

平成 26 年度 卒業論文

コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造の解析

京都大学農学部資源生物科学科

動物遺伝育種学分野

石塚 真太郎

目 次

緒 言	-----	1
材料と方法	-----	5
結 果	-----	10
考 察	-----	16
要 約	-----	19
謝 辞	-----	21
引用文献	-----	22

緒 言

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; 以下 MHC と略す) は、すべての有顎の脊椎動物が有する免疫反応に関わるゲノム領域である。MHC 領域内の遺伝子にコードされる MHC 分子と外来抗原が結合して細胞表面に提示され、それが T 細胞に認識されることによって免疫反応が引き起こされる (Klein, 1986)。MHC はゲノム内で最も多様性が高い領域であり、その多様性には特定の遺伝子のアレル数の多さに加え、進化の過程で頻繁に発生した遺伝子重複、消失による遺伝子数の多型も含まれる (Kelley ら, 2005)。これらの高い多様性は、生物が進化の過程の中で異なる感染症への免疫反応を獲得してきたために生じたと考えられている (Zinkernagel ら, 1979)。

MHC がもつ機能および多様性の高さから、これまでに多くの生物種において MHC に関する研究が行われてきた (Fernando ら, 2008)。MHC のゲノム構造についても、ヒトを含む多くの脊椎動物で明らかにされている。鳥類においては、キジ目に属するニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、クロライチョウ、キンケイおよびソウゲンライチョウについて MHC-B 全域のゲノム構造とその全塩基配列が報告されている (Kaufman ら, 1999; Hosomichi ら, 2006; Chaves ら, 2009; Ye ら, 2012; Wang ら, 2012; Eimes ら, 2013)。しかし、キジ目以外に分類される鳥類については、ゼブラフィンチ、カモおよびトキの 3 種において、MHC 領域の一部のゲノム構造が報告されているに過ぎない (Ekblom ら, 2011; Moon ら, 2011; Taniguchi ら, 2014)。鳥類の MHC の特徴や進化についての理解を深めるためには、多くの様々な鳥類種における、MHC のゲノム構造に関する情報が必要である。

MHC は生物の生存に関わる重要な遺伝子領域であるため、希少動物の保全の

観点からも注目されてきた(Sommer ら, 2005)。近年、希少動物を人工飼育下で繁殖させ、野生環境へ再導入する計画が広く行われている(Ezaki ら, 2013)。このような繁殖においては、近親交配を避け、集団の遺伝的多様性を維持することが求められる(Frankham, 2002)。この理由として、近親交配が近交退化を引き起こし、個体の適応度を下げることによって集団の存続が困難になることが挙げられる(Reed ら, 2001)。また、MHC については、その多様性が失われると、環境の変化が起こったときに集団内から新たな環境に適応する個体が現れる可能性が低くなることや、新たな感染症に対して抵抗性を示す個体が失われるなど、集団が絶滅するリスクが高くなる。したがって、希少動物集団の保全の上では、MHC の多様性を維持することが特に重要であると考えられている。また、集団の遺伝的多様性を維持していくためには、各個体の MHC アリルあるいはハプロタイプを特定し、多様性を評価することが必要となるが、より正確な評価のためにも各遺伝子のコピー数なども含めた MHC 領域のゲノム構造を知る必要がある。

コウノトリは、IUCN の絶滅危惧 IA 類に分類されている希少鳥類である(IUCN, 2014)。極東アジアを中心に分布し、冬になると越冬するために極東から中国、韓国、日本などに飛来してくる。かつては日本列島に留島している個体群も存在していたが、第二次世界大戦以降は農薬の使用や人為活動による生息地の消失などのために個体数が激減し、1971 年に日本留島個体群は絶滅したと認定された。現在の世界全体での個体数は 1,000 から 2,500 個体と見積もられている。

日本では、1955 年に「コウノトリ保護協賛会」が発足して以来、兵庫県豊岡市が中心となって保全活動が展開されてきた。1965 年からは野生個体を捕獲して繁殖を目指す事業が始まり、野生個体の絶滅後は飼育下での保護・増殖へと

進展した。現在の日本のコウノトリ集団は、**1985**年に旧ソ連より「兵庫県立コウノトリの郷公園」に贈与された**6**個体と、その後各地の動物園から移入された数個体を始祖として形成されてきた (<http://www.stork.u-hyogo.ac.jp/>)。2015年1月現在では、**3**世代に渡る**90**個体以上が園内で飼育されている。また、**2005**年には、過去の生息地である豊岡盆地へ人工繁殖させたコウノトリを放鳥する再導入計画が開始されており、現在**70**個体以上が豊岡市内に「野生個体」として生息している。この再導入計画を継続していくためには、飼育下集団を適切に管理し、個体数を維持すると同時に交配をコントロールするなどして、集団の遺伝的多様性を維持していくことが求められる。そのためには、飼育下個体群のゲノム情報を利用した遺伝的管理が必要である。

