

学 位 論 文 題 名

Structural and Phylogenetic Analysis of the MHC Class I-Like Fc Receptor Gene

(MHC クラス I 様 Fc リセプター遺伝子の構造及び系統分類の解析)

学位論文内容の要旨

哺乳動物の新生仔の免疫系は成体と比較して十分に発達していないため、病原菌などの異物に対する防御が不完全である。そのため、新生仔では、母体由来の免疫グロブリンによる受動免疫が生体防御上重要な役割を担っている。ヒトでは、母体由来の免疫グロブリンは主として胎盤を経由して胎児に移行する。それに対し、マウスなどの齧歯類は、主に初乳を摂取することにより母体由来の免疫グロブリンを獲得する。生後まもないマウスの小腸上皮細胞膜面上に発現され、母乳中の免疫グロブリンを吸収する役割を果たしているのが neonatal intestinal Fc リセプター (FcRn) である。FcRn 分子と IgG 分子は腸管内腔の pH である pH 6.0-6.5 条件下では結合し得るが、腸上皮細胞基底側の pH である pH 7.0-7.5 条件下では解離する。このため、IgG の一方向的な輸送、すなわち腸管内腔から新生仔循環系への移行が可能となる。

授乳中のマウス小腸上皮細胞から単離された FcRn 分子は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子と構造的に類似している。すなわち、FcRn 重鎖の 3 個の細胞外ドメインはクラス I 分子の対応するドメインと類似した構造をもっており、また両分子の軽鎖はともに $\beta 2$ -ミクログロブリンである。本論文では、マウス FcRn 分子重鎖をコードする遺伝子 (遺伝子名 Fcgrt) をクローニングし、その構造を決定するとともに、本遺伝子の多型の有無、他のクラス I 遺伝子との関係を明らかにした。

マウス FcRn 分子重鎖をコードする cDNA クローンの単離

FcRn 分子重鎖をコードする完全長 cDNA クローンは BALB/c 新生仔マウスの近位小腸から調製した cDNA を鋳型として PCR 法により分離した。cDNA クローンの塩基配列を決定することにより、マウス FcRn 分子重鎖の一次構造を決定した。

マウス FcRn 分子重鎖をコードするゲノミック・クローンの単離

FcRn 分子重鎖 cDNA クローンをプローブとして BALB/c マウス EMBL3 ライブラリーをスクリーニングすることにより、FcRn 分子重鎖をコードする 3 個のゲノミック・クローン (λ 2-1-5、 λ 1-4-3、 λ B) を得た。マウス FcRn 分子重鎖をコードする遺伝子

(Fcgrt) は合計 7 個のエクソンからなり、約 11 kb の全長を有していた。個々の機能的ドメイン ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ドメイン、膜貫通領域、細胞内領域) が各々別のエクソンによってコードされているという点で、Fcgrt 遺伝子の構造は MHC クラス I 遺伝子のそれと類似しており、本遺伝子がクラス I 遺伝子の一つであることがエクソン・イントロン構造の比較から実証された。しかし、MHC クラス I 遺伝子と異なり、Fcgrt 遺伝子の 5' 非翻訳領域は 2 個のエクソンに分割されていた。また、MHC クラス I 遺伝子では通常 3 個のエクソンによってコードされる細胞内領域と 3' 非翻訳領域が Fcgrt 遺伝子では 1 個のエクソンによってコードされていた。cDNA プロブを用いたサザン・ブロット解析の結果、マウス・ゲノムには Fcgrt 遺伝子は 1 コピーしか存在しないことが明らかとなった。

マウス Fcgrt 遺伝子の転写開始部位の決定と 5' フランキング領域の構造的特性

プライマー伸長反応法および RNase プロテクション法を用いることにより、マウス Fcgrt 遺伝子の転写開始部位を決定した。その結果、Fcgrt 遺伝子は翻訳開始部位の上流 316 bp と 284 bp の位置に主要な転写開始部位を持っていることが明らかとなった。転写開始部位の上流域には明確な TATA ボックスや CAAT ボックスは存在せず、そのかわりに SP1 結合モチーフとよく合致する配列が、-278 bp から -270 bp、-101 bp から -93 bp の位置に認められた。また、Fcgrt 遺伝子のプロモーター領域には、MHC クラス I 遺伝子に特徴的なエンハンサー A、B 配列や interferon response element は存在せず、かわりに IL-6 によって誘導される転写因子 NF-IL6 の結合モチーフが見いだされた。

Fcgrt 遺伝子の系統分類分析

Fcgrt 遺伝子と他のクラス I 遺伝子との進化的関係を近隣接合法を用いて系統樹を作製することにより検討した。Fcgrt 遺伝子は、他の MHC クラス I 遺伝子とクラスターを形成せず、また既知の MHC 外でコードされるクラス I 遺伝子ともクラスターを形成しなかった。以上から、Fcgrt 遺伝子は他のクラス I 遺伝子とは特に近縁でないことが判明した。系統樹の分岐パターンの解析から、Fcgrt 遺伝子は両生類が出現した後、哺乳類が出現する前の段階で MHC クラス I 遺伝子から分岐して誕生した遺伝子であることが示唆された。

マウス Fcgrt 遺伝子の多型

8系統の純系マウスから PCR 法によって増幅した Fcgrt 遺伝子の塩基配列を比較することにより、本遺伝子には、低レベルの多型が存在し、アミノ酸置換を伴った少なくとも 3 個のアリルが存在することが判明した。興味深いことに、多型残基の一つは IgG の Fc 部位と相互作用する部位に位置していた。

