[Original paper]

Sequence analysis of functional *Mhc* class II β genes on quails of high- and low-IgG strains, developed by line breeding based on serum IgG concentration

Kazuyoshi HOSOMICHI¹, Takashi SHIINA², Sayoko, SHIMIZU²
Hidetoshi INOKO² and Kei HANZAWA¹

¹ Laboratory of animal Physiology, Faculty of agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1737 Funako, Atsugi, Kanagawa 243-0034, Japan.

² Department of Basic Medical Science and Molecular Medicine, Division of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

ABSTRACT

In order to clarify the immunological and genetic features of functional *Mhc* class II β genes in chicken and quails, we established a modified RT-PCR method, which classify to major or minor *B-L* β genes. Using this methodology, we classified quail *Mhc* class II β (*CojaII* β) sequences to major or minor *CojaII* β , and found interesting features of functional *MhcII* β genes by detail comparisons between the quail and chicken, and the quail H_{TUA} and L_{TUA} lines. First, one major and one minor *B-L* β genes was identified in the chicken B²¹ haplotype. Four major and six minor *CojaII* β genes in H_{TUA} line and two major and seven minor *CojaII* β genes in L_{TUA} line were identified in quail two lines, respectively. Major genes were highly expressed in most of organs but minor genes were lowly expressed in a part of organs. Meanwhile, minor *CojaII* β genes weakly expressed only in some immune organs, and this phenomenon suggest that these genes specifically appears depending on the modality and maturity of lymphocytes.

(Received, 18 May 2004 : Accepted, 20 July 2004)

Key words

Apis, *Mhc* class II gene, quail, chicken, RT-PCR

血清 IgG 高低選抜ニホンウズラ系統における機能的 *Mhc* クラス II β 遺伝子の塩基配列解析

細道一善¹・椎名 隆²・清水佐良子²・猪子英俊²・半澤 恵¹

¹ 東京農業大学農学部家畜生理学研究室、243-0034 神奈川県厚木市船子 1737

² 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143

要 約

本研究では、ニワトリおよびニホンウズラの免疫器官由来細胞において発現している *Mhc* クラス II β 遺伝子の特徴を明らかにすることを目的に、まずニワトリ個体の主働 *B-L* β あるいは微働 *B-L* β に分類する方法を確立した。次いで、この方法を用いて、ニホンウズラの H_{TUA} 系ならびに L_{TUA} 系における *CojaII* β を主働あるいは微働 *CojaII* β に分類し、ニワトリとニホンウズラの間およびニホンウズラ両系統の間における詳細な比較解析を実行することにより、機能的 *Mhc* クラス II β 遺伝子の特徴を明らかにした。その結果、ニワトリでは1種類ずつの主働 *B-L* β と微働 *B-L* β 、ニホンウズラ H_{TUA} 系では4種類の主働 *CojaII* β と6種類の微働 *CojaII* β 、L_{TUA} 系では2種類の主働 *CojaII* β と7種類の微働 *CojaII* β がそれぞれ確認された。主働遺伝子はほとんどの免疫器官由来細胞にて高い発現量を示し、それぞれの塩基配列間の類似性が極めて低いことから免疫応答能に影響を及ぼすものと考えられた。一方、微働遺伝子は一部の免疫器官由来細胞にて低い発現量を示し、リンパ球の種類、分化・成熟の状況によって特異的に発現している可能性が示唆された。

緒 言

主要組織適合遺伝子複合体 (*Mhc*; major histocompatibility complex) 領域は、異物由来の外來抗原ペプチドをT細胞に提示することにより、免疫応答の誘導に深く関わる白血球抗原を規定する多重遺伝子族からなるゲノム領域である。家禽では、ニワトリとウズラの *Mhc* 領域のゲノム塩基配列が決定されており、それらの配列を用いた多型解析により、*Mhc* 領域とマレック病やラウス肉腫などの免疫性疾病、産卵率や卵重などの経済有用形質および免疫応答能との関連性が調べられている。