コウノトリの遺伝学的研究については、これまでにミトコンドリア DNA、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的多様性に関する研究が報告されている。ミトコンドリアゲノムに関しては、全塩基配列が決定されるとともに、飼育下**26**個体の D ループハプロタイプが**9**種類であることが示されている (Yamamoto ら, 2000)。この報告では、サケ(**16**個体において**4**多様体)、スイギュウ(**80**個体において**33**ハプロタイプ)の野生集団のハプロタイプ頻度と比較して、飼育下コウノトリ集団のそれは比較的高いと述べられている。マイクロサテライトに関しても、飼育下**31**個体において**8**座位の平均アレル数が**5.08**であり、トキ(**8**座位において最大アレル数が**3**種類)のそれと比較して相対的に高いことが報告されている(内藤ら, 2012)。しかし、日本コウノトリ集団の遺伝的多様性に関する報告は非常に少なく、これまでにコウノトリ MHC のゲノム構造や多様性に関する報告はほとんど認められない。したがって、コウノトリ集団の MHC の遺伝的多様性を明らかにすることは、保全への取り組みに非常に有用であると期待される。また、キジ目とは分類上で大きく異なるコウノトリ

目に属するコウノトリの MHC ゲノム構造を明らかにすることは、鳥類の MHC の進化についても情報を与えると考えられる。

当研究室では、コウノトリの MHC のゲノム構造と、日本集団におけるその多様性を明らかにすることを目的とした研究を進めている。クラス II 領域については、ゲノム構造として *COL11A2*-MHC IIA/IIB-*BRD2* の順に遺伝子が並んでいることならびに主要な始祖 6 個体には 9 種類のハプロタイプが存在することを明らかにしている(辻, 2015)。本研究では、まだ解析が進んでいないコウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造を明らかにすることを目的とし、MHC クラス I 領域についてコンティグの作製およびその塩基配列の決定を行った。

材料と方法

プライマー

PCR に用いたプライマーを表 1 に示した。A11B F/R プライマーと A11B BRD2 F/R プライマーは、*BRD2* 遺伝子を含むクローン A11B の配列に基づいて、A11B の 3'末端および *BRD2* 遺伝子内に設定した(辻, 2015)。TAP1 exon7 F/R プライマーは、データベースのニワトリとウズラの *TAP1* 遺伝子エクソン 7 の配列に基づいて作製した。その他のプライマーは、本研究で得られたサブクローン末端の配列に基づいて設計した。

コウノトリゲノムライブラリーの PCR スクリーニング

スクリーニングには、当研究室で作製されたコウノトリゲノムライブラリーを使用した(辻, 2015)。PCR スクリーニングは、Taniguchi ら(2014)の方法に従って行った。また、PCR は以下の反応条件下で行った。ファージ溶液 1.5 μ l、2 \times KOD FX Neo Buffer (TOYOBO 社) 7.5 μ l、dNTP (各 2.5mM) 3 μ l、プライマー (各 50 μ M) 0.75 μ l、KOD FX Neo (TOYOBO 社) 0.3 μ l に DDW を加えて全量が 15 μ l となるように調製した。初めに 95°C で 5 分間加熱した後、DNA 変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを表 1 に示した温度で 30 秒、伸長反応を 72°C で 30 秒のサイクルを 35 回繰り返した。反応後、1.5%アガロースゲルで約 30 分間電気泳動を行い、増幅産物を検出した。各クローンの単離に使用したプライマーを表 2 に示した。Q17G は A11B F/R プライマーで陽性であり、A11B BRD2 F/R プライマーで陰性であるクローンとして単離した。Q13C は TAP1 exon7 F/R プライマーで陽性であるクローンとして得た。K8A と K6J は Q13C

表 1.PCR に用いたプライマー一覧

プライマー名	配列	アニーリング 温度()	増幅産物 鎖長(bp)	由来配列
A11B F	CACCATCCACCCAACCTCCT	58	386	A11B 3'末端
A11B R	ACCAGTGACGAGTGGTGTC			
A11B BRD2 F	GCCGGAGGTTTCCAACCCCAAG	63	300	A11B上BRD2配列
A11B BRD2 R	ACATCCGGGGTCAGGCAGCA			
TAP1 exon7 F	GCCCAGGGTAGGAGAACCA	60	176	ニワトリ、ウズラの TAP1配列
TAP1 exon7 R	CTGTCCCCAGGTCCTGCTC			
Q13C S	ATGTGGGACCCCAGGGGTAGT	62	293	Q13C 5'末端
Q13C A	TGAGCCCCTCAGACCGTCCTT			
MHC F	GGGAGGGACTTCATCGCCTT	60	304	Q13C上MHC- 遺伝子の配列
MHC R	GCCTCCTTCCCCGACACT			
Q13C F	TCCCCCTCCAAGTGCCAGTGA	60	217	Q13C 3'末端
Q13C R	GGCACAAAGTGGGGAGGACAA			
K6J F	CGTCTACCAAAGGAAACTGCC	57	195	K6J 3'末端
K6J R	TTTTCTTACCGGTTGTGCTCC			
T69H F	TACCAGCTGGAGCTCTGCC	60	281	T69H 3'末端
T69H R	AGGACAAGGCACCCCAGAAG			
V66E S	GACTTGCAACGGGGACAGAC	60	421	V66E 5'末端
V66E A	GCTGTGTGGCCAAACCTCTC			
V66E F	TGTGACTAGTCCTTGCAGCGT	58	201	V66E 3'末端
V66E R	AGGGCCTTATACTTCCATGGGT			
Z34D F	GGCAACTCTGCAGACAGCAAG	59	374	Z34D 3'末端
Z34D R	TGGGCTCACTTTCACACCCAA			