Fcgrt 遺伝子の進化的保存

マウス Fcgrt 遺伝子をプローブとして "Zoo" プロット解析を行なうことにより、Fcgrt 様遺伝子が他の動物種にも検出されるか否かを検討した。その結果、齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ）のみならず、ヒト、ニワトリにも Fcgrt 様遺伝子が存在することが示唆された。

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 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Structural and Phylogenetic Analysis of the MHC Class I-Like Fc Receptor Gene

(MHC クラス I 様 Fc リセプター遺伝子の構造及び系統分類の解析)

哺乳動物の新生仔の免疫系は成体と比較して十分に発達していないため、病原菌などの異物に対する防御が不完全である。そのため、新生仔では、母体由来の免疫グロブリンによる受動免疫が生体防御上重要な役割を担っている。マウスなどの齧歯類は、主に初乳を摂取することにより母体由来の免疫グロブリンを獲得する。生後まもないマウスの小腸上皮細胞膜面上に発現され、母乳中の免疫グロブリン吸収する役割を果たしているのが neonatal intestinal Fcリセプター (FcRn)である。FcRn 分子と IgG 分子は腸管内腔の pH 6.0-6.5 条件下では結合し得るが、腸上皮細胞基底側の pH である pH 7.0-7.5 条件下では解離する。このため、IgG の腸管内腔から新生仔循環系への一方向的な移行が可能となる。授乳中のマウス小腸上皮細胞から単離された FcRn 分子は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子と構造的に類似している。申請者は、マウス FcRn 分子重鎖をコードする遺伝子 (遺伝子名 *Fcgrt*) をクローニングし、その構造を決定するとともに、本遺伝子の多型の有無、他のクラス I 遺伝子との関係を明らかにした。

1. FcRn 分子重鎖をコードする完全長 cDNA クローンは BALB/c 新生仔マウスの近位小腸から調製した cDNA を鋳型として PCR 法により分離した。cDNA クローンの塩基配列を決定することにより、マウス FcRn 分子重鎖の一次構造を決定した。

2. FcRn 分子重鎖 cDNA クローンをプローブとして BALB/c マウス EMBL3 ライブラリーをスクリーニングすることにより、FcRn 分子重鎖をコードする 3 個のゲノミック・クローン (λ 2-1-5, λ 1-4-3, λ B) を得た。マウス FcRn 分子重鎖をコードする遺伝子 (*Fcgrt*) は合計 7 個のエクソンからなり、約11kb の全長を有していた。個々の機能的ドメイン (α 1, α 2, α 3 ドメイン、膜貫通領域、細胞内領域) が各々別々のエクソンによってコードされており、本遺伝子がクラス I 遺伝子の一つであることが実証された。しかし、MHC クラス I 遺伝子と異なり、*Fcgrt* 遺伝子の 5' 非翻訳領域は 2 個のエクソンに分割されていた。また、MHC クラス I 遺伝子では通常 3 個のエクソンによってコードされる細胞内領域と 3' 非翻訳領域が *Fcgrt* 遺伝子では 1 個のエクソンによってコードされていた。マウス・ゲノムには *Fcgrt* 遺伝子は 1 コピーしか存在しないことが明らかとなった。

3. プライマー伸長反応法および RNase プロテクション法を用いることにより、マウス *Fcgrt* 遺

伝子は翻訳開始部位の上流316 bp と 284 bp の位置に主要な転写開始部位を持っていることが明らかとなった。転写開始部位の上流域には明確な TATA ボックスや CAAT ボックスは存在せず、そのかわりに SP1 結合モチーフとよく合致する配列が、-278 bp から -270 bp、-101 bp から -93 bp の位置に認められた。また、*Fcgrt* 遺伝子のプロモーター領域には、MHC クラス I 遺伝子に特徴的なエンハンサー A、B 配列や interferon response element は存在せず、かわりに IL-6 によって誘導される転写因子 NF-IL6 の結合モチーフが見いだされた。

4. *Fcgrt* 遺伝子と他のクラス I 遺伝子との進化的関係を近隣接合法を用いて系統樹を作製することにより検討した。その結果、*Fcgrt* 遺伝子は他のクラス I 遺伝子とは特に近縁でないことが判明した。系統樹の分岐パターンの解析から、*Fcgrt* 遺伝子は両生類が出現した後、哺乳類が出現する前の段階で MHC クラス I 遺伝子から分岐して誕生した遺伝子であることが示唆された。また、マウス *Fcgrt* 遺伝子をプローブとした "Zoo" プロット解析の結果、*Fcgrt* 様遺伝子は齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ）のみならず、ヒト、ニワトリにも存在することが示唆された。

5. 純系マウス8系統の *Fcgrt* 遺伝子の塩基配列を比較した結果、本遺伝子には、低レベルの多型が存在し、アミノ酸置換を伴った少なくとも3個のアリルが存在することが判明した。興味深いことに、多型残基の一つは IgG の Fc 部位と相互作用する部位に位置していた。

公開発表にあたり、副査の小野江教授から、FcRn遺伝子の用語名、遺伝子発現調節要素、FcRnの生理学的機能、鳥類におけるFcRn様タンパクの存在意義について、主査の柿沼から、FcRnが小腸上皮に発現する期間、他動物種のIgGとの交差結合について、副査の上出教授からはFcRnのIgG結合領域についてなど多数の質問があったが申請者は適切な回答をなし得た。

審査員一同は本研究の学術的成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。