性抗原クラスII遺伝子
“*RT1. Ha*, *RH1. Hb*, および *RT1. DOa*” の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

主要組織適合性抗原複合体 (Major Histocompatibility Complex: *MHC*) は、免疫調節機能の中心的役割を担っており、そのクラスII遺伝子産物は、 α 鎖および β 鎖の2量体から成り、主に抗原提示細胞 (APCs) に発現している。ラット *MHC* (*RT1*) クラスII亜領域には、*RT1. D* (*HLA-DR*相当) および *RT1. B* (*HLA-DQ*相当) の遺伝子が知られている。近年、ヒト *HLA-DP* 様の新しい遺伝子 *RT1. H* (*Ha*, *Hb*) の存在が示唆されるようになったが、その実体は明らかでない。他方、以前に報告された *RT1. Bb2* は、*HLA-DOB* 相当の遺伝子 (*RT1. DOb*) であることが判明しているが、これまで第3エクソンのみ見つかっており、その全貌は明らかではない。加えて、*DOb* と2量体を形成する α 鎖の遺伝子 (*RT1. DOa*) はまだ見つかっていない。また、マウス *MHC* (*H-2*) のクラスII遺伝子のうち、*Pb* は偽遺伝子であり、それに対する α 鎖遺伝子 (*Pa*) はマウスのゲノムから欠如している可能性が高いと考えられてきた。今回、ラットのゲノムライブラリーを作成して、*H* 遺伝子を単離し、遺伝子構造を決定した。また、同時に *RT1. DOa* も単離することができた。さらに、マウスの *H-2Pa* 遺伝子の有無についても検討を行った。

材料と方法

- 1) 実験動物： 近交系ラット *LEC* (*RT1^l*) ならびに近交系マウス、*AKR/J*、*NOD*、*C3H/HeS1c* を用いた。
- 2) DNAプローブ： ヒト *HLA-DPA*、*HLA-DPB*、マウス *H-2Aa*、*H-2Ea*、ラット *RT1. Ha* (*C20' α* 由来)、*Hb* (*C15 β* 由来) を用いた。
- 3) ゲノムライブラリーの作成とスクリーニング： ラット腎臓DNAを、制限酵素 *SauIIIA1* で部分消化して、ライブラリーを作成した。ブランクハイブリダイゼーションは、 5×10^8 cpm/ μ g 以上の比活性のプローブを用いて 42°C 、12-18時間

行ない、最終的に1x SSC、0.1% SDS、45℃、30分洗浄後、-80℃で2-3日間コダックXPRフィルムに露光させた。単離したクローンについて制限酵素地図を作成し、サブクローニングした後に、自動シーケンサーにて塩基配列を決定した。

4) サザンブロット解析ならびにノーザンブロット解析： ラットならびにマウスの腎臓のDNA 10 μ gを、制限酵素で切断し、0.75%アガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜へサザントランスファーした。膜は、プローブと42℃、12-18時間ハイブリダイゼーションした。ノーザンブロット解析では、脾臓よりグアニジニウムイソチオシアネート/フェノール/クロロホルム法にて抽出した全RNA20 μ gを用いた。

5) PCRとRT-PCR： C5 β とC7 α の間隙をつなぐためのPCRは、ラットDNA 1 μ gを94℃1分、55℃1分、72℃2分の条件で30サイクル行った。RT-PCRでは、LECラットの脾臓の全RNA 1 μ gを42℃、2時間逆転写反応し、第2エクソンと第3エクソンの間でPCRを94℃1分、49℃1分、72℃3分の30サイクル行った。反応産物をアガロース電気泳動してバンドを回収し、塩基配列を決定した。

結 果

1) 新しいRT1遺伝子のクローニング： LECラットのゲノムライブラリーを作成し、HLA-DPプローブにて約150万個のクローンをスクリーニングし、4つの陽性ファージクローンを得た (C7 α 、C20' α 、C5 β およびC15 β)。これらのクローンの制限酵素地図を作成した結果、C7 α とC20' α 、C5 β とC15 β がそれぞれオーバーラップすることが判明した。前者には、RT1. HaおよびRT1. D0aの一部を含んでいた。後者はRT1. Hbを含んでいた。また、C5 β とC7 α の間隙に対してPCRを行なったところ、その長さは345bpであり、4つのファージクローンと1つのPCRクローンは最終的に約37kbをカバーしていた。HbとHaの距離は約1.5kbで逆向きに位置し、HaとD0aの距離は約7kbであった。