表 2.各クローンの単離に用いたプライマー

No.	クローン名	陽性選抜用プライマー	陰性選抜用プライマー
1	Q17G	A11B F/R	A11B BRD2 F/R
2	Q13C	TAP1 exon7 F/R	
3	K8A	Q13C S/A	Q13C F/R
4	K6J	Q13C F/R	Q13C S/A
5	T69H	K6J F/R	MHC F/R
6	V66E	T69H F/R	K6J F/R
7	Z34D	MHC F/R	
8	N49F	Z34D F/R, MHC F/R	

からそれぞれ 5'末端方向、3'末端方向へのゲノムウォーキングによって得た。同様に K6J から 3'末端方向のゲノムウォーキングを繰り返し、T69H と V66E を単離した。Z34D は MHC I F/R プライマーで陽性であるクローンとして単離した。N49F は MHC I F/R、Z34D F/R の両プライマーで陽性であるクローンとして単離した。

単離したラムダファージクロンの解析

陽性ファージクロンはプレートライセイト法により、ファージ DNA を精製した。得られたファージ DNA については、Q17G は *Bam*HI で、K8A と Q13C は *Eco*RI と *Xho*I で、その他のクローンは *Eco*RI で切断し、得られた制限酵素断片をプラスミドベクター pBluescriptII にサブクローニングした。トランスフォーメーションのコンピテントセルには Competent Quick DH5 α (TOYOBO 社) を使用した。大腸菌からのプラスミド DNA の精製には、Mini PlusTM Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE 社) を用いた。サブクローンの末端の塩基配列の決定は、(株)ファスマックに委託して行った。得られた配列データは BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bkast>) によりホモロジー検索を行い、アノテーションを試みた。配列データの解析には GENETYX version 11 (Software Development) を使用した。

PCR による繰り返し配列の同定

単離した 4 種類のクローン(K6J, T69H, V66E, N49F)に対して、5 種類のプライマー(K6J F/R, V66E S/A, T69H F/R, V66E F/R, MHC I F/R)を用いて PCR を行った。PCR は、PCR スクリーニングと同じ組成とし、サイクル数を 33 回とした。反応後、1.5%アガロースゲルで約 30 分間電気泳動を行い、増幅産物を

検出した。

鳥類 MHC のゲノム構造の比較

MHC 領域のゲノム構造が明らかになっている鳥類 8 種について、MHC クラス I 領域の *BRD2* 下流のゲノム構造を比較した。各ゲノム構造については、トキでは松本(2015)、カモでは Moon ら(2011)、ニワトリでは Kaufman ら(1999)、シチメンチョウでは Chaves ら(2009)、キンケイでは Ye ら(2012)、クロライチョウでは Wang ら(2012)、ソウゲンライチョウでは Eimes ら(2013)、ウズラでは Shiina ら(2004)を参照した。

次世代シーケンサー解析

MHC クラス I 領域の全塩基配列を決定するため、8 種類のサブクローンからゲノム DNA 断片を精製し(図 1)、クラス II 領域の DNA 断片と合わせて約 100kb について、北海道システムサイエンス社に委託して、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 による配列データの取得および Velvet プログラムによる de novo アセンブルを行った。得られたコンティグについては、BLAST によるホモロジー検索ならびに既知の各サブクローンの末端配列との相同性の一致程度の分析を行い、各コンティグの MHC 領域内の位置を同定した。

