

学 術

ウシ主要組織適合遺伝子クラスIIの多様性の解析と ウシ慢性感染症との関連性

竹嶋伸之輔¹・間 陽子²

1. 十文字学園女子大学 食物栄養学科

2. 理化学研究所 開拓研究本部

1. はじめに

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) は、近交系マウス同士の皮膚移植片の適合および拒絶に関与する遺伝子領域として発見され、マウスにおいてH-2領域と命名された。その後、この領域は脊椎動物で広く保存されていることが判明し、ヒトではヒト白血球抗原 (HLA)、ウシではウシ白血球抗原 (BoLA) などと呼称され、免疫応答に関与する多数の遺伝子が密に連鎖して存在していることがわかっている。特に、抗原提示という極めて重要な免疫機能を担うMHCクラスIおよびMHCクラスIIは、組織適合に決定的な役割を有しており、さらには、免疫応答の個体差の生成にも関与していると考えられている。

このMHC領域は、他の遺伝子領域と比較して一般的に飛び抜けて多様性が高く、遺伝子密度も高い領域であり、全世界で行われたヒトゲノム解析においても、HLA領域は別のコンソーシアムが組織され、1999年にその配列の全容が公開された¹⁾。HLA領域はヒト6番染色体上の360万塩基対にわたる領域に位置しており、224遺伝子が領域内に同定された。また、HLA領域の遺伝子数はハプロタイプによって大きく異なる事も明らかとなり、この領域の高度な多様性やそれぞれの遺伝子の著しい多型性、そして免疫に関与する多数の遺伝子座がマップされていることから、免疫応答の多様性を生み出していることが明らかとされ、その結果としてHLA領域には、100にもおよぶ疾病の責任遺伝子がマップされ

ており、疾患と相関する遺伝子領域としての重要性が明らかとなっている (図1)。

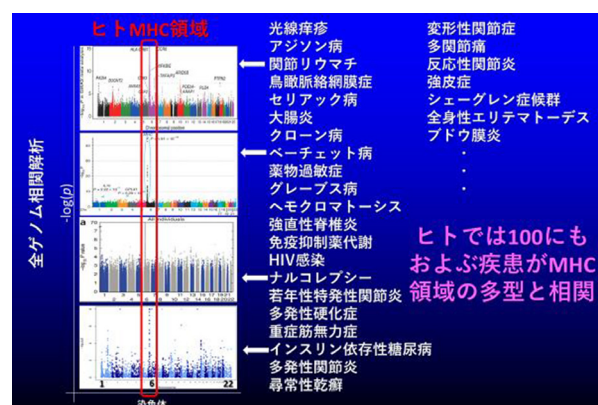


図1 主要組織適合遺伝子領域と相関するヒト疾患

ウシMHCであるBoLA領域はウシ23番染色体上に、2カ所に分断されて位置している。クラスII遺伝子領域はセントロメアに近い方のクラスIIb遺伝子領域と、白血球の表面抗原で、外来ペプチドの認識に関わる古典的クラスII抗原をコードするクラスIIa遺伝子領域に大きく分断されている。クラスIIa領域に続いて、補体などの自然免疫に関与する遺伝子群を豊富に含むクラスIII領域が位置し、そのさらにテロメア側に内在性抗原の認識に関与するクラスI抗原をコードするクラスI遺伝子がマップされるクラスI遺伝子領域が位置している (図2)。興味深いことに、BoLAクラスIIa領域は、他のBoLA遺伝子領域と比較して、DRおよびDQといった抗原提示を担うクラスII分子のみがコードされている。特にDR分子はクラスII分子の中でも最も強く発現しており、