2) RT1. Hb遺伝子の構造解析： 第2エクソン (第5コドン) から、予想されるコーディング領域の最後 (終止コドン) までを決定した。Hb遺伝子は β 2ドメイン (Hbコドン171-173) に7bpの欠失があるため、フレームシフト変異を起こし、結果的に13アミノ酸後に終止コドンを生じて偽遺伝子となっていた。173番目にあるべきシステイン残基は上記の欠失によって失われていた。ラットとマウスの β 2ドメインはDNAレベルで85%のホモロジーを有していたが、これら2種は他の動物種に対しては比較的低いホモロジーを示した。

3) RT1. Ha遺伝子の構造と発現： コーディング領域の全ての塩基配列を決定した。Haのエクソン、イントロン構成はヒトのHLA-DPA1と同様であり、塩基の欠失、挿入の変異はなかった。 α 2ドメインについてHaと他の種の相当遺伝子と比較したところ、ウサギ (RLA-DPa) で82%、ヒト (HLA-DPA1) で79%のDNAのホ

モロジーを示した。ノーザンプロット解析では、mRNAは検出できなかったが、RT-PCRでは第2イントロンをスプライシングしたmRNAの断片を増幅した。

4) *RT1. D0a*遺伝子の構造と発現: *D0a*遺伝子は、第1エクソンから細胞膜貫通ドメインの途中までが明らかとなり、エクソン、イントロン構成はヒト*HLA-DNA*と同様であった。 $\alpha 2$ ドメインでの*D0a*と他の種の相当遺伝子との比較では、ヒト (*HLA-DNA*) で84%、マウス (*H-20a*) で93%のDNAのホモロジーを示し、高度に保存されていた。ノーザンプロット解析では、脾臓で2.0kbと3.5kbの2種類のmRNAが検出された。

5) マウス*H-2Pa* 遺伝子の検出: *Ha*をプローブとしてマウスDNAのサザンプロット解析を行った。*AKR*、*C3H*、*NOD*マウスで、1本ないし2本の明らかなバンドが見られ、*DPA*相当遺伝子の存在が示唆された。

考察と結語

5つのクローンの解析によって、ヒトの場合と同様に、*RT1. Ha*と*Hb*とは逆向きに近接して位置し、また*RT1. D0a*遺伝子は*D0b*遺伝子との間にペプチドトランスポーター遺伝子を挟んで存在しており、クラスII重領域の構成はよく保存されていることが判明した。*Hb*遺伝子の $\beta 2$ ドメインにおける7bpの欠失は、過去に報告されたマウス*H-2Pb*遺伝子の $\beta 2$ ドメインの8bpの欠失と良く似ているがその位置は異なる。ラットとマウスの $\beta 2$ ドメインにおけるDNAのホモロジーは両者の欠失を除いて比較すると89%に達し、他の種の相当遺伝子との比較値よりもかなり高い。したがってこの2種は進化上、比較的後期になって分岐したと推察される。*Ha*遺伝子は低いレベルではあるが転写されていたので、他のクラスII β 鎖遺伝子、すなわち*RT1. Bb*、*Db*と結合している可能性もある。*D0a*とマウス*H-20a*の $\alpha 2$ ドメインでのホモロジーは93%ときわめて高く、また*D0a*のノーザンプロット解析で2種類のmRNAが認められたことはヒト*HLA-DNA*の報告に類似するので、*D0a*鎖が*D0b*鎖と結合して発現していることを示唆する。*Ha*プローブによりマウスの*Ha*相当遺伝子 (*H-2Pa*) と思われる明瞭なバンドが3つの系統のマウスで認められた。この結果が正しいとすれば、ラットと同様にマウスにおいても*H-2Pa*遺伝子は*Pb*と*0a*の間に存在することが予想される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