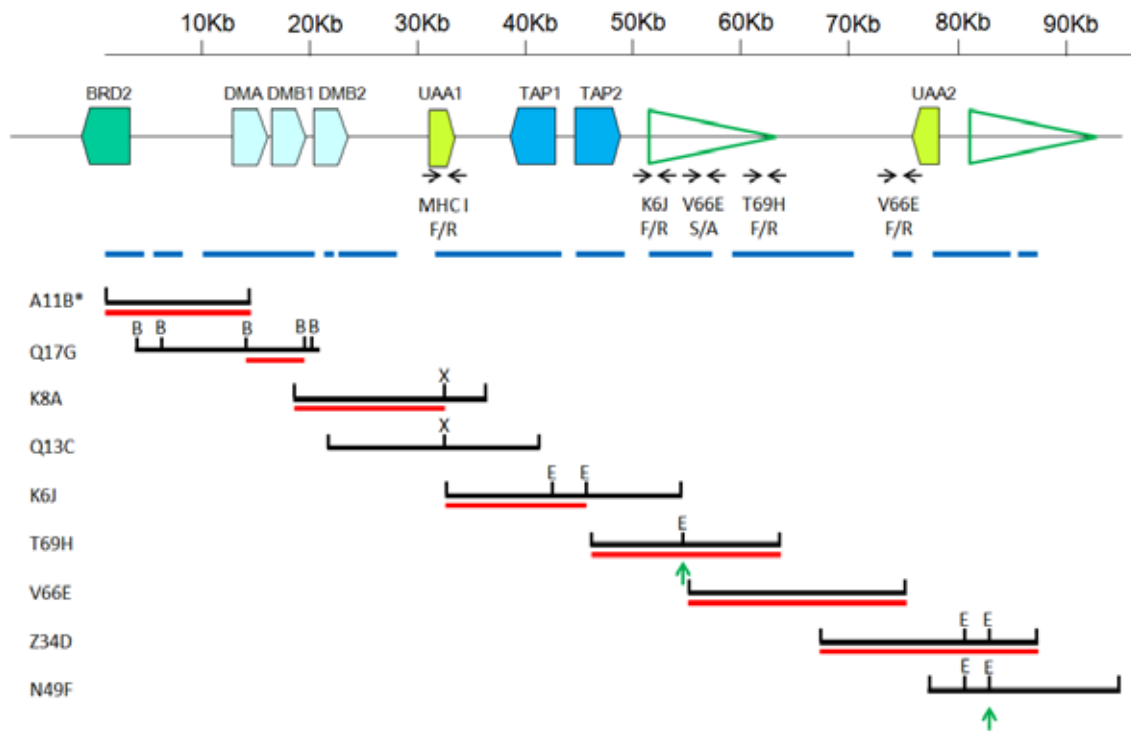


図 1.コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造

BRD2、*DMA*、*DMB1*、*DMB2*、MHC I(*UAA1*)、*TAP1*、*TAP2*および MHC I(*UAA2*) 遺伝子の位置と転写方向が示されている。緑の三角形は繰り返し配列が存在していると考えられる領域を、緑の矢印は両側の配列が高い相同性を示した *EcoRI* 部位を示している。B、E および X は、サブクローニングに用いた *Bam*HI、*Eco*RI および *Xho*I の制限酵素部位をそれぞれ示している。黒線は単離したラムダファージクローンの位置を、赤線は次世代シーケンサー解析を行ったゲノム DNA 断片を、青線は次世代シーケンサー解析により、塩基配列が得られた領域を示している。また、向かい合った矢印はプライマーの位置を示している。A11B*クローンについては、辻, (2015)を参照した。

結 果

コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造

コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造を決定するために、MHC 遺伝子のクローニングを実施した(表 2)。はじめに、*BRD2* 下流を含むクローンとして Q17G を、*TAP1* を含むクローンとして Q13C を単離した。サブクロンの末端配列のホモロジー検索から、クローン Q17G は *BRD2*、*DMA* および *DMB2* 遺伝子を、クローン Q13C は *DMB2*、MHC I(*UAA1*) および *TAP1* 遺伝子を含むことが示唆された。次に、クローン Q13C から両方向へのゲノムウォーキングによってクローン K8A とクローン K6J を単離した。クローン K8A によりクローン Q17G とクローン Q13C の間のギャップは補間された。クローン K6J のサブクローン末端配列からは、新たに *TAP2* 遺伝子が検出された。さらに、クローン K6J から下流方向にゲノムウォーキングを繰り返すことで、クローン T69H とクローン V66E を単離した。クローン Z34D は MHC I(*UAA2*) 遺伝子を含むクローンとして単離したが、その後の PCR を使った解析により、V66E と重複していることが示唆された。最後に、Z34D の下流を含むクローン N49F を単離し、最終的に約 90kb のコンティグを作製した。コンティグは *BRD2* の一部、*DMA*、*DMB1*、*DMB2*、*UAA1*、*TAP1*、*TAP2* および *UAA2* を含んでおり、これらの遺伝子の転写方向を含め、おおよそのゲノム構造が決定された。

クラス I 領域内の繰り返し配列の分析

各サブクロンの両端の塩基配列を決定した結果、クローン T69H の *EcoRI* 切断部位両側の塩基配列は、クローン N49F の下流側の *EcoRI* 切断部位両側の塩基配列と高い相同性を示した(図 1, 緑の矢印)。そこで、*TAP2* と *UAA2* の間と

UAA2 下流に繰り返し配列が存在しているかどうかを検討するために、4 種類のファージクローンに対して 5 種類のプライマーを用いて PCR を行った(図 2)。K6J F/R プライマーおよび V66E S/A プライマーを用いた PCR では、クローン N49F において増幅が見られた。T69H F/R プライマーを用いた PCR においても、シグナルは弱いものの、クローン N49F で増幅が見られた。一方、V66E F/R プライマーを用いた PCR では、クローン N49F でのシグナルは、V66E F/R プライマー領域を含む V66E クローンのシグナルよりも弱く、かつこの領域を含まないクローン T69H と同程度であったことから、増幅されていないと判断した。MHC I F/R プライマーを用いた PCR においては、クローン K6J とクローン N49F でのみ増幅が見られ、N49F がクローン T69H やクローン V66E とは異なるゲノム上の位置にあることが示された。これらの結果から、*UAA2* 下流に、少なくとも K6J F/R プライマーから T69H F/R プライマーまでのかなり長い配列が繰り返し配列として存在していると考えられた(図 1, 緑の三角)。

