

学 位 論 文 題 名

ラットの主要組織適合性複合体クラス II 遺伝子

RT1-DOa および *-DOb* の解析

学位論文内容の要旨

主要組織適合性複合体(Major Histocompatibility Complex: MHC)は、免疫調節機能の中心的役割を担っており、クラス I, クラス II 遺伝子系に大別される。このうち、クラス II 遺伝子産物は、 α 鎖および β 鎖の 2 量体からなる糖タンパク質で、抗原提示細胞で発現している。その機能としては、貪食、消化した外来性抗原を結合して CD4 陽性 T 細胞に提示し、それを活性化することが知られている。第 20 染色体上に存在するラット MHC(*RT1*)クラス II 領域の遺伝子構成はヒトおよびマウスと同様であり抗原提示能をもつ *RT1-D*(HLA-DR 相当)および *RT1-B*(HLA-DQ 相当)の遺伝子のほかに、偽遺伝子になった *RT1-H*, 輸送タンパク(*Tap*) などの遺伝子が存在する。本論文はクラス II 領域に存在する *RT1-DOa* および *RT1-DOb* の遺伝子構造と発現、ならびに、*RT1-DOb* の多型を解析した結果を纏めた。

[実験材料と方法]

1. ラット: 北海道大学医学部付属動物実験施設あるいは北海道大学実験生物センターから供給された 21 系統(自然発生 *RT1* 内組換えラット 5 系統を含む)の近交系ラットを用いた。

2. ライブラリー、遺伝子クローニング、および、PCR: ゲノムライブラリーは Arimura らが LEC ラット(*RT1^d*)の腎臓 DNA を λ DASH ファージに組み込んだもの、cDNA ライブラリーは Sprague-Dawley(SD)ラット(*RT1^b*あるいは *RT1^k*)の脾臓 cDNA を λ gt10 に組み込んだもの(Stratagene)を用いた。ゲノムライブラリーはヒトの *HLA-DPA* プロンプ、および、既に偽遺伝子として報告されていた Wistar ラットの *RT1-DOb* の部分的塩基配列をもとに、LEC のゲノム DNA を鋳型にして PCR で増幅した断片を用いてスクリーニングした。cDNA ライブラリーは LEC の *RT1-DOb* のエクソン 2 を含む DNA 断片でスクリーニングした。そのほかに、必要に応じてゲノム遺伝子の一部を PCR で、あるいは、LEC ラットの脾臓の mRNA を RT-PCR で増幅した。得られた DNA 断片をプラスミドにサブクローニングした後に、それらの塩基配列を自動シーケンサー 373A(ABI)で決定した。

3. ノーザン解析: RNA は各種臓器からグアニジウム/フェノール/クロロフォルム法で抽出した。全 RNA あるいはオリゴデックス法で選別したポリ(A)+RNA をノーザン解析に用いた。

[結果]

1. *RT1-DOa* 遺伝子の構造解析および発現

RT1-H 遺伝子をクローニングしたときに得られた陽性ファージクローンのうち、クローン C7 α

と C20 α は HLA-DPA プローブにもハイブリダイズした。これらのクローンには RT1-DOa のエクソン 1 から細胞膜貫通ドメインの途中までが含まれていた。そこで、3'RACE を用いて RT1-DOa の 3'部分の cDNA を合成し塩基配列を決定し、明らかになった 3'非翻訳領域の塩基配列とエクソン 3 との間で PCR を行い、3'側のエクソン、イントロン構成を決定した。RT1-DOa のエクソン、イントロン構成はヒトの HLA-DNA およびマウスの H2-Oa と同じく、5つのエクソン、すなわち、5'非翻訳領域-シグナルペプチド、 $\alpha 1$ ドメイン、 $\alpha 2$ ドメイン、結合部-膜貫通部-細胞内ドメイン、および、細胞内ドメインの末端と引き続く 3'非翻訳領域から構成され、225 アミノ酸のポリペプチドをコードすることがわかった。予想される糖鎖付加部位および $\alpha 2$ ドメインにおけるループ形成に必要なシステイン残基は、マウスおよびヒトのホモログと同じ位置にあった。ノーザンブロット解析により LEC の脾臓で 2.0kb/3.0 kb の 2 種類の mRNA が検出された。

