

ネコ MHC 遺伝子の多型性に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

岡野 雅春

2020

目次

第1章	5
第2章	12
2.1 序論	13
2.2 材料および方法	15
2.2.1 参照ゲノム配列における各FLA クラスI遺伝子構造の検討	15
2.2.2 供試検体	15
2.2.3 RNA の抽出および逆転写酵素反応によるcDNA の合成	15
2.2.4 アンプリコンシーケンシング法によるFLA クラスI遺伝子のPCR 増幅	16
2.2.5 アンプリコン法のPCR 増幅産物の精製および定量	17
2.2.6 アンプリコン法のエマルジョンPCR、NGS によるアンプリコンシーケンシングおよびデータ処理	17
2.2.7 アンプリコン法のリードの選別およびトリミング	18
2.2.8 アンプリコン法の新規FLA クラスI配列の同定とリファレンスの作成	18
2.2.9 アンプリコン法の個体毎のFLA クラスI配列の同定およびリード数の算定	19
2.2.10 サブクローニング法によるFLA-E, -H および-K 遺伝子の転写産物の解析	19
2.2.11 塩基配列の解析	20
2.3 結果	21
2.3.1 遺伝子構造が保存されたFLA クラスI遺伝子の推定	21
2.3.2 アンプリコン法によるFLA クラスI遺伝子の転写産物の同定	21
2.3.3 アンプリコン法により同定された5 個体のFLA クラスI遺伝子	23
2.3.3 サブクローニング法により同定された各個体のFLA クラスI遺伝子	24
2.4 考察	25
第3章	38
3.1 序論	39
3.2 材料と方法	41
3.2.1 供試検体	41
3.2.2 RNA の抽出および逆転写酵素反応によるcDNA の合成	41
3.2.3 アンプリコンシーケンスによるFLA クラスI多型解析のPCR 増幅	41
3.2.4 アンプリコン法のPCR 増幅産物の精製および定量	42
3.2.5 アンプリコン法のエマルジョンPCR、NGS を用いたアンプリコンシーケンスおよびデータ処理	43
3.2.6 アンプリコン法のリード選別およびトリミング	43

3.2.7	アンブリコン法の新規FLA クラスIアレルの同定とリファレンスの作成.....	43
3.2.8	分子系統解析によるFLA クラスIアレルの分類.....	44
3.2.9	アンブリコン法のマッピング解析によるアレルの同定およびリード数の算定 ...	44
3.2.10	Holmes 法のPCR 増幅、増幅産物の精製および定量.....	44
3.2.11	Holmes 法のNGS によるシーケンス、データの処理および解析.....	45
3.2.12	新規FLA クラスIアレルおよびハプロタイプの命名方法.....	46
3.3	結果.....	47
3.3.1	アンブリコン法によって同定されたFLA クラスIアレル.....	47
3.3.2	アンブリコン法から同定されたFLA クラスIアレルの分子系統解析.....	47
3.3.3	アンブリコン法により各個体に同定されたFLA クラスIアレル.....	48
3.3.4	FLA クラスIハプロタイプの推定.....	49
3.3.5	推定されたFLA クラスIハプロタイプの比較.....	50
3.3.6	FLA クラスIアレルおよび系統毎のリード数比較.....	50
3.3.7	Holmes 法とアンブリコン法との結果の比較.....	51
3.4	考察.....	53
第4章	78
4.1	序論.....	79
4.2	材料と方法.....	82
4.2.1	供試検体.....	82
4.2.2	アンブリコンシーケンスによるFLA-DRB 多型解析のPCR 増幅.....	82
4.2.3	PCR 増幅産物の精製および定量.....	83
4.2.4	エマルジョンPCR、NGS のシーケンスおよびデータ処理.....	83
4.2.5	リード選別およびトリミング.....	83
4.2.6	新規FLA-DRB アレルの同定とリファレンスの作成.....	83
4.2.7	マッピング解析によるアレルの同定およびリード数の算定.....	84
4.2.8	塩基配列の解析および分子系統解析によるFLA-DRB アレルの分類.....	84
4.2.9	新規FLA-DRB アレルおよびハプロタイプの命名方法.....	84
4.3	結果.....	85
4.3.1	多型解析によって同定されたFLA-DRB アレル.....	85
4.3.2	同定されたFLA-DRB アレルの分子系統解析.....	85
4.3.3	各個体に同定されたFLA-DRB アレル.....	86
4.3.4	FLA-DRB ハプロタイプの推定.....	86
4.3.5	推定されたFLA-DRB ハプロタイプの比較.....	87
4.3.6	FLA クラスI領域からFLA-DRB 領域までのハプロタイプ構造.....	87
4.3.7	FLA-DRB 系統毎の平均リード数の比較.....	88

4.4 考察	89
第 5 章	109
5.1 序論	110
5.2 材料と方法.....	112
5.2.1 供試検体	112
5.2.2 アンプリコンシーケンス法による FLA-DRB 多型解析の PCR 増幅.....	112
5.2.3 PCR 増幅産物の精製および定量.....	112
5.2.4 エマルジョン PCR、NGS のシーケンスおよびデータ処理.....	112
5.2.5 リード選別およびトリミング	113
5.2.6 新規 FLA-DRB アレルの同定.....	113
5.2.7 配列の相同性検索と分子系統解析による FLA-DRB アレルの分類.....	113
5.2.8 マッピング解析による各個体の FLA-DRB アレルの同定.....	113
5.2.9 FLA-DRB ハプロタイプの推定.....	113
5.2.10 新規 FLA-DRB アレルおよびハプロタイプの命名方法.....	114
5.3 結果	115
5.3.1 150 個体から同定された FLA-DRB アレルの分子系統解析.....	115
5.3.2 同定された FLA-DRB アレルの頻度	116
5.3.3 推定された FLA-DRB ハプロタイプ毎の比較.....	116
5.3.4 雑種群と洋品種群間の FLA-DRB ハプロタイプ出現頻度の比較	118
5.4 考察	119
第 6 章	130
謝辞.....	136
引用文献.....	138

第 1 章

緒論

主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) は、有類以降の脊椎動物に出現し、進化の過程で保存されてきた分子である。ヒトの MHC であるヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA) は、HLA クラス I (HLA-I) と HLA クラス II (HLA-II) に大別される。HLA-I の構造は、主要な α 鎖と HLA-I の構造を支える $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) から構成される。一方、HLA-II は、 α 鎖と β 鎖から構成される。これらの分子は、どちらも細胞表面に発現し、なおかつ細胞膜の外側に溝 (ペプチド収容溝) を持つ。このペプチド収容溝にペプチドを挟み込み、T 細胞へ提示することで獲得免疫を発動させる。この HLA-I と HLA-II の発現細胞と免疫機構での役割は大きく異なる。まず HLA-I は、ほとんどの有核細胞の表面上に発現し、細胞内に由来する抗原 (細胞内在性抗原) の断片 (抗原ペプチド) を提示する。生体内では、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などにおいて、HLA-I のペプチド収容溝にはウイルスまたは腫瘍関連抗原由来の抗原ペプチドが挟み込まれ、細胞表面に発現される。この HLA-I と抗原ペプチドの複合体は、T 細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を介して細胞傷害性 T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞) に認識される。これにより活性化した細胞傷害性 T 細胞は、標的細胞のアポトーシスを誘導し、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などを排除する。次に HLA-II は、主に樹状細胞などの抗原提示細胞や B 細胞などの表面に発現し、細胞外に由来する抗原 (細胞外来性抗原) を提示する。生体内において、これらの細胞によって貪食された細菌や寄生虫などの外来性因子は、細胞内での処理を経て抗原ペプチドとなり、HLA-II のペプチド収容溝に挟み込まれ、細胞表面に発現される。この HLA-II および抗原ペプチドの複合体は、TCR を介してヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) に認識される。細菌や寄生虫に由来する抗原ペプチドを認識したヘルパー T 細胞は活性化し、サイトカイン産生などを行うことにより、B 細胞やマクロファージ

ジの活性化など免疫反応を誘起する。以上のように、HLA-IおよびHLA-IIは獲得免疫の発動を担うことから、免疫機構においてなくてはならない分子である。

ヒトゲノム内のHLAをコードする遺伝子（HLA遺伝子）は、第6番染色体上に集中しており、これをHLA領域と呼ぶ。この領域には、複数のHLAクラスI遺伝子が位置するHLAクラスI領域と、複数のHLAクラスII遺伝子が位置するHLAクラスII領域が含まれる。また、この2つの領域（HLAクラスIおよびクラスII領域）の間には、HLA遺伝子ではなく補体や腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor, TNF）などの種々の免疫関連遺伝子が集中している領域があり、これをHLAクラスIII領域と呼ぶ。これら3つの領域のうち、HLAクラスI領域には、HLA-Iの α 鎖をコードする6個のHLAクラスI遺伝子（*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F* および *HLA-G*）が同定されている。一方HLA-Iの β 2mは、第15番染色体上に存在する。また、HLAクラスII領域には、HLA-II DR、DQ および DP 分子の α 鎖をコードする3個のHLAクラスII遺伝子（*HLA-DRA*, *HLA-DQA1* および *HLA-DPA1*）および β 鎖をコードする3個のHLAクラスII遺伝子（*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* および *HLA-DPB1*）が同定されている(Mungall et al., 2003)。

HLA遺伝子は、ヒトの遺伝子の中で、各人のゲノムによる塩基配列の違い、すなわち多型性が最も大きい遺伝子であることが知られている。HLA多型情報が公開されているImmuno Polymorphism Database (European Bioinformatics Institute, EBI)によると、HLAクラスI遺伝子である*HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C* においては、それぞれ3896, 4803 および 3618 種類の対立遺伝子（アレル）が現在までに報告されている (IPD-IMGT/HLA Release 3.42.0 2020-10-15)。一方HLA-Iの β 2mにおける多型は認められていない。また、HLA-IIにおいて、 β

鎖をコードする *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* および *HLA-DPB1* は、それぞれ 1973, 1273 および 1064 種類のアレルが報告されており、 α 鎖をコードする *HLA-DRA*, *HLA-DQAI* および *HLA-DPAI* と比較して多型に富むことが知られている (EBI)。これらの HLA 遺伝子の多型は、ペプチド収容溝を形づくる領域に集中している。つまり、HLA 多型によってペプチド収容溝のアミノ酸配列に違いが生じ、抗原ペプチドとの結合性に HLA アレルごとの差が生み出される (Dai et al., 2008)。さらに、同一染色体上の各座位におけるアレルの並びをハプロタイプと呼ぶが、HLA 領域における各 HLA 座位には、それぞれ数多くのアレルが報告されていることから、HLA ハプロタイプは膨大な数の組み合わせが生み出される。また、この HLA ハプロタイプは、父親および母親から 1 セットずつ遺伝されることから、子における 2 つのハプロタイプの組み合わせによっても、HLA の多様性が生み出されている。

このように、免疫において重要であり、なおかつ多型に富む特徴を有する HLA 遺伝子と免疫反応の個人差との様々な関連解析は、今までに数多く報告されてきた (Shiina et al., 2004; Shiina et al., 2009)。まず、ヒトに感染するレトロウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus, HIV) において、特定の HLA クラス I ハプロタイプ (*HLA-B*52:01-C*12:02*) を有する HIV 感染患者は、このハプロタイプを持たない患者と比較して、血漿中ウイルス量が低いことが明らかになっている (Chikata et al., 2017)。また、日本人の関節リウマチにおいて、特定の HLA クラス I アレルである *HLA-DRB1*13:02* を保有する人は、この HLA アレルを持たない人と比較して発症するリスクが低いことが報告されている (Oka et al., 2014)。

さらに、臓器移植の際にドナーとレシピエントとの HLA の違いにより、免疫拒絶が引き起こされることが知られている (Zinkernagel and Doherty,

1997;Nakamura et al., 2019)。このように、比類なき遺伝的多型性を有する HLA は、感染症および自己免疫疾患の発症や重症化ならびに他家移植の際の組織適合性といった免疫反応の個人差に深く関わっている。

獣医学分野でもウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ニワトリおよびサケ科魚類などの MHC 遺伝子解析が進められている(Ballingall et al., 2018)。特に、産業動物であるウシ(Davies et al., 1997)およびブタ(Ho et al., 2009)と、伴侶動物であるイヌ(Kennedy et al., 2001)における MHC 多型情報が蓄積されてきた。また、これらの哺乳類において、MHC 多型と疾患との関連性も数多く報告されている。具体的には、ウシに感染するレトロウイルスであるウシ白血病ウイルスにおいて、特定の MHC クラスIIハプロタイプ (DRB3*1101-DQA1*10011) を有する感染牛は、このハプロタイプを持たない牛と比較して、プロウイルス量が低いことが報告され、飼育牛群の疾病対策に応用されている(Lewin et al., 1988;Miyasaka et al., 2013)。また、ブタにおける MHC 領域とメラノーマ発症との間に有意な相関性が認められ(Geffrotin et al., 2004)、ヒトの腫瘍発症モデル動物として研究されている。さらに、イヌにおける関節リウマチ(Ollier et al., 2001)、炎症性腸疾患(Peiravan et al., 2016)、壊死性髄膜脳炎(Greer et al., 2010;Pedersen et al., 2011)などの疾患において、特定のアレルまたはハプロタイプとの疾患関連性が報告されている。加えて、イヌにおけるドナーとレシピエント間の MHC の適合性と免疫拒絶反応との関連解析も行われている(Miyamae et al., 2019;Sato et al., 2020)。イヌにおけるこれらの研究成果は、疾患関連性因子を避けたブリーディングや拒絶反応が少ない移植医療を目的としたドナーとレシピエント間の組織適合性検査など、獣医療への応用が期待されている。このようにウシ、ブタおよびイヌなどの MHC 多型に関する研究成果は数多く報告されている。また、その MHC 多型情報は Immuno Polymorphism

Database に登録され、動物毎の MHC 多型情報が臨床および応用分野との関連研究に活かされつつある。しかしながら、MHC 遺伝子解析の報告が少ないことから、ネコの MHC の多型解析法は未だに開発されておらず、その情報も極めて乏しいため、データベースすら存在していない状況である。

本邦にて飼育される伴侶動物は、人気の高いイヌが長年にわたり飼育頭数の最上位に位置していたのに対して、ネコは二番手の存在であった。しかしながら、2019 年に行われた調査によりネコは、その飼育頭数が 977 万頭に達し、イヌの 879 万頭を上回り、最も多い伴侶動物である(一般社団法人ペットフード協会, 2019)。ヨーロッパ諸国やアメリカ合衆国でも日本と同様に、ネコはイヌよりも飼育頭数が多い(The European Pet Food Industry, 2017; American Veterinary Medical Association, 2018)。獣医療の対象としても重要性が高まってきたネコにおいて、乳腺腫瘍(Dagher et al., 2020)やリンパ腫(Paulin et al., 2018)に加え、免疫の関与が疑われる歯肉口内炎(Harley et al., 2011)や全身性エリテマトーデス(Gorman and Werner, 1986)などの発症例が報告されている。これらの疾患のほとんどは、ヒトにおいて HLA との関連性が報告されている(Shiina et al., 2009)が、MHC 情報が極めて乏しいネコにおいて、MHC との関連性が報告された例はない。また、獣医学分野では、古くからネコのレトロウイルス(Olmsted et al., 1992; Maruyama et al., 2003)や、コロナウイルス(O'Brien et al., 2006)などの研究が進められてきた。これらのうち、レトロウイルス感染症に対する効果的なワクチン開発を目指したネコ白血病ウイルスの抗原ペプチドと FLA クラス I 分子との結合性の有無を観察した結晶構造解析などの研究が進められている(Liang et al., 2018)。レトロウイルス感染症のような致死的なウイルス感染症の中には、有効なワクチンや治療法が確立されていないものも多いが、ネコにおいて、これらウイルス感染症と MHC との関連性が報告された例は数少ない。

ヒトにおける腎臓や肝臓などの他家移植では、拒絶反応を防ぐためにドナーリンパ球に対するレシピエントの抗体の有無を調べるリンパ球クロスマッチ検査に加えて、HLA 検査（HLA 遺伝子の多型解析）によって、ドナーとレシピエント間の HLA 型の一致率を調べる(湯沢賢治, 2014)。この HLA 型の一致率は、移植片の長期生着に関わると考えられている(Everly and Terasaki, 2009)。近年では、ネコにおける末期の慢性腎不全の治療法として、腎移植が臨床分野で行われている(Mishina et al., 1996)。また、その他の難治性疾患に対する再生医療がネコにおいても求められてきているが、ネコの MHC 検査法が開発されていないため、MHC 型を一致させた移植を行うことはできない。このように、ネコの獣医療のさらなる発展のためには、ネコの MHC と感染症、自己免疫疾患および移植の際の組織適合性などとの関連解析による新たな知見が求められている。

ネコは主要な伴侶動物であるにも関わらず、MHC 多型解析法が開発されていないために、多型情報は極めて乏しい。この課題を解決するために、本学位論文ではネコの MHC (Feline Leukocyte Antigen, FLA) 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。そのために、まず、FLA クラスI遺伝子の転写産物を同定し、機能的な遺伝子を同定した(第2章)。その後、FLA クラスIおよびクラスII遺伝子における多型解析法を開発し、血縁関係の明確な個体群から、その有用性と正確さを明らかにした(第3章および第4章)。最後に、様々な品種のネコにおいて、FLA クラスII遺伝子における多型解析から、ネコの品種と FLA 多型との関連性を検討した(第5章)。本学位論文を通して、高度な獣医療に必須である FLA 遺伝子の多型情報を収集する新たな手法を開発した。これによって、臨床応用に向けた FLA 遺伝子の研究基盤を築いた。

第 2 章

FLA クラス I 遺伝子の転写産物の同定

2.1 序論

MHC クラスI領域のゲノム構造は、動物種によって違いが認められる。ヒトは第6番染色体にMHCクラスI領域が存在し、6個のMHCクラスI遺伝子が同定されているが、イヌでは二つの染色体に分かれてMHCクラスI領域が存在し、第18番染色体上に1個、第12番染色体上に3個のMHCクラスI遺伝子が同定されている (**Figure 1**)。具体的には、ヒトの *HLA-A*, *-G* および *-F* が位置する領域 (*MHC-A/G/F* 領域) は、イヌでは1個のMHCクラスI遺伝子 (*DLA-79*) が同定されている。次に、ヒトにおいて、*HLA-E* が位置する領域 (*MHC-E* 領域) は、イヌでは認められない。さらに、ヒトにおいて *HLA-B* および *-C* が位置する領域 (*MHC-B/C* 領域) は、イヌでは3個 (*DLA-88*, *DLA-88L/12* および *DLA-64*) が同定されている (Miyamae et al., 2018)。以上のように、ヒトとイヌを比較するとMHCクラスI遺伝子の数と、MHCゲノム構造に違いが認められている。

ネコは第B2染色体にMHCクラスI領域が存在し、そのゲノム配列は、Yuhkiら (2008年) によって決定された。この報告では、ネコの *MHC-A/G/F* 領域が欠失し、*MHC-E* 領域に2個 (*FLA-S* および *FLA-R*) および *MHC-B/C* 領域に17個 (*FLA-A*~*FLA-Q*) が同定された。このように、ネコは、ヒトやイヌと比較して極めて数多くのMHCクラスI遺伝子が同定された (Yuhki et al., 2008)。これら計19個のうち *FLA-E*, *-H* および *-K* は、ヒトやマウスのMHCクラスI遺伝子と同様のエクソン構造を有し、且つ多くの臓器や細胞 (心筋、腎臓、リンパ節、肺、末梢血単核球、卵巣、空腸および脾臓) で転写産物が同定された (Holmes et al., 2013)。加えて、*FLA-E*, *-H* および *-K* それぞれに10、11および12種類の対立遺伝子 (アレル) が報告され、多型性を有することから、

抗原提示の役割を担う主要な FLA クラスIと考えられている(Holmes et al., 2013)。以上のように、計 19 個のうち、*FLA-E*, *-H* および *-K* は転写産物および多型性が認められているが、その他は、現在まで解析対象とされておらず、遺伝子発現の有無などの詳細な報告はなかった。

次世代シーケンス (Next Generation Sequencing, NGS) を用いたアンプリコンシーケンシング法 (アンプリコン法) は、mRNA (cDNA) を鋳型とした PCR および NGS による塩基配列決定を行う方法である。本解析法は、NGS のハイスループットな解析能によって、遺伝子発現レベルが低いものから高いものまで、網羅的な配列決定が可能であることが利点としてあげられる。また、おおよそその転写産物量が、NGS から出力されるリード数から評価できることも利点である(Kita et al., 2012)。