ニワトリの *Mhc* 領域である *Gado-B* 領域は最小不可欠 *Mhc* と称されており、B ハプロタイプ B¹² 型のゲノム配列 (92kb) は 1999 年に Kaufman らによって報告されており、その領域内に 2 個の機能的な *Mhc* クラス II B 遺伝子座 (*B-Lβ*; *B-Lβ1* および *B-Lβ2*)、2 個の *Mhc* クラス II 遺伝子座 (*B-Fα1* および *B-Fα2*)、*RING3*、*Tapasin*、C 型レクチン様遺伝子座 (*B-Lec*) などを含む 19 個の遺伝子が同定されている (Guillemot ら 1988; Kaufman ら 1999)。また、*B-Lβ* のうち、*RING3* と *Tapasin* 遺伝子座との間に位置する *B-Lβ2* は発現量が多く、かつ主に機能する主働 (Major) 遺伝子座であるのに対し、*Tapasin* と *B-Lec* 遺伝子座との間に位置する *B-Lβ1* は発現量が少なく、かつ組織特異的発現を示す微働 (Minor) 遺伝子座であると報告されている (図 1、Kaufman ら 1999; Jacob ら 2000)。

一方、ニホンウズラの *Mhc* 領域は *Coja* 領域と称さ

れており、*Coja* ハプロタイプ 1 型のゲノム配列 (180kb) は 2004 年に Shiina らによって報告された (Shiina ら 2004)。この領域には 7 個の機能的な *Mhc* クラス II β 遺伝子座 (*CojaIIβ*; *Coja-DAB1*, *-DBB1*, *-DCB1*, *-DDB1*, *-DEB1*, *-DFB1* および *-DGB1*)、5 個の *Mhc* クラス I 遺伝子座 (*Coja-B1*, *-B2*, *-D1*, *-D2*, *-E*)、*RING3*、*Tapasin*、C 型レクチン様遺伝子座 (*Coja-Lec*) などを含む 41 個の遺伝子が同定されている (Shiina ら 1999, 2004)。これらのうち *CojaIIβ* においては、発現解析ならびに *RING3*、*Tapasin* および *Coja-Lec* 遺伝子座との位置関係より、*Coja-DAB1* および *-DBB1* が主働 *Mhc* クラス II β 遺伝子座 (主働 *CojaIIβ*) であり、*Coja-DCB1*、*-DDB1*、*-DEB1*、*-DFB1* および *-DGB1* が微働 *Mhc* クラス II β 遺伝子座 (微働 *CojaIIβ*) であることが示唆されている (図 1、Shiina ら 2004)。これらのことから、*CojaIIβ* は *B-Lβ* に比べて多様なゲノム構造をしており、抗原提示機能を介して引き起こされる免疫応答能ならびに抗病性において、ニホンウズラはニワトリよりも著しい多様性を有しているものと考えられる。したがって、*B-Lβ* と *CojaIIβ* の遺伝学的特徴を明らかにすることは免疫応答におけるニワトリとニホンウズラ間の相違を理解するために極めて重要である。また、獲得免疫で主体をなす T 細胞や B 細胞は一次免疫器官である胸腺およびファブリスウス嚢でそれぞれ分化・成熟するが、成熟過程において特有の表面抗原を発現することから、微働 *B-Lβ* 抗原は未成熟リンパ球に特有なものであるとの見解もある (Jacob ら 2000)。さら

Fig. 1. Location of major and minor *CojaIIβ* loci in *Coja* haplotype 1. Lines show orthologous loci between quail and chicken.

に *MhcII β* 抗原は主にヘルパー T 細胞に対する外来性抗原の提示という機能を担っていることから、ニホンウズラの血清 IgG 値による高低両選抜系統である High IgG 系 (H_{TUA} 系) と Low IgG 系 (L_{TUA} 系) (Watanabe と Nagayama 1979) の間には機能的な *CojaII β* の発現量や組織特異性などに差異が認められる可能性が考えられる。

本研究では、ニワトリおよびニホンウズラの免疫臓器における機能的 *MhcII β* 遺伝子の特徴を明らかにするために、まずハプロタイプ B²¹ 型のニワトリを対象とし、免疫臓器および末梢リンパ球において発現している *B-L β* の塩基配列を決定し、塩基配列型の出現頻度から主働 *B-L β* と微働 *B-L β* に分類した。その後、同様の手法によってニホンウズラの H_{TUA} 系および L_{TUA} 系における主働 *CojaII β* と微働 *CojaII β* を推定した。