他の鳥類との MHC クラス I 領域のゲノム構造の比較

コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造の特徴を理解するために、他の鳥類のゲノム構造と比較した(図 3)。コウノトリクラス I 領域内における *BRD2* - *DMA* - *DMB1* - *DMB2* - *UAA1* - *TAP1* - *TAP2* - *UAA2* という遺伝子の並びは、概ね他の鳥類のものと一致していた。*DMB2* と *TAP1* の間の MHC I についてもコウノトリでは 1 コピー存在し、他の 8 種中 5 種の鳥類(トキ、ニワトリ、シチメンチョウ、キンケイおよびクロライチョウ)と数および転写方向が一致していた。一方、コウノトリの *BRD2* から *TAP2* までの領域は、キジ目のものよりも長く、遺伝子密度が低くなっていることが推察された。また、*TAP2* と *UAA2* の間の距離についても、他の鳥類と比べてかなり長くなっていた。*TAP2* 遺伝子

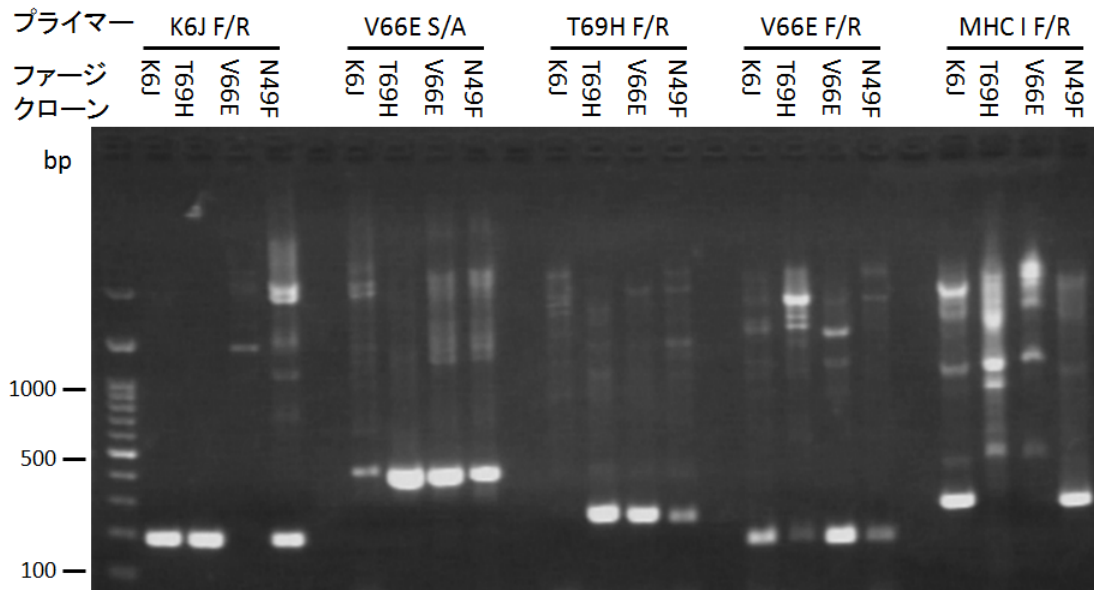


図 2. 繰り返し配列についての PCR 解析

ファージクローン K6J、T69H、V66E および N49F に対して、K6J F/R、V66E S/A、T69H F/R、V66E F/R および MHC-I F/R プライマーを用いて PCR を行った。分子量マーカーとして、100bp ラダー(GeneDireX 社)を泳動した。