2. RT1-DOb 遺伝子の構造解析および発現

RT1-DOb 遺伝子は 1985 年に偽遺伝子 A $\beta 2$ としてゲノム遺伝子の一部が報告されたまま、その後解析されていない。今回、RT1-DOb を含む LEC のゲノム DNA 8818bp、さらに、SD の cDNA 1082 bp の塩基配列を解析した。RT1-DOb 遺伝子はシグナルペプチドを除いて 246 アミノ酸のポリペプチドをコードし、ヒトやマウス同様に 6 つのエクソン、すなわち、5'非翻訳領域-シグナルペプチド、 $\beta 1$ ドメイン、 $\beta 2$ ドメイン、結合部-膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン 1、および、細胞内ドメイン 2-3'非翻訳領域の 6 つのエクソンからなり、約 7 kb に亘って存在する。予想される糖鎖付加部位および $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ドメインにおけるループ形成に必要なシステイン残基は、マウスおよびヒトのホモログと同じ位置にあった。一方、cDNA 塩基配列は翻訳開始コドンの 10 bp 上流から始まっていた。LEC のゲノム DNA と SD の cDNA のコーディング領域の塩基酸配列を比較すると、シグナルペプチドは同一で、 $\beta 1$ ドメインには 3 塩基置換があったが、全て同義置換であった。これに対して、 $\beta 2$ ドメインには 10 塩基の置換があり、3 アミノ酸置換を伴っていた。ノーザンブロット解析により脾臓で 1.2 kb/1.9 kb の 2 種類の mRNA が検出された。

3. RT1-DOb の $\beta 1$ ドメインの多型解析

21 系統のラットの $\beta 1$ ドメインの配列を比較した結果、塩基配列では 6 型に分かれ、アミノ酸レベルでは 4 型に分類された。これをクラス II 領域の他の遺伝子との連鎖を考慮して分類すると、対立遺伝子として *u*, *a*, *k*, *b*, *l*, *q*, *n*, および、*d* が区別できた。*u* と比べて *a* は同一、*k* および *b* は 3 つの同義置換、*l* は L44F と 3 つの同義置換、*q* は L44F, A58T と 3 つの同義置換、*n* は L44F と 2 つの同義置換、*d* は L44F および V56M と 2 つの同義置換があった。

[考察]

1. RT1-DO 分子は遺伝子構造が完全に保たれ、マウスやヒトと同様におもに脾臓で発現している。この分子のホモログの研究はヒト (HLA-DNA/DOB) で最も進んでおり、細胞表面には存在せずに、細胞質で HLA-DM 分子あるいは II 鎖と相互作用し、抗原ペプチドとは直接結合しないと報告されている。RT1-DOb の $\beta 1$ ドメインが多型が少なく保存されてきたのは蛋白間相互作用が $\beta 1$ ドメインで行われるためかもしれない。

2. RT1-DOb の $\beta 1$ ドメインの多型を利用して、クラス II 領域内の組換えラット, LEJ, KGH, WIN における組換え部位を DOa と DOb の間に特定できた。

3. ラットのクラス II 領域の動原体から遠位の境界から *Tap1* までの物理的地図は Lund のグルー

ブによって作製されている。一方、近位の境界から *RT1-Hb* までのコスミドコンテイングが Gunther のグループによって報告された。本研究を含めて著者たちの研究室で作製された約 37 kb のファージコンテイングは Gunther らのコスミドコンテイング約 58 kb と連結し、動原体側の約 80 kb がマップされたことになる。クラス II 領域の中間部 *DOa* から *Tap1* まで約 80 kb の地図はまだ完成されていないが、この間には *DMA*, *DMb* および *Lmp2* の遺伝子座が存在するものと思われる。

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 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

ラットの主要組織適合性複合体クラス II 遺伝子

RT1-DOa および *-DOb* の解析

主要組織適合性複合体(Major Histocompatibility Complex: MHC)は、免疫調節機能の中心的役割を担っており、クラス I, クラス II 遺伝子系に大別される。このうち、クラス II 遺伝子産物は、 α 鎖および β 鎖の 2 量体からなる糖タンパク質で、抗原提示細胞で発現している。その機能としては、食食、消化した外来性抗原を結合して CD4 陽性 T 細胞に提示し、それを活性化することが知られている。第 20 染色体上に存在するラット MHC(*RT1*)クラス II 領域の遺伝子構成はヒトおよびマウスと同様であり、抗原提示能をもつ *RT1-D*(HLA-*DR* 相当)および *RT1-B*(HLA-*DQ* 相当)の遺伝子のほかに、偽遺伝子になった *RT1-H*, 輸送タンパク(*Tap*) などの遺伝子が存在する。本論文はクラス II 領域に存在する *RT1-DOa* および *RT1-DOb* の遺伝子構造と発現、ならびに、*RT1-DOb* の多型を解析した結果を学位申請論文として纏めた。

