

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580431

研究課題名(和文)ニホンウズラの拡張MHC領域に関する多様性解析

研究課題名(英文)Analysis of genetic diversity of the extended MHC region of Japanese quail

研究代表者

半澤 恵 (Hanzawa, Megumu)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：00181032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：1. 拡張MHC領域の構造解析 ニホンウズラの主要組織適合性複合体領域(拡張MhcCoja領域)にTRIM亜領域およびCD1亜領域を同定した。

2. 多型カタログの作成 (1)高密度DNA多型マーカーの設計：TRIM亜領域に4種類、MHC class IIB亜領域に3種類、MHC class I亜領域に4種類、CD1亜領域に2種類、計13種類のマーカーを構築した。(2)ハプロタイプ解析：各亜領域内の遺伝子は、それぞれ連鎖しているが、一方、各亜領域間には組換え領域が存在することを示唆した。(3)各ハプロタイプの遺伝子構造：機能的なMHC class IIB遺伝子座数のハプロタイプ間差を示唆した。

研究成果の概要(英文)：1. TRIM sub-region and CD1 sub-region were identified in major histocompatibility complex from Japanese quail (Extended MhcCoja region).

2. The making of the polymorphism catalogue (1) The design of the high-density DNA polymorphism marker: We built the following thirteen markers, four markers in TRIM subregion, three markers in MHC class IIB subregion, four markers in MHC class I subregion, and two markers in CD1 subregion. (2) Haplotype analysis: The genes in each subregion have linkage each other, but there was recombination region between each subregion. (3) The gene structure of each haplotype: We suggested the differences among haplotypes of the number of functional MHC class IIB loci.

研究分野：動物分子免疫学

キーワード：ウズラ MHC TRIM CD1 DNA多型 ハプロタイプ 連鎖 組換え

1. 研究開始当初の背景

ニホンウズラの *MhcCoja* 領域は、同じキジ科のニワトリ *MhcB* 領域に比べて直接抗原認識に関与する遺伝子座が著しく重複しており (Shiina *et al* 2004), その遺伝子座数に多型が存在し、また *Coja* 領域全体に組換えホットスポットモチーフを含む多型性を示すサテライト配列が多数認められ、さらに *B* 領域では連鎖不平衡にある class IA と class IIB との間に組み換えが生じている可能性が高いことを明らかにした (Hosomich *et al* 2006). 以上の特徴はニホンウズラの抗病性がニワトリに比べて高いこと (Ratnamohan 1985) と考え合わせると、組み換え個体を利用し、免疫応答能に優れたハプロタイプブロック、対立遺伝子を効率的に検出する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

(1) 構造解析: *MhcCoja* 領域のセントロメア側に存在しウイルス増殖抑制作用が注目される *TRIM* 遺伝子群を含む *TRIM* 亜領域、並びにテロメア側に存在し、哺乳類では MHC とは別の染色体に位置し脂質抗原を認識する第 3 の MHC として注目される *CD1* 遺伝子座を含む *CD1* 亜領域の遺伝子構造を明らかにし、これらを含む拡張 *MhcCoja* 領域全体の遺伝子構造を把握する。

(2) 多型カタログの作成: 拡張 *MhcCoja* 領域に高密度の多型マーカーを設計し、それを用いてハプロタイプの多様性を明確にすると共にハプロタイプブロック/組換え領域を推定する。さらに決定した各ハプロタイプにおける機能的な *Mhc class IIB* (*CjCIIB*) 遺伝子座の数を把握する。

3. 研究の方法

(1) 構造解析: *TRIM* 亜領域または *CD1* 亜領域陽性コスミドクローンを分離し、キャピラリーシーケンサーを用いて塩基配列を決定

した。

(2) 多型カタログの作成: ①高密度 DNA 多型マーカーの設計 構造解析の結果明らかとなった各亜領域に座位する複数の遺伝子座について、様々な由来を持つニホンウズラ系統の個体を供試してそれらの多型性を検証し、PCR 増幅産物のシーケンシングによりタイピング可能な多型マーカーを設計する。②ハプロタイプ解析: 設計した多型マーカーを用いて、拡張 MHC 領域のハプロタイプの多様性、ならびにハプロタイプブロックと組換え領域を確認する。③各ハプロタイプの遺伝子構造の比較: *CjCIIB*01~*06* 個体由来の末梢リンパ球よりローカスおよびアレルに特異的なエキソン 2 の両側に設計した既知のすべての *CjCIIB* を増幅するプライマーを用いて RT-PCR 産物を得た。これを次世代シーケンサーにより網羅的に解析し、各ハプロタイプに機能的な MHC class IIB 遺伝子構成を明確にする。

4. 研究成果

(1) 構造解析: ニホンウズラ主要組織適合性複合体領域 (拡張 *MhcCoja* 領域) のもっともセントロメア寄りに *BG/LEC* 亜領域に隣接する *TRIM* 亜領域 (5 遺伝子座) を同定した。またもっともテロメア寄りに MHC class I 亜領域に隣接する *CD1* 亜領域 (6 遺伝子座) を同定した。これら亜領域の位置関係はニワトリと相同であったが、*CD1* 亜領域の下流にニワトリでは染色体上の位置が特定されていない精子尾部構成タンパク質をコードする *ODF3* 遺伝子 2 座位を確認した。

(2) 多型カタログの作成: ①高密度 DNA 多型マーカーの設計: セントロメア側より順に、*TRIM* 亜領域に 4 種類 (*HEP21: I*, *TRIM39.2: II*, *BTN1* および *BTN2: III*), MHC class IIB 亜領域に 3 種類 (*DCB1*, *TAPBP* および *DBB1: IV*), MHC class I 亜領域に 4 種類 (*DMB1: V*, *DMB2: VI*, *TAP1* および *TPA2: VII*), *CD1* 亜領域に 2 種類 (*CD1.1* および *CD1.2*),