材料および方法

1 全 RNA の抽出

供試鶏には (財) 日本生物科学研究所において閉鎖集団として飼育管理されているハプロタイプ B²¹ 型のニワトリ GSP 系から 5 週齢の雄 1 個体を用いた。また、供試ウズラには東京農業大学農学部家畜生理学研究室において閉鎖集団として飼育管理されている H_{TUA} 系および L_{TUA} 系から 3 週齢の雄 1 個体ずつを用いた。全 RNA 抽出は胸腺、ファブリキウス囊、脾臓および末梢リンパ球を材料とし、TRIZOL REAGENT (インビトロジェン) を用いて行った。

2 RT-PCR

RT-PCR は、まず免疫臓器および末梢リンパ球由来の全 RNA を鋳型として First Strand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace- α - (東洋紡) を用いて cDNA を合成した。

プライマーは、ニワトリでは、GenBank に登録されているすべての *B-L β* の共通配列から、 β 1 ドメイン領域 (エクソン 2) ~ 細胞膜貫通領域 (エクソン 4) 間の 604 bp を特異的に増幅させる共通プライマー Ex2a (5'-gagtgcactacctgaacggcaccgagcg-3') および Ex4 (5'-gcgccaggaagacgagccccagcac-3') を設計した (Zoorob ら 1993)。また、ニホンウズラは、これまで著者らが解析したすべての *CojaII β* のシグナルペプチド領域 (エクソン 1) ~ β 2 ドメイン (エクソン 3) 領域間の 411 bp ~ 441 bp を特異的に増幅させる共通プライマー C2BNO2 (5'-ccggctctgctacggaac-3') および C2BNO5 (5'-aaccattcaccttcacctccatctc-3') を設計した。

その後、PCR 増幅は、サーマルサイクラー Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し、プレ熱変性: 96 °C、3 分間の後、熱変性: 96 °C、30 秒間、アニーリング: 63 °C、30 秒間、伸長反応: 72 °C、30 秒間のサイクルを 30 回繰り返す、さらに 72 °C、5 分間にて最終伸長反応を行った。

3 塩基配列解析

RT-PCR 産物のクローニングは、pGEM-T easy Vector System (プロメガ) および DH5 α Competent high (東洋紡) を用い、PCR 産物ごとに、ニワトリで 24 クローン、ウズラで 48 クローンずつ調製した。塩基配列は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (アプライドバイオシステムズ) および ABI PRISM 377 (アプライドバイオシステムズ) を用いて決定した。塩基配列データは遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Mac v11.0 (ソフトウェアデベロプメント) および類似配列検索プログラム BLAST を用いて解析した。

4 分子系統的解析

B-L β および *CojaII β* 遺伝子間の類縁関係を解析するために、本研究で新たに決定した 16 個の発現遺伝子 (DDBJ/EMBL/ GenBank accession No. AB181861 ~ AB181874, AB181876 および AB181877) の塩基配列ならびに 15 種類の既知配列を CLUSTALW プログラム (DDBJ) を用いて、整列化させた後、近隣結合法 (Saitou と Nei 1985) によって系統樹を作成した。なお、系統樹作成の外群にはヒト *MHC* クラス II 抗原遺伝子 *HLA-DRB1*0101* (AF142457) を用いた。また、系統樹作成の際に用いたその他の既知配列は以下の通りである。すなわち、ニワトリハプロタイプ B² 型、B⁴ 型、B¹² 型、B¹⁴ 型、B¹⁵ 型、B¹⁹ 型および B²¹ 型の *B-L β* mRNA (AJ248576, AJ248583, AJ248572, AJ248581, AJ248585, AJ248577, AJ248584, AJ248579, AJ248580, AJ248582, AJ248574, AJ248586, AJ248575 および AJ248573) である。

結 果

1 B²¹ 型ニワトリにおける発現 *B-L β* 遺伝子の塩基配列解析

ニワトリハプロタイプ B²¹ 型の、胸腺、ファブリキウス囊、脾臓および末梢リンパ球に由来する RT-PCR 産物のクローンのうち、それぞれ 13、16、14 および 13 クローン、計 56 クローンの塩基配列を決定