FLA クラスI遺伝子の多型解析法を開発するためには、偽遺伝子はその対象から除く必要がある。そこで本章では、FLA クラスI遺伝子毎の転写産物の同定を行った。そのために、まず、ネコの参照ゲノム配列のうち、FLA クラスI領域に同定された計 19 個の FLA クラスI遺伝子の遺伝子構造を検討し、発現遺伝子を推定した。その後のアンプリコン法による転写産物の解析によって、発現遺伝子を同定した。

2.2 材料および方法

2.2.1 参照ゲノム配列における各 FLA クラスI遺伝子構造の検討

ネコの参照ゲノム配列（アクセッション番号；EU153401）から、19個の各 FLA クラスI遺伝子の配列を取得した。これら 19 個に対して、GeneScan (Burge and Karlin, 1998)の規定値設定にてエキソンの推定を行った。その後、8つのエキソン様構造が認められた FLA クラスI遺伝子に関して、Sequencher ver 5.0.1 (Gene Codes Co.) および GENETYX (株式会社ゼネティクス) を用いて翻訳領域を推定した。推定された各 FLA クラスI遺伝子翻訳領域のアミノ酸配列は、GENETYX を用いて ClustalW によるマルチプルアライメントを行い、ヒト MHC である HLA-A*01:01:01:01（アクセッション番号；NM_001242758）、マウス MHC である H2-K1（アクセッション番号；L23495）との比較解析を行った。この推定翻訳領域の比較では、MHC 分子のペプチド収容溝をコードする塩基配列の長さを検討した。

2.2.2 供試検体

日本大学動物病院に来院した雑種のネコ 1 個体（個体番号；A6）およびアビシニアン種のネコ 4 個体（個体番号；A116, A165, A176 および A214）の検査後の残余全血を使用した。全血は EDTA-2K により抗凝固処理を施したものをを用いた。

2.2.3 RNA の抽出および逆転写酵素反応による cDNA の合成

TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) および Direct-zol RNA Kit (Zymo Research 社) を用い、製品添付のプロトコルに従って 5 個体の全血

から total RNA を抽出した。全血から抽出した RNA を DNase I (Thermo Fisher Scientific 社) で処理した後、ReverTra Ace (東洋紡株式会社) を用いて cDNA 合成を行なった。DNase I 処理および cDNA 合成はいずれも添付のプロトコルに従った。

2.2.4 アンプリコンシーケンシング法による FLA クラスI遺伝子の PCR 増幅

NGS を用いたアンプリコンシーケンスによる FLA クラスI遺伝子の転写産物の同定 (アンプリコン法) を行うにあたり、まずプライマーを設計した。このアンプリコン法のプライマーは、2.2.1 にて遺伝子構造が認められた 8 個すべての FLA クラスI遺伝子が増幅されるように設計する必要があった。また、このアンプリコン法のプライマーは、増幅された領域の塩基配列の違いに基づいて、いずれかの FLA クラス I 遺伝子に分類できるように設計する必要があった。これらを踏まえて、*FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L, -M* および *-O* すべてに共通した配列部分であり、なおかつ、各遺伝子の分類が可能な特異性が高い領域 (エキソン 3~4) を含むようにプライマーを設計した (**Figure 2**)。なお、**Figure 2** には、本解析により、遺伝子発現が認められた 7 個の FLA クラスI遺伝子のみ記載している。このプライマーから予想される PCR 増幅長は、290 bp であった。また、プライマーの名称および塩基配列は **Table 1A** に示した。さらに、このアンプリコン法では、NGS 装置である Ion PGM (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、一度に複数サンプルの解析が可能なマルチプレックスアンプリコンシーケンシングを適用した。今回の実験では、同時に 5 個体の解析を行うために、プライマーの 5' 末端には、Ion Torrent adapters (A アダプターおよび P1 アダプター) および 5 個体を識別するバーコード (10 bp) を付加した計 5 種類プライマーを設計した。

合成された cDNA を鋳型として、PrimeSTAR GXL (タカラバイオ株式会社) と上述したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応溶液は、cDNA を 10 ng、PrimeSTAR GXL DNA 合成酵素を 1 単位、PCR バッファー (5 mM Mg⁺) を 4.0 uL、dNTP (2.5 mM) およびプライマー (0.4 uM) をそれぞれ 1.6 uL を加え、総量 20 uL とした。PCR 反応条件は、最初に 96°C で 2 分間の変性を行なったのちに、98°C で 10 秒間、55°C で 15 秒間、68°C で 30 秒間の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 35 サイクル行なったのちに、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行った。

2.2.5 アンプリコン法の PCR 増幅産物の精製および定量

増幅産物は Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) を用いた精製を行ったのち、PicoGreen (Thermo Fisher Scientific) および Fluoroskan Ascent micro-plate fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた DNA 濃度の定量を行なった。定量された DNA 濃度に基づいて、5 個体の PCR 増幅産物が等モル量になるように一つのチューブへ混合し、プロトコルに従い希釈した。

2.2.6 アンプリコン法のエマルジョン PCR、NGS によるアンプリコンシーケンシングおよびデータ処理

希釈した PCR 増幅産物を鋳型として、Ion PGM Template IA 500 Kit (Thermo Fisher Scientific) および GeneAmp PCR system 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、エマルジョン PCR (emPCR) を行なった。emPCR 後、ビーズと結合した一本鎖 DNA テンプレートを濃縮するために、Ion OneTouch Enrichment System (Thermo Fisher Scientific 社) をプロトコルに従って行なった。その後、Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific 社) お

よび Ion 316 Chip Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてシーケンシングを実施した。生データの情報処理、ベースコール、トリミング、クオリティフィルタは、Torrent Suite 4.2.1 (Thermo Fisher Scientific 社) によって処理され、5 個体の識別が可能なバーコードに基づいて 5 つの fastq ファイルに分類された。

2.2.7 アンプリコン法のリードの選別およびトリミング

fastq ファイルには、一つの PCR 増幅産物 (290 bp) が 1 本の配列 (リード) として塩基配列決定されたものが、10,000 リード以上含まれていた。

この fastq ファイルのリードは、配列のクオリティが低いものを除去し、各リードのプライマー配列を除去する必要があった。まず初めに、リードの中から、PRINSEQ ver. 0.20.3 lite (Schmieder and Edwards, 2011) を用いて、quality values (QVs) が 9 を下回るようなクオリティの低いリードを除去した。次に、リードには、PCR に用いたプライマーの配列が含まれていることから、Sequencher ver 5.0.1 (Gene Codes Co.) を用いたトリミングを行った。このリードのトリミングにより、すべてのリードは PCR 増幅長の 290 bp からプライマー配列が除かれ、252 bp へトリミングされた。

2.2.8 アンプリコン法の新規 FLA クラス I 配列の同定とリファレンスの作成

リードの選別およびトリミング後の配列を用いて、新規配列の同定を行った。具体的には、Sequencher ver 5.0.1 および AmpliSAS (Sebastian et al., 2016) を用いて、リードの *de novo* アッセムブリ解析を行った。この *de novo* アッセムブリ解析では、新規配列を同定するために各個体にて 10 リード以上から構成されたコンセンサス配列を作成した。次に、作成されたコンセンサ

ス配列およびデータベースに登録されている FLA クラス I 配列に対するリードのマッピングを GS Reference Mapper ver. 3.0 (Roche Ltd) を用いて行った。このマッピングでは matching parameter 98~100% および minimum overlap length parameter 200~252 bp に設定した。以上の解析から新規の FLA クラス I 配列を同定した。同定された新規および既知 FLA クラス I 配列をリファレンスとして、続いてのマッピング解析に用いた。

2.2.9 アンプリコン法の個体毎の FLA クラス I 配列の同定およびリード数の算定

FLA クラス I 配列に対するリードのマッピングを GS Reference Mapper ver. 3.0 を用い、matching parameter 100%、および minimum overlap length parameter 150 bp に設定して行った。これにより、FLA クラス I 配列のリードから、各個体の FLA クラス I 配列を同定した。また、FLA クラス I 配列のリード数の合計を、個体毎に 100,000 リードに補正し、個体間での比較を行った。

2.2.10 サブクローニング法による *FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子の転写産物の解析

FLA クラス I 遺伝子のうち、これまでの研究で遺伝子発現がすでに同定されている *FLA-E*, *-H* および *-K* において、サブクローニング法による塩基配列決定を行うために、プライマーを設計した (**Table 1B**)。このプライマーは、*FLA-E*, *-H* および *-K* に共通であり、かつエクソン 1~8 の PCR 増幅が可能な位置に設計した (**Figure 2**)。

合成された cDNA を鋳型として、KOD FX (東洋紡株式会社) とプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応溶液は、cDNA を 10 ng、KOD FX DNA 合成酵素を 0.4 単位、PCR バッファー、dNTP (2.5 mM) およびプライマー

(0.4 uM) を加え、総量 20 uL とした。PCR 反応条件は、最初に 94°C で 2 分間の変性を行ったのちに、98°C で 10 秒間、58°C で 30 秒間、68°C で 1 分間の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 35 サイクル行ったのちに、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行った。

PCR 増幅産物は、プロトコルに従って pTA2 クローニングベクター（東洋紡株式会社）へ導入した。遺伝子導入されたクローンは、サンガーシーケンス装置である ABI3130（Thermo Fisher Scientific）を用いた Big Dye サイクルシーケンシングによって、プロトコルに従い配列決定された。PCR およびシーケンス時のエラーを防ぐために、1 個体あたり 21~52 クローンを配列決定した。

2.2.11 塩基配列の解析

塩基配列および推定アミノ酸配列の相同性解析は、GENETYX および Sequencher ver 5.0.1 を用いた。NCBI データベースに対する塩基配列の相同性検索には BLAST を用いた。

2.3 結果

2.3.1 遺伝子構造が保存された FLA クラスI遺伝子の推定

ネコゲノムの MHC 領域から、19 個の FLA クラスI遺伝子の塩基配列を取得した。この 19 個のうち 10 個 (*FLA-A, -E, -F, -H, -J, -K, -L, -M, -O* および *Q*) は、ヒトおよびマウスの MHC クラスI遺伝子と同様、8 つのエキソン様の構造が認められ、翻訳領域が推定できた (**Table 2**)。その他 (*FLA-B, -C, -D, -G, -I, -N, -P, -R* および *S*) は、一部のエクソンが欠失していたため以降の解析から除いた。次に、翻訳領域が推定された 10 個のうち、*FLA-F* の推定アミノ酸配列のエキソン 4 内に終止コドンが認められた (**Table 3**)。同様に、*FLA-Q* の推定アミノ酸配列のエキソン 2 内にも終止コドンが認められた。これらのことから、*FLA-F* および *Q* は、ペプチド収容溝を有する MHC 分子の発現が不可能であると考えられたため以降の解析から除いた。その一方で、8 個 (*FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L, -M* および *O*) は、エクソン 2~4 に終止コドンが挿入されることなくアミノ酸配列が推定された。このうち *FLA-A* は、エクソン 5 に終止コドンが認められたが、エクソン 1~4 まではアミノ酸翻訳が可能であり、ペプチド収容溝を有する MHC 分子の機能を有すると考えられた。以上のように本解析から、8 個 (*FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L, -M* および *O*) は FLA クラスI遺伝子候補、その他 (*FLA-B, -C, -D, -F, -G, -I, -N, -P, -Q, -R* および *S*) は偽遺伝子と定義した。以降の転写産物解析では、8 個の遺伝子候補を対象とした。

2.3.2 アンプリコン法による FLA クラスI遺伝子の転写産物の同定

アンプリコンシーケンスによる FLA クラスI遺伝子の転写産物の同定 (アンプリコン法) では、8 個それぞれの FLA クラス I 遺伝子 (*FLA-A, -E, -H,*

-J, -K, -L, -O および -M) のエキソン 3~4 配列の同定を試みた。これらの解析の結果、計 20 種類の FLA クラス I 遺伝子の配列 (No. 01~20) が決定された。計 20 種類の配列は、FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L および -O のいずれかの FLA クラス I 遺伝子と 94~100% の相同性を示した (Table 4)。しかしながら、FLA-M と高い相同性を示す配列は認められなかった。具体的には、計 20 種類の FLA クラス I 遺伝子の配列のうち、5 種類 (No. 01~05) が FLA-E に、3 種類 (No. 06~08) が FLA-H に、4 種類 (No. 09~12) が FLA-K に、1 種類 (No. 13) が FLA-A に、2 種類 (No. 14 および 15) が FLA-J に、1 種類 (No. 16) が FLA-L に、4 種類 (No. 17~20) が FLA-O に分類された。以上のことから、FLA クラス I 遺伝子のうち、7 個の遺伝子 (FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L および -O) の転写産物が同定された。

FLA クラス I 遺伝子の配列のうち No. 18 および No. 20 は、目的増幅長である 252 bp よりも 38 bp 短い配列 (214 bp) であった (Table 4)。また、No. 18 と No. 17 を比較して、No. 18 は、No. 17 の一部 (38 bp) が欠失しており、この欠失が認められた領域は、FLA クラス I 遺伝子のエキソン 3 とエキソン 4 の境界であった。No. 20 も同様に、No. 19 の一部 (38 bp) の欠失が認められた。これらことから、No. 18 および No. 20 は、選択的スプライシングによる変異体と考えられた。これらの二つの配列が高い相同性を示した FLA-O との比較を行ったところ、No. 18 および No. 20 は、38 bp の短縮によるフレームシフトが原因となり、アミノ酸配列の途中で終止コドンが認められる非機能的な配列と考えられた。このため、No. 18 および No. 20 は、以降の解析から除いた。

2.3.3 アンプリコン法により同定された 5 個体の FLA クラスI遺伝子

アンプリコン法から、計 18 種類の配列が同定され、それぞれ *FLA-A*, -*E*, -*H*, -*J*, -*K*, -*L* および -*O* 遺伝子に分類された。この同定された配列の数や種類は、個体毎に異なっていた (**Table 5**)。例えば、個体番号 A6 において、アンプリコン法では 7 個の FLA クラスI遺伝子 (*FLA-A*, -*E*, -*H*, -*J*, -*K*, -*L* および -*O*) の転写産物である計 13 種類の配列 (No. 01, 02, 05, 08~10, 13 および 15~20) が同定された。具体的には、*FLA-E* に分類された No. 01, 02 および 03 が認められた。同様に、*FLA-H* に No. 08 が、*FLA-K* に No. 09 および 10 が、*FLA-A* に No. 13 が、*FLA-J* に No. 15 が、*FLA-L* に No. 16 が、*FLA-O* に No. 17 および No. 19 が認められた。このように、アンプリコン法にて 5 個体に同定された配列は、少ないもので個体番号 A214 の 9 種類、多いもので A165 の 15 種類であり、配列の種類も異なっていた。

次に、FLA クラス I 遺伝子毎の配列数を比較したところ、配列数に違いが認められた (**Table 5**)。特に、*FLA-A*, -*J*, -*L* および -*O* 遺伝子は、1 個体に認められる配列数が 1 または 2 種類であるのに対し、*FLA-E*, -*H* および -*K* 遺伝子は、3 種類も認められた個体がいた。具体的には、*FLA-E* 遺伝子は、個体番号 A6 に 3 種類もの配列 (No. 01, 02 および 05) が認められた。同様に、*FLA-E* 遺伝子は A165, A176 および A214 に、*FLA-H* 遺伝子は A116 に、*FLA-K* 遺伝子は A116 および A165 に 3 種類も配列が認められた。このように、*FLA-E*, -*H* および -*K* 遺伝子は、同一の遺伝子に分類される 3 種類の配列が同定される個体がいた。このことが意味することは、1 個体のゲノムを構成する 2 つハプロタイプのうち、どちらか片方のハプロタイプに、同一の遺伝子が 2 つ重複して存在するということである。つまり、この結果から、*FLA-E*, -*H* および -*K* 遺伝子の遺伝子重複が示唆された。さらに、*FLA-H* および -*A* 遺伝子が認められない個体が存在した。具

体的には、*FLA-H* 遺伝子は、A176 および A214 に配列が認められなかった。同様に、*FLA-A* 遺伝子は、A214 に認められなかった。これらの個体では、*FLA-H* および *-A* 遺伝子の欠失が示唆された。以上のように転写産物の解析から、個体によって FLA クラス I 遺伝子の数に違いが認められたことから、遺伝子の重複や欠失によるコピー数多型が考えられた。

2.3.3 サブクローニング法により同定された各個体の FLA クラス I 遺伝子

また、同 5 個体をサブクローニング法でも解析した結果、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子の転写産物である計 11 種類の配列 (No. 01-05 および 07-12) が同定された (**Table 5**)。アンプリコン法の *FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子の配列と比較して、サブクローニング法では No. 06 は認められなかった。このアンプリコン法とサブクローニング法の間で、個体毎に同定された *FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子の配列を比較してみたところ、アンプリコン法では認められるが、サブクローニング法では認められない配列が存在した。例えば、個体番号 A6 は、アンプリコン法で同定された *FLA-K* の No. 10 は、サブクローニング法では認められなかった。その他の個体も同様に、A116 の No. 01, 06 および 09、A165 の No. 02 および 08、A176 の No. 01, 02 および 09 は、アンプリコン法で同定されたが、サブクローニング法では認められなかった。

2.4 考察

ゲノム上の MHC 領域は、進化の過程で遺伝子重複および偽遺伝子化が頻繁に生じる領域であることが、ヒトやマウスなどの哺乳類、ニワトリ、カエルおよびゼブラフィッシュ MHC 遺伝子の塩基配列を用いた系統解析によって明らかにされている(Nei et al., 1997)。ネコゲノムの FLA 領域に位置する FLA クラス I 遺伝子群も、複数回の遺伝子重複によって形成されたと考えられている(Yuhki et al., 2003)。しかしながら、*FLA-E*, *-H* および *-K* 以外の FLA クラス I 遺伝子は今までに解析されていなかったため、それぞれの遺伝子の遺伝子発現が不明であった。本章におけるゲノム配列の解析から、計 19 個の FLA クラス I 遺伝子のうち、遺伝子構造が保存されたものは *FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L*, *-M* および *-O* の 8 個であった。次に、5 個体における転写産物の解析によって、8 個の FLA クラス I 遺伝子のうち、転写産物が認められたものは *FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O* の 7 個であった。以上のことから、今まで報告されていた *FLA-E*, *-H* および *-K* に加えて、新たに *FLA-A*, *-J*, *-L* および *-O* の遺伝子発現を同定した。これにより、計 7 個 (*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O*) を対象にした多型解析を行う必要があることが明らかになった。この結果に基づいて、以後の FLA クラス I 遺伝子における多型解析法の開発では、これら 7 個を実験の対象とした。

本章の転写産物の解析から、発現された FLA クラス I 遺伝子の数が異なる個体がいた。特に、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子が数多く認められる個体や、*FLA-A* および *-H* 遺伝子が認められない個体がいた。このように、個体レベルで発現される遺伝子に違いが認められたことから、違いが認められた個体のゲノム中の FLA クラス I 領域において、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子の重複と、*FLA-A* および *-H* 遺伝子の欠失が示唆された。このことから、FLA クラス I 遺

伝子は、コピー数多型を示し、ハプロタイプ毎に遺伝子の数が多様であることが考えられた。このような MHC 遺伝子のコピー数多型は、他の哺乳類にて報告されている。カニクイザルの MHC クラスI遺伝子がすでに同定されているが、カニクイザルでは、ハプロタイプ毎に同定された MHC クラスI遺伝子の数は3~11個と多様であり、MHC クラスI遺伝子のコピー数多型を有する動物種として知られている(Shiina and Blancher, 2019)。

本章の実験には、従来の方法であるサブクローニング法と、NGS を用いたアンプリコンシーケンシング法（アンプリコン法）の2種類の塩基配列決定方法を適用した。これら二つの方法によって同定されたアレルの数に関して、アンプリコン法はサブクローニング法と比較し、より多くのアレルが同定された。このことから、複数の遺伝子に対する網羅的な転写産物の解析には、アンプリコン法の方がサブクローニング法よりも適していると考えられた。また、本章のアンプリコン法から、複数個体の同時解析も可能と考えられた。このため、アンプリコン法であれば、複数個体において同時に7個のFLA クラスI 遺伝子の多型解析が可能であり、サブクローニング法と比較して、必要な時間および費用が削減できると考えられた。

以上により、7個の遺伝子から生成されるFLA クラスI遺伝子の多型は、遺伝子毎のアレルの多型に加え、コピー数多型によっても多様性が生み出されていることが考えられた。FLA クラスI遺伝子の多型解析を正確に行うためには、遺伝子毎のアレルの多型およびコピー数多型のどちらも同定できるような網羅的な方法の開発が必要と考えられた。

Table 1. Primer information used for this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer position	Primer length	Product length	Analyzed length
A. For FLA-I transcribed analysis					
FLA-I_exp_F-1	RGATTACATCGCCCTGAAC	Exon 3	19 bp	290 bp	252 bp
FLA-I_exp_F-2	RGATTACATCACCCCTGAAC	Exon 3	19 bp		
FLA-I_exp_F-3	RGATTACATCTCCCTGAAC	Exon 3	19 bp		
FLA-I_exp_R	GCCAGGTYRGGGTGATCTC	Exon 4	19 bp		
B. For sub-cloning of FLA-E/H/K genes					
FLAI_CDS_F	CTCCTGAGACTCACATTTCTCC	Exon 1	22 bp	1163 bp	1122 bp
FLAI_CDS_R	CAGATCCTGCATCGCTCAG	Exon 8	19 bp		

Table 2. Characteristics of gene structure in FLA-class I loci

Locus	Conserved exon	Locus	Conserved exon
<i>FLA-A</i>	exon 1-8	<i>FLA-K</i>	exon 1-8
<i>FLA-B</i>	exon 3-7	<i>FLA-L</i>	exon 1-8
<i>FLA-C</i>	exon 2-4	<i>FLA-M</i>	exon 1-8
<i>FLA-D</i>	exon 7-8	<i>FLA-N</i>	exon 1
<i>FLA-E</i>	exon 1-8	<i>FLA-O</i>	exon 1-8
<i>FLA-F</i>	exon 1-8	<i>FLA-P</i>	exon 4
<i>FLA-G</i>	exon 1-7	<i>FLA-Q</i>	exon 1-8
<i>FLA-H</i>	exon 1-8	<i>FLA-R</i>	exon 4
<i>FLA-I</i>	exon 1	<i>FLA-S</i>	exon 1-5
<i>FLA-J</i>	exon 1-8		

This table shows the characteristics of gene structure based on FLA genomic sequence (EU153401). All FLA-I loci were compared to the exon structure with known MHC class I genes such as human and mouse in this study.