また既知の対立遺伝子数が136と、他の多型的なMHC分子と比較しても極めて高度な多型性を有している。

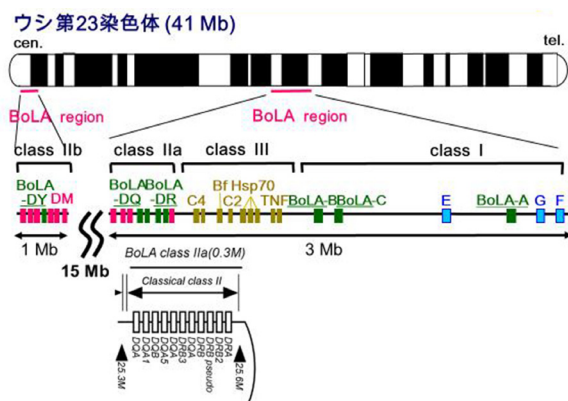


図2 ウシ主要組織適合遺伝子領域 (BoLA)

2. BoLA-DRB3のタイピング法の開発

理研の間研究室では、BoLAクラスII DRB3遺伝子が地方病性牛白血病 (EBL) の発症と強く関連することを25年前に見だし、その解析を進めてきた。136ものアレルが報告されているBoLA-DRB3遺伝子は、BoLAクラスII領域の中でも最も多型的な遺伝子座であるため、正確なタイピングは困難であった (図3)。

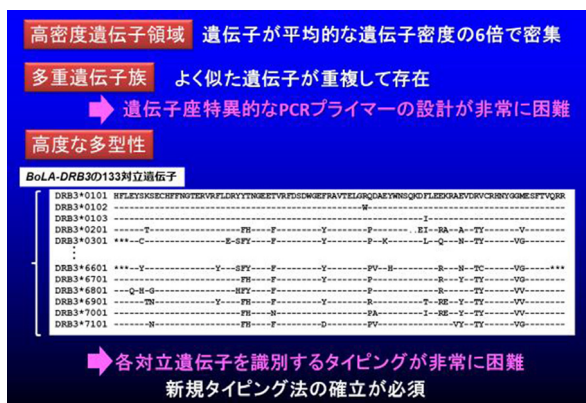


図3 BoLA領域内の遺伝子の特徴

そこで、我々は、世界中のウシのBoLA-DRB3遺伝子を正確にタイピング可能なPCR sequence based typing (SBT) 法の開発に着手した²⁻⁵⁾ (図4)。

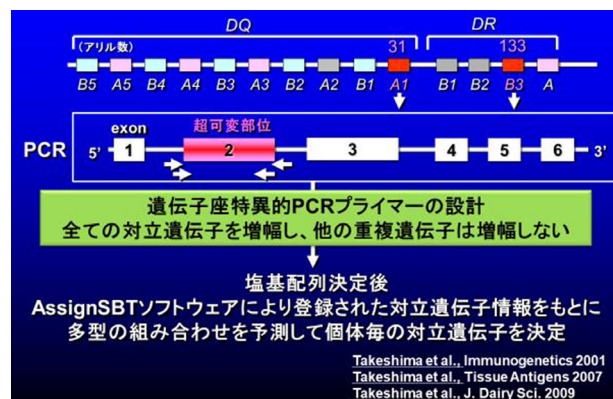


図4 BoLAクラスIIのPCR-sequence based typing (SBT) 法の開発

DRB1、DRB2やDQBなどの重複遺伝子は増幅せず、DRB3遺伝子のみを特異的に増幅し、さらにDRB3の136アレル全てを増幅可能なPCR法の設計のために、日本・フィリピンなどのアジア諸国および北・南米大陸に赴き、8年間で17品種より5,000頭のサンプリングを行い、そのゲノム解析を行い、世界中のウシをタイピング可能なPCR-SBT法の構築に成功した (図5)⁶⁻⁸⁾。