した(表1)。決定した塩基配列のエクソン2に相当する部分(244 bp)は *B²¹-B-Lβ2* (AJ248585) あるいは *B²¹-B-Lβ1* (AJ248586) と完全に一致した。しかしながら、その他のBハプロタイプの塩基配列との類似性は99.2%以下を示した。したがって、得られたRT-PCR産物はハプロタイプ *B²¹* 型の塩基配列であり、ハプロタイプ *B²¹* 型は既報(Kaufmanら1999; Jacobら2000)どおりに2個の機能的な遺伝子座を有することが確認された。また、これらの塩基配列は出現頻度が異なり、主働遺伝子座である *B-Lβ2* は全ての臓器において78.6%以上の高い出現頻度を示し、特に胸腺と末梢リンパ球においては100%の出現頻度であった。一方、微働遺伝子座である *B-Lβ1* はファブリキウス囊および脾臓においてのみ認められ、その出現頻度は12.5および21.4%と低い値を示した。なお、胸腺および末梢血リンパ球においては *B-Lβ1* の発現は認められなかった(表1)。

2 ニホンウズラ *H_{TUA}* 系における発現 *CojaIIβ* 遺伝子の塩基配列解析

ニホンウズラ *H_{TUA}* 系の胸腺、ファブリキウス囊、脾臓および末梢リンパ球に由来するRT-PCR産物のクローンのうち、それぞれ30、24、16および29クローン、計99クローンの塩基配列を決定したところ、10タイプの塩基配列型が見い出された(表2)。これら10タイプの塩基配列型について、*Coja* ハプロタイプ1型の *CojaIIβ* のゲノム配列との相同性を解析したところ、これらのうち5タイプは、*Coja-DAB1*、*-DBB1*、*-DCB1*、*-DFB1* あるいは *DGB1* (AB078884) のいずれかと完全に一致し、1タイプは *Coja-DEB1* と99.6%の極めて高い類似性を示した。したがって、これら6タイプは上記遺伝子座に由来する対立遺伝子であると判断し、*Coja-DAB1*01*、*-DBB1*01*、*-DCB1*01*、*-DEB1*02*、*-DFB1*01* および *-DGB1*01* (**AB181861** ~

AB181863、**AB181865** および **AB181866**) と命名した。一方、残りの4タイプの塩基配列型は、ハプロタイプ1型の *CojaIIβ* のゲノム配列との間、ならびに4タイプの塩基配列型相互間における類似性が77.4%~87.8%と低いことから、未同定の遺伝子座に由来するものと判断し、*CojaIIβ -01*、*-02*、*-04* および *-12* (**AB181870** ~ **AB181873**) と命名した(表2)。

各免疫臓器および末梢リンパ球における10タイプの塩基配列型の組織特異性や出現頻度について比較すると、*Coja-DAB1*01*、*-DBB1*01* および *CojaIIβ-02* は全ての組織において発現が確認され、その出現頻度は末梢リンパ球における *Coja-DAB1*01* の3.4%を除き、いずれも10%以上の高い値を示した。他方、*CojaIIβ-01* は胸腺、脾臓および末梢リンパ球において20%以上の極めて高い出現頻度を示し、特に末梢リンパ球では58.6%と最も高い出現頻度を示した。しかしながら、ファブリシウス囊では発現が認められなかった。また、*CojaIIβ-04* は胸腺、ファブリキウス囊および脾臓においてはその発現が確認されたが、末梢リンパ球では認められなかった。一方、*Coja-DCB1*01*、*-DFB1*01*、および *-DGB1*01* は1つの組織での発現しか認められず、その出現頻度は20%未満の低い値を示した。

これらの塩基配列型を2つ以上の組織で認められ、その割合が20%以上であったものを主働遺伝子、割合がいずれも20%未満であったものを微働遺伝子と分類したところ、*Coja-DAB1*、*-DBB1*、*CojaIIβ-01* および *-02* の4種類の塩基配列型は出現頻度から主働 *CojaIIβ*、*Coja-DCB1*01*、*-DEB1*02*、*-DFB1*01*、*-DGB1*01*、*CojaIIβ-04* および *-12* の6種類の塩基配列型は微働 *CojaIIβ* であると推測した。