Table 3. GeneScan analysis of conservation of coding exons in the FLA-class I loci

Locus	Length of coding exon (bp)								Total length of CDS	
	exon	exon	exon	exon	exon	exon	exon	exon	nt	aa
	1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>FLA-A</i>	73	270	276	276	107*				1002	334
<i>FLA-E</i>	73	270	276	276	108	33	48	5*	1089	363
<i>FLA-F</i>	73	270	275	21*					-	-
<i>FLA-H</i>	73	270	276	276	108	33	48	5*	1089	363
<i>FLA-J</i>	70	270	276	276	108	33	48	5*	1086	362
<i>FLA-K</i>	73	270	276	276	108	33	48	5*	1089	363
<i>FLA-L</i>	73	270	276	276	108	33	17*		1053	351
<i>FLA-M</i>	73	270	273	276	108	33	48	5*	1086	362
<i>FLA-O</i>	73	270	276	276	108	33	48	5*	1089	363
<i>FLA-Q</i>	61	269*							-	-

Asterisk indicates the presence of the exonic terminator codon. Yellow background indicate the FLA-I gene candidate that were predicted by *in-silico* analysis.

Table 4. FLA-I allele sequences derived from the subcloning and amplicon sequencing methods using five unrelated cats and their nucleotide similarities

Provisional sequence name	Most similar FLA-class I locus	Nucleotide similarity (bp)	(%)
No. 01		252/252	100
No. 02		251/252	99
No. 03	FLA-E	246/252	97
No. 04		242/252	96
No. 05		238/252	94
No. 06		252/252	100
No. 07	FLA-H	251/252	99
No. 08		249/252	98
No. 09		252/252	100
No. 10		251/252	99
No. 11	FLA-K	249/252	98
No. 12		244/252	96
No. 13	FLA-A	252/252	100
No. 14		252/252	100
No. 15	FLA-J	246/252	97
No. 16	FLA-L	252/252	100
No. 17		252/252	100
No.18*		214/214	100
No. 19	FLA-O	250/252	99
No. 20*		212/214	99
None	FLA-M	-	-

The nucleotide similarity was calculated by comparing with the FLA genomic sequence (EU153401). *No. 18 and No. 20 show splice variants of No. 17 and No. 19, respectively.

Table 5. FLA-I allele sequences and classified loci in five unrelated cats

Provisional sequence name	Classified FLA-I loci (Table 4)	A6		A116		A165	
		Reads Num.	Subclone Num.	Reads Num.	Subclone Num.	Reads Num.	Subclone Num.
No. 01	FLA-E	31540	16	186	0	28219	19
No. 02		27349	1	0	0	4936	0
No. 03		0	0	24738	8	0	0
No. 04		0	0	0	0	15317	15
No. 05		5928	1	0	0	0	0
No. 06	FLA-H	0	0	455	0	0	0
No. 07		0	0	12669	2	0	0
No. 08		12676	2	8652	2	11890	0
No. 09	FLA-K	11516	1	1097	0	14113	13
No. 10		1515	0	0	0	19271	5
No. 11		0	0	21941	6	726	0
No. 12		0	0	24817	3	0	0
No. 13	FLA-A	192	0	79	0	197	0
No. 14	FLA-J	0	0	1869	0	847	0
No. 15		4339	0	0	0	64	0
No. 16	FLA-L	414	0	434	0	592	0
No. 17	FLA-O	584	0	0	0	580	0
No. 19		1072	0	1331	0	694	0
Total Num.		100,000	21	100,000	21	100,000	52
Total Seq. Num.		13	5	13	5	15	4

Table 5. Continued

Provisional sequence name	Classified FLA-I loci (Table 4)	A176		A214	
		Reads Num.	Subclone Num.	Reads Num.	Subclone Num.
No. 01	FLA-E	94	0	0	0
No. 02		3305	0	40329	1
No. 03		0	0	0	0
No. 04		39084	21	18473	10
No. 05		0	0	8575	6
No. 06	FLA-H	0	0	0	0
No. 07		0	0	0	0
No. 08		0	0	0	0
No. 09	FLA-K	188	0	0	0
No. 10		46314	12	20404	4
No. 11		0	0	0	0
No. 12		0	0	0	0
No. 13	FLA-A	431	0	0	0
No. 14	FLA-J	3137	0	1651	0
No. 15		0	0	7164	0
No. 16	FLA-L	1023	0	185	0
No. 17	FLA-O	0	0	0	0
No. 19		2989	0	1548	0
Total Num.		100,000	33	100,000	21
Total Seq. Num.		10	2	9	4

Yellow and blue backgrounds indicate FLA-I allele sequences detected by both the subcloning and amplicon sequencing methods and by the amplicon sequencing method only, respectively.

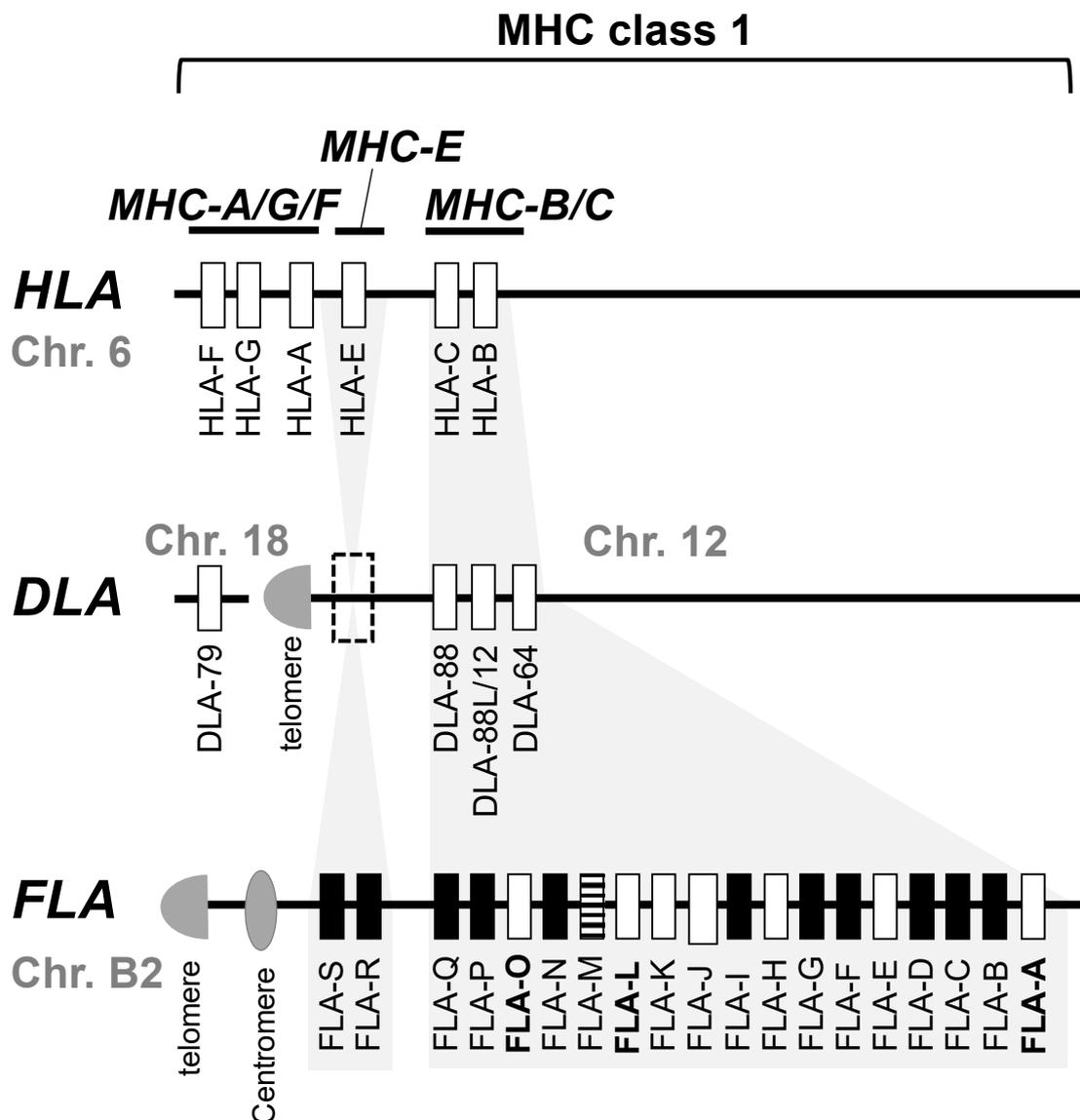


Figure 1. Comparative genome map of FLA, HLA and DLA class 1 genomic regions. This map shows the approximate locations of MHC genes based on the HLA (NC_000006.12), DLA (CM000012.3 and CM000018.3) and FLA genomic information (EU153401 and Beck et al., 2001). White, striped and black boxes indicate transcribed genes, gene candidates and pseudogenes, respectively, after our classification in this study. In the HLA map, only the expressed genes are described. Gray highlights indicate orthologous genomic regions (E and B/C) where the number of MHC genes

differs between HLA, DLA and FLA. Bold letter of the gene name indicates a gene whose transcription was newly confirmed in this study.

(A)

		α1 domain (Exon 2)		
FLA-E	1	GGCTCCCACTCCCTGAGGTATTTCTACACCGCGGTGTCCCGGCCCGGCTCGGGAGCCCCGCTTCATCT CCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCC	100	
FLA-H	1A.....G.....	100	
FLA-K	1A.....G.....	100	
FLA-A	1T...T...T...GG...A...A...G.A.T.GGAA...C...A.....	100	
FLA-J	1C.....A.....G.....T.....	100	
FLA-L	1C.....A.....G.....	100	
FLA-O	1T.....C.....A.....A.....G.....	100	
		α2 domain (Exon 3)		
FLA-E	101	TGCGGTTGACAGCGACGCCCCGAATCCAGGGAAGAGCCGGCGCCCTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGACCCGGAACACGCGGATTTA	200	
FLA-H	101G...ATG.....ACGC	200	
FLA-K	101G...ATG.....G.....T.....A.G.G.....ACG	200	
FLA-A	101	C.....T...G...ATG...A...C.T...AT...T...A...C...G...G.A.G.G.....GGCGC	200	
FLA-J	101C.....T...G...TCT.....G.....T...T.C.....A.G.G.....ACGC	200	
FLA-L	101A...C.G.....G.A.C.G.....GGT	200	
FLA-O	101C.....A...G...ATG.....T...A.....G.G.....CGC	200	
		α3 domain (Exon 4)		
FLA-E	201	CTTGACACCCGACAGATTTCCGAGTGAACCTGAACACCTGTGCTCCGCTACTACAACAGAGCGAGTCC GGGTCGCACACATCCAGAGAATGTATGGC	300	
FLA-H	201	GAA...A.....A.....G.....	300	
FLA-K	201	GAA...A.....T.....G.....A.....T.....G.....	300	
FLA-A	201	.AA.....C...T...C...G.....G.G.....AG...T...C.....T.GC...C.TC	300	
FLA-J	201	GAA...A.....AA.TT...G...C.G.ACA...G.G.....T...T...A.A.....T.G.....	300	
FLA-L	201	.AA...CA...C...T...C...G...ACC...G.G.....T..... A.....G.C.....	300	
FLA-O	201	.AA..TGCA...G...G...CC...C.G..CGCC.....A...G.....C.....	300	
		FLA-I_exp_F		
FLA-E	301	TGTGACGTGGACCCAGACCCGCGCTTCCCTCCGGGTACAGTCAGGACTCCTATGACGGCAA AGATTACATCGCCCTGAAC AGGACCTGCGCTCCTGGA	400	
FLA-H	301G.....A.....TT.G.....G.....	400	
FLA-K	301G.....A.....TT.G.....G.....	400	
FLA-A	301	...C...A...GG...C...TT...C...A...A...T.G...TT.G...G.....G.....T.....	400	
FLA-J	301	...A.C.GA...GA...A.C...C...TG.....	400	
FLA-L	301	...A.C.GG...T...G.C...C...G...C...G.....T.....	400	
FLA-O	301	...A.C.GG...T...G.A...C...TTGG...C...GC.....	400	
		FLA-I_exp_R		
FLA-E	401	CCGCGGGGACACCCGCGCGCAGATCACACCGCCGAAGTGGGAGGAGCCGGTGTGGCGGAGCAGGAGAGAACTACCTGGAGGGCACGTCGCTGGAGTG	500	
FLA-H	401C.....T.....C..AG.CATC.....C	500	
FLA-K	401C.....T.....C..AG.CATC.....C	500	
FLA-A	401G.....C.....CT...A.CA...C...TC.A...G...C...T...A...A.....	500	
FLA-J	401C...A...C...T...T...CT...A...CT.C...GT...C.....	500	
FLA-L	401T.....A.....GCTG.....A.....G.....	500	
FLA-O	401T.....T.....A...C...GCT.T.C...G.....A...T...C.G.....	500	
		α3 domain (Exon 4)		
FLA-E	501	GCTCGCCAATACCTGGACATGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCGCA GAATCTCCCAACACAGCGGTGACCCGCCACCCCATCTCTGACCGTGAGGTGACC	600	
FLA-H	501	...A.G.....C.A.G.AG.....GG.....A.....A.....	600	
FLA-K	501	...CGG...G...T...G.G...CA...A... CC.C...G...A.A.C...A.T...CT...A...T...C...	600	
FLA-A	501	...A.....G.....G..... ...C.A...G.....	600	
FLA-J	501	...C...G.....T.....TG...AT.....A.....	600	
FLA-L	501	...CG..GG...G.....T... ...G.....A...A.....GG.....A.....	600	
FLA-O	501	...CG..GG...G.....T... ...G.....A...A.....GG.....A.....	600	
		FLA-I_exp_R		
FLA-E	601	CTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCG AGATCACCTGACCTGGC AGCGTGATGGGAGGACACACCCAGGACACAGAGCTTGTGGAGACCA	700	
FLA-H	601T.....G.....	700	
FLA-K	601T.....G.....	700	
FLA-A	601	...A...T...T...A.....G...TG.T...A.G...T...C.T...	700	
FLA-J	601G.....G.....	700	
FLA-L	601T.....A.....G.....C.....	700	
FLA-O	601T.....A.....G.....	700	

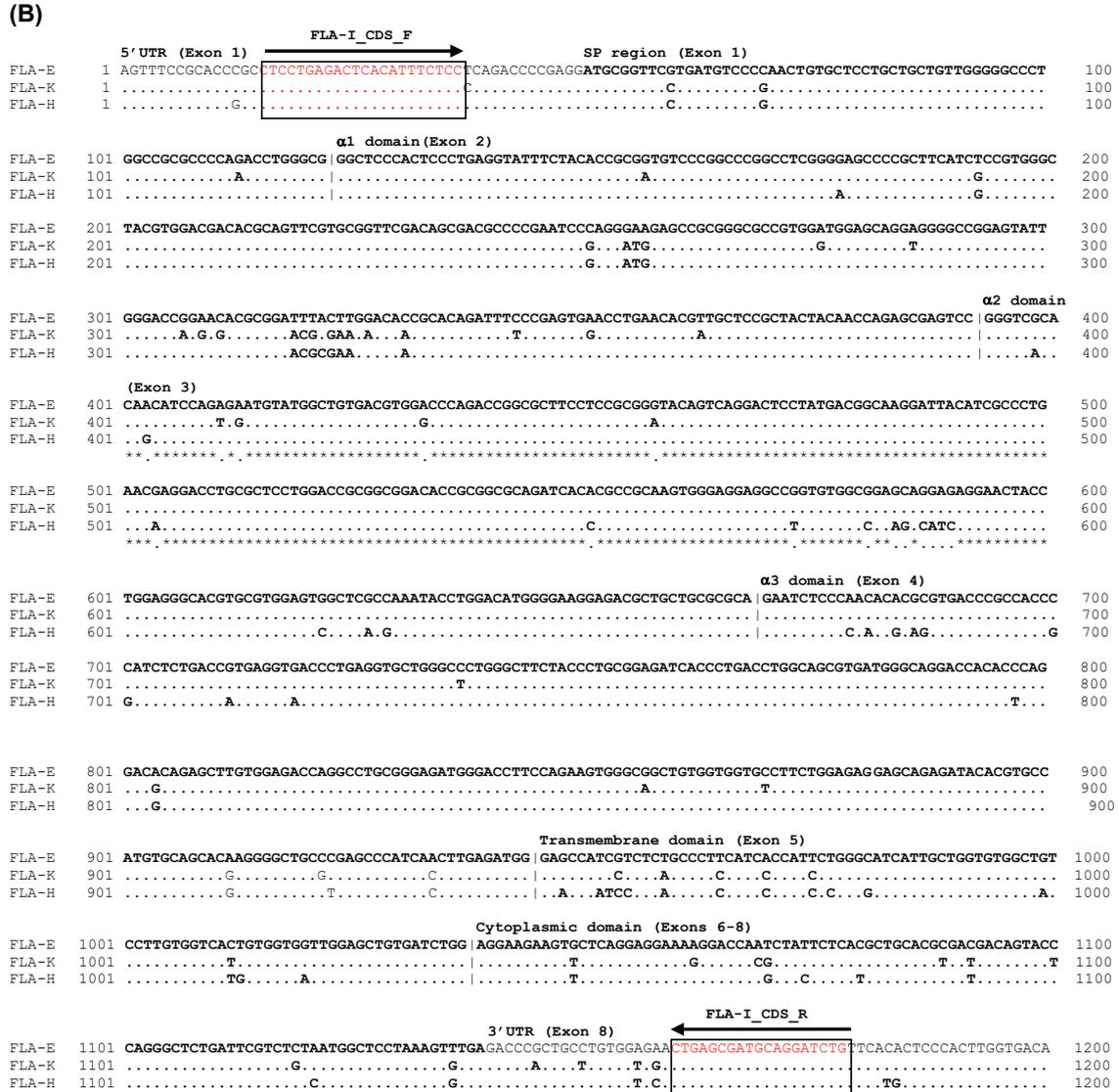


Figure 2. Nucleotide alignment for FLA-I cDNA sequences and primer locations.

(A) shows the nucleotide alignment of FLA-E/H/K genes and primer locations for sub-cloning of FLA-I genes (Table 2B), (B) shows the nucleotide alignment of seven FLA-I genes and primer locations for FLA-I expression analysis (Table 2A). The nucleotide alignments were constructed by using the 2.98 Mb genomic sequence (EU153401). 5'UTR, SP and 3'UTR indicate 5' untranslated region, signal peptide and 3' untranslated region, respectively. Locations of primers are indicated by boxes and red letters. Arrows shows direction of primers.