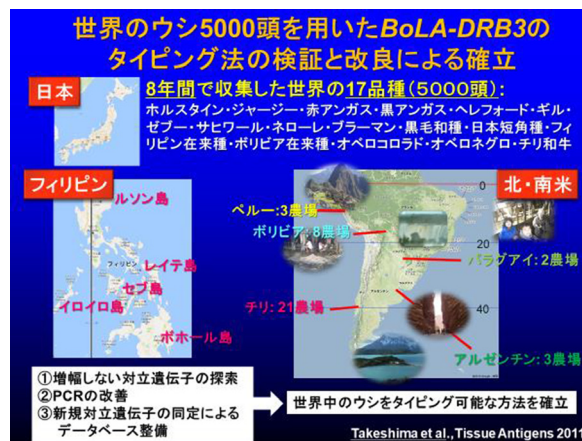


図5 世界のウシ5000頭を用いたBoLA-DRB3のタイピング法の検証と改良による確立

収集した17品種について、BoLA-DRB3のアレル頻度を解析したところ、品種によって固有のアレル頻度が存在し、その頻度は品種ごとに大きく異なることが明らかとなった (図6)。

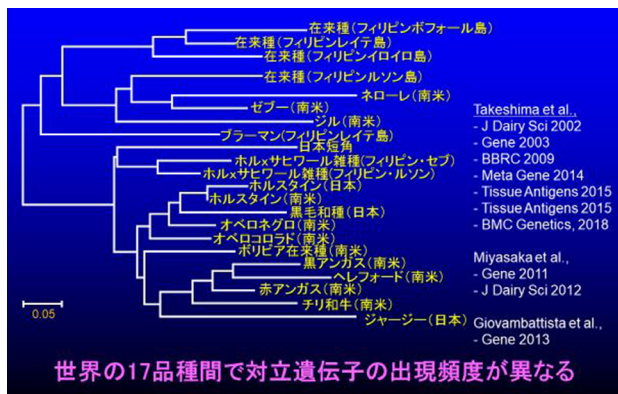


図6 確立した新技術を用いた17品種のBoLA-DRB3 s 対立遺伝子の同定とその頻度から構築した品種間の系統樹

この事は、疾患感受性アレルを検出するための相関解析は、各々の品種ごとに実施する必要があることを意味していた。

3. BoLAクラスIIと乳房炎

我々は、同様の手法を用いて、クラスIIで2番目に多型的なBoLA-DQA1遺伝子のPCR-SBT法の開発にも成功し、これらのタイピング法を用いて、BoLAクラスII遺伝子と乳房炎との関連性の解析を行った(図7)。



図7 乳房炎発症に関するBoLA対立遺伝子の同定

その結果、乳房炎の発症には、BoLAクラスIIの中でもとくにDQA1遺伝子のホモ接合度が関与している可能性があることを世界で初めて見いだした⁹⁾(図8)。

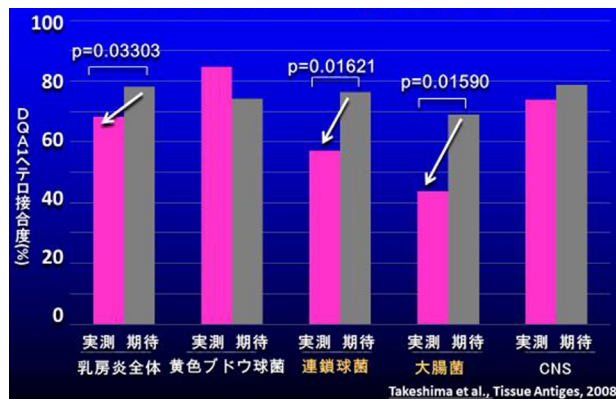


図8 連鎖球菌と大腸菌性乳房炎の発症牛でBoLA-DQA1のヘテロ接合度が低下

4. BoLAクラスIIと地方病性牛白血病

また、地方病性牛白血病との関連性の解析を行った結果、ホルスタイン種ではDRB3*0902とDRB3*14011、黒毛和種ではDRB3*0902アレルを有する個体では牛白血病ウイルス (BLV) の血中プロウイルス量の上昇が強く抑制されることを見いだした¹⁰⁾(図9)。