ゲノムライブラリーは LEC ラット(*RT1^u*)の腎臓 DNA を λ DASH フェージに組み込んだもの、cDNA ライブラリーは Sprague-Dawley(SD)ラット(*RT1^b* あるいは *RT1^k*) の脾臓 cDNA を λ gt11 に組み込んだものを用い、通常の分子生物学的手法によって解析した

RT1-DOa のエクソン/イントロン構成はヒトの *HLA-DNA* およびマウスの *H2-Oa* と同じく、5 つのエクソン、すなわち、5'非翻訳領域-シグナルペプチド、 $\alpha 1$ ドメイン、 $\alpha 2$ ドメイン、結合部-膜貫通部-細胞内ドメイン、および、細胞内ドメインの末端と引き続く 3'非翻訳領域から構成され、225 アミノ酸のポリペプチド鎖をコードすることがわかった。

RT1-DOb を含む LEC のゲノム DNA 8818 bp, さらに、SD の cDNA 1082 bp の塩基配列を解析した。*RT1-DOb* 遺伝子はシグナルペプチドを除いて 246 アミノ酸のポリペプチド鎖をコードし、ヒトやマウス同様に 6 つのエクソン、すなわち、5'非翻訳領域-シグナルペプチド、 $\beta 1$ ドメイン、 $\beta 2$ ドメイン、結合部、膜貫通ドメイン-細胞内ドメイン 1、および、細胞内ドメイン 2 - 3'非翻訳領域の 6 つのエクソンからなり、cDNA 塩基配列は翻訳開始コドンの 10bp 上流から始まっていた。LEC のゲノム DNA と SD の cDNA のコーディング領域の塩基配列を比較すると、シグナルペプチドは同一で、 $\beta 1$ ドメインには 3 塩基置換があったが、全て同義置換であった。これに対して、 $\beta 2$ ドメインには 10 塩基の置換があり、3 アミノ酸置換を伴っていた。

ノーザンブロット解析により LEC の脾臓で 2.0 kb/3.0 kb の 2 種類の *RT1-DOa* mRNA, 1.2 kb/1.9

kb の 2 種類の *RT1-DOb* mRNA が検出された。

北海道大学実験生物センターおよび北海道大学医学部動物実験施設において維持されている 21 系統のラットの *RT1-DOb* 遺伝子の $\beta 1$ ドメインの配列を比較した結果、対立遺伝子として *u*, *a*, *k*, *b*, *l*, *q*, *n*, および *d* が区別できた。*u* と比べて *a* は同一、*k* および *b* は 3 つの同義置換、*l* は L44F と 3 つの同義置換、*q* は L44F, A58T と 3 つの同義置換、*n* は L44F と 2 つの同義置換、*d* は L44F および V56M と 2 つの同義置換があった。

公開發表に当たり副査の守内教授から LEC ラットを用いて遺伝子解析を行った理由、*RT1-DOb* 遺伝子がかって偽遺伝子と考えられていた理由、 $\beta 1$ ドメインは多型が少ないので、他の部位の配列を用いて対立遺伝子の分類を行う必要があるのではないか、GA リピートは系統によって一定しているか、*RT1-DO* 抗原の細胞内における存在部位について等の質問、また、小野江教授からは $\beta 2$ ドメインではなくて $\beta 1$ ドメインの多型を調べた理由、マウスの胸腺において *RT1-DO* が発現している細胞について質問とコメントがあったが、申請者は自分の実験結果、および文献を用いて適格な解答をなしえたと思われた。

この論文はこれまでに解析されていなかったラットの *RT1-DOa* および *RT1-DOb* 遺伝子が免疫関連細胞において発現しており、それらは多型に乏しいこと、*RT1* クラス II 領域の染色体地図の完成に向けて大きく貢献したこと、さらに、これまで知られているクラス II 領域内遺伝子組換え点を狭い範囲に収斂させたことなど多くの新知見がみとめられる。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。