第3章

FLA クラスI遺伝子の多型解析の開発

FLA クラスIアレルの同定およびハプロタイプの推定

3.1 序論

現在までに、FLA クラスI遺伝子の多型性に関する報告は、わずか1報のみである(Holmes et al., 2013)。その報告では、ゲノム DNA を対象として *FLA-E*, *-H* および *-K* それぞれに特異的な3種類のプライマーを用いた PCR-sequence based typing (PCR-SBT) 法が用いられた。この PCR-SBT 法により12個体のネコから、12種類の *FLA-E* アレル、11種類の *FLA-H* アレルおよび10種類の *FLA-K* アレルが同定された。この計33種類のアレルが、ネコの MHC クラスI遺伝子の多型情報であり、イヌの205種類(EBI;Miyamae et al., 2018)、ウシの91種類(EBI)およびブタの239種類(EBI)と比較して極めて乏しい。また、ネコの各組織由来の RNA を用いた実験から、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子に共通の PCR プライマー (*FLA-I_U_multiple_F* および *R*) を用いた組織発現解析が行われた(Holmes et al., 2013)。その結果、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子は、全身の各組織に転写産物が認められた。このことから、*FLA-E*, *-H* および *-K* 遺伝子は、抗原提示の役割を担う主要な FLA クラスI分子をコードする遺伝子と考えられた。しかしながら、その他の FLA クラスI遺伝子の転写産物は同定されておらず、多型の有無などの詳細は不明であった。第2章より、今までに転写産物が同定されていた *FLA-E*, *-H* および *-K* に加えて、*FLA-A*, *-J*, *-L* および *-O* の転写産物が新たに同定された。つまり、FLA クラスI遺伝子における多型解析法を開発するためには、これら7個全ての FLA クラスI遺伝子の対立遺伝子 (アレル) を同定する必要があると考えられた。

近年、哺乳類のアカゲザルやカニクイザル(Wiseman et al., 2009;Budde et al., 2010;Shiina et al., 2015)、ブタ(Kita et al., 2012)、鳥類のシロエリヒタキ(Radwan et al., 2012)、魚類のグッピー(Herdegen et al., 2014)など様々な動物にお

いて、MHC 遺伝子の多型解析の新たな手法であるアンプリコンシーケンス法が適用されてきた。この手法は、NGS のハイスループットな解析能によって、転写産物量が乏しいものを含め、網羅的な MHC アレルの配列決定が可能であることが利点としてあげられる。

本章では、NGS を用いたアンプリコンシーケンス法による FLA クラス I 遺伝子の多型解析法（アンプリコン法）の開発を試みた。また、開発した多型解析法の正確性を明らかにするために、血縁関係の明確な 2 家系の個体群を実験に供した。すなわち、FLA クラス I 多型解析によって、各個体の FLA クラス I アレルの同定を行った。同定されたアレルの分子系統解析により、各 FLA クラス I 遺伝子へ分類した。その後、個体毎に同定されたアレルの組み合わせと、個体間の血縁関係から、FLA クラス I ハプロタイプの推定を行った。さらに、Holmes ら（2013 年）によって報告された方法（Holmes 法）を用い、同個体群において再解析を行った。以上の実験を通して、FLA クラス I 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。

3.2 材料と方法

3.2.1 供試検体

実験動物生産販売施設（北山ラベス株式会社）から供された血縁関係の明確な2家系20個体のネコ（雑種）の全血を実験に用いた。供試されたネコは、2つの家系（Family 1 および Family 2）に属していた。この2つの家系は、それぞれ10個体が含まれ、3世代から成り立っていた。これら全20個体の家系図、個体名および性別は **Figure 1** に示した。ネコ全血の採取は、株式会社北山ラベス動物福祉委員会に定められた手順に従って行われた。全血はEDTA-2Kにより抗凝固処理を施したものをを用いた。

3.2.2 RNA の抽出および逆転写酵素反応による cDNA の合成

TRIzol LS Reagent（Thermo Fisher Scientific 社）および Direct-zol RNA Kits（Zymo Research 社）を用い、製品添付のプロトコルに従って20個体の全血から total RNA の抽出した。全血から抽出した RNA を DNase I（Thermo Fisher Scientific 社）で処理した後、ReverTra Ace（東洋紡株式会社）を用いて cDNA 合成を行なった。DNase I 処理および cDNA 合成はいずれも添付のプロトコルに従った。

3.2.3 アンプリコンシーケンスによる FLA クラスI多型解析の PCR 増幅

NGS を用いたアンプリコンシーケンスによる FLA クラスI多型解析法（アンプリコン法）を開発するにあたり、まずプライマーを設計した

（**Figure 2A**）。このアンプリコン法のプライマーは、第2章にて転写産物が認められた7個すべての FLA クラスI遺伝子が増幅されるように設計する必要がある

あった。また、このアンプリコン法のプライマーは、7個の FLA クラス I 遺伝子それぞれの対立遺伝子（アレル）を同定するために、多型の集中する領域の上流と下流に設計する必要があった。これらを踏まえて、*FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L* および *-O* すべてに共通した配列部分であり、なおかつ、多型が集中する領域（エキソン 2~3）を含むようにプライマーを設計した。このプライマーから予想される PCR 増幅長は、353 bp であった。プライマーの名称、塩基配列および設計位置は **Table 1A** に示した。また、NGS 装置である Ion S5（Thermo Fisher Scientific 社）による 20 個体の識別可能なマルチプレックスアンプリコンシーケンシングを行うために、プライマーの 5' 末端に Ion Torrent adapters（A アダプターおよび P1 アダプター）および 20 個体が識別可能なバーコード（10 bp）を付加したプライマーを 20 種類設計した。

合成された cDNA を鋳型として、KOD FX（東洋紡株式会社）とプライマーを用いて PCR を行なった。PCR 反応溶液は、cDNA を 10 ng、KOD FX DNA 合成酵素を 0.4 単位、PCR バッファー、dNTP（2.5 mM）およびプライマー（0.4 uM）を加え、総量 20 uL とした。PCR 反応条件は、最初に 96°C で 2 分間の変性を行なったのちに、98°C で 10 秒間、56°C で 30 秒間、68°C で 30 秒間の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 35 サイクル行なったのちに、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行なった。

3.2.4 アンプリコン法の PCR 増幅産物の精製および定量

PCR 産物は Agencourt AMPure XP（Beckman Coulter, Inc.）を用いた精製を行なったのち、PicoGreen（Thermo Fisher Scientific 社）および Fluoroskan Ascent micro-plate fluorometer（Thermo Fisher Scientific 社）を用いた DNA 濃度の定量を行なった。定量された DNA 濃度に基づいて、20 個体の PCR 増幅産物

が等モル量になるように一つのチューブへ混合し、プロトコルに従い希釈した。

3.2.5 アンプリコン法のエマルジョン PCR、NGS を用いたアンプリコンシーケンスおよびデータ処理

希釈した PCR 増幅産物を鋳型として、Ion 520 & Ion 530 Kit-OT2 および OneTouch 2 instrument (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたエマルジョン PCR (emPCR) を行った。emPCR 後、ビーズと結合した一本鎖 DNA テンプレート濃縮するために、Ion OneTouch Enrichment System (Thermo Fisher Scientific 社) をプロトコルに従い行なった。その後、Ion 520/530 Chip Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてシーケンシングを実施した。生データの情報処理、ベースコール、トリミング、クオリティフィルターは、Torrent Suite 5.6.0 (Thermo Fisher Scientific 社) によって処理され、20 種類の Ion Xpress Barcodes に基づいて fastq ファイルに分類された。

3.2.6 アンプリコン法のリード選別およびトリミング

20 個体の fastq ファイルからのリード選別およびトリミングは第 2 章と同様の方法を用いた。選別後の全てのリードは、PCR 増幅長の 353 bp からプライマー配列が除かれ、316 bp へトリミングされた。

3.2.7 アンプリコン法の新規 FLA クラス I アレルの同定とリファレンスの作成

リードの選別およびトリミング後の配列を用いて第 2 章と同様の方法にて、各個体での新規配列を同定した。また、新規 FLA クラス I アレルのリフ

アレンス作成は、第2章と同様の方法を用いた。なお、リファレンス作成にて、マッピング解析の minimum overlap length parameter は、200~316 bp に設定した。

3.2.8 分子系統解析による FLA クラスIアレルの分類

FLA クラス I アレルの塩基配列および推定アミノ酸配列の NCBI データベースに対する相同性検索には BLAST を用いた。推定アミノ酸配列に基づく分子系統解析には、MEGA7 ソフトウェア(Kumar et al., 2016)を用いた。ClustalW を用いた新規および既知の FLA クラスIアレルの推定アミノ酸配列 (105 残基) のアライメントを行った。また、アウトグループとしてイヌの MHC クラスI遺伝子である *DLA-88* (アクセッション番号 ; NM_001014767) を加えた。アライメント結果から、近接結合法を用いた系統樹を作成し、p 距離モデルおよびブーストラップ法 (2,000 回反復) で統計的支持値を算出した。

3.2.9 アンプリコン法のマッピング解析によるアレルの同定およびリード数の算定

マッピング解析は第2章と同様の方法で行い、FLA クラス I アレルにマッピングされたリードから、個体毎の FLA クラスIアレルを同定した。また、個体毎に FLA クラス I アレルへマッピングされたリード数の合計を 100,000 リードに補正し、個体間でのリード数の比較を行った。

3.2.10 Holmes 法の PCR 増幅、増幅産物の精製および定量

FLA クラスI遺伝子の mRNA に基づく塩基配列決定方法は、現在までに Holmes ら (2013 年) によって *FLA-E*, *-H* および *-K* の共通プライマーを用いた

方法 (Holmes 法) が報告された。そこで本実験では、この Holmes 法の共通プライマー (FLA-I_Umultiple_F および R) を用いた PCR および NGS を用いた塩基配列決定による再解析を行った。この FLA-I_Umultiple_F および R は、FLA-E, -H および -K の共通配列部分であり、なおかつエクソン 1~4 の PCR 増幅が可能な位置に設計された (Figure 2B)。プライマーの塩基配列、設計位置および予想される増幅長は Table 1B に示した。この再解析には、アンプリコン法を行った 20 個体のうち 4 個体を用いた。この 4 個体は、2 家系 20 個体において推定された全てのハプロタイプを網羅できるように選択された。この Holmes 法による再解析と、本章で開発したアンプリコン法との結果を照らし合わせ、アンプリコン法の正確さを確認した。

PCR は、合成された cDNA を鋳型として、KOD FX (東洋紡株式会社) と Holmes 法の FLA-I_Umultiple_F および R を用いて行った。PCR 反応溶液は、cDNA を 10 ng、KOD FX DNA 合成酵素を 0.4 単位、PCR バッファー、dNTP (2.5 mM) およびプライマー (0.4 uM) を加え、総量 20 uL とした。PCR 反応条件は、最初に 96°C で 2 分間の変性を行なったのちに、98°C で 10 秒間、58°C で 30 秒間、68°C で 1 分間の 3 工程を 1 サイクルとし、合計 35 サイクル行なったのちに、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行った。その後の PCR 増幅産物の精製および定量は 3.2.4 と同様の方法を用いて行った。

3.2.11 Holmes 法の NGS によるシーケンス、データの処理および解析

再解析の PCR および精製した産物から、NGS ライブラリを作成した。既報のように、PCR 増幅産物の断片化およびバーコード付加によるライブラリ作成、DNA 断片長の測定、DNA の定量を行った (Ozaki et al., 2015)。その後、

エマルジョン PCR、NGS によるシーケンス、データ処理およびデータ解析は、3.2.5 および 3.2.6 と同様の方法を用いて行った。

3.2.12 新規 FLA クラスIアレルおよびハプロタイプの命名方法

多型解析において同定された新規 FLA クラスIアレルは、一時的な通し番号として FLAI_001～FLAI_014 と名付けた上で、Genbank/EMBL/DDBJ データベースに登録された。推定された FLA クラスIハプロタイプは、ブタ MHC である SLA のハプロタイプ命名法に従って命名した (Smith et al., 2005)。例えば、FLA クラスI領域のハプロタイプ (ハプロタイプ 1) は Hp-1.0 と表記した。

3.3 結果

3.3.1 アンプリコン法によって同定された FLA クラスIアレル

アンプリコンシーケンスによる FLA クラスI多型解析法（アンプリコン法）では、7個の FLA クラス I 遺伝子（*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L* および *-O*）それぞれのアレルの同定を試みた。この結果、2家系 20 個体から計 32 種類の FLA クラスIアレルが同定された（**Table 2**）。これらのうち、18 種類は既知のアレルであったが、14 種類は新規のアレルであった（**Table 2** 内の赤文字で示したアレル）。これら新規アレルは FLAI_001 から FLAI_014 と命名した。また、これら計 32 種類の FLA クラスIアレルのうち、FLAI_011 と FLAI_012 は、異なる塩基配列であったが、同一のアミノ酸配列に翻訳されたことから同義置換のアレルであった。同様に、FLA-E*01601 と FLAI_009 および FLA-L と FLAI_013 も同義置換のアレルであった。

3.3.2 アンプリコン法から同定された FLA クラスIアレルの分子系統解析

計 32 種類の FLA クラスIアレルを系統樹に基づいて分類した（**Figure 3** および **Table 2**）。この系統樹から、計 32 種類の FLA クラス I アレルのうち、31 種類を 5 つの系統（*FLA-E/H/K*, *FLA-O*, *FLA-J*, *FLA-L* および *FLA-A*）に分類した。具体的には、18 種類（FLA-E*01801, K*00401, K*00101, H003011, K*00303, E*00902, E*01401, E*00501, H*016:01, 008011, K*00701 および FLAI_001~007）を *FLA-E/H/K* 系統に分類した。同様に、4 種類（FLA-O および FLAI_010~012）を *FLA-O* に、6 種類（FLA-J*01:18, J*01:16, J*01:14, E*01601, FLAI_008 および 009）を *FLA-J* に、2 種類（FLA-L および FLAI_013）を *FLA-L* に、および 1 種類（FLA-A）を *FLA-A* に分類した。

このうち、*FLA-E/H/K* 系統に分類した 18 種類のアレルのうち、*FLA-H* のアレル (*FLA-H*003011*) と *FLA-K* のアレル (*FLA-K*00303*) が同一の系統枝に分類され、同様に *FLA-E* のアレル (*FLA-E*01801*) と *FLA-K* のアレル (*FLA-K*00401*) も同一の系統枝に分類された。これらのことから、本解析では *FLA-E*、*-H* および *-K* の相同性が極めて高いために混合した一つの系統 (*FLA-E/H/K* 系統) とした。

計 32 種類の FLA クラス I アレルのうち、1 種類 (*FLAI_014*) は、*FLA-J* 系統と *FLA-L* 系統の間に分岐し、他の配列と系統枝を形成しないアレルであった。この *FLAI_014* の BLAST 検索および分子系統解析を詳細に行ったところ、2 つの異なる配列に由来するキメラ様構造を示していた (**Figure 4A**)。具体的には、316 bp からなる *FLAI_014* の塩基配列のうち 5' 末端側の 124 bp は BLAST 検索の結果、*FLA-E* アレルを含む 12 種類と同一の配列であった。同様に 3' 末端側の 191 bp は、*FLA-K* アレルを含む 2 種類と同一の配列であった (**Figure 4C** および **4D**)。この 2 つの断片の間に存在する 1 塩基は、いずれの配列とも異なっていた (**Figure 4B**)。これらの理由から、*FLAI_014* は、*FLA-E* および *-K* のキメラであることが考えられた。このため *FLAI_014* が分類される新たな系統を、*FLA-E/H/K_Rec* 系統と命名した。

3.3.3 アンプリコン法により各個体に同定された FLA クラス I アレル

計 32 種類の FLA クラス I アレルに対して、個体毎にマッピング解析を行った (**Table 3**)。この結果、少ない個体で 7 種類、多い個体で 14 種類の FLA クラス I アレルが同定された。例えば、Family 1 の個体番号 01 において、*FLA-E/H/K* 系統の *FLA-E*00501*, *H*003011*, *K*00401*, *K*00701* および *FLAI_006* が同定された。同様に、*FLA-A* 系統の *FLA-A*、*FLA-J* 系統の *FLA-*

E*01601 および J*01:14、*FLA-L* 系統の FLA-L および *FLA-O* 系統の FLA-O および FLAI_012 が同定された。このように個体番号 01 は、これら計 11 種類の FLA クラス I アレルが同定され、同様のマッピング解析から、計 20 個体の FLA クラス I アレルが同定された。

3.3.4 FLA クラス I ハプロタイプの推定

各個体に同定された FLA クラス I アレルの組み合わせと、個体の血縁関係に基づいて、ハプロタイプ推定を行った (**Table 4**)。Family 1 の個体番号 05 と、05 の父と母である 01 と 02 に同定された FLA-E/H/K 系統のアレルを例にして説明する。まず、子である個体番号 05 には、*FLA-E/H/K* 系統の 5 種類のアレル (E*00501, E*01801, K*00701, FLAI_004 および FLAI_005) が同定された。これら 5 種類のうち、2 種類 (E*00501 および K*00701) は父である個体番号 01 に認められ、残る 3 種類 (E*01801, FLAI_004 および FLAI_005) は母である 02 に同定された。同一染色体上のアレルの組み合わせであるハプロタイプは、父および母から子へ 1 セットずつ遺伝されることから、E*00501 および K*00701 は、ハプロタイプ (Hp-1.0) として父から遺伝し、同様に、E*01801, FLAI_004 および FLAI_005 は、ハプロタイプ (Hp-4.0) として母から遺伝したと考えられた。個体番号 05 のその他の系統のアレルや、その他の個体においても同様に、FLA クラス I ハプロタイプが推定された (**Figure 5**)。以上のようにハプロタイプ推定を行った結果、2 家系 20 個体から、計 7 種類の FLA クラス I ハプロタイプ (Hp-1.0~Hp-7.0) が推定された (**Figure 6**)。

3.3.5 推定された FLA クラス I ハプロタイプの比較

推定された計 7 種類のハプロタイプを比較すると、ハプロタイプ毎に含まれる FLA クラス I アレルの数が異なっていた (**Figure 6**)。例えば、Hp-1.0 は *FLA-E/H/K* 系統の 2 種類 (E*00501 および K*00701)、*FLA-J* 系統の E*01601 および *FLA-O* 系統の FLAI_012 の計 4 種類のアレルから構成されていたハプロタイプであった。同様に、Hp-5.0 は 5 種類、Hp-6.0 は 6 種類、Hp-2.0 は 7 種類および Hp-3.0, Hp-4.0 および Hp-7.0 は 8 種類のアレルから構成されていた。このハプロタイプ毎のアレル数の違いは、特に *FLA-E/H/K* 系統に集中していた。具体的には、Hp-1.0, -3.0 および -5.0 に推定された *FLA-E/H/K* 系統のアレルは 2 種類であった。その一方で、Hp-2.0, -4.0 および -6.0 が 3 種類、Hp-7.0 が 4 種類であった。同様に、*FLA-J* および *FLA-O* 系統のアレルにおいても、ハプロタイプに推定されるアレルが 1 または 2 種類であり、ハプロタイプ毎のアレル数に違いが認められた。

FLA-A 系統において、ハプロタイプ毎にアレルの有無があった。具体的には、Hp-2.0, -3.0, -4.0 および -7.0 において、*FLA-A* アレルが同定されたのに対して、Hp-1.0, -5.0 および -6.0 には認められなかった。同様に、*FLA-L* 系統においても、ハプロタイプ毎のアレルの有無があった。つまり、*FLA-A* および *FLA-L* 系統において、ハプロタイプによってはアレルの欠失が示唆された。

3.3.6 FLA クラス I アレルおよび系統毎のリード数比較

推定されたハプロタイプ、系統分類およびリード数に基づいて、FLA クラス I 系統の平均リード数を算出した。この結果、FLA クラス I 系統のリード数を比較すると、系統による転写産物量の違いが明らかとなった (**Table 5**)。例えば、*FLA-E/H/K* 系統には、18 種類のアレルが分類された。これら 18 種類の

アレルが全 20 個体のハプロタイプ ($2n=40$) に認められた回数 (アレルの出現回数) は、少ないアレルで 1 回、多いアレルで 15 回であり、合計すると 95 回であった。この計 95 回のリード数を平均すると、16,444 リードであった。このようにして、すべての系統のリード数を算出したところ、*FLA-E/H/J_Rec* 系統は 11,820 リード、*FLA-A* 系統は 210、*FLA-J* 系統は 5,069、*FLA-L* 系統は 248、*FLA-O* 系統は 878 であった。この平均リード数を系統間で比較したところ、大まかに $FLA-E/H/K > FLA-E/H/K_Rec > FLA-J > FLA-O > FLA-L = FLA-A$ の関係性にあることが考えられた。

次に、*FLA-E/H/K_Rec* 系統の FLAI_014 アレルの平均リード数 (11,831 リード) は、*FLA-E/H/K* 系統のアレルの平均リード数 (16,444 リード) との間に有意差 ($P=0.06$) は認められなかった。その一方で、*FLA-E/H/K_Rec* 系統のアレルの平均リード数は、*FLA-J* 系統 (5,071 リード) と比較して有意に多かった ($P=1.2 \times 10^{-9}$)。このようなリード数の違いから、*FLA-E/H/K_Rec* 系統は、*FLA-E/H/K* 系統に含まれることが示唆された。

