

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700446

研究課題名(和文) 実験動物として現存するコモンマーモセットの MHC ハプロタイプ数の推定

研究課題名(英文) Estimate of the number of MHC haplotypes of a common marmoset

研究代表者

高林 秀次 (SHUJI TAKABAYASHI)

研究者番号：70372521

研究成果の概要(和文)：本研究はコモンマーモセットの(主要組織適合複合体) MHC 遺伝子の遺伝子型判定法を確立し、MHC クラス I およびクラス II のコモンマーモセット個体における遺伝子多型を明らかにすることを目的に行なった。はじめに MHC クラス II の *Caja-DQA1*、*DQB1*、*DRA1* および *DRB1\*03* のエクソン 2 について PCR 法を用いた遺伝子型の判定方法を確立し、その多型性について解析を行った。つぎに、MHC クラス I の *Caja-G* のエクソン 3 について PCR 法を用いた遺伝子型の判定方法を確立し、その多型性について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：This study aims at establishing the PCR-based major histocompatibility complex (MHC) genotyping methods for the common marmosets and identifying genetic polymorphism of MHC class I and class II gene in individual marmosets. I present here a first step in the molecular characterization of the common marmoset's MHC class II genes, *Caja-DQA1*, *DQB1*, *DRA1* and *DRB1\*03* by nucleotide sequence analysis of the polymorphic exon 2 segments. Next step, I analyzed the molecular characterization of the common marmoset's MHC class I, *Caja-G* gene by nucleotide sequence analysis of the polymorphic exon 3 segments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：コモンマーモセット、主要組織適合複合体 (MHC)

## 1. 研究開始当初の背景

真猿類マーモセット属のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) (以下、マーモセットと呼ぶ) は、マカク属のカニクイザルおよびアカゲザルと比較して、(1)小型で片手で捕まえられる、(2)性成熟が約 1.5 年と早く、世代交代時間が短い、(3)平均産仔数が 3 頭であり、1 頭の雌の出産回数が多いなど、実験動物としての利点を持つことが知られている。最近、マーモセットを用いて生殖工学や ES 細胞の樹立、iPS 細胞の開発などの再生医療に向けた基礎研究および応用研究が行われてきている。

申請者の施設では実験動物中央研究所由来のコモンマーモセットを用いて 2007 年より繁殖を開始した。維持、繁殖と平行してマウスで培った遺伝学的手法を用い、マーモセットのゲノムマーカーの開発研究を行った。

マーモセットの応用研究が進む一方、マーモセットのゲノム情報はあまり明らかにされていない。特に、免疫系に関わる MHC に関する報告は少ない。このような現状はマーモセットを移植やがん研究などの応用研究に利用する妨げになっていると考えられる。MHC 分子は感染病原体やがん細胞の排除及び臓器移植の拒絶反応などに関与し、免疫にとって重要な働きをする。MHC はヒトでは HLA (Human Leukocyte Antigen) と呼ばれ、マーモセットでは Caja と呼ぶ。MHC 分子は大きく分けてクラス I とクラス II の 2 種類がある。代表的なものにクラス I 分子には HLA-A、-B、-C、クラス II 分子には HLA-DR、-DQ があり、それぞれの遺伝子が個体間で非常に多様性に富んでいる。MHC を含む領域は全長 3.6Mbp 以上におよぶ遺伝子複合体を形成し、1 組のまとまったハプロタイプとして親から子へ遺伝する。

子は父親由来、母親由来のハプロタイプを 1 組ずつ受け継ぐ。骨髄移植や臓器移植において HLA-A-B-DRB1 の 3 座位で構成されるハプロタイプは特に重要で、これら不一致が GVHD (移植片対宿主病) などの拒絶反応を引き起こし、術後の生存率にも影響する。マーモセットにおいてはクラス II の DRB、DQA1、DQB1 及び DQB2 のエクソン 2 に個体間で多型が存在することが報告されている (Artunes et al. 1998, Wu et al. 2000, Shilpanjali et al., 2006)。しかし、クラス I についての報告はまだない。ハプロタイプについても明らかにされていない。最近、

## 2. 研究の目的

本研究は、次の 2 点を明らかにすることを目的に実施される。

(1) コモンマーモセットの MHC クラス I およ

びクラス II の遺伝子レベルでの検査法の確立。

(2) 我々が保有するコモンマーモセット集団を調査することにより Caja MHC クラス I およびクラス II におけるアレル数を明らかにすると共にハプロタイプを推定する。

## 3. 研究の方法

当施設で維持しているマーモセットを対象に MHC クラス I およびクラス II の多型を調べた。マーモセットの MHC クラス I

(*Caja-G*) エクソン 3 領域およびクラス II (*DQA1*、*DQB1*、*DRA1* および *DRB1*) のエクソン 2 領域を増幅可能な PCR プライマーをそれぞれ設計した。マーモセットの耳片より抽出した DNA 溶液を用いて、各遺伝子について PCR を行った。PCR 産物をダイレクトシーケンスまたはサブクローニングしてからシーケンスを行った。