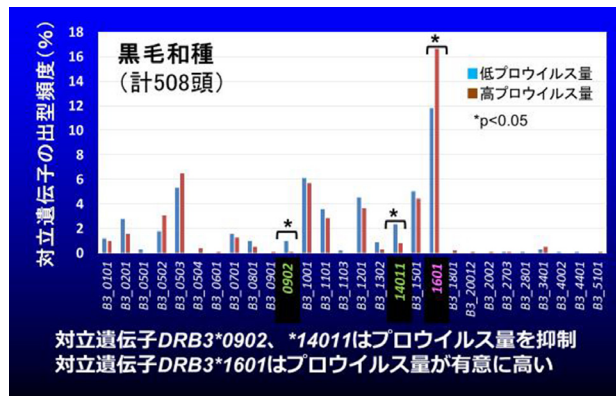


図9 BLVプロウイルス量と関連する黒毛和種のBoLA-DRB3対立遺伝子

一方で、血中プロウイルス量の上昇に関与するBoLA-DRB3アレルは品種によって異なり、ホルスタイン種ではDRB3*1201およびDRB3*1501が、黒毛和種ではDRB3*1601が感受性遺伝子として検出された(図10)。

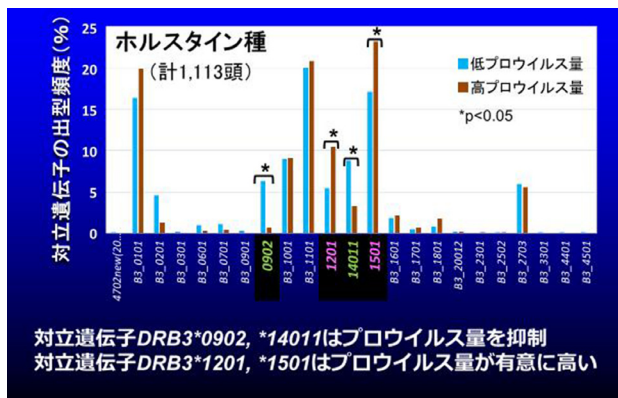


図10 BLVプロウイルス量と相関するホルスタイン種のBoLA-DRB3対立遺伝子

続いてBLV感染実験において、感受性遺伝子DRB3*1201を有する個体では血中プロウイルス量が上昇するのに対して、DRB3*1201とともに抵抗性遺伝子DRB3*14011を有する個体では、血中プロウイルス量の上昇が抑制されていること（図11）。

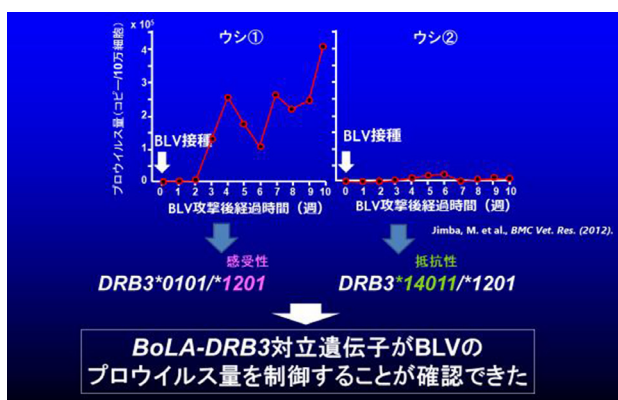


図11 ホルスタイン種の実験感染個体におけるプロウイルス量の推移とBoLA-DRB3対立遺伝子の同との相関性

および農場のホルスタイン種の血中プロウイルス量の推移を観察すると、感受性遺伝子を有する個体では血中プロウイルス量が高値を維持するが、抵抗性遺伝子を有する個体で低値を維持すること、などが確かめられ、我々の見いだした感受性・抵抗性遺伝子のBLVの病態進行に影響する事を確かめた（図12）。