3 ニホンウズラ *L_{TUA}* 系における発現 *CojaIIβ* 遺伝子の塩基配列解析

ニホンウズラ *L_{TUA}* 系の4組織に由来するRT-PCR

Table 1. Expression patterns and its frequencies of functional *B-Lβ* genes derived from immuno organs of *B²¹* homozygous chicken

Locus	Clone names	Nucleotide homologies with locus (%)	Organ			
			Thy	Bru	Spl	Ply
		n	13	16	14	13
<i>B-Lβ2</i>	<i>GSP-B-Lβ2</i>	100.0	100.0	87.5	78.6	100.0
<i>B-Lβ1</i>	<i>GSP-B-Lβ1</i>	100.0	0.0	12.5	21.4	0.0

Thy: thymus, Bur: bursa of fabricius, Spl: spleen, and Ply: peripheral lymphocytes

Table 2. Expression patterns and its frequencies of functional *CojaII* β genes derived from immuno organs of Japanese quail H_{TUA} and L_{TUA} lines

Locus	Allele or clone name	Nucleotide homologies with Coja gene (%)	H _{TUA} line				L _{TUA} line			
			Organs				Organs			
			Thy	Bur	Spl	Ply	Thy	Bur	Spl	Ply
Contig 1		n	28	24	16	29	22	38	22	25
<i>Coja-DAB1</i>	<i>Coja-DAB1*01</i>	100.0	25.0	12.5	25.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Coja-DBB1</i>	<i>Coja-DBB1*01</i>	100.0	17.9	29.2	12.5	20.7	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Coja-DCB1</i>	<i>Coja-DCB1*01</i>	100.0	0.0	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>Coja-DCB1*02</i>	99.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0
<i>Coja-DDB1</i>	<i>Coja-DDB1*01</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Coja-DEB1</i>	<i>Coja-DEB1*01</i>	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>Coja-DEB1*02</i>	99.6	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Coja-DFB1</i>	<i>Coja-DFB1*01</i>	100.0	3.6	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	9.1	0.0
	<i>Coja-DFB1*02</i>	99.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	4.0
<i>Coja-DGB1</i>	<i>Coja-DGB1*01</i>	100.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>Coja-DGB1*02</i>	98.9	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0
Tentatively named genes										
	<i>CojaII</i> β -01		21.4	0.0	25.0	58.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>CojaII</i> β -02		17.9	29.2	25.0	13.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>CojaII</i> β -04		14.3	4.2	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>CojaII</i> β -12		0.0	12.5	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>CojaII</i> β -13		0.0	0.0	0.0	0.0	22.7	47.4	50.0	60.0
	<i>CojaII</i> β -14		0.0	0.0	0.0	0.0	54.5	44.7	36.4	36.0
	<i>CojaII</i> β -15		0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	2.6	4.5	0.0

Thy: thymus, Bur: bursa of fabricius, Spl: spleen, and Ply: peripheral lymphocytes
 Bold numbers indicate expression frequencies over 20%.

産物のクローンには7タイプの塩基配列型が見い出された(表2)。これらの塩基配列型について、*Coja* ハプロタイプ1型の *CojaII* β のゲノム配列と比較したところ、これら7種類のうち1タイプは *Coja-DFB1* と完全に一致し、また3タイプは *Coja-DCB1*、*-DFB1* あるいは *-DGB1* と98.9%以上の高い類似性を示した。したがって、これら4タイプは上記遺伝子座に由来する対立遺伝子であると判断し、*Coja-DCB1*02*、*-DFB1*01*、*-DFB1*02* および *-DGB1*02* (**AB181864**、**AB181866**、**AB181867** および **AB181869**) と命名した。一方、残りの3タイプの塩基配列型は、ハプロタイプ1型の *CojaII* β のゲノム配列との間、および H_{TUA} 系で新規に同定された *CojaII* β -01、-02、-04 および -12 との間で75.6 ~ 89.3%と低い類似性を示し

た。そこで、これら3種類の塩基配列型は、未同定の遺伝子座に由来するものと判断し、*CojaII* β -13、-14 および -15 (**AB181874**、**AB181876** および **AB181877**) と命名した。