約 300-kb の領域に計 13 種類の DNA 多型マーカーを構築した。

②ハプロタイプ解析：これら 13 マーカーのうち DCB1~TAPBP~DBB1, DMB1~DMB2, TAP1~TAP2 および CD1.1~CD1.2 は、それぞれハプロタイプブロックを形成していることを考慮し、羽装等の異なる 6 系統 270 個体を供試してマーカー I~VII のタイピングに基づき 75 種類のハプロタイプを確認した。さらにこれらハプロタイプの頻度から、III と IV および IV と V の間に組換え領域が存在することを示唆した。

③各ハプロタイプの遺伝子構造の比較：DBB1~Tapasin~DCB1, DMB1~DMB2, TAP1~TAP2 および CD1.1~CD1.2 の構造は主要 8 ハプロタイプで共通していた。ついでマーカー IV に基づくハプロタイプ CjIIB*01~*05 間で機能的 CjIIB 遺伝子座を網羅的に解析したところ、機能的 CjIIB 遺伝子座の数にハプロタイプ間差が示唆された (表 1)。

表 1. MHC class IIB (CjIIB) 亜領域のハプロタイプ間の CIIB 遺伝子構成の比較

ハプロタイプ	主働遺伝子数	微働遺伝子数
CjCIIB*01	2	7
CjCIIB*02	1	1
CjCIIB*03	2	3
CjCIIB*04	3	1
CjCIIB*05	1	6
CjCIIB*06	2	-

今後、各ハプロタイプホモ系統の作出とそれらを用いた免疫学的研究により、CjIIB ハプロタイプ間の免疫応答能の差異を明確にしうることが期待される。

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 3 件)

1. 朝治桜子・鈴木進悟・細道一善・原ひろみ・平野貴・椎名隆・半澤恵, ニホンウズラ主要組織適合性複合体 (Mhc

Coja) 領域のハプロタイプ解析による組換え部位の推定, DNA 多型, 査読有, 23 巻, 2015, 13-16

ISSN: 2188-3815

2. 鈴木進悟・細道一善・横山佳菜・津田薫・原ひろみ・吉田豊・藤原哲・水谷誠・椎名隆・河野友宏・半澤恵, 20130111, Primary analysis of DNA polymorphisms in the *TRIM* region (*MHC* subregion) of the Japanese quail, *Coturnix japonica*, Anima Science Journal, 査読有, Vol.84, 2013, 90-96

ISSN: 1740-0929

3. 横山佳菜・朝治桜子・鈴木進悟・細道一善・原ひろみ・吉田豊・水谷豊・藤原哲・椎名隆・半澤恵, ニホンウズラ CD1 遺伝子領域の多様性解析, DNA 多型, 査読有, Vol.20, 2012, 30-35

ISBN: 978-4-86459-055-6 C3347

[学会発表] (計 7 件)

1. 朝治桜子・石毛太一郎・鈴木進悟・細道一善・平野貴・原ひろみ・椎名隆・半澤恵, ハプロタイプ解析によるウズラ主要組織適合性複合体の組換え領域の推定, 日本畜産学会第 119 回大会 (於宇都宮大学), 2015, 175
2. 朝治桜子・石毛太一・鈴木進悟・細道一善・平野貴・原ひろみ・椎名隆・半澤恵, ニホンウズラ主要組織適合性複合体 Mhc Coja クラス IIB 領域のハプロタイプ解析, 日本分子生物学会第 37 回年会 (於パシフィコ横浜), 2014, 1P-0022

3. 杉山由香里・鈴木進悟・細道一善・椎名隆・平野貴・原ひろみ・半澤恵,
ニホンウズラ *CjDMB1* および
CjDMB2 の基礎的比較解析, 日本畜
産学会第 118 回大会 (於筑波エポカ
ル), 2014, 165
4. 菅原拓海・平野貴・原ひろみ・半澤
恵, ニホンウズラ TRIM 亜領域の DNA
多型解析, 日本家禽学会 2014 年春季
大会 (於筑波大学), 2014, 6
5. 杉山由香里・鈴木進悟・細道一善・椎名隆・平野貴・原ひろみ・半澤恵,
ニホンウズラ *CjDMB1* における多型マ
ーカーの確立, 日本畜産学会第 117
回大会 (於新潟大学), 2013, 57
6. 杉山由香里・鈴木進悟・細道一善・椎名隆・平野貴・原ひろみ・半澤恵,
ニホンウズラ *DMB2* 遺伝子の多型解析,
日本畜産学会第 116 回大会 (於広島
安田女子大学), 2013, 151
7. 横山佳菜・朝治桜子・鈴木進悟・細
道一善・水谷豊・藤原哲・椎名隆・原ひろみ・吉田豊・半澤恵, ニホン
ウズラ *CD1* 遺伝子の基礎的解析, 日
本組織適合性学会第 21 回大会 (於明
大駿河台キャンパス), 2012, MHC
Vol.19, 190

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半澤 恵 (HANZAWA, Megumu)
東京農業大学・農学部・教授
研究者番号: 00181032

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

原 ひろみ (HARA, Hiromi)
東京農業大学・農学部・助教
研究者番号: 00343567

椎名 隆 (SHIINA, Takashi)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 00317744

細道 一善 (HOSOMICHI, Kazuyoshi)
金沢大学・医学部・准教授
研究者番号: 50420948

(4) 研究協力者

前田 芳實 (MAEDA Yoshimi)
水谷 誠 (MIZUTANI Makoto)
万年 英之 (MANNEN Hideyuki)
Miller Marcia