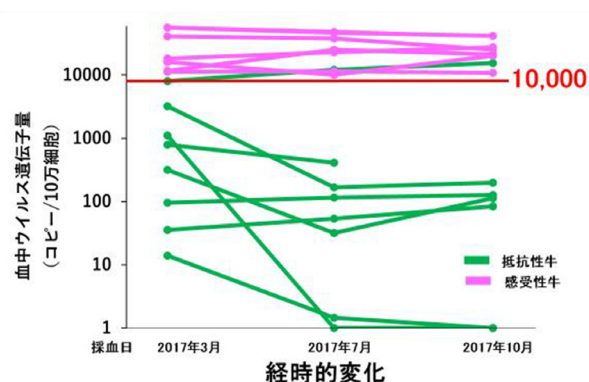


図12 プロウイルス量は感受性牛で高く、抵抗性牛で低く維持される

続いて、マイクロアレイを用いた全ゲノム相関解析によりBLVの血中プロウイルス量に関連する一塩基多型 (SNP) の検出を行ったところ、22番染色体 (rs110616206)、23番染色体BoLAクラスIII領域内 (rs29026690) およびBoLAクラスI領域内 (rs17872126) の3カ所のSNPsがBLVプロウイルス量と相関する事を明らかにした¹¹⁾ (図13)。

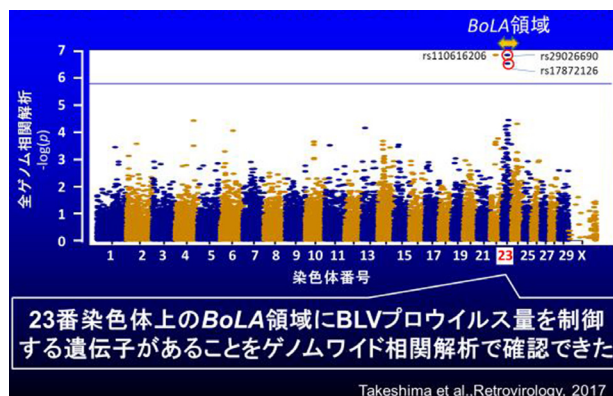


図13 マイクロアレイによる全ゲノム相関解析によるBLVプロウイルス量を制御するSNPマーカーの検出

5. 全BoLA領域の解析

しかしながら、BoLA領域は高度に多型性に富む遺伝子が狭い領域に他の領域に比べて6倍もの密度で密集しており、さらに高精度な解析が必須であった。そこで、我々は現在、次世代シーケンサー (NGS) を用いたBoLA領域の解析法の開発に着手している（図14）。

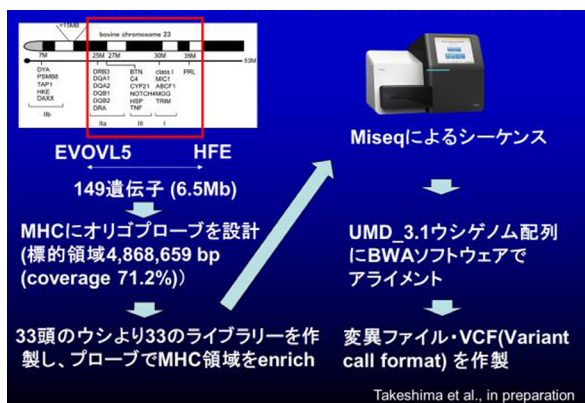


図14 BoLA領域のターゲット・リシーケンス法の開発

この方法で33頭のBoLA領域の変異解析を行った所、47,747の既知の変異に対して、8,139もの新規変異が検出され、NGSの有用性が強く示唆された。今後、本手法を用いた相関解析をすすめていくことにより、血中プロウイルス量と真に相関する責任遺伝子が同定されることが期待される（図15）。