4組織におけるこれら7タイプの塩基配列型の組織特異性や出現頻度について比較すると、*CojaII* β -13 および -14 は全ての組織において発現が確認され、その出現頻度は20%以上の高い値を示した。一方、*DCB1*02*、*-DFB1*01/02*、*-DGB1*02*、および *CojaII* β -15 は組織特異性を示し、*DGB1*02* の胸腺における13.6%を除き、いずれも9.1%以下の低い出現頻度を示した(表2)。

CojaII β -13 および -14 の2種類の塩基配列型は出現頻度から主働 *CojaII* β 、*Coja-DCB1*02*、*-DFB1*01*、

-*DFB1**02、-*DGB1**02 および *CojaIIβ-15* の 5 種類の塩基配列を微働 *CojaIIβ* であると推測した。

4 H_{TUA} 系と L_{TUA} 系における発現 *CojaIIβ* 遺伝子の比較

H_{TUA} 系、 L_{TUA} 系の両系個体にて得られた塩基配列の組織特異性、出現頻度および類似性を比較した。ハプロタイプ 1 に含まれる *Coja-DDB1**01 と -*DEB1**01 は両系統で発現が認められなかった。次いで、両系間で完全に一致した配列は *Coja-DFB1**01 のみであったが、*Coja-DCB1**01 と -*DCB1**02、*Coja-DFB1**01 と -*DFB1**02 および *Coja-DGB1**01 と -*DGB1**02 はそれぞれ 99.6 %、99.3 % および 98.9 % とお互いに高い類似性を示した。これら 7 種類の塩基配列型は出現頻度から微働 *CojaIIβ* であると推測された (表 2)。また、各 *Coja* 遺伝子座と組織特異性との関係を調べた結果、*Coja-DCB1* は、 H_{TUA} 系、 L_{TUA} 系ともにファブリキウス嚢にのみ検出された。これに対して、両系個体間で発現している臓器が異なる遺伝子も認められた。すなわち *Coja-DFB1* は、 H_{TUA} 系では胸腺のみで検出されたが、 L_{TUA} 系ではすべての組織にて検出され、また *Coja-DGB1* は、 H_{TUA} 系では胸腺のみで検出されたが、 L_{TUA} 系では末梢リンパ球のみに検出された。

一方、高い出現頻度を有する主働 *CojaIIβ* は、 H_{TUA} 系において *Coja-DAB1**01、-*DBB1**01、*CojaIIβ-01*、-02 の 4 種類、また L_{TUA} 系において *CojaIIβ-13* と -14 の 2 種類であった (表 2)。この主働 *CojaIIβ* 間の類似性は 80.0 % ~ 91.9 % と低い値を示し、両系個体間における主働 *CojaIIβ* は極めて異なる構造を有していると推測された。

5 発現 *CojaIIβ* 遺伝子の分子系統的解析

DNA データベースに登録されている *B-Lβ*、*Coja* ハプロタイプ 1 の *CojaIIβ* ならびに本研究にて得られたニホンウズラ *CojaIIβ* の間および主働遺伝子と微働遺伝子の間の類縁関係を明らかにするためにニワトリ 14 種類、ニホンウズラ 16 種類およびヒト 1 種類の合計 32 種類の塩基配列を用いて系統樹解析をおこなった (図 2)。その結果、*CojaIIβ* は *B-Lβ* と異なる集団を形成し、*CojaIIβ* 集団の中でさらに 3 つの亜集団 (図 2 の A, B, C) に大別された。これらのうち、主働 *CojaIIβ* と考えられる 6 種類の塩基配列のうち、亜集団 C に属する *CojaIIβ-01* を除いた 5 種類は亜集団 B に属した。ところが、亜集団 B には、微働遺伝子である *Coja-DFB1**01、-*DFB1**02、*CojaIIβ-15* が含まれることから、