また、*FLA-E/H/K* および *FLA-E/H/K_Rec* 系統の平均リード数は、その他の *FLA-A*、*-J*、*-L* および *-O* 系統の平均リード数と比較して有意に多かった (16,095 リード vs 2,201 リード)。特に、FLA クラス I 遺伝子毎の平均リード数が最も少ない *FLA-A* 系統の平均リード数は、最も多い *FLA-E/H/K* 系統のおよそ 1/80 であった。以上のようなリード数の違いから、FLA クラス I 系統によって転写産物量が大きく異なることが示唆された。

3.3.7 Holmes 法とアンプリコン法との結果の比較

本実験で開発したアンプリコン法による FLA クラス I 多型解析と、既報の解析方法である Holmes 法による再解析の結果を照らし合わせ、アンプリ

コン法の正確さを確認した (Table 6)。この Holmes 法には、推定された全ての FLA クラスIハプロタイプを網羅する 4 個体 (個体番号 01, 02, 07 および 13) を用いた。この結果、Holmes 法においてもアンプリコン法と同様に 4 個体から 18 種類の FLA クラス I アレルが同定された。具体的には、個体番号 01 において、多型解析において、5 種類の *FLA-E/H/K* 系統のアレル E*00501, K*00701, H*003011, K*00401 および FLAI_006 が同定されたが、再解析においても同一の 5 種類が同定された。また、Holmes 法にて新たなアレルが同定されることはなかった。他の 4 個体も同様に、2 つの解析結果に違いは認められず、Holmes 法にて新たにアレルが同定されることはなかった。

3.4 考察

NGS を用いたアンプリコンシーケンシング法（アンプリコン法）は、様々な動物種において、MHC 遺伝子の多型解析に適用されてきた(Radwan et al., 2012;Herdegen et al., 2014)。この方法は、DNA または RNA (cDNA) のどちらをテンプレートとしても多型解析が可能である。本研究では RNA をテンプレートとして実験を行った。RNA を用いたアンプリコン法の利点として次の二つが挙げられる。一つは、プライマー領域が類似した偽遺伝子の PCR 増幅を避けて、mRNA へ転写された MHC 遺伝子のみを標的にできる点である。二つ目は、MHC アレルのおおよその転写産物量が、NGS から出力されるリード数から評価できる点である(Kita et al., 2012)。このような特徴を有するアンプリコン法を、FLA クラスI遺伝子に適用した結果として、筆者は、計 32 種類の FLA クラスIアレルを同定した。同定されたアレルの分子系統解析から、5 つの異なった FLA クラス I 系統 (*FLA-E/H/K, -A, -J, -L* および *-O*) に分類した。このことより、*FLA-E/H/K, -A, -J, -L* および *-O* の各アレルを網羅的に解析できた。また、同定されたアレルのうち、43.8%ものアレルは、本解析で新たに同定された。第 2 章に記したように、ネコ MHC 領域には数多くの偽遺伝子が存在する。本章で開発したアンプリコン法によって、これら偽遺伝子の PCR 増幅を避けて、効率的に FLA クラス I 遺伝子の多型解析が可能となった。以上のことから、ネコにおいて初めて FLA クラス I 遺伝子の網羅的な多型解析法が開発され、今後も本解析を行うことでより数多くのアレルが同定されることが期待できる。

本解析において、ネコにおいて初めて FLA クラスIハプロタイプが推定され、その推定結果は、個体間の血縁関係と矛盾が無かった。これらのハプロ

タイプを比較すると、ハプロタイプに含まれるアレルの数に違いが認められた。また、ハプロタイプによっては遺伝子の欠失が認められた。以上のことから、FLA クラス I 遺伝子のコピー数多型が示唆された。今後、血縁関係が明確な個体群の解析を行うことで、数多くの FLA クラス I ハプロタイプが推定されることが考えられる。

RNA をテンプレートとしたアンプリコンシーケンシング法は、MHC アレル毎に転写産物量の差が大きいため、DNA をテンプレートとしたときよりも多くのリード配列が必要となる点が欠点として挙げられる。このような欠点を踏まえて、本解析では、1 個体あたり 10,000 以上のリード配列から、アレルの同定を行った。その結果、FLA クラス I 系統間でのリード数に差が認められ、リード数の乏しい系統 (*FLA-A* および *L*) が認められた。また、これらの 2 つの系統において、ハプロタイプ特異的なアレルの欠失が認められた。しかしながら、このアレルの欠失は、解析に用いたリード数が少ないために、マッピング解析によって同定されなかったことが原因として考えられる。本章で解析した個体のうち、個体番号 04 および 12 から、*FLA-A* 系統のリードは認められなかった。また、個体番号 04 においては、*FLA-L* 系統も確認されなかった。これらの個体のマッピング解析に用いた総リード数は、個体番号 04 が 46,589 リード、12 が 45,490 リードであり、全個体の平均総リード数 (42,696 リード) を上回るものであった。つまり、これらの個体に *FLA-A* および *FLA-L* 系統のアレルが認められなかったことは、解析に用いたリード数の不足によるものではなく、ハプロタイプ毎の遺伝子の欠失であると考えられた。しかしながら、*FLA-A* および *FLA-L* において、リード数の不足およびハプロタイプ特異的なアレルの欠失の原因には、プライマーの特異性が不足している可能性も考えられる。このような、ハプロタイプ特異的な FLA クラス I 遺伝子の情報を明

らかにするためには、本研究のような NGS による多型解析法を用いた詳細な解析に加えて、各 FLA クラス I 遺伝子特異的なプライマーを用いた発現解析を行うことが必要となる。

ヒトにおいて、HLA クラス I 分子のうち、HLA-A、-B および -C は、抗原提示が主要な役割であり、古典的 HLA クラス I 分子と呼ばれる。その一方で、HLA-E、-F および -G は、NK 細胞に対する免疫抑制のシグナル伝達などに関わり、非古典的 HLA クラス I 分子と呼ばれる。これらの古典的 HLA 分子をコードする古典的 HLA 遺伝子は非古典的と比較して多型に富むこと、全身の各組織において遺伝子発現が認められること、各組織にて高い転写産物量を示すことなどが挙げられる(黒木喜美子 et al., 2016)。本解析でも、FLA クラス I アレルのおおよそその転写産物量は、NGS から出力されるリード数から評価できた。このリード数を FLA クラス I 系統毎に比較すると、*FLA-E/H/K* > *FLA-E/H/K_Rec* > *FLA-J* > *FLA-O* > *FLA-L* = *FLA-A* のように、系統による転写産物量の違いが明らかとなった。これに加えて、*FLA-E*、*-H* および *-K* は、他の FLA クラス I 遺伝子 (*FLA-A*、*-J*、*-L* および *-O*) よりも多型に富むことが示唆された。これらのことから、*FLA-E*、*-H* および *-K* は、転写産物量が多く、多型に富む古典的 FLA クラス I 遺伝子であることが考えられた。また、古典的 FLA クラス I 遺伝子との転写産物量と多型性の違いから、*FLA-A*、*-J*、*-L* および *-O* が非古典的 FLA クラス I 遺伝子であると考えられた。今回明らかとなった、ネコの古典的および非古典的 FLA クラス I 遺伝子に関して、リアルタイム PCR などを用いた各遺伝子における転写産物レベルの測定などを行うことで、各遺伝子の特徴がより詳細に明らかになる。今後、ネコの免疫機構の解明に向けて、FLA クラス I 遺伝子においても、古典的および非古典的遺伝子の機能の違いが明らかにされることが求められる。

Table 1. Primer information used for this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer position	Primer length	Product length	Analyzed length	Reference
A. For genotyping of FLA-I genes						
FLA-I_F2	GTSGGCTACGT RGACGACA	Exon 2	19 bp	353 bp	316 bp	This study
FLA-I_R2m	ATCTGCGCHG CSGTGTCC	Exon 3	18 bp			This study
B. For confirmation of genotyping data in FLA-E/H/K genes						
FLA-I_ Umultiple_F	GTGCTCCTGCT GCTGTTG	Exon 1	18 bp	827 bp	789 bp	Holmes et al. 2013
FLA-I_ Umultiple_R	TGGCACGTGT ATCTCTGCTC	Exon 4	20 bp			Holmes et al. 2013

Table 2. Identified FLA-class I alleles and lineages of FLA-class I loci for phylogenetic analysis

FLA-I allele name	Accession number	FLA locus lineage in Figure 3
FLA-E*00501	KC763048	FLA-E/H/K
FLA-E*00902	KC763019	FLA-E/H/K
FLA-E*01401	KC763050	FLA-E/H/K
FLA-E*01801	EU915360	FLA-E/H/K
FLA-H*003011	KC763028	FLA-E/H/K
FLA-H*008011	KC763034	FLA-E/H/K
FLA-K*00101	EU153401	FLA-E/H/K
FLA-K*00303	KC763039	FLA-E/H/K
FLA-K*00401	KC763049	FLA-E/H/K
FLA-K*00701	KC763047	FLA-E/H/K
FLAI_001	LC534228	FLA-E/H/K
FLAI_002	LC534229	FLA-E/H/K
FLAI_003	LC534230	FLA-E/H/K
FLAI_004	LC534231	FLA-E/H/K
FLAI_005	LC534232	FLA-E/H/K
FLAI_006	LC534233	FLA-E/H/K
FLA-H*016:01	MK644232	FLA-E/H/K
FLAI_007	LC534234	FLA-E/H/K
FLAI_014	LC534241	FLA-E/H/K_Rec
FLA-A	EU153401	FLA-A
FLA-E*01601	EU915358	FLA-J
FLAI_008	LC534235	FLA-J
FLA-J*01:18	MK737915	FLA-J
FLAI_009	LC534236	FLA-J
FLA-J*01:16	MK737902	FLA-J
FLA-J*01:14	MK737908	FLA-J
FLA-L	EU153401	FLA-L
FLAI_013	LC534240	FLA-L
FLA-O	EU153401	FLA-O
FLAI_010	LC534237	FLA-O
FLAI_011	LC534238	FLA-O
FLAI_012	LC534239	FLA-O

Table 3. Read information for genotyping of FLA-class I genes in the two cat families

Family 1

FLA locus lineage in Figure 3	FLA-I sequence name	Family 1				
		01	02	03	04	05
FLA-E/H/K	FLA-E*00501	12179	0	0	31332	28084
	FLA-E*00902	0	0	0	18333	0
	FLA-E*01401	0	0	0	0	0
	FLA-E*01801	0	7504	0	0	11645
	FLA-H*003011	20171	0	0	0	0
	FLA-H*008011	0	0	0	0	0
	FLA-K*00101	0	0	7503	0	0
	FLA-K*00303	0	0	0	0	0
	FLA-K*00401	4628	0	0	0	0
	FLA-K*00701	12897	0	0	29436	8973
	FLAI_001	0	29099	20896	0	0
	FLAI_002	0	4647	6977	0	0
	FLAI_003	0	0	24315	0	0
	FLAI_004	0	31513	0	0	24697
	FLAI_005	0	12292	0	0	12557
	FLAI_006	39954	0	0	0	0
	FLA-H*016:01	0	0	14883	0	0
FLAI_007	0	0	8604	0	0	
FLA-E/H/K_Rec	FLAI_014	0	0	0	14090	0
FLA-A	FLA-A	369	16	511	0	483
FLA-J	FLA-E*01601	7483	474	0	6466	7975
	FLAI_008	0	5161	5798	0	0
	FLA-J*01:18	0	3609	4260	0	0
	FLAI_009	0	0	3202	0	0
	FLA-J*01:16	0	0	0	0	0
	FLA-J*01:14	229	1293	0	0	3256
FLA-L	FLA-L	41	682	236	0	0
	FLAI_013	0	364	0	0	154
FLA-O	FLA-O	1527	1963	1448	209	1644
	FLAI_010	0	1383	1366	0	0
	FLAI_011	0	0	0	0	0
	FLAI_012	523	0	0	134	532
Total	sequence number	11	14	13	7	11

Table 3. Family 1 continued

FLA locus lineage in Figure 3	FLA-I sequence name	Family 1				
		06	07	08	09	10
FLA-E/H/K	FLA-E*00501	26666	0	0	0	28269
	FLA-E*00902	0	15585	15263	15923	0
	FLA-E*01401	0	0	0	0	0
	FLA-E*01801	0	0	0	0	0
	FLA-H*003011	0	0	0	0	0
	FLA-H*008011	0	0	0	0	0
	FLA-K*00101	0	8222	7780	0	6874
	FLA-K*00303	0	0	0	0	0
	FLA-K*00401	0	0	0	0	0
	FLA-K*00701	8850	19177	19956	23379	8280
	FLAI_001	29111	0	0	25226	0
	FLAI_002	8131	0	0	7592	0
	FLAI_003	0	16509	18921	0	20260
	FLAI_004	0	0	0	0	0
	FLAI_005	0	0	0	0	0
	FLAI_006	0	0	0	0	0
	FLA-H*016:01	0	12992	11959	0	11901
FLAI_007	0	8240	8757	0	10546	
FLA-E/H/K_Rec	FLAI_014	0	12972	12564	9328	0
FLA-A	FLA-A	482	371	287	129	471
FLA-J	FLA-E*01601	6803	835	886	676	8283
	FLAI_008	10092	0	0	8185	0
	FLA-J*01:18	6061	0	0	6272	0
	FLAI_009	0	3613	2495	0	4101
	FLA-J*01:16	0	0	0	0	0
	FLA-J*01:14	0	0	0	0	0
FLA-L	FLA-L	139	479	319	472	196
	FLAI_013	0	0	0	0	0
FLA-O	FLA-O	1481	1004	813	1327	332
	FLAI_010	1584	0	0	1491	0
	FLAI_011	0	0	0	0	0
	FLAI_012	599	0	0	0	486
Total	sequence number	12	12	12	12	12

Table 3. Family 2 continued

FLA locus lineage in Figure 3	FLA-I sequence name	Family 2				
		11	12	13	14	15
FLA-E/H/K	FLA-E*00501	0	27281	0	0	32844
	FLA-E*00902	0	0	14386	0	0
	FLA-E*01401	0	28739	21472	0	0
	FLA-E*01801	0	0	0	0	0
	FLA-H*003011	0	0	0	0	0
	FLA-H*008011	0	10619	10161	0	0
	FLA-K*00101	0	0	0	0	0
	FLA-K*00303	0	13133	10876	0	0
	FLA-K*00401	0	0	0	0	0
	FLA-K*00701	0	8127	24780	0	9686
	FLAI_001	50725	0	0	54450	28380
	FLAI_002	15354	0	0	15737	7485
	FLAI_003	0	0	0	0	0
	FLAI_004	0	0	0	0	0
	FLAI_005	0	0	0	0	0
	FLAI_006	0	0	0	0	0
	FLA-H*016:01	0	0	0	0	0
FLAI_007	0	0	0	0	0	
FLA-E/H/K_Rec	FLAI_014	0	0	11328	0	0
FLA-A	FLA-A	205	0	0	79	170
FLA-J	FLA-E*01601	0	5637	788	0	5825
	FLAI_008	17388	0	0	14284	7628
	FLA-J*01:18	11558	0	0	10565	4711
	FLAI_009	0	0	0	0	0
	FLA-J*01:16	0	4942	4567	0	0
	FLA-J*01:14	0	0	0	0	0
FLA-L	FLA-L	503	128	385	304	180
	FLAI_013	0	0	0	0	0
FLA-O	FLA-O	1337	0	481	1281	693
	FLAI_010	2930	0	0	3301	1437
	FLAI_011	0	782	776	0	0
	FLAI_012	0	611	0	0	960
Total	sequence number	8	10	11	8	12

Table 3. Family 2 continued

FLA locus lineage in Figure 3	FLA-I sequence name	Family 2				
		16	17	18	19	20
FLA-E/H/K	FLA-E*00501	0	0	0	0	0
	FLA-E*00902	0	15681	15539	0	16352
	FLA-E*01401	23411	0	0	23881	0
	FLA-E*01801	0	0	0	0	0
	FLA-H*003011	0	0	0	0	0
	FLA-H*008011	10520	0	0	8902	0
	FLA-K*00101	0	0	0	0	0
	FLA-K*00303	11741	0	0	11518	0
	FLA-K*00401	0	0	0	0	0
	FLA-K*00701	0	23677	24124	0	23005
	FLAI_001	23536	23101	21507	23886	22439
	FLAI_002	8708	8031	6918	7031	6991
	FLAI_003	0	0	0	0	0
	FLAI_004	0	0	0	0	0
	FLAI_005	0	0	0	0	0
	FLAI_006	0	0	0	0	0
	FLA-H*016:01	0	0	0	0	0
FLAI_007	0	0	0	0	0	
FLA-E/H/K_Rec	FLAI_014	0	10335	11959	0	11987
FLA-A	FLA-A	226	112	100	213	182
FLA-J	FLA-E*01601	0	809	832	0	972
	FLAI_008	8652	7465	8830	8925	8002
	FLA-J*01:18	5418	7504	7409	7125	7299
	FLAI_009	0	0	0	0	0
	FLA-J*01:16	3756	0	0	5468	0
FLA-L	FLA-J*01:14	0	0	0	0	0
	FLA-L	517	326	273	258	245
FLA-O	FLAI_013	0	0	0	0	0
	FLA-O	593	1150	1054	868	913
	FLAI_010	1758	1809	1454	1196	1613
	FLAI_011	1163	0	0	727	0
Total	FLAI_012	0	0	0	0	0
	sequence number	13	12	12	13	12

The read numbers are normalized per 100,000 reads per cat. Novel FLA-class I sequences and their accession numbers are indicated by red letters.

Table 4. Estimated FLA-I haplotypes

Family 1

Simplified name	01		02		03	
FLA-class I Hp.	Hp-1.0	Hp-2.0	Hp-3.0	Hp-4.0	Hp-3.0	Hp-7.0
	E*00501	H*003011	FLAI_001	E*01801	FLAI_001	K*00101
FLA-E/H/K	K*00701	K*00401	FLAI_002	FLAI_004	FLAI_002	FLAI_003
		FLAI_006		FLAI_005		H*016:01
						FLAI_007
FLA-E/H/K_Rec						
FLA-A		FLA-A	FLA-A	FLA-A	FLA-A	FLA-A
FLA-J	E*01601	J*01:14	FLAI_008	E*01601	FLAI_008	FLAI_009
			J*01:18	J*01:14	J*01:18	
FLA-L		FLA-L	FLA-L	FLAI_013	FLA-L	FLA-L
FLA-O	FLAI_012	FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLA-O
			FLAI_010		FLAI_010	

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	04		05	
FLA-class I Hp.	Hp-1.0	Hp5.0	Hp-1.0	Hp-4.0
	E*00501	E*00902	E*00501	E*01801
FLA-E/H/K	K*00701	K*00701	K*00701	FLAI_004
				FLAI_005
FLA-E/H/K_Rec				
FLA-A		FLAI_014		FLA-A
FLA-J	E*01601	E*01601	E*01601	E*01601
				J*01:14
FLA-L				FLAI_013
FLA-O	FLAI_012	FLA-O	FLAI_012	FLA-O

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	06		07		08	
FLA-class I Hp.	Hp-1.0	Hp-3.0	Hp5.0	Hp-7.0	Hp5.0	Hp-7.0
FLA-E/H/K	E*00501	FLAI_001	E*00902	K*00101	E*00902	K*00101
	K*00701	FLAI_002	K*00701	FLAI_003	K*00701	FLAI_003
				H*016:01 FLAI_007		H*016:01 FLAI_007
FLA- E/H/K_Rec			FLAI_014		FLAI_014	
FLA-A		FLA-A		FLA-A		FLA-A
FLA-J	E*01601	FLAI_008 J*01:18	E*01601	FLAI_009	E*01601	FLAI_009
FLA-L		FLA-L		FLA-L		FLA-L
FLA-O	FLAI_012	FLA-O FLAI_010	FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLA-O

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	09		10	
FLA-class I Hp.	Hp-3.0	Hp5.0	Hp-1.0	Hp-7.0
FLA-E/H/K	FLAI_001	E*00902	E*00501	K*00101
	FLAI_002	K*00701	K*00701	FLAI_003
				H*016:01 FLAI_007
FLA- E/H/K_Rec		FLAI_014		
FLA-A	FLA-A			FLA-A
FLA-J	FLAI_008 J*01:18	E*01601	E*01601	FLAI_009
FLA-L	FLA-L			FLA-L
FLA-O	FLA-O FLAI_010	FLA-O	FLAI_012	FLA-O

Table 4. Family 2

Simplified name	11		12		13	
FLA-class I Hp.	Hp-3.0	Hp-3.0	Hp-1.0	Hp-6.0	Hp5.0	Hp-6.0
	FLAI_001	FLAI_001	E*00501	E*01401	E*00902	E*01401
FLA-E/H/K	FLAI_002	FLAI_002	K*00701	H*008011	K*00701	H*008011
				K*00303		K*00303
FLA-E/H/K_Rec					FLAI_014	
FLA-A	FLA-A	FLA-A				
FLA-J	FLAI_008	FLAI_008	E*01601	J*01:16	E*01601	J*01:16
	J*01:18	J*01:18				
FLA-L	FLA-L	FLA-L		FLA-L		FLA-L
FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLAI_012	FLAI_011	FLA-O	FLAI_011
	FLAI_010	FLAI_010				

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	14		15	
FLA-class I Hp.	Hp-3.0	Hp-3.0	Hp-1.0	Hp-3.0
	FLAI_001	FLAI_001	E*00501	FLAI_001
FLA-E/H/K	FLAI_002	FLAI_002	K*00701	FLAI_002
FLA-E/H/K_Rec				
FLA-A	FLA-A	FLA-A		FLA-A
FLA-J	FLAI_008	FLAI_008	E*01601	FLAI_008
	J*01:18	J*01:18		J*01:18
FLA-L	FLA-L	FLA-L		FLA-L
FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLAI_012	FLA-O
	FLAI_010	FLAI_010		FLAI_010

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	16		17		18	
FLA-class I Hp.	Hp-3.0	Hp-6.0	Hp-3.0	Hp5.0	Hp-3.0	Hp5.0
	FLAI_001	E*01401	FLAI_001	E*00902	FLAI_001	E*00902
FLA-E/H/K	FLAI_002	H*008011	FLAI_002	K*00701	FLAI_002	K*00701
		K*00303				
FLA- E/H/K_Rec				FLAI_014		FLAI_014
FLA-A	FLA-A		FLA-A		FLA-A	
FLA-J	FLAI_008	J*01:16	FLAI_008	E*01601	FLAI_008	E*01601
	J*01:18		J*01:18		J*01:18	
FLA-L	FLA-L	FLA-L	FLA-L		FLA-L	
FLA-O	FLA-O	FLAI_011	FLA-O	FLA-O	FLA-O	FLA-O
	FLAI_010		FLAI_010		FLAI_010	

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	19		20	
FLA-class I Hp.	Hp-3.0	Hp-6.0	Hp-3.0	Hp5.0
	FLAI_001	E*01401	FLAI_001	E*00902
FLA-E/H/K	FLAI_002	H*008011	FLAI_002	K*00701
		K*00303		
FLA- E/H/K_Rec				FLAI_014
FLA-A	FLA-A		FLA-A	
FLA-J	FLAI_008	J*01:16	FLAI_008	E*01601
	J*01:18		J*01:18	
FLA-L	FLA-L	FLA-L	FLA-L	
FLA-O	FLA-O	FLAI_011	FLA-O	FLA-O
	FLAI_010		FLAI_010	

Red letter indicates novel allele.