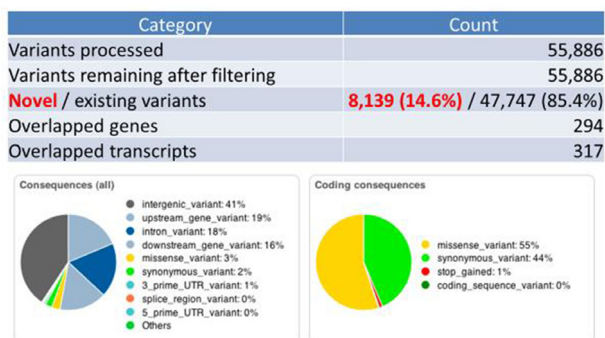


図15 次世代シーケンスにより第23番染色体・BoLA領域に8139個の新規SNPを見いだした

6. まとめ

宿主遺伝子タイピングによる病態進行の予測法は、感受性動物を用いた効果的なワクチン開発や発症予測、さらに、抵抗性個体の育種による感染症対策や、抵抗性個体においてウイルスが増殖せず、感染源とならない事を利用した新たな防疫対策などに応用可能である。MHCと相関する疾患は、我々の示した2種類の疾患にとどまらず、多岐にわたると考えられ、今後のタイピング法の開発にあわせて、獣医領域の疾患に対する感受性・抵抗性の識別はますます

重要性が増してくると考えられる。

本研究は理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニットで実施されたものであり、間陽子博士をはじめとしたユニット員の方々、および全国・全世界の共同研究者の先生方、農場の方々に深謝いたします。

キーワード

キーワード1：ウシ

キーワード2：血液・造血器系

キーワード3：人獣共通感染症

キーワード4：牛白血病ウイルス

引用文献

- 1) consortium TMs: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 1999, 401 (6756) : 921-923.
- 2) Takeshima SN, Matsumoto Y, Miyasaka T, Arainga-Ramirez M, Saito H, Onuma M, Aida Y: A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens* 2011, 78(3) : 208-213.
- 3) Takeshima S, Saitou N, Morita M, Inoko H, Aida Y: The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* 2003, 316 : 111-118.
- 4) Takeshima S, Nakai Y, Ohta M, Aida Y: Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *J Dairy Sci* 2002, 85(6) : 1630-1632.
- 5) Takeshima S, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Aida Y: Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics* 2001, 53(1) : 74-81.
- 6) Takeshima SN, Corbi-Botto C, Giovambattista G, Aida Y: Genetic diversity of BoLA-DRB3 in South American Zebu cattle populations. *BMC genetics* 2018, 19(1) : 33.
- 7) Takeshima SN, Miyasaka T, Matsumoto Y, Xue G, Diaz Vde L, Rogberg-Munoz A, Giovambattista G, Ortiz M, Oltra J, Kanemaki M *et al*: Assessment of biodiversity in Chilean cattle using the distribution of major histocompatibility complex class II BoLA-DRB3 allele. *Tissue Antigens* 2015, 85(1) : 35-44.
- 8) Takeshima SN, Giovambattista G, Okimoto N, Matsumoto Y, Rogberg-Munoz A, Acosta TJ, Onuma M, Aida Y: Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens* 2015, 86(6) : 419-430.

- 9) Takeshima S, Matsumoto Y, Chen J, Yoshida T, Mukoyama H, Aida Y: Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens* 2008, 72(6) : 525-531.
- 10) Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsuhashi T, Sentsui H, Aida Y: Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* 2013, 81(2) : 72-82.
- 11) Takeshima SN, Sasaki S, Meripet P, Sugimoto Y, Aida Y: Single nucleotide polymorphisms in the bovine MHC region of Japanese Black cattle are associated with bovine leukemia virus proviral load. *Retrovirology* 2017, 14(1) : 24.

プロフィール

1972年生まれ

2001年3月 東北大学大学院 博士課程後期資源生物科学専攻修了

1998年4月 理化学研究所 ジュニアリサーチアソシエイト

2001年4月 理化学研究所 協力研究員

2011年4月 理化学研究所 研究員

2018年4月 十文字学園女子大学食物栄養学科 教授

現在に至る

2001年3月 博士（農学）学位取得（東北大学）

「Study of bovine major histocompatibility complex (BoLA) class 2 DRB3 gene」

2018-2019年度 日本獣医学会賞 受賞

主な著書：獣医免疫学—獲得免疫における主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と抗原提示細胞，緑書房、2015年
The genetics of cattle 2nd ed. -Bovine Immunogenetics, CAB International Mycol oical Institute、2014年