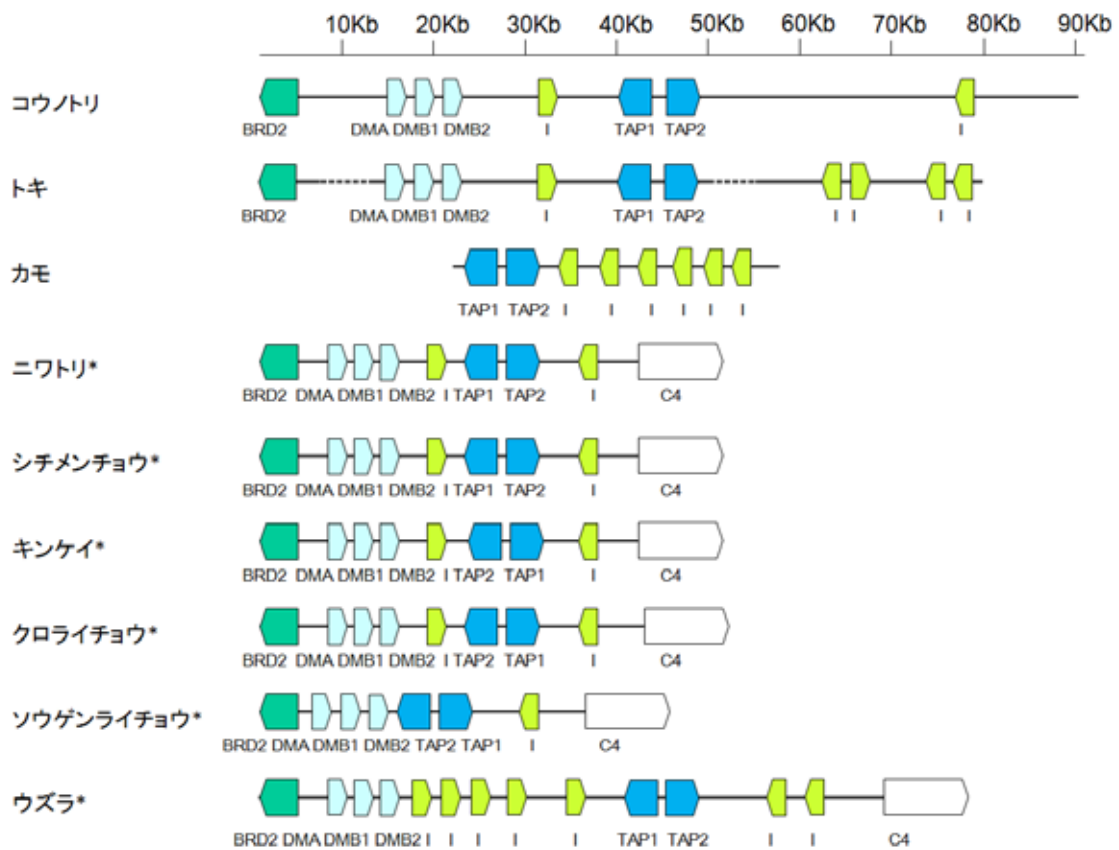


図 3.鳥類の MHC クラス I 領域のゲノム構造の比較

アスタリスクはキジ目の鳥類であることを示す。カモでは *TAP1* 上流のゲノム構造が明らかにされていない。トキでの点線はゲノム構造が明らかになっていない領域を示す。コウノトリ、トキおよびカモでは *TAP2* 下流に位置する MHC I の遺伝子領域のさらに下流のゲノム構造が明らかになっていない。

下流に存在する MHC I 遺伝子領域の構造は、トキ、カモおよびキジ目の鳥類の間で種間差が大きい。コウノトリではこの領域に MHC I 遺伝子が 1 コピーのみ検出されたが、さらに下流においてさらなる MHC I 遺伝子が存在している可能性も残されている。コウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造は、遺伝子の並びは他の鳥類と概ね一致している一方、遺伝子密度はキジ目よりも低くなっていると考えられた。

次世代シーケンサーによる塩基配列の決定

コウノトリ MHC クラス I およびクラス II 領域の塩基配列を決定するために、Illumina HiSeq2500 によるシーケンスを行った結果、11,944,902 リード、計 1.2Gb の配列データが得られた(クラス II 領域については、辻(2015)を参照のこと)。クラス I 領域に関しては、アセンブルされたコンティグのうちの 15 個がマッピングされた(図 1)。解析を行ったクラス I 領域の長さは約 80kb であったが、塩基配列がマッピングされたのは約 57.5kb であり、11 か所のギャップを含んでいた(図 S1)。サブクローン末端の配列から検出されていた 8 遺伝子は、次世代シーケンサーによる各コンティグにおいてもホモロジー検索により存在が確認され、*DMA*、*DMB1*、*TAP1* および *TAP2* については、遺伝子の全長の塩基配列が推定された。*UAA1* および *UAA2* の上流領域についてはマッピングされたコンティグが少なく、比較的大きなギャップが残された。得られた塩基配列データの中に多くのギャップが残され、アセンブルのミスも含まれていたことから、コウノトリ MHC クラス I 領域全域の塩基配列を決定するためにはさらなる解析が必要である。

考 察

本研究では、コウノトリ MHC クラス I 領域の約 90kb のコンティグが作製され、少なくとも 8 個の遺伝子を含むコウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造が明らかにされた(図 1)。コウノトリでの *BRD2* - *DMA* - *DMB1* - *DMB2* - *UAA1* - *TAP1* - *TAP2* - *UAA2* という遺伝子の並びは他の鳥類と概ね一致しており(図 3)、鳥類の共通祖先の MHC クラス I 領域においてもこのようなゲノム構造であったことが示唆される。さらに、キジ目以外のカモとトキでの *TAP1* と *TAP2* の並びを考慮すると、クロライチョウ、ソウゲンライチョウおよびキンケイにおいて見られる *TAP1*-*TAP2* 領域の部分の反転(図 3)は、キジ目が分岐した後後に生じたとも考えられる。

TAP2 下流の MHC クラス I 遺伝子群のゲノム構造には、鳥類の種間で大きな差が見られた。*TAP2* 下流に存在する MHC I 遺伝子の数については、ウズラを除くキジ目では 1 コピーのみが検出されているのに対し、トキ、カモおよびウズラのような渡りを行う鳥の鳥類では複数コピーが検出されている。これは、渡り鳥が移動の際により多様な環境に対して適応してきた結果、多くの MHC I 遺伝子と MHC IIB 遺伝子を獲得してきたためと考えられている(Shiina ら, 2004)。コウノトリが渡り鳥であることを考慮すると、*UAA2* 下流にはさらに MHC I 遺伝子が存在していることが予想される。

コウノトリでは *UAA2* の両側に長い繰り返し配列が存在していたが(図 1)、鳥類において *TAP2* 下流の MHC I 遺伝子の両側に長い繰り返し配列が確認されているのはコウノトリのみである。ニワトリ、シチメンチョウ、キンケイ、クロライチョウおよびソウゲンライチョウでは、*TAP* と *C4* の間に MHC I 遺伝子が 1 コピー存在しているのみである(図 3)。ウズラとカモにおいては、転写方向が

すべて同じ MHC I 遺伝子が *TAP2* 下流に 2 コピーと 5 コピーそれぞれ存在している。トキでは 4 つの MHC I 遺伝子(*UAA2-5*)が確認されており(松本, 2015)、このうち *UAA3* とその下流約 12kb は *UAA4* と逆向き繰り返し配列となっている。これらの比較から、鳥類の *TAP* 下流の MHC クラス I 領域は種間差が大きいゲノム領域と考えられ、それぞれの種が共通祖先と分岐した後に特異的な進化をとげた結果と考えられる。

本研究では、次世代シーケンサーを用いてコンティグの全塩基配列の決定を試みたが、多くの塩基配列が決定されない領域が残された。これは、コウノトリ MHC クラス I 領域に複数存在する繰り返し配列や、2 コピーの MHC I 遺伝子(*UAA1* と *UAA2*)の間でアセンブルにミスが生じたこと、既知の塩基配列情報がサブクローン末端に限られており、マッピングされていないコンティグが残されていることが関係していると考えられる。したがって、現状では、遺伝子の構造や遺伝子間の領域に関して信頼できる解析が行えていない。Velvet 以外のプログラムを用いたアセンブル解析や、ギャップ部分についてサンガーシーケンスを用いた配列データを取得するなど、さらなる解析が必要である。全塩基配列の決定を進めることにより、遺伝子密度なども含めたコウノトリ MHC クラス I 領域の特徴がより明らかにできると考えられる。

本研究でのコウノトリ MHC クラス I 領域約 90kb のゲノム構造に加え、クラス II 領域については約 40kb のゲノム構造が明らかにされている(辻, 2015)。キジ目以外の鳥類においては、このような広域の MHC のゲノム構造が明らかにされたのは初めてであり、今後、コウノトリ MHC 領域の全ゲノム構造の決定を進めることは、鳥類の MHC の進化を解明する上での手がかりとなることが期待できる。

本研究で明らかになったコウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造の知見を、

保全に役立てることも期待される。これまでも、希少動物であるハワイモンクアザラシやキングサーモンの MHC I 遺伝子の多様性を解析し、集団の絶滅の危険性について論じた報告が認められている(Aldridge ら, 2006; Garrigan ら, 2001)。現在、日本コウノトリ集団の始祖 6 個体においてクラス II 領域のハプロタイプは 9 種類存在していることが明らかにされており(辻, 2015)、クラス I 領域での多様性解析の結果も加えることで、日本コウノトリ集団の遺伝的多様性の理解がさらに深められると期待される。これらの情報を用いて交配させる個体をコントロールすることなどにより、日本コウノトリ集団の保全活動が促進されることが望まれる。

要 約

コウノトリ (*Ciconia boyciana*) は絶滅危惧種に指定されている希少鳥類であり、現在、国内において飼育下での繁殖や過去の生息地への放鳥など、積極的な保全活動が実施されている。このような希少動物の保全においては、集団の遺伝的多様性を維持することが重要な課題となっている。そのためには、ゲノム情報を利用した飼育下個体群の遺伝的管理や交配のコントロールなどが必要である。希少動物の保全のための遺伝的多様性の評価を行う際には、中立マーカーに加えて、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の多型が利用される。MHC は免疫に関わる遺伝子を多く含み、最も多様性に富むゲノム領域の一つである。MHC の多様性が失われると、環境変化や新たな感染症によって集団が絶滅するリスクが高くなることから、MHC の多様性を維持することは特に重要であると考えられる。これまでにコウノトリ MHC に関する研究として、MHC クラス II 領域のゲノム構造ならびに日本コウノトリ集団の始祖となっている 6 個体での多様性の解析が進められている。そこで本研究では、ゲノム構造が明らかになっていないコウノトリ MHC クラス I 領域のゲノム構造を明らかにするために、ゲノムウォーキングによるコンティグの作製および次世代シーケンサーによる塩基配列の決定を試みた。

PCR スクリーニングによって 8 種類のファージクローンを単離し、約 90kb の MHC クラス I 領域のコンティグを作製した。BLAST のホモロジー検索により、コンティグには *BRD2* の一部 - *DMA* - *DMB1* - *DMB2* - MHC I(*UAA1*) - *TAP1* - *TAP2* - MHC I(*UAA2*) の順で遺伝子が存在することが示された。さらに、PCR による解析により、*UAA2* の両側には約 10kb の繰り返し配列が存在していると考えられた。他の鳥類との MHC ゲノム構造の比較からは、*BRD2* か

ら *TAP2* までのゲノム構造が保存されている一方、コウノトリの *TAP2* から *UAA2* までの距離は他のどの鳥類よりも長くなっており、MHC 遺伝子の数や転写方向を含め、*TAP2* 遺伝子下流の領域では大きな種間差が見られた。また、次世代シーケンサーを用いてコンテイング約 **80kb** の塩基配列の決定を試みたが、配列が決定されたのは約 **57.5kb** であり、その中には **11** カ所のギャップが存在した。よって全塩基配列の決定にはさらなる解析が必要である。本研究で得られた情報は、コウノトリの保全活動に有用であるとともに、鳥類の MHC 進化を考える上でも有益であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始において多大なる御指導、ご協力をいただいた祝前博明教授に深く感謝するとともに、本研究の遂行ならびに本論文の作製にあたり直接御指導いただきました谷口幸雄助教、研究報告や文献紹介において貴重な御意見をいただいた松田洋和助教に深く感謝の意を表します。

また、サンプルを提供してくださった内藤和明准教授をはじめとする兵庫県立コウノトリの郷公園の方々、本研究を行う上での多大なる支援をしてくださった金子良則獣医師をはじめとする佐渡トキ保護センターの方々、貴重な実験のアドバイスをくださった新潟大学の山田宜永教授に深く感謝いたします。

最後に、いつも私を応援し、研究に専念させてくれた家族、多くの御助言や励ましの御言葉をくださった研究室の皆様に深く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- Aldridge, B. M., L. Bowen, B. R. Smith, G. A. Antonelis, F. Gulland, J. L. Stott
Paucity of class I MHC gene heterogeneity between individuals in the endangered Hawaiian monk seal population. *Immunogenetics*, 58, 203-215, 2006
- Eimes, J. A., K. M. Reed, K. M. Mendoza, J. L. Bollmer, L. A. Whittingham, Z. M. Bateson, P. O. Dunn
Greater prairie chickens have a compact *MHC-B* with a single class IA locus. *Immunogenetics*, 65, 133-144, 2013
- Ekblom, R., J. Stapley, A. D. Ball, T. Birkhead, T. J. Slate
Genetic mapping of the major histocompatibility complex in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Immunogenetics*, 63, 523-530, 2011
- Ezaki, Y., Y. Ohsako, S. Yamagishi
Re-introduction of the oriental white stork for coexistence with humans in Japan. *Global Re-introduction Perspectives*, 85-89, 2013
- Fernando, M. M. A., C. R. Stevens, E. C. Walsh, P. L. D. Jager, P. Goyette, R. M. Plenge, T. J. Vyse, J. D. Rioux
Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLoS Genetics*, 25, 100024, 2008

Frankham R., J. D. Ballou, D. A. Briscoe

Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, 2002

Garrigan, D., P. W. Hedrick

Class I MHC polymorphism and evolution in endangered California

Chinook and other Pacific salmon. Immunogenetics, 53, 483-489, 2001

IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.

<http://www.iucnredlist.org>

Kaufman, J., S. Milne, T. W. Gobel, B. A. Walker, J. P. Jacob, C. Auffray, R.

Zoorob, S. Beck

The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. Nature, 401, 923-925, 1999

Kelley, J., L. Walter, J. Trowsdale

Comparative genomics of the major histocompatibility complexes.

Immunogenetics, 56, 683-695, 2005

Klein, J.

Antigen-Major Histocompatibility Complex-T cell receptors: Inquiries into the immunological menage a trois. Immunologic Research, 5, 173-190, 1986

松本 啓佑

トキ MHC 領域のゲノム構造の解明ならびに日本集団における多様性の解析.
京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻博士前期課程 修士論文, 1-70,
2015

Moon, D. A., S. M. Veniamin, J. A. Parks-Dely, K. E. Magor

The MHC of the duck (*Anas platyhynchos*) contains five differentially
expressed class I genes. *The Journal of Immunology*, 175, 6702-6712, 2005

内藤 和明, 西森 功, 大迫 義人

豊岡の飼育下および野外のコウノトリの遺伝的多様性と繁殖計画への示唆.
野生復帰, 2, 57-62, 2012

Reed, D. H., R. Frankham

How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic
variation? A meta-analysis. *Evolution*, 55, 1095-1103, 2001

Shiina, T., S. Shimizu, K. Hosomichi, S. Kohara, S. Watanabe, K. Hanzawa,
S. Beck, J. K. Kulski, H. Inoko

Comparative genomics analysis of two avian (quail and chicken) MHC
regions. *The Journal of Immunology*, 172, 6751-6763, 2004

Sommer, S.

The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology
and conservation. *Frontiers in Zoology*, 20, 2-16, 2005

Taniguchi Y., K. Matsumoto, H. Matsuda, T. Yamada, T. Sugiyama, K. Homma, Y. Kaneko, S. Yamagishi, H. Iwaisaki
Structure and polymorphism of the major histocompatibility complex class II region in the Japanese Crested Ibis, *Nipponia nippon*. PLoS One, 9, e108506, 2014

辻 浩基

コウノトリ MHC クラス II 領域のゲノム構造および遺伝的多様性の解明. 京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻博士前期課程 修士論文, 1-70, 2015

Yamamoto, Y., K Murata, H. Matsuda, T. Hosoda, K. Tamura, J. Furuyama
Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the oriental white stork, *Ciconia boyciana*. Genes and Genetic Systems, 75, 25-32, 2000

Ye, Q., K. He, S. Wu, Q. Wan
Isolation of a 97-kb minimal essential MHC B locus from a new reverse-4D BAC library of the golden pheasant. PLoS One, 7, e32154, 2012

Wang, B., R. Ekblom, T. M. Strand, S. Portela-Bens, J. Hoglund
Sequencing of the core MHC region of black grouse (*Tetrao tetrix*) and comparative genomics of the galliform MHC. BMC Genomics,

Zinkernagel, R. M., P. C. Doherty

MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Advance in Immunology*, 27, 52-277, 1979