これら 3 つの亜集団を主働遺伝子集団と微働遺伝子集団に明確に分類することは不可能であった (図 2)。

考 察

ニワトリにおいて、主働遺伝子座である *B-Lβ2* の mRNA はすべての臓器から高い頻度で確認されたが、微働遺伝子座である *B-Lβ1* の mRNA は一部の臓器でのみ低い頻度で確認された (表 1)。この結果は既知の報告と完全に一致した (Kaufman ら 1999; Jacob ら 2000)。このことより、RT-PCR 産物由来の塩基配列の出現頻度が、mRNA の発現の多寡を反映しており、本実験方法が遺伝子の発現の割合を調査するのに有効であることが証明された。

ニホンウズラでは、ニワトリと比べ多種類の配列が確認されたが、ニワトリ同様に出現頻度に偏りが確認された (表 2)。このことからニホンウズラはニワトリに比べ多くの遺伝子重複が認められるが、ニワトリ同様に主働遺伝子座と微働遺伝子座が存在することが明確となった。特にニホンウズラの *Coja* ハプロタイプ 1 とニワトリの *Mhc* 領域のゲノム塩基配列から主働遺伝子座の位置を比較すると、ニワトリの主働遺伝子座である *B-Lβ2* が位置する *Tapasin* と *RING3* 遺伝子座との間のゲノム領域に、ニホンウズラでは *Coja-DAB1* および -*DBB1* が同定された (図 1、Kaufman ら 1999; Shiina ら 2004)。本実験において H_{TUA} 個体の *Coja-DAB1* および -*DBB1* 由来の RT-PCR 産物の出現頻度がニワトリ *B-Lβ2* と同様に高かったことから、*Coja* ハプロタイプ 1 を持つニホンウズラにおいては *Coja-DAB1* および -*DBB1* が主働遺伝子座であることが示唆された。したがって、本研究によって新たに同定された、出現頻度の高い 4 種類の塩基配列 (*CojaIIβ-01*、*CojaIIβ-02*、*CojaIIβ-13*、*CojaIIβ-14*) は主働遺伝子座であり、かつ *Tapasin* と *RING3* との間のゲノム領域に存在する可能性が高いと考えられた (細道ら、未発表)。ところが、これら 4 種類の塩基配列は、*Coja-DAB1* および -*DBB1* の塩基配列と類似性が低いことから、いわゆる一般的な同一遺伝子の対立遺伝子間の関係とは異なるものとも考えられた (図 2)。この点に関する議論として、ヒトの *Mhc* クラス II 遺伝子の DR ファミリーの例が挙げられる。このファミリーは 1 つの α 鎖 (*DRA*) および複数個の β 鎖 (*DRB*) より構成されるが、*DRB* の対立遺伝子の類似性および遺伝子座数はハプロタイプにより異なることが知られている (Corell ら 1992)。したがって、*CojaIIβ-1*、-2、-13 および -14 は、それぞれハプロタイプ 1 (*Coja-DAB1**01 および -*DBB1**01) とは異なる

Fig. 2. Phylogenetic trees showing the genetical relationships of the *Mhc* class II β . The dendrograms was constructed from the nucleotide sequences of the β 1 extracellular domain region (from exon 2) (270 nucleotides in length) of *Mhc* class II β genes. Values near the branchpoints of the tree indicate bootstrap values. The number in parenthesis indicates GenBank accession number. (A), (B) and (C) indicate sub-groups in quail lineage. Bold letters show major *MhcII β* .

Coja ハプロタイプ由来の遺伝子座であると考えられた。さらに、これら主働遺伝子のそれぞれの類似性の差異からクラス II 抗原の提示能や T 細胞レセプターとの親和性にも差異を有する可能性が考えられ、*Coja* ハプロタイプと免疫性疾患および免疫応答能については各種経済形質との関連が予想された。すなわち、これらの主働遺伝子を含む *Coja* ハプロタイプの違いこそが、ニホンウズラの血清 IgG 濃度の高低に関与する可能性が示唆された (清水ら 2004)。

一方、微働遺伝子座由来と考えられる塩基配列は、主働遺伝子座由来と考えられる塩基配列が互いに類似性が低かったのとは対照的に、高い類似性を示す 3 組: *Coja-DCB1*01/-DCB1*02*、*-DFB1*01/-DFB1*02* および *-DGB1*01/-DGB1*02* の塩基配列が確認された (図 1、表 2)。しかるに、*CojaII β -04*、*-12*、および *-15* は他のいずれの塩基配列とも類似性が低かった。したがって、これらの塩基配列も主働遺伝子座と共に連鎖する *Coja* ハプロタイプ特異的な遺伝子座であると考え