ラットの新しい主要組織適合性抗原クラスII遺伝子 “*RT1. Ha*, *RH1. Hb*, および *RT1. DOa*” の解析

ラットの主要組織適合性抗原複合体 (*RT1*) クラスII亜領域には、*RT1. D* (*HLA-DR*相当) および *RT1. B* (*HLA-DQ*相当) の遺伝子が知られているが、近年ヒト *HLA-DP* 様の新しい遺伝子 *RT1. H* (*Ha*, *Hb*) の存在が示唆されるようになった。他方、以前に報告された *RT1. Bb2* (*RT1. DOb*) は、第3エクソンのみ見つかっており、その全貌は明らかではない。加えて、*DOb* と2量体を形成する α 鎖の遺伝子 (*RT1. DOa*) はまだ見つかっていない。また、マウス *MHC (H-2)* のクラスII遺伝子のうち、*Pb* は偽遺伝子であり、それに対する α 鎖遺伝子 (*Pa*) はマウスのゲノムから欠如している可能性が高いと考えられてきた。申請者はこれらの遺伝子の実体を明らかにすることを目的として実験を行った。

まず、近交系ラット *LEC (RT1^u)* から抽出したDNAを用いて、ゲノムライブラリーを作成し、*HLA-DP* をプローブとしてスクリーニングを行った。単離したクローンについて制限酵素地図を作成し、サブクローニングしたのちに、自動シーケンサーにて塩基配列を決定した。さらに、ラットの各臓器からRNAを抽出してノーザンブロット解析を行った。また、近交系マウス、*AKR/J*, *NOD*, *C3H/HeSlc* を用いて、サザンブロット解析を行った。

得られた結果は次のとおりである。

1) 4つの陽性ファージクローン (*C7 α* , *C20' α* , *C5 β* および *C15 β*) を得、そのうち、*C7 α* と *C20' α* は、*RT1. Ha* および *RT1. DOa* の一部分を含んでいた。*C5 β* と *C15 β* は *RT1. Hb* を含んでいた。また、*C5 β* と *C7 α* の間隙に対してPCRを行なったところ、その長さは345bpであり、全体で約37kbをカバーしていた。*Hb* と *Ha* の距離は約1.5kbで逆向きに位置し、*Ha* と *DOa* の距離は約7kbであった。

2) *RT1. Hb* 遺伝子は第2エクソン以降を決定した結果、 $\beta 2$ ドメインに7bpの欠

失があり、フレームシフト変異を起こし、13アミノ酸後に終止コドンを生じて偽遺伝子となっていた。7bpの欠失は、過去に報告されたマウス *H-2Pb* 遺伝子の $\beta 2$ ドメインの8bpの欠失と良く似ているがその位置は異なる。

3) *RT1.Ha* 遺伝子は、コーディング領域の全ての塩基配列を決定した結果、エクソン、イントロン構成はヒトの *HLA-DPA1* と同様であり、塩基の欠失、挿入の変異はなかった。ノーザンブロット解析では、mRNAは検出できなかったが、RT-PCRでは第2イントロンをスプライシングしたmRNAの断片が増幅され、低いレベルではあるが転写されていた。

4) *RT1.D0a* 遺伝子は全領域の塩基配列を決定した結果、無傷で発現可能であった。 $\alpha 2$ ドメインのホモロジーを比較すると、マウス (*H-20a*) で93%となり高度に保存されていた。ノーザンブロット解析では、脾臓で2.0kbと3.5kbの2種類のmRNAが検出された。また、*RT1.D0b* のノーザンブロット解析では、3.0kbのmRNAが検出された。したがって *D0a* 鎖が *D0b* 鎖と結合して発現している可能性が高いことを示唆する。

5) *RT1.Ha* をプローブとしてマウスDNAのサザンブロット解析を行った結果、*AKR*、*C3H*、*NOD* マウスで、1本ないし2本の明らかなバンドが見られた。*DPA* 相当遺伝子 (*H-2Pa*) の存在が示唆され、さらにラットと同様にマウスにおいても *H-2Pa* 遺伝子は *Pb* と *0a* の間に存在することが予想される。

口頭発表にあたり小野江教授から *RT1.D0* とほかのクラシカル クラスII抗原との違いについて、吉木教授から *RT1.D0* mRNAが検出される細胞ならびに組織の種類について質問があったが、申請者はそれぞれ適切な応答をなしたと思われた。さらに、両教授から個別に諮問を受け合格と判定された。本論文は、実験モデル動物として有用なラットの主要組織適合性抗原の一部を世界で初めて明らかにし、さらに、これまでにその存在が知られていなかったマウスの *H-2Pa* 遺伝子の存在を示唆したものであり、博士 (医学) に相当すると考えられた。