Table 5. Average read numbers in each allele and lineage

Allele	For each allele			FLA lineage	For each lineage			
	Allele frequency (2n=40)	Average reads	±SD		Sequence Num.	Sequence frequency	Average reads	±SD
E*00501	7	26,665	6,265					
E*00902	8	15,883	1,066					
E*01401	4	24,376	2,676					
E*01801	2	9,575	2,071					
H*003011	1	20,171	0					
H*008011	4	10,050	685					
K*00101	4	7,595	489					
K*00303	4	11,817	823					
K*00401	1	4,628	0	FLA-E/H/K	18	95	16,444	8,136
K*00701	15	16,290	6,350					
I_001	14	25,168	2,639					
I_002	14	7,400	909					
I_003	4	20,001	2,830					
I_004	2	28,105	3,408					
I_005	2	12,425	132					
I_006	1	39,954	0					
H*016:01	4	12,934	1,206					
I_007	4	9,037	892					
I_014	8	11,820	1,403	FLA-E/H/K Rec	1	8	11,820	1,403
A	21	210	152	FLA-A	1	21	210	152
E*01601	17	3,220	2,636					
I_008	14	7,886	1,253					
J*01:18	14	5,842	1,159	FLA-J	6	56	5,069	2,648
I_009	4	3,363	589					
J*01:16	4	4,683	624					
J*01:14	3	1,593	1,254					
L	23	247	144	FLA-L	2	25	248	142
I_013	2	259	105					
O	30	671	351					
I_010	14	1,523	159	FLA-O	4	54	878	475
I_011	4	862	175					
I_012	7	550	225					

Red letter indicates novel allele.

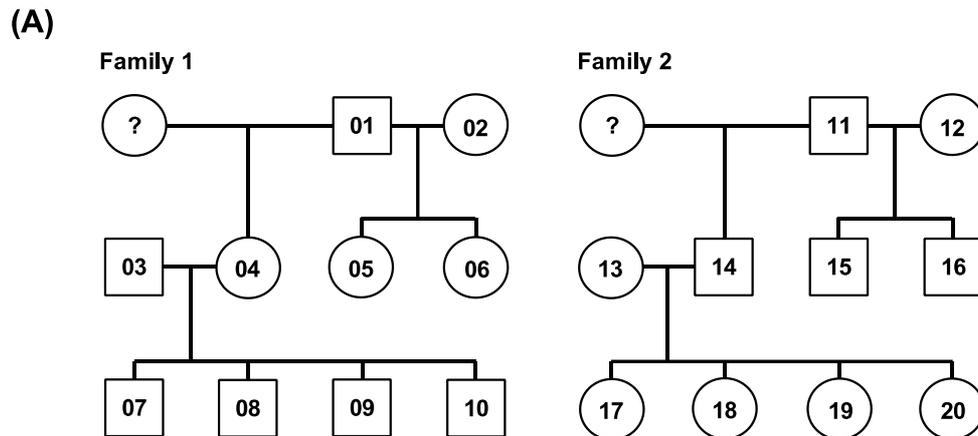
Table 6. Comparison of the FLA-E/H/K genotyping results between the two primer pairs designed in different locations

Simplified name	01				02			
	Hp-1.0		Hp-2.0		Hp-3.0		Hp-4.0	
Primer pair	C	E	C	E	C	E	C	E
FLA-E*00501	13558	31728						
FLA-K*00701	14357	22362						
FLA-E*00902								
FLA-H*003011			22455	19304				
FLA-K*00401			5152	5529				
FLAI_006			44477	21077				
FLAI_001					34212	14833		
FLAI_002					5464	9117		
FLA-E*01801							8822	12619
FLAI_004							37050	47536
FLAI_005							14452	15895
FLA-H*016:01								
FLA-K*00101								
FLAI_003								
FLAI_007								
FLA-E*01401								
FLA-H*008011								
FLA-K*00303								

Table 6. continued

Simplified name	07				13			
	FLA-I haplotype		FLA-I haplotype		FLA-I haplotype		FLA-I haplotype	
FLA-I haplotype	Hp-5.0		Hp-7.0		Hp-5.0		Hp-6.0	
Primer pair	C	E	C	E	C	E	C	E
FLA-E*00501								
FLA-K*00701	23756	28257			30340	27838		
FLA-E*00902	19307	16750			17614	14005		
FLA-H*003011								
FLA-K*00401								
FLAI_006								
FLAI_001								
FLAI_002								
FLA-E*01801								
FLAI_004								
FLAI_005								
FLA-H*016:01			16093	26590				
FLA-K*00101			10185	19900				
FLAI_003			20451	7498				
FLAI_007			10207	1005				
FLA-E*01401							26290	26074
FLA-H*008011							12440	24505
FLA-K*00303							13317	7579

The read numbers are normalized per 100,000 reads per cat. "C" and "E" indicate read numbers obtained from amplicons using FLA-I primer pairs for genotyping of FLA-I genes (**Table 1A**) and for conformation of the FLA-I genotyping results (**Table 1B**), respectively. Relationships between the simplified names and FLA-I haplotypes are shown in **Figures 5** and **6**.



(B)

Family	Generation	Individual name	ID number	gender
Family 1	1st	S12LMC	01	Male
		131279	02	Female
	2nd	383782	03	Male
		F42MFC	04	Female
		U23PFC	05	Female
		U33PFC	06	Female
	3rd	K1YPMC	07	Male
		K2YPMC	08	Male
		K3YPMC	09	Male
		K4yPMC	10	Male
Family 2	1st	176365	11	Male
		S21OFC	12	Female
	2nd	Q57MFC	13	Female
		384323	14	Male
		T11QMC	15	Male
		T21QMC	16	Male
	3rd	Z23PFC	17	Female
		Z33PFC	18	Female
		Z43PFC	19	Female
		Z53PFC	20	Female

Figure 1. Genetic and biological information of the 20 cats. (A) shows pedigree charts of 20 cats from two families used for this study. Circles and squares indicate females and males, respectively, and numbers in the circles and squares indicate the cat's ID number. Question marks indicate individuals with unknown FLA genotypes. (B) shows individual and cat ID number and gender.

(A)

		$\alpha 1$ domain (Exon 2)		FLA-I F2		
FLA-E	1	GGCTCCCACTCCCTGAGGTATTTCTACACCGGGTGTCCCGGCCCGGCTCGGGGAGCCCGCTTCATCTCC	GTGGGCTACGTGGACGACA	GCAGTTCG	100	
FLA-H	1G.....	100	
FLA-K	1A.....	100	
FLA-A	1T...T...T...GG.....A.....G.A.T.GGAAC.....A.....	100	
FLA-J	1C.....A.....G.....T.....	100	
FLA-L	1G.....	100	
FLA-O	1T.....C.....A.....A.....G.....	100	
FLA-E	101	TGGGTTTCGACAGCGACCCCGAATCCAGGGAAGAGCCCGGGCGCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACACGCGGATTTA			200	
FLA-H	101G...ATG.....	ACGC	200	
FLA-K	101G...ATG.....	T.....A.G.G.....ACG	200	
FLA-A	101	C.....T...G...G...ATG...A.C.T.AT...T.A.....C...G.....G.A.G.G.....GGCGC		200	
FLA-J	101C.....T...G...TCT.....G.....T...T.C.....	A.G.G.....ACGC	200	
FLA-L	101G...TCT.....	G.A.C.G.....GGT	200	
FLA-O	101C.....A.....G...ATG.....T...A.....G.G.....CGC		200	
		$\alpha 2$ domain (Exon 3)				
FLA-E	201	CTTGGACACCGCACAGATTCCCGAGTGAACCTGAACACCGTGTCCGCTACTACAACCCAGAGCGAGTCC	GGTCCGACACATCCAGAGAATGTATGGC		300	
FLA-H	201	GAA.....A.....A...G.....	300	
FLA-K	201	GAA.A...A.....T.....G.....A.....T.G.....	300	
FLA-A	201	AA.....C...T...C...G...C...G...G...G...AG...T...C...T.GC...C.TC		300	
FLA-J	201	GAA.....A.....AA.TT.....G...C.G.ACA...G.G.....T...A.A.....		300	
FLA-L	201	AA...CA...C...T...C...G...ACC...G.G.....T...T...A...G.C.....		300	
FLA-O	201	AA.TGCA...G...G...CC...C.G...CGCC.....		300	
FLA-E	301	TGTGACGTGGACCCAGACCGCGCTTCCTCCGGGGTACAGTCAAGTCTCTATGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCTGGA			400	
FLA-H	301A.....		400	
FLA-K	301G.....A.....		400	
FLA-A	301	...C.A...GG...C...TT...C...A.A...T.G...TT.G.....G.....T.....		400	
FLA-J	301	...A.C.GA...GA...A.C...C...TG.....A.....G.....		400	
FLA-L	301	...A.C.GG...T...G.C...C...G...C...G...T.....		400	
FLA-O	301	...A.C.GG...T...G.A...C...TTGG...C...GC.....		400	
		FLA-I R2m				
FLA-E	401	CCGCGGC	AGACCCGGCGCAGAT	CACACGCCCAAGTGGGAGGAGCCGGTGTGGCGGAGCAGGAGGAACTACCTGGAGGGCAGCTGCGTGGAGTG	500	
FLA-H	401C...AG.CATC.....C	500	
FLA-K	401	500	
FLA-A	401G.....C...CT...A.CA...C...TC.A...G...C...T...A...A.....	500	
FLA-J	401C...A...C...T...T...CT.A...CT.C...GT.....C	500	
FLA-L	401T...A...GCTG.....A.....G.....	500	
FLA-O	401T...A...C...GCT.T.C...G...A...T...C.G.....	500	
		$\alpha 3$ domain (Exon 4)				
FLA-E	501	GCTCGCCAATACCTGGACATGGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCGCA	GAATCTCCCAACACACGCGTGACCCGCCACCCCATCTCTGACCGTGAGGTGACC		600	
FLA-H	501	...A.G.....C.A...G.AG.....GG.....A...A...	600	
FLA-K	501	600	
FLA-A	501	...CGG...G...T...G.G...CA.....A...CC.C...G...G...A.A.C...A.T...CT...A...T...C...		600	
FLA-J	501	...A...A.....G.....G.....C.A...G.....		600	
FLA-L	501	...C.....G...T.....T.....TG...AT.....A.....		600	
FLA-O	501	...CG.GG...G...G...T...G...A...A.....GG.....A.....		600	
FLA-E	601	CTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCACCTGACCTGGCAGCGTGGGCGGAGCCACCCAGGACACAGAGCTTGTGGAGCCA			700	
FLA-H	601T.....G.....		700	
FLA-K	601T.....G.....		700	
FLA-A	601	...A...T...T...T...A...G...TG.T...A.G...T...C.T...		700	
FLA-J	601	700	
FLA-L	601T...T...A.....G.....C.....		700	
FLA-O	601T.....A.....A.....G.....A.....G.....		700	

(B)

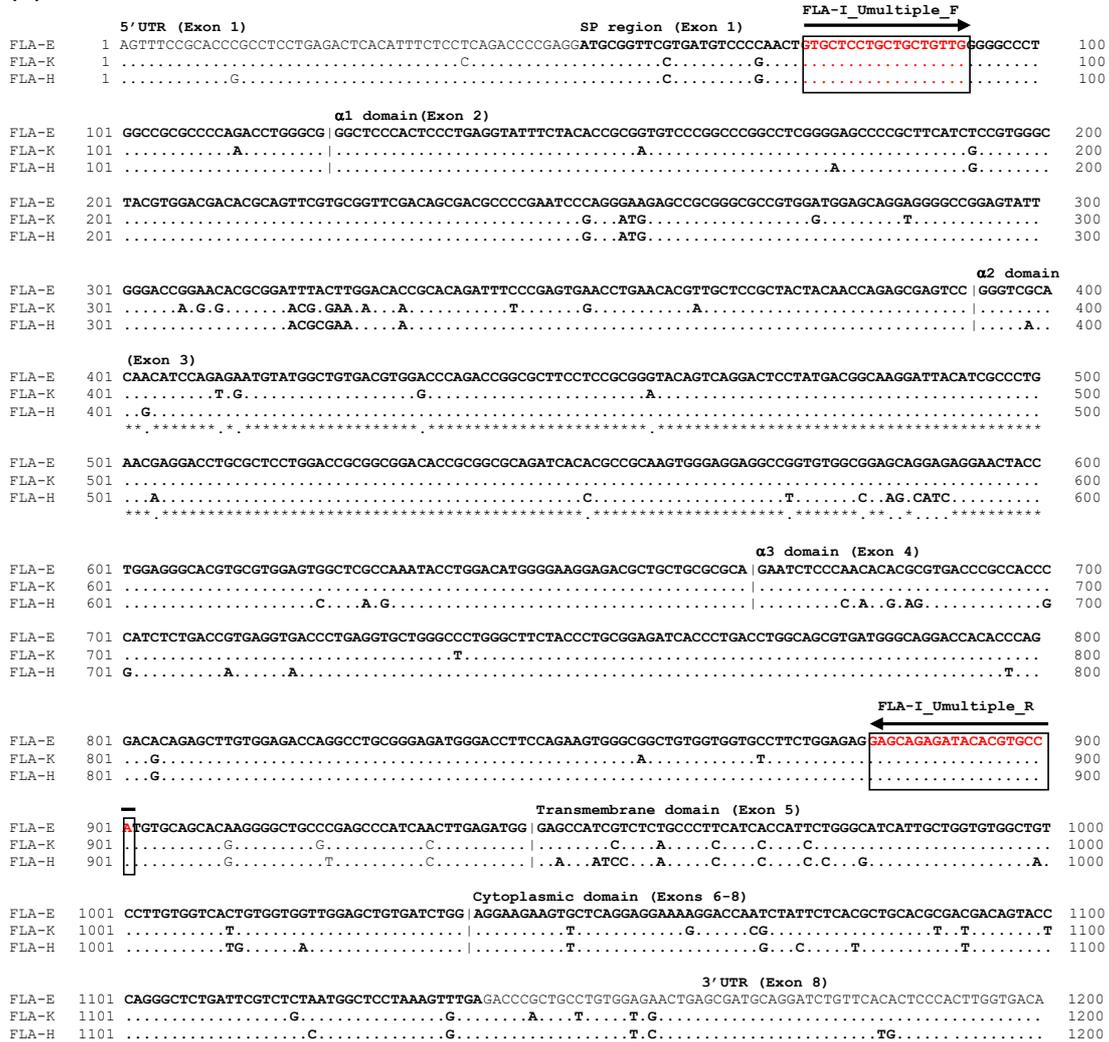


Figure 2. Nucleotide alignment for FLA-I cDNA sequences and primer locations.

(A) shows the nucleotide alignment of seven FLA-I genes and primer location for genotyping of FLA-I genes (Table 1A), (B) shows the nucleotide alignment of FLA-E/H/K genes and primer location for confirmation of the FLA-I genotyping results (Table 1B). The nucleotide alignments were constructed by using the 2.98 Mb genomic sequence (EU153401). 5'UTR, SP and 3'UTR indicate 5' untranslated region, signal peptide and 3' untranslated region, respectively. Locations of primers are indicated by boxes and red letters. Arrows shows direction of primers.

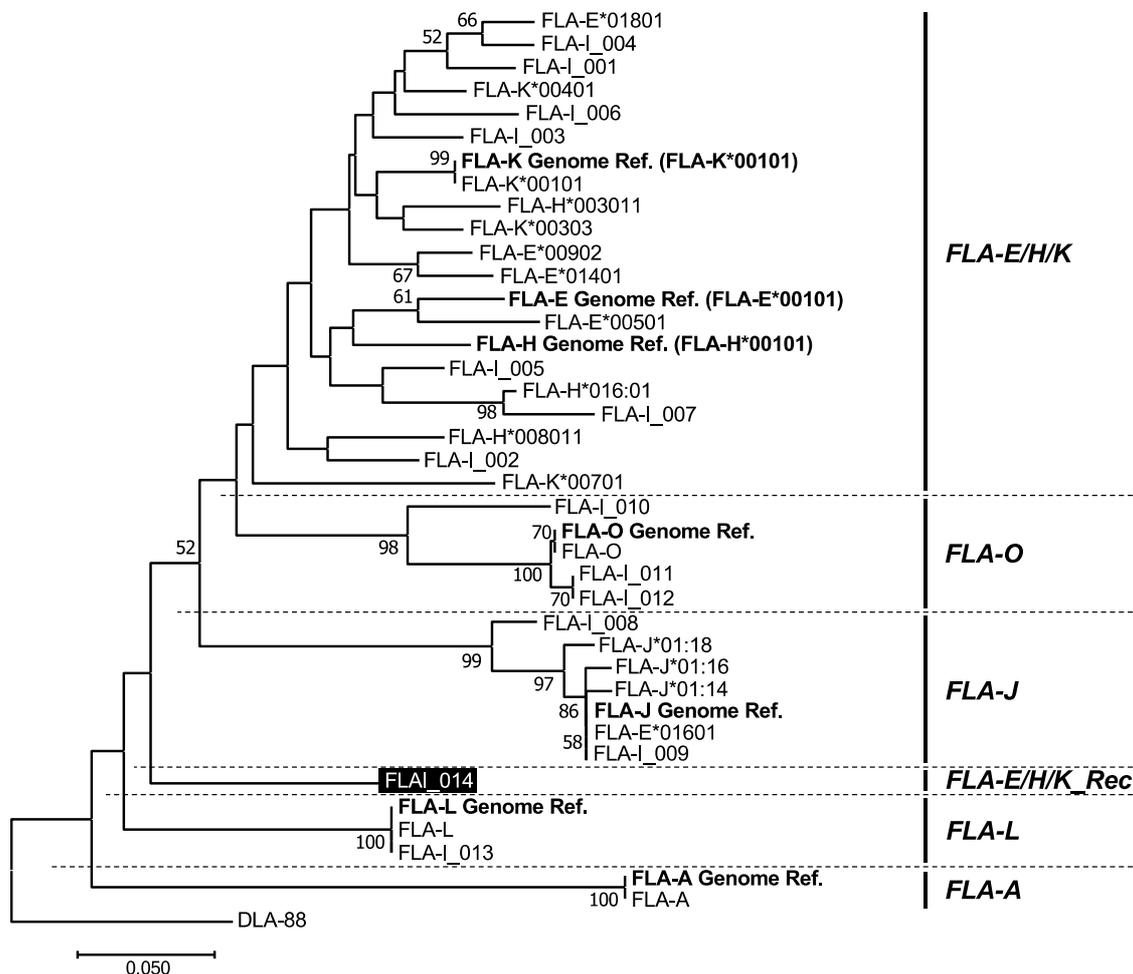


Figure 3. Amino acid sequence-based phylogenetic trees of FLA-I sequences by the Neighbor joining method. The trees were constructed by the neighbour-joining method. Numbers at branches indicate bootstrap values over 50. FLA-I tree based on 40 amino acid sequences, deduced from 32 FLA-I translated from the nucleotide sequences that were identified generated in this study, seven FLA-I reference sequences (EU153401) (bold letters) and DLA-88 (NM_001014767) that was used as an outgroup sequence were used for constructing the tree. The FLA-I_014 in FLA-E/H/K_Rec lineage that shows a unique phylogenetic relationship is indicated by a black background and white letters.

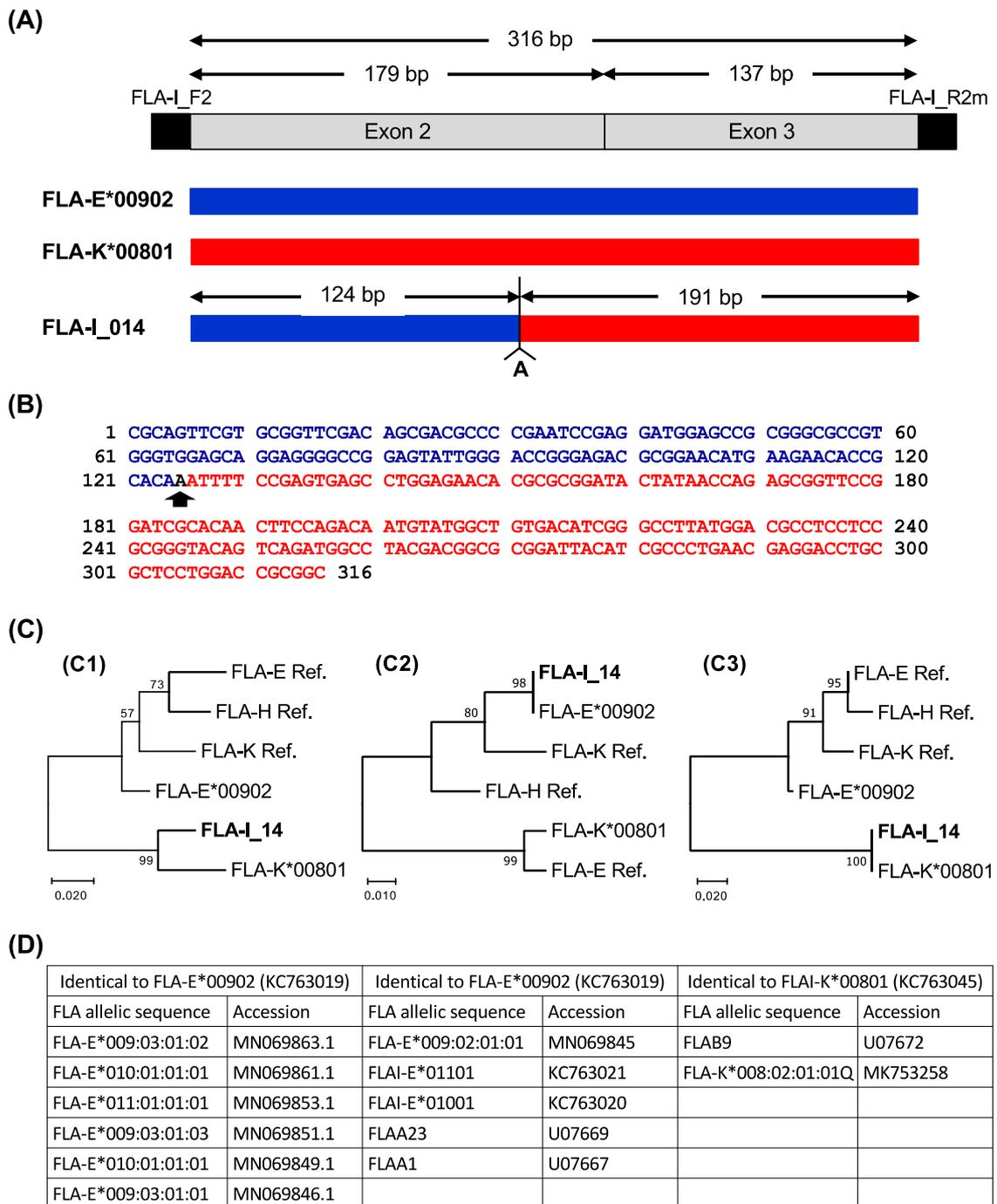
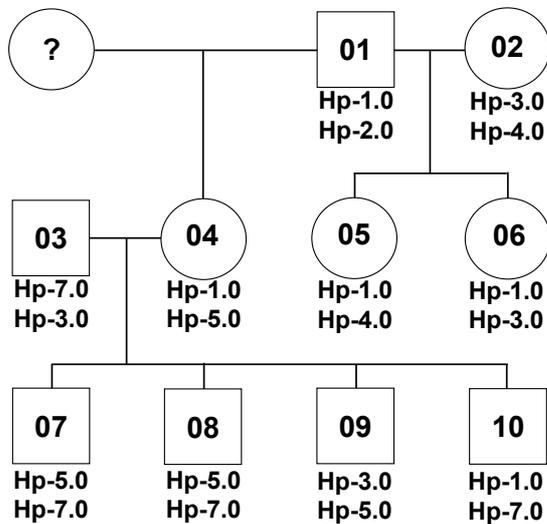


Figure 4. Gene structure of the recombinant FLA-I_014 sequence. (A) Schematic diagram showing the PCR region used for genotyping and the location of the recombination hotspot. Blue and red bars indicate nucleotides that support the FLA-

E*00902 (KC763019) and K*00801 (KC763045) sequences, respectively. (B) Nucleotide sequence of FLA-I_014. Arrow indicates estimated recombination hotspot. (C) Phylogenetic analyses using FLA-E/H/K and FLA-I_014 sequences. The FLA-E Ref., FLA-H Ref. and FLA-K Ref were obtained from the cat genome reference sequence (EU153401). Numbers showing on the branches are bootstrap values. (C1) The 316 bp alignment for the PCR region was used. (C2) The 124 bp alignment for the exon 2 was used. (C3) The 191 bp alignment for exons 2 and 3 was used. (D) List of FLA-I alleles identical to FLA-E*00902 and K*00801.

Family 1



Family 2

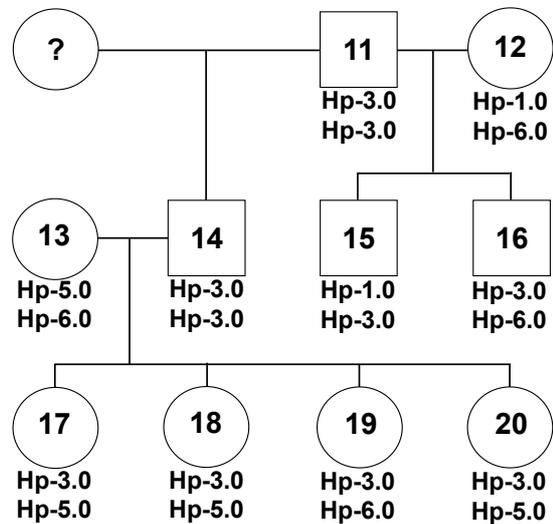


Figure 5. A summary for the inheritance of FLA haplotypes in two cat families.

The family charts with the FLA haplotype information were summarized based on the FLA haplotype structures described in **Figure 6** and **Table 3**. Circles and squares indicate females and males, respectively, and numbers in the circles and squares indicate the identification number of the 20 cats. Question marks indicate individuals with unknown FLA genotypes.

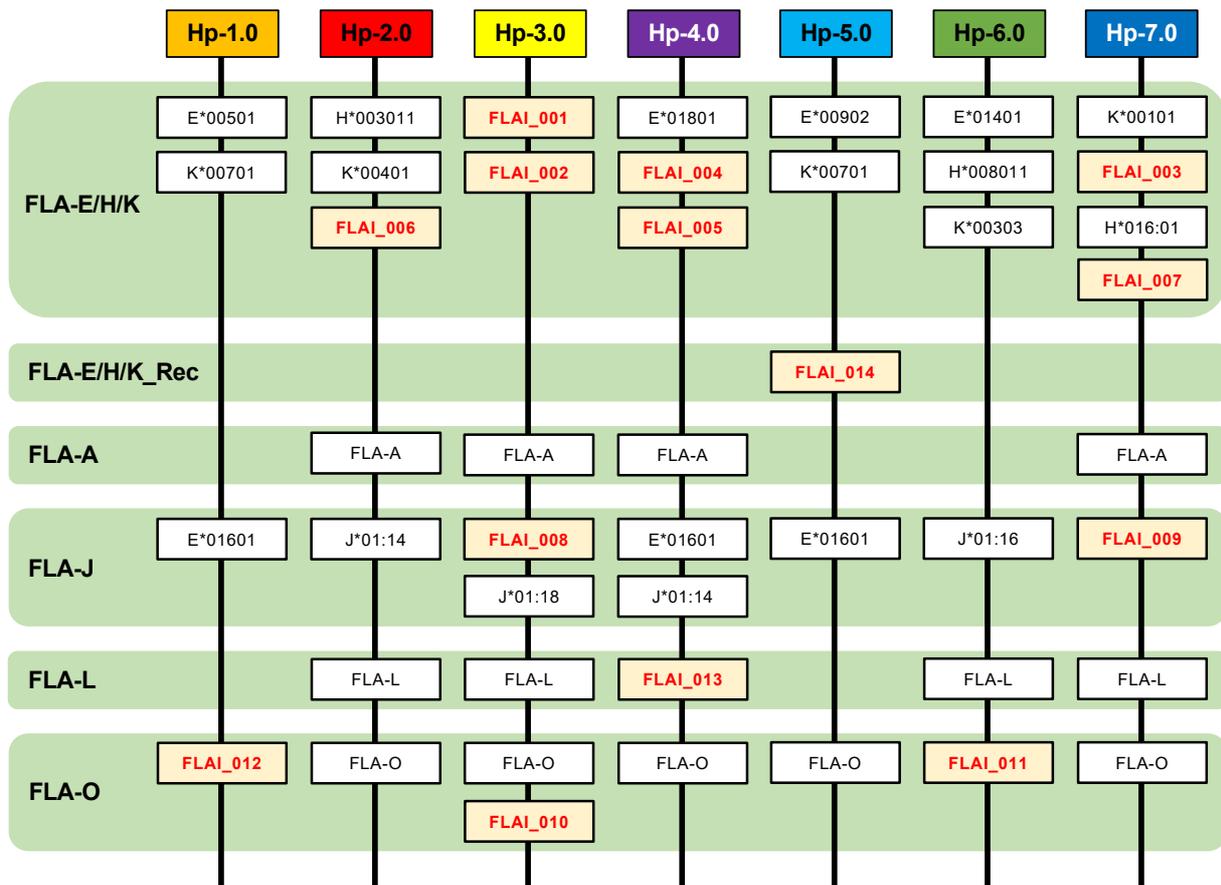


Figure 6. Haplotype structures of the FLA-I subregions. The haplotypes that are composed of the different types of transcribed FLA-I loci and alleles. The lineage of the FLA-I sequences were classified and inferred from the phylogenetic analyses. Novel sequences identified in this study are indicated by red letters and a yellow background.

第 4 章

FLA クラスII遺伝子の多型解析の開発

FLA クラスIIアレルの同定およびハプロタイプの推定

4.1 序論

MHC クラス II 領域のゲノム構造は、動物種によって違いが認められる。ヒトは第 6 番染色体に MHC クラス II 領域が存在し、13 個の MHC クラス II 遺伝子が同定された (**Figure 1**)。一方イヌは、第 12 番染色体に MHC クラス II 領域が存在し、8 個の MHC クラス II 遺伝子が同定された(Lindblad-Toh et al., 2005)。具体的には、ヒトの *HLA-DRA*, *-DRB1* および *-DRB5* が位置する領域 (*MHC-DR* 領域) には、イヌでは 2 個の MHC クラス II 遺伝子 (*DLA-DRA* および *-DRB1*) が同定された。次に、ヒトにおいて、*HLA-DQA1*, *-DQB1*, *-DQA2* および *-DQB2* が位置する領域 (*MHC-DQ* 領域) には、イヌでは 2 個の MHC クラス II 遺伝子 (*DLA-DQA1* および *-DQB1*) が同定された。また、ヒトにおいて *HLA-DOB*, *-DMB*, *-DMA* および *-DOA* が位置する領域 (*MHC-DM/DO* 領域) には、イヌでも同様に 4 個 (*DLA-DOB*, *-DMB*, *-DMA* および *-DOA*) が同定された。さらに、ヒトにおいて *HLA-DPA1* および *-DPB1* が位置する領域 (*MHC-DP* 領域) には、イヌでは、欠失している。以上のように、ヒトとイヌを比較すると MHC クラス II 遺伝子の数と、MHC ゲノム構造に違いが認められている。

ネコは第 B2 染色体に MHC クラス II 領域が存在し、そのゲノム配列は、Yuhki ら (2008 年) によって決定された。現在までに、ネコ 1 個体の 2 種類のハプロタイプ (ハプロタイプ 1 とハプロタイプ 2) が報告されている。これらのうち、ハプロタイプ 1 は MHC クラス II 領域全長の配列が公開されたが、ハプロタイプ 2 は、*MHC-DR* 領域のみの配列が公開された。

このネコとヒトの MHC クラス II 領域を比較すると、ヒトの *MHC-DQ* 領域に相当する領域は、ネコでは欠失していた。また、ネコの *MHC-DP* 領域に 2 個 (*FLA-DPA* および *-DPB*) が同定されたが、どちらも偽遺伝子であった。そ

の一方で、ヒトの *MHC-DR* 領域に相当する領域は、ネコでは拡大しており、ヒトやイヌと比較して数多くの *MHC-DR* 遺伝子が同定されている。具体的には、ハプロタイプ 1 では 7 個の遺伝子 (*FLA-DRA1*, *-DRA2*, *-DRA3*, *-DRB1*, *-DRB2*, *-DRB3* および *-DRB4*)、ハプロタイプ 2 では 8 個 (*FLA-DRA1*, *-DRA2*, *-DRA3*, *-DRB1*, *-DRB2*, *-DRB3*, *-DRB4* および *-DRB5*) が同定された。このことからハプロタイプ 1 とハプロタイプ 2 との間で *MHC-DR* 遺伝子の数が異なっており、コピー数多型を有することが明らかにされた。また、ヒトの *MHC-DM/DO* 領域に相当する領域には、ネコでは 4 個の遺伝子 (*FLA-DOB*, *-DMB*, *-DMA* および *-DOA*) が同定された。このように、ネコは、*MHC-DR* および *MHC-DM/DO* 領域に同定された遺伝子のみが機能的であった(Yuhki et al., 2008)。

ネコの *MHC-DR* および *MHC-DM/DO* 領域には、機能的な遺伝子が同定されている。このうち、*MHC-DM/DO* 領域の *MHC* クラス II 遺伝子は、ヒトにおいて多型が乏しいことから、ネコの *MHC-DM/DO* 領域の *MHC* クラス II 遺伝子も多型は期待されなかった。また、ネコの *MHC-DM/DO* 領域に同定された 4 個の遺伝子は研究の対象となっていない。その一方で、ネコの *MHC-DR* 領域の *MHC* クラス II 遺伝子のうち、1 個の *FLA-DRA* 遺伝子 (*FLA-DRA1*) および 4 個の *FLA-DRB* 遺伝子群 (*FLA-DRB1*, *FLA-DRB3*, *FLA-DRB4* および *FLA-DRB5*) の転写産物が同定された。さらに、これらの遺伝子のうち、4 個の *FLA-DRB* 遺伝子群は、*FLA-DRA* 遺伝子と比較して、多型に富むことが明らかにされている(Yuhki and O'Brien, 1997)。以上のことから、ネコの *MHC* クラス II 遺伝子のうち、遺伝子発現が認められ、多型を有するのは *FLA-DRB* 遺伝子群のみであった。以上のことから、ネコの *MHC* クラス II 遺伝子のうち、*FLA-DRB* 遺伝子群が多型解析を行う対象である。

現在までに報告された FLA-DRB アレルは、149 個体の多型解析から 70 種類のみであり、他の動物種と比較して、多型情報が極めて乏しい (Kuwahara et al., 2000;Kuwahara et al., 2001;Kennedy et al., 2002;Kennedy et al., 2003a)。また、これらの塩基配列のほとんどは、サブクローニング法によって塩基配列決定が行われてきた。しかし、サブクローニング法による塩基配列決定は、必要な時間および費用が膨大であるため、数多くの個体の多型解析には適していなかった。本章にて、FLA-DRB 遺伝子群における多型解析法を開発するためには、4 個 (*FLA-DRB1*, *FLA-DRB3*, *FLA-DRB4* および *FLA-DRB5*) すべての FLA-DRB 遺伝子における対立遺伝子 (アレル) を同定する必要があった。そこで、第 3 章と同様にアンプリコンシーケンス法が、FLA-DRB 遺伝子の多型解析法に適していると考えられた。そこで本章では、NGS を用いたアンプリコンシーケンシング法による FLA-DRB 遺伝子群を対象とした多型解析法の開発を試みた。また、開発した多型解析法の正確性を明らかにするために、第 3 章同様、血縁関係の明確な個体を実験に供した。同定されたアレルの分子系統解析により、各 FLA-DRB 遺伝子へ分類した。さらに、血縁関係に基づいたハプロタイプの推定を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 供試検体

第3章で作成した血縁関係の明確な同20個体のネコ（雑種）のcDNAを用いた。

4.2.2 アンプリコンシーケンスによる FLA-DRB 多型解析の PCR 増幅

アンプリコンシーケンスによる FLA-DRB 多型解析法を開発するにあたり、まずプライマーを設計した。このプライマーは、今までの報告にて転写産物が認められた4個の FLA-DRB 遺伝子に基づいて設計した（**Figure 2**）。具体的には、4個の FLA-DRB 遺伝子（*FLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4* および *-DRB5*）に共通した配列部分であり、なおかつ、遺伝子毎のアレルを同定するために、多型が集中するエキソン2（270 bp）を含むようにエキソン1および3にプライマーを設計した。プライマーの名称、塩基配列、設計位置および予想される増幅長は **Table 1** に示した。また、NGS 装置である Ion S5（Thermo Fisher Scientific）による20個体の識別可能なマルチプレックスアンプリコンシーケンシングを行うために、プライマーの5'末端に Ion Torrent adapters および個体識別バーコードを付加したプライマーを20種類設計した。

PCR では、合成された cDNA を鋳型として、PrimeSTAR GXL（タカラバイオ株式会社）とプライマーを用いて行った。PCR 反応溶液は、cDNA を 10 ng、PrimeSTAR GXL DNA 合成酵素を 1 単位、PCR バッファー（5mM Mg⁺）を 4.0 uL、dNTP（2.5 mM）およびプライマー（0.4 uM）をそれぞれ 1.6 uL を加え、総量 20 uL とした。PCR 反応条件は、最初に 96°C で 2 分間の変性を行なったのちに、98°C で 10 秒間、55°C で 30 秒間、68°C で 30 秒間の 3 工程を 1 サイ

クルとし、合計 40 サイクル行なったのちに、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行なった。

4.2.3 PCR 増幅産物の精製および定量

PCR 産物の精製および定量は、第 3 章と同様の方法で行った。

4.2.4 エマルジョン PCR、NGS のシーケンスおよびデータ処理

Ion 520 & Ion 530 Kit-OT2 および OneTouch 2 instrument を用いたエマルジョン PCR (emPCR)、emPCR 後の濃縮、Ion 520/530 Chip Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いたシーケンシング、生データの情報処理、ベースコール、トリミング、クオリティフィルターは、第 2 章と同様の方法で行った。

4.2.5 リード選別およびトリミング

20 個体の fastq ファイルからのリード選別およびトリミングは第 2 章と同様の方法を用いた。選別後のリードは、エキソン 2 配列の 270 bp へトリミングされた。