えられた。さらに、これら微働遺伝子座は一部の臓器に低い頻度で確認されており、その臓器も様々であることから、微働遺伝子座には、リンパ球の種類、あるいは分化・成熟の状況によって特異的に発現する遺伝子座も存在する可能性が考えられた。また、これら微働遺伝子の差異は主働遺伝子と共にクラス II 抗原の提示能や T 細胞レセプターとの親和性にも差異を有する可能性が考えられた。

図 2 の系統樹より、*CojaIIβ* はニワトリとの種分化後に遺伝子重複により形成されたことが示唆された。また、主働 *CojaIIβ* の集団には微働 *CojaIIβ* が含まれることから、*CojaIIβ* は遺伝子座ごとに異なる選択圧あるいは極度の Birth and death evolution により形成されたと考えられた (Ota ら 1994; Nei ら 1997)。そのような遺伝的な変化がウズラとニワトリとの *MhcIIβ* の発現量の差異に影響を及ぼした可能性がある (図 3)。著者らは両者間におけるこのような遺伝的な変化はニワトリが留鳥なのに対して、ニホンウズラは渡り鳥であるために、ニホンウズラはニワトリよりもより多くの抗原に暴露され、それに対する適応策として、ウズラの抗原認識機構を発達させたと推測している。

謝 辞

本研究の一部は日本学術振興事業団科学研究費基盤研究 B (課題番号: 13460135) ならびに平成 14、15 年度私立大学教育研究推進特別補助 (B3) の支援を受けて実施した。また、本研究の実施に当たり、供試鶏をご提供頂くなど種々の便宜をお計り頂いた (財) 日本生物科学研究所の水谷誠博士に、この場を借りて深謝致します。

引用文献

Corell A, Morales P, Varela P, Paz-Artal E, Martin-Villa JM, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena A. 1992. Allelic diversity at the primate major histocompatibility complex DRB6 locus. *Immunogenetics*, 36: 33–38.

Guillemot F, Billault A, Pourquie O, Behar G, Chausse A, Zoorob R, Kreibich G, Auffray C. 1988. A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class IIβ genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer. *EMBO J.*, 7: 2775–2785.

Jacob JP, Milne S, Beck S, Kaufman J. 2000. The major and a minor class II beta-chain (B-LB) gene flank the

Tapasin gene in the B-F/B-L region of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 51: 138–147.

Kaufman J, Milne S, Gobel TW, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S. 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*, 401: 923–925.

Nei M, Gu X, Sitnikova T. 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7799–7806.

Ota T, Nei M. 1994. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 469–482.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–525.

Shimizu S, Shiina T, Hosomichi K, Takahashi S, Koyama T, Onodera T, Kulski JK, Inoko H. 2004. MHC class IIB gene sequences and expression in quails (*Coturnix japonica*) selected for high and low antibody responses. *Immunogenetics*, 56 (4): 280–291.

Shiina T, Shimizu C, Oka A, Teraoka Y, Imanishi T, Gojobori T, Hanzawa K, Watanabe S. and Inoko H. 1999. Gene organization of the quail major histocompatibility complex (*MhcCoja*) class I gene region. *Immunogenetics*, 49: 384–394.

Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanabe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H. 2004. Comparative genomic analysis of two avian - quail and chicken - major histocompatibility complex regions. *J. Immunol.*, 172 (11): 6751–6763.

渡邊誠喜、永山文夫. 1979. ウズラの血清 IgG 値に関する研究. *日本家禽学会誌*, 16: 59–64.

Wittzell H, von Schantz T, Zoorob R, Auffray C. 1994. Molecular characterization of three Mhc class II B haplotypes in the ring-necked pheasant. *Immunogenetics*, 39: 395–403.

Zoorob R, Bernot A, Renoir DM, Choukri F, Auffray C. 1993. Chicken major histocompatibility complex class II B genes: analysis of interallelic and interlocus sequence variance. *Eur. J. Immunol.*, 23: 1139–1145.