## 4. 研究成果

【結果】はじめに 35 頭のマーモセットの MHC クラス II のアレル数は、*DQA1* (図 1)、*DQB1* (図 2)、*DRA1* (図 3) および *DRB1\*03* (図 4) でそれぞれ、2、3、2 および 15 であった。*DQA1*、*DQB1* および *DRA1* で見つかった多型は synonymous SNP であり、アレル間でアミノ酸置換がなかった。一方、*DRB1\*03* にはアミノ酸置換を伴う 15 個のアレルが存在し、そのうち 6 個の新しいアレルを明らかにした。77 頭のマーモセットを調べた結果、既知の *DRB1\*0301* アレルが最も頻度が高かった (約 90%)。

次にクラス I の *Caja-G* について遺伝子型検査法を確立した。その結果、アミノ酸配列が異なる 14 アレルを発見した (図 5)。そのうち、13 アレルは NCBI のデータベース上に存在しない新規のものであった。

図 1. *Caja-DQA1* エクソン 2 領域の多型  
I3101 タイプは既知の *Caja-DQA1\*2501* と同じであった。I3101 タイプと I3220a タイ



プのアミノ酸配列は同じ

図 2. *Caja-DQB1* エクソン 2 領域の多型  
アミノ酸配列はすべて同じ

I3101 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G  
 I3103 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G  
 I3268 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G

I3101 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C G G G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G  
 I3103 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C G G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G  
 I3268 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C C C G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G

I3101 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C  
 I3103 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C  
 I3268 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C

I3101 C C G A T C T 247  
 I3103 C C G A T C T 247  
 I3268 C C G A T C T 247

図 3. *Caja-DRB1* エクソン 2 領域の多型  
アミノ酸配列はすべて同じ

I3101 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G  
 I3103 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G  
 I3268 C G A T T C A T C T A T A A C C G A G A G G A G T A C C T G C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G G A G T A C C T G

I3101 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C G G G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G  
 I3103 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C C C G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G  
 I3268 C C G G T G A C C C C C T G G G G C C C C C G A T G C T G A G T A C T T G A A C A G C C A G A A G G A C T T A C T G

I3101 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C  
 I3103 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C  
 I3268 F A C A G G A C C C G G G C G G A G C T G G A C A C G G T G T G C A G A C A C A A C T A C C A G C T G G A G T T C C C C

I3101 C C G A T C T 247  
 I3103 C C G A T C T 247  
 I3268 C C G A T C T 247

図 4. *Caja-DRB1\*03* エクソン 2 領域の多型  
赤字で示した箇所に塩基置換有り

5' -CAAGTTTCTGGAGTATAGCACGTCGAGTGTCAATTTCTTCAACG  
 GGAGGAGCGGTGCGGCTCTGGAGAGATATCTCTAAYCAGAGAA  
 GATATGCGCTTCAGACAGGAGCTGGGGAGTTCGGGGCGTGACGGAG  
 CTGGGGGGCTGACCGGAGTCTGGGACAGCCAGAGGAGCTCTCTG  
 AGSASAGGCGGGCSGGTGGACACCTGCTGAGACACAACTACGAGAT  
 TTYAGASAGGTTCTAGTGGCCGGGAGAG-3' (270bp)

図 5. *Caja-G* エクソン 3 領域の多型  
赤字で示した箇所に塩基置換有り

5'-GGTCTCACACYFWCCAKKKKATGTM YGGCTGCGACGTGGGGCCG  
 GACC SGGCCCTCCTCCGYGGGTA YBBS CRG BAYGCCTAYGACGGCAR  
 GGACTACATGCCCTGAACGAGGACCTGGCTCCTGGAAGCGGGGG  
 ACKTGGCKRCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCKGCCAATGCG  
 GCTGAGRRGWRGAGAGCCTACCTGGAGGGCAVGTGCTGGAGTGGCT  
 CCRGAGATACCTGGAGAACGSGAAGGAGAGCCTGCAGMGGCGG-3'

【考察】マーモセットの MHC クラス II の遺伝子多型は *DQB1*、*DQA1* および *DRB1* において、それぞれ、4、2 および 12 のアレルがあることが報告されている。今回、我々のコロニーについて調べた結果、*DQA1*、*DQB1* および *DRA1* には SNP が存在することが明らかとなった。しかし、すべて既報告と同じアミノ酸配列であった。*DRB1* にはアミノ酸置換を伴うような多型が認められ、6 つ新規配列を明らかにした。

本研究では *Caja-DRB1\*03* と *Caja-G* の個体ごとの遺伝子型の同定とハプロタイプを明らかにすることが目的であった。しかしながら、コモンマーモセットの MHC のアレル数は想像以上に多様であり、コモンマーモセット特有の血液キメラの問題もありハプロ

タイプの同定には至らなかった。コモンマーモセット家系を用いて MHC のハプロタイプを明らかにすることが今後の課題である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 高林秀次、田中一雄、加藤秀樹  
コモンマーモセット MHC クラス II の遺伝子型多型

第 19 回日本組織適合性学会大会、2010 年 9 月 17-19 日、東京大学

2) 河野あづみ、椎名隆、亀谷美恵、高林秀次、加藤秀樹、猪子英俊

コモンマーモセット MHC クラス I 遺伝子 (*Caja-G*) の遺伝的多様性、第 19 回日本組織適合性学会大会、2010 年 9 月 17-19 日、東京大学

3) 河野あづみ、亀谷美恵、高林秀次、加藤秀樹、猪子英俊、椎名隆

コモンマーモセット MHC 領域のゲノム構造、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高林 秀次 (TAKABAYASHI SHUJI)  
浜松医科大学・医学部附属動物実験施設・助教

研究者番号：70372521

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし