

氏 名(本籍)	たけ 竹	しま 嶋	しんのすけ 伸 之 輔
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 6 4 7 号		
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科資源生物学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	Study of bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II <i>DRB 3</i> gene.:Development of PCR- sequence-based typing (SBT) method and its application (ウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) クラス II <i>DRB 3</i> 遺伝子の研究 : PCR-SBT 法の確立とその応用)		
論文審査委員	(主 査)	教 授	太 田 實
		教 授	山 岸 敏 宏
		教 授	山 口 高 弘
		助教授	中 井 裕

# 論文内容要旨

## 序論

主要組織適合性抗原 MHC は哺乳類から爬虫類まで多くの生物種に保存されている分子で、高度に多型性に富む膜糖タンパク質である。クラス I・II・III が存在し、クラス II 分子は抗原提示細胞によりプロセッシングされた外来抗原を T 細胞に提示し液性免疫を引き起こす。MHC の多型性により、疾患に対する免疫応答の個体差が生じるため、現在まで多数の MHC 領域と疾患との関連性が報告されている。ウシ MHC (BoLA) クラス II においては、DR 及び DQ 分子が細胞表面に発現されており、DQ と比較して DR 分子は高度に多型性に富み、膜表面での発現も強く抗原提示能も強いことが示されている。DR 分子は DR $\alpha$  鎖と DR $\beta$  鎖が非共有結合した分子であり、 $\beta$  鎖のみが多型性を有する。特に、DR $\beta$ 1 ドメインをコードする *DRB3 exon 2* に多型は集中しており、現在まで 90 の対立遺伝子が報告されている。DR $\beta$ 1 ドメインは DR 分子において MHC に噛み込まれる抗原を認識する部位に相当し、 $\beta$ 1 ドメインの中でも直接抗原と接触するアミノ酸残基は抗原認識部位(ARS)とよばれきわめてアミノ酸置換率が高い。DR 分子がこのような高度な多型性を有するため、特定の抗原と MHC との親和性が個体によって異なる。このため、MHC の疾患との関連性があることがヒトやマウスの MHC 分子の構造解析により示されてきている。疾患との関連性の研究のためウシ MHC の中で最も重要な BoLA-DRB3 のタイピング法は多く報告されている。しかし、これらのタイピング法は、新規の対立遺伝子と既存の対立遺伝子を識別できず、また種類の違う対立遺伝子を同じ種類として認識してしまうなど、さらに、詳細にタイピングするためには非常に手間がかか

り大量のサンプルについて行うことができないなどといった理由で疾患感受性のアミノ酸レベルの研究には不向きである。そこで、本実験において *BoLA-DRB3* 対立遺伝子の塩基配列を迅速に決定できる PCR-SBT 法を開発し、それを用いて疾患との関連性を明らかにする上で必須の情報である、品種ごとの対立遺伝子頻度を計算し、さらに牛白血病ウイルス誘発性白血病と *BoLA-DRB3* 対立遺伝子との関連性を明らかにした。

## 第1章 PCR-SBT 法による *BoLA-DRB3* 対立遺伝子のタイピング法の開発

これまでに発表されている 90 種類の *BoLA-DRB3* の塩基配列より *BoLA-DRB1* アミノ酸配列を予想し、アライメントを行った。DR $\beta$ 1 の中で特に多型の多く見られる領域を N 末端側より順番に HV1, HV2, HV3 そして HV4 とした。次に、HV1 の配列を元に全対立遺伝子を 8 グループに分け (Fig. 1)、それぞれのグループを特異的に増幅できるプライマーを設計した (Table 1)。はじめに *exon 2* 特異的なプライマーセットを用いて 1stPCR を行い、その増幅産物を用いて PCR-SSP タイピングを行った。8 種類のうち 2 種類の増幅産物が得られた場合、Fig. 2A に示すように 2 本についてダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定した。増幅産物が 1 つのみ得られた場合は同じ対立遺伝子をホモで持つ場合 (Fig. 2B) および同じアレル群の異なる対立遺伝子をヘテロでもつ場合 (Fig. 2 C,D) があり、特に Fig. 2D のような場合は、両方向からシーケンスをすることではじめて全長の塩基配列が決定できた。今回開発した PCR-SBT を用いて、はじ

めに第 5 回国際 BoLA ワークショップにおいてすでに解析されている 52 のゲノム DNA を用いてタイピングを行った (Table 2)。52 頭のタイピングの結果はワークショップにおいて行われた PCR-RFLP 型とすべて一致した。さらに、これらのサンプルより 4 種類の新規対立遺伝子を同定することができ、それらはすべてジャージー種由来のサンプルであった。この事より、PCR-SBT 法が BoLA-DRB3 タイピングにきわめて有効な方法であることが示された。

## 第 2 章 日本短角種を用いた BoLA-DRB3 タイピング

PCR-SBT の正確性が示されたので、次に本法を用いて東北大学大学院附属農場の日本短角種 29 頭のタイピングを行った (Fig. 3, Table 3)。また、結果を確かめるため全てのウシについて PCR-RFLP も同時に行った (Table 3)。その結果、PCR-SBT では 9 種類の既存の対立遺伝子が検出され、PCR-RFLP においても同様に 9 種類が検出された。さらに PCR-SSP では新たに 7 種類が検出された。対立遺伝子頻度を求めたところ、最も高頻度なものが DRB3\*1201 (24.1%)、次に DRB3\*14011 (20.7%) であった (Table 4)。さらに、母ウシを青森より導入した群と岩手より導入した群において著しく対立遺伝子頻度が異なっていることが示された。附属農場の日本短角種において、全ての対立遺伝子は PCR-RFLP 型も異なっていた (Table 5)。そこで、現在までに Gen-EMBL データベースに登録されている BoLA-DRB3 対立遺伝子 102 種類について PCR-RFLP と PCR-SSP, SBT による結果を比較した (Table 6)。すると 102 種類の対立遺伝子は 50 種類の

PCR-RFLP 型をもち、一つの塩基配列と対応しているものは 28 種類であった。本実験により、対立遺伝子の詳細な解析には PCR-RFLP では不十分であり、PCR-SBT が有効な方法であることが再確認され、また PCR-SBT が野外のウシのタイピングにおいても有効な方法であることが示された。

### 第 3 章 黒毛和種、日本短角、ジャージー及びホルスタインにおける *BoLA-DRB3* 対立遺伝子の多様性と進化

*BoLA-DRB3* 対立遺伝子の決定法が確立されたため、次に家畜改良事業団より分与していただいた 4 種類の品種、ホルスタイン 102 頭、日本短角 100 頭、ジャージー種 17 頭、黒毛和種 200 頭のゲノム DNA を用いて *BoLA-DRB3* 遺伝子のタイピングを行った。その結果ホルスタイン、18 種、日本短角 20 種、黒毛和種 23 種、ジャージー種 12 種の対立遺伝子が検出された。黒毛和種より新規対立遺伝子が 3 種類見出された (Fig. 4, Table 7)。4 つの品種の対立遺伝子頻度を計算したところ全ての種において最も頻度の高い対立遺伝子は異なっていることが示された (Fig. 5)。次に対立遺伝子の塩基配列を元に系統樹を作成したところ品種に特異的に見られた対立遺伝子は系統樹に広く分布し、クラスタを形成しなかった (Fig. 6)。このように品種間に塩基配列による特徴は存在しない。そこで、対立遺伝子頻度に基づき 4 品種の遺伝距離を算出し、系統樹を作成した (Fig. 7)。その結果、ホルスタインと黒毛和種は 4 品種の中で最も近く、ジャージー種は他の 3 品種とかなり離れていることが明らかとなった。本研究にお

いて、MHC と抗病性との関連を研究する上で必須のデータである正常なウシのアリル頻度を明らかにした。更に、種特異的なアリルが認められる一方、品種間で共通なアリルも存在することから、同一の祖先から分岐した 4 品種が、それぞれ独自の選抜を受けて異なるアリル頻度を持つに至った事が示唆された。

#### 第 4 章 牛白血病ウイルス誘発性白血病（地方病性牛白血病）発症に対して感受性と抵抗性を規定する *BoLA-DRB3* 対立遺伝子

*BoLA-DRB3* の正常なウシにおける対立遺伝子頻度を明らかにしたため、次に疾患との関連性についての研究を行った。BLV 感染牛 81 頭を BLV 誘発性の 3 つのステージ（健康牛・持続的リンパ球増多症(PL)・白血病発症牛）に分類し対立遺伝子頻度を比較した(Table 8)。*DRB3\*14011* が健康牛に有意に多く認められ、*DRB3\*1601* は PL および発症牛に有意に多く認められた。次に *DRB3* 遺伝子より予測されるβ1 ドメインの多型残基を比較したところ、71, 74, 77 および 78 位のアミノ酸残基に特徴的な配列が見出された。その部位の配列を元に遺伝子頻度を並べ替えたところ、74, 77 及び 78 のアミノ酸配列は 6 種類、71, 74, 77 及び 78 のアミノ酸は 9 種類見出された(Table 9)。PL、発症牛と強い相関を示したのは 71, 74, 77 及び 78 位に Lys(K)Glu(E)Arg(R)Val(V) または Arg(R)Glu(E)Arg(R)Val(V) (74, 77 及び 78 位が ERV) で、健康牛と強い相関を示したのは Lys(K)Ala(A)Thr(T)Tyr(Y)(74, 77 及び 78 位が ATY)であった。このことから KERV/RERV をもつ対立遺伝子は白血病発症に、KATY を持つ対立遺

伝子は抵抗性に関与している可能性が示唆された。さらに、個体中に存在する 2 種類の対立遺伝子の遺伝子型が各ステージでの頻度を調べた(Table 10)。その結果、抵抗性モチーフ KERV/RERV (ERV) を持つ対立遺伝子を少なくとも片方にもつウシは健康牛で 51.2%であるのに対し、PL で 13.3%、発症牛で 8.7%と、有意に減少していることが明らかになった。また、感受性モチーフ KATY (ATY) を片方に持つウシは健康牛で 65%であるのに対し PL,発症牛では 93.3%、91.3%であり、有意に増加していた。さらに、感受性と抵抗性を両方有する個体は健康牛に有意に多く見られ、ERV が ATY に対して有意であることが明らかとなった。71, 74 および 78 番目のアミノ酸残基はヒト MHC の構造と比較すると、DR 分子の中でポケット 4 と 7 を構成し、直接抗原と接する残基であり、この部位のアミノ酸置換により免疫応答が変化し、片方でも抵抗性の対立遺伝子をもつものは強い免疫応答の結果として健康牛に、両方に感受性をもつものは免疫応答が弱く、発症へと傾くことが予想される。

## 総括

本研究において、世界に先駆けて *BoLA-DRB3* の PCR-SBT 法の開発に成功した。この方法により、ウシ 10 品種、581 頭、1162 対立遺伝子のタイピングを行い、新規対立遺伝子 7 種類を含む 40 種類の対立遺伝子の同定に成功した。その結果より、黒毛和種、日本短角、ジャージー種およびホルスタイン種の正常アレル頻度を世界に先駆けて明らかにすることができ、それらの品種間の進

化を示すことができた。これは様々な疾患との関連性を明らかにする上で必須の基礎的情報である。そこで、この情報を基に黒毛和種における BLV 誘発性白血病発症ウシと正常なウシの比較を行った。その結果、白血病発症に対し抵抗性及び易病性の対立遺伝子の存在を明らかにする事ができた。

PCR-SBT 法は他の遺伝子への応用も容易であり、*BoLA* のような高度な多型性を持つ遺伝子の解析を行う上できわめて有効な方法である。本研究の成果はワクチンや薬物を使用しない、ウシ抗病性品種の開発の糸口を提供することができると思われる。

#### 原著論文

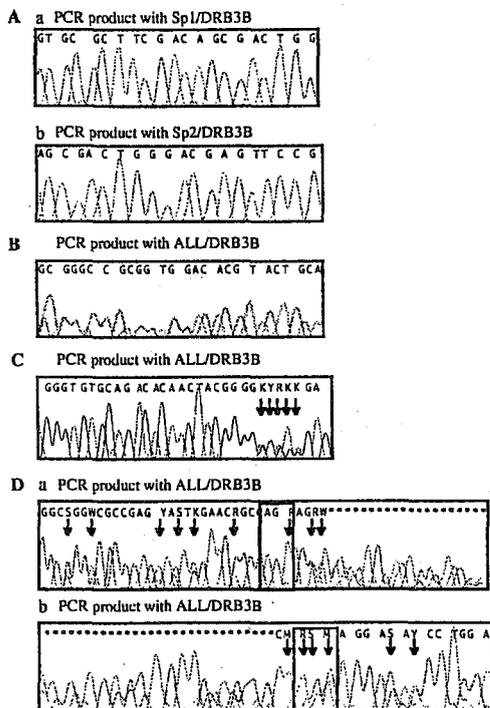
- (1) Yoko Aida, **Shin-nosuke Takeshima**, Yoshiko Nagaoka, Mie Ikegami, Kumiko Gotoh-Inabe, Hidenori Kabeya, Misao Onuma, Kousuke Okada (2000) The relationship between polymorphism of the MHC class II DR gene and resistance and susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma. *Proceedings of the International Veterinary Cytokine and Vaccine Conference*. 159-162.
- (2) **Shin-nosuke Takeshima**, Mie Ikegami, Mitsuo Morita, Yutaka Nakai, Yoko Aida. (2000) Identification of new bovine *BoLA-DRB3* alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics*, in press.

- (3) **Shin-nosuke Takeshima**, Yutaka Nakai, Minoru Ohta, Yoko Aida. Bovine MHC DRB3 typing of Japanese Shorthorn cattle by PCR-sequence based typing. *Animal Genetics*, submitted.
- (4) **Shin-nosuke Takeshima**, Naruya Saitou, Mitsuo Morita, Toshihide Inoko, Yutaka Nakai, Minoru Ohta, Yoko Aida. Bovine MHC class II *DRB3* genes diversity in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle. *Journal of Immunology*, in preparation.
- (5) Yoko Aida, **Shin-nosuke Takeshima**, Yoshiko Nagaoka, Mie Ikegami, Kumiko Gotoh-Inabe, Kousuke Okada. The relationship between polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene and resistance or susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma. *Journal of Immunology*, in preparation.

**Table 1. Oligonucleotide primers for the first-round PCR, subsequent PCR-SSP and direct sequencing**

Orientation	Primer	Sequence	Length (bp)	Location (nucleotide)	Tm (°C)			
1st PCR	sense	ERB3N	GGA ATT OCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC	28	intron 14 bp + exon 2 14-22	67.4		
	antisense	HL031	TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT	26	exon 2 375-242 + intron 10 bp	75.4		
2nd PCR	sense	Sp1 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>AGC ACA TTT CCT</u> GCA GTA TC	38	exon 2 23-34	58.6		
		Sp2 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>AGC ACA TTT CCT</u> GGA GTA TTC TAA	42	exon 2 23-35	61.2		
		Sp3 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>AGC ACA TTT CCT</u> GGA GTA TTA	39	exon 2 23-31	57.1		
		Sp4 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>AGC ACA TTT CCT</u> GGA GTA TTG	39	exon 2 23-31	60.0		
		Sp5 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>CAC ATT TCG</u> TGG AGT ATG	36	exon 2 23-31	52.4		
		Sp6 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>GCA CATT TCG</u> TGG AGT ATG	37	exon 2 23-31	56.2		
		Sp7 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>AGC ACA TTT CCT</u> GGA GTA TA	38	exon 2 23-31	55.5		
		Sp8 <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>CAC ATT TCG</u> TGG AGT ATT CTA C	40	exon 2 23-35	56.1		
		ALL <sup>a</sup>	tgt aaa acg acg gcc tpt <u>ATT OCT CTC TCT</u> GCA GCA CAT TTC CTC	45	exon 2 23-24	71.7		
		antisense	DRB3B <sup>d</sup>	cag gaa aca gcc agc tcc <u>GCC GCG TCC</u> ACA GTG AAA CTC	39	exon 2 261-274	72.2	
		Direct sequencing	sense	-21M13	TGT AAA ACC ACC GCC AGT	18		
			antisense	M13Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	18		

<sup>a</sup> Lowercase letters denote complementary -21M13 primer.  
<sup>b</sup> Lowercase letters denote complementary M13Reverse primer.  
<sup>c</sup> The underlined sequence overlaps with the 3' end of ERB3N.  
<sup>d</sup> The underlined sequence overlaps with the 3' end of HL031.  
<sup>e</sup> Tm = melting temperature



**Fig. 2** Partial sequences of products of PCR-SSP from animals WK5-38, WK5-45, WK5-33 and WK5-19 (Fifth International BoLA Workshop). **A** WK5-38 yielded two products of PCR with primers Sp1 or Sp2 and DRB3B and was, therefore, classified as heterozygous for alleles in groups G1 and G2. Each product of PCR was sequenced with a -21M13 primer. **B** WK5-45 yielded one product of PCR with primers Sp1 and DRB3B and was, therefore, classified as homozygous or heterozygous for an allele in group G1. The product of PCR with primers ALL and DRB3 was sequenced with a -21M13 primer and the animal was classified as homozygous. **C** WK5-33 yielded one product of PCR with primers Sp2 and DRB3B and was, therefore, classified as homozygous or heterozygous for an allele in group G2. The product of PCR with primers ALL and DRB3 was sequenced with a -21M13 primer and then this animal was classified as heterozygous. **D** WK5-19 yielded one product of PCR with primers Sp8 and DRB3B and was, therefore, classified as homozygous or heterozygous for an allele in group G8. PCR product with primers ALL and DRB3 was sequenced using a -21M13 primer (a) and an M13Reverse primer (b). This animal was classified as heterozygous, having an allele with a 3-bp deletion at nucleotide positions 193-195, which corresponds to codon 65 and an allele without this deletion. Boxes indicate three peaks at nucleotide positions 193-195. Letters indicate nucleotide sequence as determined from chromatograms. Arrows indicate heterozygous peaks.

	HVI	NR-1		
			9	10
G1	Q - H - G	*2201, *2202, *1401, *2801, *2802, *1101, U00126		
G2	- - S - S	U00133, *0101, *0102, *0901, *0902, *3001, *3601, *0503, *1902, *3801, *1901, *3501, *1001, AF008234, U00125, U00131, U00139		
G3	- - Y - G - - Y - R	*1102, *3101, *1103 *2701, *2702, *2703, *2704, *2705, *2706, *2707, *2708, *1002		
G4	- - C - - - - C - S - - C - R	*3203 *3002, *0301, *0302, *0303, *3401, *3402 *2401, *2001, *2002, *2003, *3202, *3201, *0701, *0601, U00128, U00129		
G5	- - A Q S - - A T S	*2901 *1701, *1702, *1802, *1801, *0801		
G6	- - H - S - - L - S - - R - S	*0501, U00141, U00134, *0502 *1301, Z30652 *4201, *4301		
G7	- - - - -	*1601, *2301, *1201, *1602, *4101, *2601, U00144, U00143		
G8	- - S T G - - S T S	*4001, *1703, *3901, *2101 *3301, *0201, *0401, *1501, *1502, *3701, *2501, U00137, U00132		

**Fig. 1** Alignment of the predicted amino acid sequences of the  $\beta$ 1 domain encoded by 88 separate *BoLA-DRB3* alleles with amino acids encoded by the NR-1 cDNA clone which represents the *BoLA-DRB3* gene. Sequences were divided into eight groups (G1 through G8) according to sequences of amino acids 9-13 in the first hypervariable region HVI. A dash indicates identity with the amino acid sequence at the top. Sequences were taken from the web site of the International Society for Animal Genetics BoLA Nomenclature Committee and the GenBank nucleotide sequence database. Numbers refer to positions of amino acids in the mature protein.

**Table 2. Results of *BoLA-DRB3* typing of animals of the Fifth International BoLA Workshop**

Animal <sup>a</sup>	Breed <sup>b</sup>	PCR-RFLP <i>DRB3.2</i> typing <sup>a</sup>		PCR-SSP typing		SBT analysis		Method <sup>c</sup>
		A	B	A	B	<i>DRB3</i> allele	Method <sup>c</sup>	
WK5-01	BF	22	21	G1	G5	*1101	*0801	1
WK5-02	BF x AY	16	11	G2	G8	*0901	*1501	1
WK5-03	AY x LM	10	12	G7	G4	*1601	*3202	1
WK5-04	BF x HE	7	12	G8	G4	*0201	*3201	1
WK5-05	BF x HE	18	1	G5	G6	*1801	*0501	1
WK5-06	BF	3	22	G2	G1	*1001	*1101	1
WK5-07	BF	7	11	G8	G2	*0201	*0902	1
WK5-08	BF	22	24	G3	G2	*1102	*0101	1
WK5-09	DR	11	10	G7	G2	*1601	*0901	1
WK5-10	DR	27	10	G7	G1	*1601	*1401	1
WK5-11	DR	27	22	G1	G1	*1401	*1101	2
WK5-12	DR	15	22	G4	G1	*2001	*1101	1
WK5-13	DR	15	22	G4	G1	*2001	*1101	1
WK5-14	DR	11	15	G2	G4	*0902	*2001	1
WK5-15	DR	27	15	G1	G4	*1401	*2001	1
WK5-16	DR	15	15	G4	G4	*2001	*2001	2
WK5-17	JE	15	9	G3	G4	*4501	*0301	1
WK5-18	JE	7	15	G8	G3	*0201	*4501	1
WK5-19	DB	16	7	G8	G8	*1501	*0201	3
WK5-20	DB	8	7	G7	G8	*1201	*0201	1
WK5-21	DB	24	16	G8	G8	*1501	*1501	1
WK5-22	DB	16	7	G8	G8	*1501	*0201	3
WK5-23	DB	8	7	G7	G8	*1201	*0201	1
WK5-24	DB	8	7	G7	G8	*1201	*0201	1
WK5-25	DB	18	8	G5	G7	*1801	*1201	1
WK5-26	DB	16	22	G8	G3	*1501	*1102	1
WK5-27	DB	8	22	G7	G3	*1201	*1102	1
WK5-28	DB	28	16	G4	G8	*0701	*1501	1
WK5-29	BF	24	8	G2	G7	*0101	*1201	1
WK5-30	BF	24	15	G2	G4	*0101	*2002	1
WK5-31	BF	3	22	G2	G1	*1101	*1101	1
WK5-32	BF	3	18	G2	G5	*1001	*1801	1
WK5-33	BF	24	11	G2	G2	*0101	*0902	2
WK5-34	BF	3	22	G3	G3	*1002	*1102	2
WK5-35	BF	22	21	G1	G5	*1101	*0801	1
WK5-36	BF	28	22	G4	G3	*0701	*1102	1
WK5-37	DB	28	3	G4	G2	*0701	*1001	1
WK5-38	DB	31	3	G1	G2	*2801	*1001	1
WK5-39	DB	24	28	G2	G4	*0101	*0701	1
WK5-40	DB	31	7	G1	G8	*2801	*0201	1
WK5-41	DB	24	7	G2	G8	*0101	*0201	1
WK5-42	DB	31	22	G1	G1	*2801	*1101	2
WK5-43	DB	16	22	G8	G1	*1501	*1101	1
WK5-44	DB	31	16	G1	G8	*2801	*1501	1
WK5-45	DB	22	22	G1	G1	*1101	*1101	2
WK5-46	DB	18	22	G5	G1	*1801	*1101	1
WK5-49	BF	28	8	G4	G7	*0701	*1201	1
WK5-51	BF	28	8	G4	G7	*0701	*1201	1
WK5-56	JE	15	20	G3	G3	*4501	*4401	2
WK5-58	JE	21	10	G5	G7	*0801	*2006	1
WK5-59	HF	24	23	G2	G3	*0101	*2703	1
WK5-61	JE	15	17	G3	G8	*4501	*2502	1

<sup>a</sup> The 52 animals were typed for *BoLA-A* antigens by serology and IEF, and for *BoLA-DQA*, *-DQB*, *-DIA*, *-DOB*, *-DIB* and *-DRB* by serology, IEF, RFLP analysis and PCR-RFLP analysis as part of the Fifth International BoLA Workshop. Genomic DNA was extracted from whole blood with 10% SDS and phenol-chloroform.

<sup>b</sup> AY= Ayrshire; BF= British Friesian; DB= Danish Black Pied; DR= Danish Red; HE= Hereford; HF= Holstein Friesian; JE= Jersey; LM= Limousin

- <sup>c</sup> 1, Two products of PCR-SSP from an animal heterozygous for alleles in different groups of alleles were sequenced.  
 2, One product of PCR-SSP from an animal homozygous or heterozygous for alleles belonging in the same group of alleles was sequenced.  
 3, One product of PCR-SSP from an animal heterozygous for an allele with a 3-bp deletion at nucleotide positions 193-195 was sequenced.

**Table 3** Results of *BoLA-DRB3* typing by PCR-SBT, PCR-SSP and PCR-RFLP in analysis of 29 Japanese Shorthorn cattle

Animal number	Sire	Dam (origin)	PCR-SBT*		PCR-SSP*		PCR-RFLP*	
			A	B	A	B	A	B
196	676	65 (Aomori)	*0501	*0801	G6	G5	*01	*21
297	210	196 ( # )	*0101	*0501	G2	G6	*24	*01
326	210	192 ( # )	*0301	*1201	G4	G7	*09	*08
347	Akihebi	202 ( # )	*0101	*1201	G2	G7	*24	*08
356	Sachitama	289 ( # )	*0301	*0801	G4	G5	*09	*21
371	Ohno268	Kiyofuku ( # )	*0801	*0901	G5	G2	*21	*11
373	Rikihoho	Tadahime ( # )	*0201	*0801	G8	G5	*07	*21
374	Sachikaze	Okahime91 ( # )	*0801	*1201	G5	G7	*21	*08
375	Matsumaka	Fujihime ( # )	*1201	*1401	G7	G1	*08	*27
376	Kazutono	356 ( # )	*0801	*1401	G5	G1	*21	*27
384	Kazutono	326 ( # )	*0301	*1201	G4	G7	*09	*08
385	Sachitama	250 ( # )	*0301	*1401	G4	G1	*09	*27
802	Akihebi	712 (Iwate)	*1201	*1201	G7	G7	*08	*08
807	210	616 ( # )	*0101	*0301	G2	G4	*24	*09
813	210	780 ( # )	*0101	*1201	G2	G7	*24	*08
814	210	693 ( # )	*0301	*0501	G4	G6	*09	*01
824	210	710 ( # )	*0101	*0101	G2	G2	*24	*24
829	210	788 ( # )	*0101	*0301	G2	G4	*24	*09
846	Kotohoho	802 ( # )	*1201	*1201	G7	G7	*08	*08
847	Sachitama	788 ( # )	*1101	*1401	G1	G1	*22	*27
849	Sachitama	787 ( # )	*0501	*0801	G6	G5	*01	*21
863	Kazutono	809 ( # )	*0301	*1401	G4	G1	*09	*27
864	Kazutono	829 ( # )	*0101	*1401	G2	G1	*24	*27
865	Kazutono	788 ( # )	*1101	*1401	G1	G1	*22	*27
866	Kazutono	846 ( # )	*1201	*1401	G7	G1	*08	*27
875	Kazutono	813 ( # )	*1201	*1401	G7	G1	*08	*27
877	Kazutono	802 ( # )	*1201	*1401	G7	G1	*08	*27
878	Kazutono	802 ( # )	*1201	*1401	G7	G1	*08	*27
879	Kazutono	788 ( # )	*0101	*1401	G2	G1	*24	*27

\* Both alleles of each animal, A and B, are shown.

**Table 4** Frequencies of various *BoLA-DRB3* alleles in 29 Japanese Shorthorn cattle as determined by PCR-SBT

DRB3 allele	Frequency *					
	Total (n=58)		Aomori (n=24)		Iwate (n=34)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
*1201	14	(24.1)	5	(20.8)	9	(26.5)
*1401	12	(20.7)	3	(12.5)	9	(26.5)
*0101	9	(15.5)	2	(8.3)	7	(20.6)
*0301	8	(13.8)	4	(16.7)	4	(11.8)
*0801	7	(12.1)	6	(25.0)	1	(2.9)
*0501	4	(6.9)	2	(8.3)	2	(5.9)
*1101	2	(3.4)	0	(0.0)	2	(5.9)
*0201	1	(1.7)	1	(4.2)	0	(0.0)
*0901	1	(1.7)	1	(4.2)	0	(0.0)

\* The animals used in this study were born to cows that originated from Aomori Prefecture or Iwate Prefecture.

**Table 5** Comparative *BoLA-DRB3* typing of 29 Japanese Shorthorn cattle by PCR-SBT, PCR-SSP and PCR-RFLP analysis

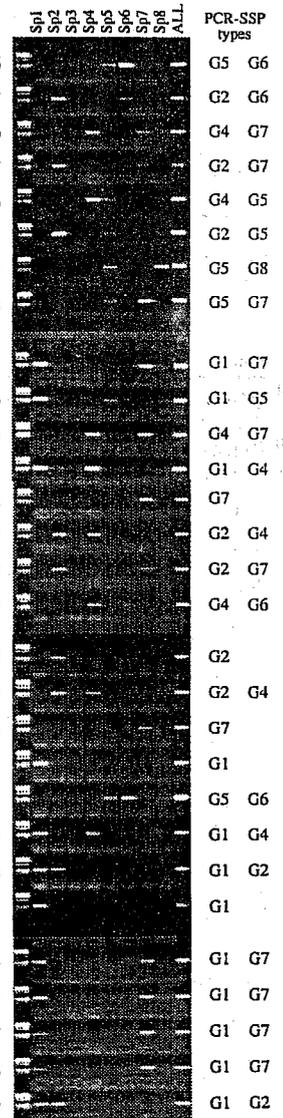
	PCR-SSP	PCR-SBT	PCR-RFLP
	G1	*1401	*27
		*1101	*22
	G2	*0101	*24
		*0901	*11
	G4	*0301	*09
	G5	*0801	*21
	G6	*0501	*01
	G7	*1201	*08
	G8	*0201	*07

**Table 6** *BoLA-DRB3* alleles with their equivalents\*

PCR-RFLP type	Fragment patterns (RsaI, BstYI, HaeIII)			PCR-SSP type	DRB3 allele by PCR-SBT
*01	a	a	a	G2	*0503, U00133
				G6	*0501, U00134
*02	b	b	a	G6	U00141, *1301
*03	b	b	b	G2	*1001
				G3	*1002
*04	c	a	a		No sequence
*05	r	a	c	G8	*3301
*06	d	c	a	G1	*2201, *2202
*07	e	c	a	G8	*0201
*08	f	a	a	G7	*1201
*09	f	a	a	G4	*0301, *0302
				G6	*1302
*10	f	b	a	G7	*1601, *1602, U00143, *2006
*11	g	e	a	G2	*0901, *0902
*12	h	a	a	G4	*3201, *3202, *3203
				G5	*1701, *1702
*13	h	b	a	G4	*4601
				G8	*0401
*14	h	b	b		No sequence
*15	i	b	a	G3	*4501
				G4	*2001, *2002, *2003, *2004
				G8	AF144546
*16	j	b	d	G8	*1501, *1502
*17	k	b	b	G2	*2502
*18	l	b	f	G5	*1801, *1802
*19	s	b	b	G7	*2601
*20	l	b	b	G2	*3601, U00131
				G3	*4401
				G5	*2901
				G6	Z30632
				G7	*2301
				G5	*0801
*21	l	b	a	G1	*1101
*22	m	b	a	G3	*1102, *1103, *4002
				G3	*2701, *2702, *2703, *2705, *2706, *2707, *2708, *2709, *2710
*23	n	b	a	G2	*0101, *0102, U00125
*24	n	b	a		No sequence
*25	o	a	b	G4	*0601
*26	o	a	b	G1	*1401, *1402, U00126
				G3	*3101
*28	o	b	b	G4	*0701
*29	p	b	c	G7	*4101
*31	l	b	f	G1	*2801
*32	m	a	a	G4	*2401
*33	n	b	f	G3	*2704
*34	l	a	b	G2	*3001
				G4	*3002
*35	c	b	b	G8	*2101
*36	l	b	a	G4	U00128
*37	o	b	a	G4	U00129
*38	b	b	a	G2	U00139
*39	t	b	a		No sequence
*40	u	b	a		No sequence
*41	a	b	a	G2	*3801, *1901
				G6	*0502
*42	h	b	f	G1	*2802
*43	k	b	f	G8	*25012
*44	k	b	i	G8	*25011
*45	s	d	b	G4	*3401, *3402
*46	v	b	a	G2	*3501
*47	w	a	a	G8	*1703
*48	w	b	a	G8	*3901
*49	w	b	e	G8	*3701, U00132
*50	x	b	a	G6	*4001
*51	g	a	a	G6	*4201
*52	s	a	a	G4	*0303
*53	y	b	a	G2	*1902
				G8	U00137
*54	j	d	b	G6	*4301
fah	f	a	b	G7	U00144
ydb	y	d	b	G2	AF008234
fab	f	a	b		No sequence
fbf	f	b	b		No sequence
fbc	f	b	e		No sequence
iaf	i	a	a		No sequence
iaf	i	a	a		No sequence
kba	k	b	a		No sequence
nbe	n	b	e		No sequence
obe	o	b	e		No sequence

\* To date, 102 alleles have been identified by sequencing of cloned genomic DNA, cDNA or cloned products of PCR and by PCR-SBT of genomic DNA. These alleles were identified in various breeds that included Holstein, Red Pied, Martinique, Brahman, Japanese Black, Jersey, Hereford, Ethiopian Arsi, N'Dama, Boran, Swedish Red-and-White, Simmental.

**Fig. 3** Electrophoresis of products of PCR-SSP specific for exon 2 of *BoLA-DRB3* allele in a herd of Japanese Shorthorn cattle. The highly variable exon 2 of all *BoLA-DRB3* genes was first amplified from the genomic DNA by PCR with the locus-specific primers ERB3N and HL031. Second-round amplification (PCR-SSP) was performed with one of the distinct group-specific primers (Sp1 through Sp8) that amplified all the alleles in each of the eight groups (G1 through G8) and the locus-specific primer DRB3B. The locus-specific primer DRB3ALL (ALL) was also used for amplification of all alleles. The numbers on the left correspond to the numbers in Table 1.





**Table 8**  
BoLA-DRB3 typing of normal cattle and cattle with BLV-induced lymphoma, PL and healthy.

Allele (DRB3*)	Control cattle (n=400)		BLV-infected cattle with healthy (n=86)		PL (n=30)		lymphoma (n=46)		P values* (vs. control)		
	n	%	n	%	n	%	n	%	Healthy	PL	Lymphoma
0101	14	3.5	4	4.7	0	0.0	0	0.0	0.539	0.612	0.379
0201	18	4.5	4	4.7	1	3.3	5	10.9	1.000	1.000	0.076
0501	2	0.5	1	1.2	0	0.0	1	2.2	0.443	1.000	0.279
0502	12	3.0	1	1.2	0	0.0	0	0.0	0.481	1.000	0.622
0503	10	2.5	3	3.5	1	3.3	0	0.0	0.710	0.553	0.609
0701	19	4.8	7	8.1	1	3.3	0	0.0	0.195	1.000	0.242
0801	4	1.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0	1.000	0.305	1.000
0901	7	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.613	1.000	1.000
0902	29	7.3	5	5.8	0	0.0	2	4.3	0.817	0.280	0.758
1001	70	17.5	10	11.6	3	10.0	11	23.9	0.203	0.448	0.312
1101	44	11.0	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.330	0.347	0.453
1201	34	8.5	6	7.0	1	3.3	1	2.2	0.829	0.495	0.240
1302	20	5.0	7	8.1	1	3.3	0	0.0	0.295	1.000	0.248
14011	8	2.0	7	8.1	0	0.0	0	0.0	8.21E-03	1.000	1.000
1501	31	7.8	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.661	0.094	0.560
1601	51	12.8	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.598	1.81E-05	3.26E-04
20012	5	1.3	1	1.2	0	0.0	3	6.5	1.000	1.000	0.040
2703	6	1.5	2	2.3	0	0.0	0	0.0	0.636	1.000	1.000
3401	1	0.3	1	1.2	0	0.0	1	2.2	0.323	1.000	0.196
4002	3	0.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1.000	1.000	1.000
m40sp6	2	0.5	0	0.0	1	3.3	0	0.0	1.000	0.070	1.000
4401	5	1.3	0	0.0	0	0.0	1	2.2	0.592	1.000	0.482
1103	5	1.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.592	1.000	1.000

**Table 9**  
Association of DRB3 epitopes with BLV-induced cattle lymphoma

Epitope	BLV-infected cattle with healthy (n=86)		PL (n=30)		lymphoma (n=46)		P values (vs. healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
V <sup>78</sup>	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.00187	0.00195
Non-V <sup>78</sup> (Y <sup>78</sup> )	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.00187	0.00195
R <sup>77</sup>	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.00223	0.000535
Non-R <sup>77</sup> (T <sup>77</sup> )	61	70.9	29	96.7	44	95.7	0.00223	0.000535
E <sup>74</sup>	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.00187	0.00195
Non-E <sup>74</sup> (N <sup>74</sup> )	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.759	0.085
(A <sup>74</sup> )	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.033	0.00000791
(Y <sup>74</sup> )	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.316	0.493
(S <sup>74</sup> )	0	0.0	1	3.3	0	0.0	0.259	-
K <sup>71</sup>	37	43.0	17	56.7	18	39.1	0.210	0.714
Non-K <sup>71</sup> (R <sup>71</sup> )	21	24.4	2	6.7	8	17.4	0.037	0.387
(A <sup>71</sup> )	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.608	0.070
(E <sup>71</sup> )	8	9.3	6	20.0	2	4.3	0.189	0.493
R <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.00223	0.000535
T <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.675	1.000
T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.00187	0.00195
E <sup>74</sup> R <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.00223	0.000535
E <sup>74</sup> T <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.675	1.000
A <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.033	0.00000791
Y <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.316	0.493
N <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.759	0.085
S <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	0	0.0	1	3.3	0	0.0	0.259	-
K <sup>71</sup> E <sup>74</sup> R <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	11	12.8	0	0.0	0	0.0	0.064	0.00834
R <sup>71</sup> E <sup>74</sup> R <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	14	16.3	1	3.3	2	4.3	0.111	0.053
R <sup>71</sup> E <sup>74</sup> T <sup>77</sup> V <sup>78</sup>	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.675	1.000
A <sup>71</sup> A <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.608	0.070
K <sup>71</sup> A <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.000902	0.014
R <sup>71</sup> A <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	1	1.2	0	0.0	3	6.5	1.000	0.122
E <sup>71</sup> Y <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.316	0.493
K <sup>71</sup> N <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.759	0.085
E <sup>71</sup> S <sup>74</sup> T <sup>77</sup> Y <sup>78</sup>	0	0.0	1	3.3	0	0.0	0.259	-

**Table 10**  
Genotype frequencies based on amino acid motifs at positions β71, 74, 77 and 78

Genotype	BLV-infected cattle with healthy (n=43)		PL (n=15)		lymphoma (n=23)		P values (vs. healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
RV/RV or non-RV	22	51.2	1	6.7	2	8.7	2.22E-03	5.25E-04
TV/TV or non-TV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.664	1.000
TY/TY or non-TY	39	90.7	15	100.0	23	100.0	0.564	0.289
ERV/ERV or Non-ERV	22	51.2	2	13.3	2	8.7	0.014	5.25E-04
ERV/Non-ERV	19	44.2	2	13.3	2	8.7	0.059	4.73E-03
ETV/ETV or Non-ETV	6	14.0	0	0	3	13.0	0.323	1.000
ATY/ATY or Non-ATY	28	65.1	14	93.3	21	91.3	0.046	0.036
ATY/Non-ATY	22	51.2	10	66.7	5	21.7	0.374	0.034
NTY/NTY or Non-NTY	12	27.9	3	20.0	2	8.7	0.736	0.113
YTY/YTY or Non-YTY	8	18.6	5	33.3	2	8.7	0.288	0.474
STY/STY or Non-STY	0	0	1	6.7	0	0	0.259	-
ERV/ERV	3	7.0	0	0	0	0	0.561	0.546
ERV/ATY	10	23.3	2	13.3	1	4.3	0.712	0.081
ERV/NTY	5	11.6	0	0	1	4.3	0.313	0.656
ERV/YTY	3	7.0	0	0	0	0	0.561	0.546
ERV/ETV	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
ETV/ATY	3	7.0	0	0	3	13.0	0.561	0.413
ETV/NTY	2	4.7	0	0	0	0	1.000	0.539
ATY/ATY	6	14.0	5	33.3	16	69.6	0.131	1.45E-05
ATY/NTY	4	9.3	2	13.3	0	0	0.643	0.289
ATY/YTY	5	11.6	4	26.7	1	4.3	0.218	0.656
NTY/STY	0	0	1	6.7	0	0	0.259	-
NTY/NTY	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
NTY/YTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.259	0.656
KERV/KERV or non-KERV	10	23.3	0	0	0	0	0.050	0.011
KERV/non-KERV	9	20.9	0	0	0	0	0.094	0.022
RERV/RERV or Non-RERV	13	30.2	1	6.7	2	8.7	0.087	0.065
RERV/Non-RERV	12	27.9	1	6.7	2	8.7	0.150	0.113
RETV/RETV or Non-RETV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.664	1.000
KATY/KATY or Non-KATY	13	30.2	11	73.3	14	60.9	5.67E-03	0.020
KATY/Non-KATY	13	30.2	8	53.3	12	52.2	0.129	0.111
AATY/AATY or Non-AATY	19	44.2	5	33.3	14	60.9	0.552	0.301
AATY/Non-AATY	18	41.9	5	33.3	10	43.5	0.760	1.000
KNTY/KNTY or Non-KNTY	12	27.9	3	20.0	1	4.3	0.736	0.025
EYTY/EYTY or Non-EYTY	7	16.3	5	33.3	2	8.7	0.265	0.478
KERV/KERV	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
KERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
KERV/AATY	2	4.7	0	0	0	0	1.000	0.539
KERV/KNTY	3	7.0	0	0	0	0	0.561	0.546
KERV/EYTY	2	4.7	0	0	0	0	1.000	1.000
KERV/KATY	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
RERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
RERV/RETV	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
RERV/KATY	4	9.3	1	6.7	0	0	1.000	0.289
RERV/AATY	3	7.0	0	0	1	4.3	0.561	1.000
RERV/KNTY	2	4.7	0	0	1	4.3	1.000	1.000
RERV/EYTY	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
RETV/KATY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.259	0.348
RETV/AATY	3	7.0	0	0	2	8.7	0.561	1.000
RETV/KNTY	2	4.7	0	0	0	0	1.000	1.000
KATY/KATY	0	0	3	20.0	2	8.7	0.015	0.118
KATY/RATY	1	2.3	0	0	3	13.0	1.000	0.118
KATY/AATY	4	9.3	2	13.3	7	30.4	0.643	0.040
KATY/KNTY	1	2.3	1	6.7	0	0	0.454	1.000
KATY/EYTY	2	4.7	3	20.0	1	4.3	0.103	1.000
AATY/AATY	1	2.3	0	0	4	17.4	1.000	0.046
AATY/KNTY	3	7.0	1	6.7	0	0	1.000	0.546
AATY/EYTY	3	7.0	1	6.7	0	0	1.000	0.546
AATY/ESTY	0	0	1	6.7	0	0	0.259	-
KNTY/KNTY	1	2.3	0	0	0	0	1.000	1.000
KNTY/EYTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.259	0.348

## 論文審査結果要旨

主要組織適合性抗原 (MHC) クラス II 分子は抗原提示細胞によりプロセッシングされた外来のタンパク質をペプチド収容溝に噛み込み, T細胞に提示し, 生体の免疫反応を引き起こす分子である。この分子は高度に多型に富んでおり, ヒトMHC-*DRB1*遺伝子では約270種類, ウシMHC (BoLA) *DRB3*遺伝子においては約100種類の対立遺伝子が報告されている。MHCが疾患感受性を規定している例は多数報告されており, 注目を浴びている。しかし, ウシMHC-DR分子のタイピング法は未だ確立されておらず, BoLAと疾患との関連性の研究はヒトに比べて大きく立ち後れており, タイピング法の確立が強く望まれている。BoLA-DR分子は多型のない*DRA*遺伝子の産物であるDR $\alpha$ 鎖と, 高度に多型に富む*DRB3*遺伝子の産物であるDR $\beta$ 鎖が非共有結合したものである。*DRB3* 遺伝子は4つのエクソンより構成されており, 多型は外来抗原を噛み込む部位である $\beta$ 1ドメインをコードする *exon2* に集中している。そこで, 本研究者は, このBoLA-DR分子の新しいタイピング法として *BoLA-DRB3 exon2* の PCR-sequence based typing (PCR-SBT) を開発した。それを用いて, コントロールDNAとして第5回BoLA国際ワークショップにおいて使用された52頭のウシゲノムDNAタイピング, 及び, 野外のサンプルとして東北大学大学院農学研究科附属農場の29頭の日本短角牛のタイピングを行い, その正確性と有用性を確かめた。更に, PCR-SBT法を用いて, 現在まで明らかとなっていない, *BoLA-DRB3* 対立遺伝子頻度を, ジャージー種・ホルスタイン種・黒毛和種・日本短角種について算出し, それらの品種の進化を明らかにした。BoLAと疾患との関連性を調べる上で必須の情報である, 正常な対立遺伝子頻度が明らかとなったので, 実際にウシ白血病ウイルス (BLV) との関連性を調査した。その結果, BoLA-DR $\beta$ 1ドメインにおける71,74,77及び78位のアミノ酸残基がBLV感染牛の白血病発症, 非発症に大きく関わっていることが明らかとなった。これら4つのアミノ酸は $\beta$ 1ドメインにおいて実際に抗原と接触する残基であることから, 免疫反応の相違が実際に病態に関わっている可能性が示唆された。

以上のように本研究は, 現在まで確立されていなかった *BoLA-DRB3* 遺伝子のタイピング法を開発し, それを用いて世界に先駆けて対立遺伝子頻度の算出, 及びBLV感染ウシの白血病発症との関連性を明らかにしたものであり, その成果は動物の新たな抗病性の育種に道を拓くものと考えられる。よって審査員一同は本論文の著者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。