4.2.6 新規 FLA-DRB アレルの同定とリファレンスの作成

リードの選別およびトリミング後の配列を用いて、各個体での新規配列の同定およびリファレンスの作成を行った。新規 FLA-DRB アレルの同定とリファレンスの作成は、第 2 章と同様の方法を用いた。なお、リファレンス作成にて、マッピング解析の minimum overlap length parameter は、200~270 bp に設定した。

4.2.7 マッピング解析によるアレルの同定およびリード数の算定

マッピング解析は第2章と同様の方法で行い、個体毎にリファレンスへマッピングされたリードから、FLA-DRB アレルの有無を判定した。また、個体毎にマッピングされたリード数の合計を 100,000 リードに補正した。この補正リード数は、各アレル毎の平均リード数および系統樹によってアレルが分類された系統毎の平均リード数を算出した。この平均リード数から、FLA-DRB 系統間でのリード数の比較を行った。

4.2.8 塩基配列の解析および分子系統解析による FLA-DRB アレルの分類

塩基配列および推定アミノ酸配列の NCBI データベースに対する相同性検索には BLAST を用いた。推定アミノ酸配列に基づく分子系統解析には、MEGA7 ソフトウェア(Kumar et al., 2016)を用いた。ClustalW を用いた新規および既知の FLA-DRB アレルのエキソン 2 の推定アミノ酸配列 (90 残基) のアライメントを行った。アライメント結果から、近接結合法を用いた分子系統樹を作成し、p 距離モデルおよびブーストラップ法 (2,000 回反復) で統計的支持値を算出した。

4.2.9 新規 FLA-DRB アレルおよびハプロタイプの命名方法

多型解析において同定された新規 FLA-DRB アレルは、一時的な通し番号として FLA-DRB_001~FLA-DRB_007 と名付けた上で、Genbank/EMBL/DDBJ データベースに登録された。推定された FLA-DRB ハプロタイプは、第3章と同様に命名した。例えば、FLA クラス II 領域のハプロタイプ (ハプロタイプ 1) は Hp-0.1 と表記した。

4.3 結果

4.3.1 多型解析によって同定された FLA-DRB アレル

FLA-DRB 多型解析では、4 個の FLA-DRB 遺伝子 (*FLA-DRB1*, *FLA-DRB3*, *FLA-DRB4* および *FLA-DRB5*) それぞれのアレルの同定を試みた。この結果、2 家系 20 個体から、計 16 種類の FLA-DRB アレルが同定された (**Table 2**)。これらのうち、9 種類は既知のアレルであったが、7 種類は新規のアレルであった (**Table 2** 内の赤文字で示したアレル)。これら新規アレルは、FLA-DRB_001 から FLA-DRB_007 と命名した。また、これら 16 種類の FLA-DRB アレルのうち、FLA-DRB_n06 と FLA-DRB_001 は、異なる塩基配列であったが、同一のアミノ酸配列に翻訳されたことから同義置換のアレルであった。

4.3.2 同定された FLA-DRB アレルの分子系統解析

計 16 種類の FLA-DRB アレルを系統樹に基づいて分類した (**Figure 3** および **Table 2**)。この系統樹から、計 16 種類の FLA-DRB アレルを、4 つの系統 (*FLA-DRB1*, *FLA-DRB3*, *FLA-DRB4* および *FLA-DRB5*) に分類した。具体的には、3 種類 (FLA-DRB*040101, DRB*n05 および DRB_004) を *FLA-DRB1* 系統に分類した。同様に、6 種類 (FLA-DRB*n06, DRB_001-003, DRB*0203 および DRB_006) を *FLA-DRB3* 系統に、6 種類 (FLA-DRB*0301, DRB1-rr6, DRB_007, DRB1-rr7, DRB*0107 および DRB*0103) を *FLA-DRB4* 系統および 1 種類 (FLA-DRB_005) を *FLA-DRB5* 系統に分類した。

4.3.3 各個体に同定された FLA-DRB アレル

計 16 種類の FLA-DRB アレルに対して、個体毎にマッピング解析を行った。この結果、少ない個体で 2 種類、多い個体で 6 種類の FLA-DRB アレルが同定された (**Table 3**)。例えば、Family 1 の個体番号 01 において、*FLA-DRB1* 系統の FLA-DRB*n05、*FLA-DRB3* 系統の FLA-DRB*0203、DRB*n06 および DRB_001 および *FLA-DRB4* 系統の FLA-DRB*0107 が同定された。このように個体番号 01 は、これら計 5 種類の FLA-DRB アレルが同定された。他の個体も同様に、FLA-DRB アレルが同定された。

4.3.4 FLA-DRB ハプロタイプの推定

各個体に同定された FLA-DRB アレルの組み合わせと、個体の血縁関係に基づいて、全 20 個体のハプロタイプ推定を行った (**Table 4**)。Family 1 の個体番号 05 と、05 の父と母である 01 と 02 に同定されたアレルを例にして説明する。まず、子である 05 には、5 種類のアレル (DRB*n05, DRB*n06, DRB*0107, DRB_004 および DRB_001) が同定された。これら 5 種類のうち、3 種類 (DRB*n05, DRB*n06 および DRB*0107) は父である 01 に認められ、残る 2 種類 (DRB_004 および DRB_001) は母である 02 に同定された。同一染色体上のアレルの組み合わせであるハプロタイプは、父および母から子へ 1 セットずつ遺伝されることから、DRB*n05, DRB*n06 および DRB*0107 は、ハプロタイプ (Hp-0.1) として父から遺伝し、同様に、DRB_004 および DRB_001 は、ハプロタイプ (Hp-0.4) として母から遺伝したと考えられた。その他の個体においても同様に、ハプロタイプが推定された。以上のようにハプロタイプ推定を行った結果、2 家系 20 個体から、計 8 種類の FLA-DRB ハプロタイプ (Hp-0.1~Hp-0.8) が推定された。

4.3.5 推定された FLA-DRB ハプロタイプの比較

推定された計 8 種類のハプロタイプを比較すると、ハプロタイプ毎に構成される FLA-DRB アレルの数が異なっていた (**Figure 4**)。具体的には、Hp-0.1 は、*FLA-DRB1* 系統の FLA-DRB*n05、*FLA-DRB3* 系統の DRB*n06 および *FLA-DRB4* 系統の DRB*0107 の計 3 種類のアレルから構成されていたハプロタイプであった。同様に、Hp-0.2~0.4 は 2 種類、Hp-0.5~0.8 は 3 種類のアレルから構成されていた。また、推定された FLA-DRB ハプロタイプは、ハプロタイプ特異的なアレルの欠失やハプロタイプ毎のアレル数の違いが認められた。これらのことから、FLA-DRB ハプロタイプ毎のアレル数の違い、つまり、コピー数多型が認められた。

また、Hp-0.1 と Hp-0.8 は、どちらも 3 つのアレルが含まれていたが、そのうち *DRB1* および *DRB4* 系統の 2 種類のアレル (DRB*n05 および DRB*0107) は、どちらのハプロタイプにおいても認められた。しかし、*DRB3* 系統は異なっており、Hp-0.1 は DRB*n06 が、と Hp-0.8 は DRB_006 が含まれていた。

4.3.6 FLA クラス I 領域から FLA-DRB 領域までのハプロタイプ構造

第 3 章と本章にて同一の 2 家系 20 個体を実験に用いたことから、FLA クラスIから FLA-DRB 領域まで (FLA 領域全体) のハプロタイプが推定された (**Figure 5**)。本研究に用いた 20 個体から、計 8 種類の FLA クラスI - DRB ハプロタイプ (Hp-1.1, Hp-2.2, Hp-3.3, Hp-3.8, Hp-4.4, Hp-5.5, Hp-6.6 および Hp-7.7) が推定された。このハプロタイプのうち Hp-3.3 は、個体番号 11 にて、ホモ接合体と推定された。また、計 8 種類の FLA クラスI-DRB ハプロタイプのうち Hp-3.3 と Hp-3.8 は、同一の FLA クラスIハプロタイプ (Hp-3.0) を共有していた。

その一方で、これら2つのハプロタイプは、異なる FLA-DRB ハプロタイプ (Hp-0.3 または Hp-0.8) から構成されていた。

4.3.7 FLA-DRB 系統毎の平均リード数の比較

推定されたハプロタイプ、系統分類およびリード数に基づいて、FLA-DRB 系統の平均リード数を算出した。この結果、FLA-DRB 系統のリード数を比較すると、系統による転写産物量の違いが明らかとなった (**Table 5**)。例えば、*FLA-DRB1* 系統には、3種類のアレルが分類された。これら3種類のアレルが全20個体のハプロタイプ ($2n=40$) に認められた回数 (アレルの出現回数) は、少ないアレルで2回、多いアレルで13回であり、合計すると19回であった。この計19回のリード数を平均すると、25,228リードであった。このようにして、すべての系統のリード数を算出したところ、*FLA-DRB3* 系統は14,701リード、*FLA-DRB4* 系統は14,340リード、*FLA-DRB5* 系統は41,605リードであった。この平均リード数を系統間で比較したところ、大まかに $DRB5 > DRB1 > DRB3 = DRB4$ の関係性であることが考えられた。このうち、FLA-DRB 遺伝子毎の平均リード数が最も少ない *FLA-DRB4* は、最も多い *FLA-DRB5* のおよそ 1/3 であった。

4.4 考察

本研究における多型解析法では、今までに多型を有することが明らかであった FLA-DRB 遺伝子 (*FLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4* および *-DRB5*) に共通のプライマーを設計した。このプライマーと NGS によるアンプリコンシーケンシング法を用いて、FLA-DRB 遺伝子の網羅的な多型解析を試みた。その結果、20 個体の解析から 16 種類の FLA-DRB アレルが同定され、そのうち 7 種類 (43.8%) は新規アレルであった。このことから、アンプリコンシーケンシング法によって、より効率的な FLA-DRB 多型解析が実現された。

本解析において、FLA-DRB ハプロタイプが推定された。なおかつ、各個体のハプロタイプ推定結果は、個体間の血縁関係と矛盾が無かった。今後、様々なネコの品種にて血縁関係が明確な個体の解析を行うことで、数多くの FLA-DRB ハプロタイプが推定できると考えられる

MHC 遺伝子は、進化の過程で、正の自然選択の影響を受けてきたために、相同組換え (乗換えや遺伝子変換) によって遺伝子が重複や欠失、または新たな遺伝子が生成されてきたと考えられている (Nei et al., 1997)。本章で推定されたハプロタイプを比較すると、ハプロタイプに含まれるアレルの数に違いが認められた。また、ハプロタイプによっては遺伝子の欠失が認められた。以上のことから、FLA-DRB 遺伝子はコピー数多型を有することが考えられた。また、本章で推定されたハプロタイプの中には、*DRB3* 系統アレルのみ異なり、他の 2 つの系統 (*DRB1* および *DRB4* 系統) のアレルが共通した 2 種類のハプロタイプ (Hp-0.1 および Hp-0.8) が認められた。この 2 つのハプロタイプは、FLA-DRB 領域の相同組換えによって、*DRB3* 系統のアレルが遺伝子変換または組換えを起し、生み出されたと推測できた。

前章と同様に、解析によって各アレルのリード数から推定される転写産物量を、FLA-DRB 系統毎に比較すると、DRB5 > DRB1 > DRB3 = DRB4 の関係性が明らかになったが、前章で解析した FLA クラスIにおける系統と比較し、DRB 系統によるリード数の差は小さかった。このことから、FLA-DRB 系統による遺伝子発現レベルの違いは少なく、いずれの遺伝子も類似した MHC クラスII分子の機能を有すると考えられる。将来的に各 FLA-DRB 系統に特異的なプライマーなどを用いたより詳細な遺伝子発現量の解析などが必要であるが、本解析法が FLA-DRB 遺伝子においてもアレルの同定および転写産物量の推定にも有用であると考えられる。

第3章および本章での実験によって、20 個体から計 8 種類の FLA クラス I - DRB ハプロタイプが推定された。これらのうち Hp-3.3 と Hp-3.8 は、同一の FLA クラスIハプロタイプである Hp-3.0 を共有していた。しかし、FLA-DRB ハプロタイプは Hp-0.3 または Hp-0.8 と異なっていた。このことから、以下の仮説が考えられる。本解析に用いたネコの祖先個体は、Hp-3.3 と Hp-8.8 のヘテロ接合体であった。この祖先ネコの体内において、減数分裂の際に FLA クラス I 領域と FLA-DRB 領域との間で相同組換えが起きた。この相同組換えの結果、Hp-3.8 と Hp-8.3 の 2 種類のハプロタイプが生成された。このうち、Hp-3.8 が、本解析に用いたネコに遺伝された。また、この減数分裂にて、Hp-8.3 も生成されているはずであるが、本解析では認められなかった。今後、FLA-DRB 多型解析を続けていく中で、Hp-8.3 が推定されることが考えられる。

本章から、FLA-DRB 遺伝子のアレルの同定およびハプロタイプの推定は、第3章で開発した FLA クラスI遺伝子と比較して、一つのハプロタイプに含まれるアレルの数が少なく、アレルの同定にかかる時間や解析の作業量が少なかった。このことから、FLA-DRB 遺伝子の多型解析は、FLA クラス I 遺伝

子と比較して容易である。具体的には、ハプロタイプに含まれるアレルの数は、FLA-DRB ハプロタイプは2,3種類であり、FLA クラス I ハプロタイプの4~8種類と比較して少ない。このため、FLA-DRB ハプロタイプ推定は、少ない数のアレルの組み合わせであるために容易である。この理由から、不特定多数の個体を対象にする際は、まず初めにFLA-DRB 遺伝子のアレルの同定およびハプロタイプの推定を行うことが適切であると考えられる。

Table 1. Primer information used for this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer position	Primer length	Product length	Analyzed length
For genotyping of FLA-DRB genes					
FLA-DRB_F	YCTKGATGRCAGCTCTGATG	Exon 1	20 bp	412 bp	372 bp
FLA-DRB_R	GAGCAGACCARGAGGTTGTG	Exon 4	20 bp		

Table 2. Identified FLA-DRB I alleles and lineages of FLA-DRB loci for phylogenetic analysis

FLA-DRB allele name*	Accession number	FLA locus lineage in Figure 4
FLA-DRB*0401*	U51527	FLA-DRB1
FLA-DRB*n05	EU916196	FLA-DRB1
FLA-DRB_004	LC534245	FLA-DRB1
FLA-DRB*0203*	U51498	FLA-DRB3
FLA-DRB*n06	EU916197	FLA-DRB3
FLA-DRB_001	LC534242	FLA-DRB3
FLA-DRB_002	LC534243	FLA-DRB3
FLA-DRB_003	LC534244	FLA-DRB3
FLA-DRB_006	LC534247	FLA-DRB3
FLA-DRB*0103*	U51483	FLA-DRB4
FLA-DRB*0107*	U51487	FLA-DRB4
FLA-DRB*0301*	U51514	FLA-DRB4
FLA-DRB1-rr6*	AJ428211	FLA-DRB4
FLA-DRB1-rr7*	AJ428212	FLA-DRB4
FLA-DRB_007	LC534248	FLA-DRB4
FLA-DRB_005	LC534246	FLA-DRB5

Table 3. Read information for genotyping of FLA-DRB genes in the two cat families

Family 1

FLA locus lineage in Figure 4	FLA-DRB allele name*	Family 1				
		01	02	03	04	05
FLA-DRB1	FLA-DRB*0401*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB*n05	19746	23726	20467	18568	24202
	FLA-DRB_004	0	13859	0	0	6994
FLA-DRB3	FLA-DRB*0203*	39908	0	0	0	0
	FLA-DRB*n06	16105	0	0	14127	22868
	FLA-DRB_001	11542	24149	0	0	19322
	FLA-DRB_002	0	0	0	13138	0
	FLA-DRB_003	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_006	0	8051	32123	0	0
FLA-DRB4	FLA-DRB*0103*	0	0	0	7309	0
	FLA-DRB*0107*	12700	30215	11432	7659	26615
	FLA-DRB*0301*	0	0	2006	0	0
	FLA-DRB1-rr6*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB1-rr7*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_007	0	0	33972	0	0
FLA-DRB5	FLA-DRB_005	0	0	0	39199	0
Total	sequence number	5	5	5	6	5

Table 3. Family 1 continued

FLA locus lineage in Figure 4	FLA-DRB allele name*	Family 1				
		06	07	08	09	10
FLA-DRB1	FLA-DRB*0401*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB*n05	43502	0	0	18136	22276
	FLA-DRB_004	0	0	0	0	0
FLA-DRB3	FLA-DRB*0203*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB*n06	17103	0	0	0	17357
	FLA-DRB_001	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_002	0	12916	12737	13842	0
	FLA-DRB_003	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_006	15650	13464	13327	12958	15438
FLA-DRB4	FLA-DRB*0103*	0	8702	7273	9911	0
	FLA-DRB*0107*	23745	0	0	7672	13708
	FLA-DRB*0301*	0	1394	2784	0	3569
	FLA-DRB1-rr6*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB1-rr7*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_007	0	23735	24796	0	27651
FLA-DRB5	FLA-DRB_005	0	39788	39084	37481	0
Total	sequence number	4	6	6	6	6

Table 3. Family 2

FLA locus lineage in Figure 4	FLA-DRB allele name*	Family 2				
		11	12	13	14	15
FLA-DRB1	FLA-DRB*0401*	0	40942	40767	0	0
	FLA-DRB*n05	0	21414	0	22137	24011
	FLA-DRB_004	0	0	0	0	0
FLA-DRB3	FLA-DRB*0203*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB*n06	0	13763	0	0	18845
	FLA-DRB_001	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_002	0	0	8013	0	0
	FLA-DRB_003	0	12579	6083	0	0
	FLA-DRB_006	0	0	0	18892	0
FLA-DRB4	FLA-DRB*0103*	0	0	10949	0	0
	FLA-DRB*0107*	0	9194	0	11277	12321
	FLA-DRB*0301*	0	2108	2922	0	0
	FLA-DRB1-rr6*	81776	0	0	36757	36075
	FLA-DRB1-rr7*	18224	0	0	10937	8748
	FLA-DRB_007	0	0	0	0	0
FLA-DRB5	FLA-DRB_005	0	0	31266	0	0
Total	sequence number	2	6	6	5	5

Table 3. Family 2 continued

FLA locus lineage in Figure 4	FLA-DRB allele name*	Family 2				
		16	17	18	19	20
FLA-DRB1	FLA-DRB*0401*	40982	0	0	62614	0
	FLA-DRB*n05	0	14994	0	0	0
	FLA-DRB_004	0	0	0	0	0
FLA-DRB3	FLA-DRB*0203*	0	0	0	0	0
	FLA-DRB*n06	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_001	0	0	0	0	0
	FLA-DRB_002	0	7712	11005	0	7439
	FLA-DRB_003	14556	0	0	10668	0
	FLA-DRB_006	0	9464	0	0	0
FLA-DRB4	FLA-DRB*0103*	0	10961	12658	0	9073
	FLA-DRB*0107*	0	12783	0	0	0
	FLA-DRB*0301*	2322	0	0	1772	0
	FLA-DRB1-rr6*	35246	0	18537	18371	22485
	FLA-DRB1-rr7*	6893	0	7825	6575	9040
	FLA-DRB_007	0	0	0	0	0
FLA-DRB5	FLA-DRB_005	0	44086	49975	0	51963
Total	sequence number	5	6	5	5	5

The read numbers are normalized per 100,000 reads per cat. Novel FLA-DRB sequences and their accession numbers are indicated by red letters. Asterisks show the allele sequences with 237-238 bp of exon 2 in FLA-DRB gene.

Table 4. Estimated FLA-DRB haplotypes

Family 1

Simplified name	01		02		03	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.1	Hp-0.2	Hp-0.8	Hp-0.4	Hp-0.8	Hp-0.7
FLA-DRB1	DRB*n05		DRB*n05	DRB_004	DRB*n05	
FLA-DRB3	DRB*n06	DRB*0203 DRB_001	DRB_006	DRB_001	DRB_006	DRB_006
FLA-DRB4	DRB*0107		DRB*0107		DRB*0107	DRB*0301 DRB_007
FLA-DRB5						

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	04		05	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.1	Hp-0.5	Hp-0.1	Hp-0.4
FLA-DRB1	DRB*n05		DRB*n05	DRB_004
FLA-DRB3	DRB*n06	DRB_002	DRB*n06	DRB_001
FLA-DRB4	DRB*0107	DRB*0103	DRB*0107	
FLA-DRB5	DRB_005			

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	06		07		08	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.1	Hp-0.8	Hp-0.5	Hp-0.7	Hp-0.5	Hp-0.7
FLA-DRB1	DRB*n05	DRB*n05				
FLA-DRB3	DRB*n06	DRB_006	DRB_002	DRB_006	DRB_002	DRB_006
FLA-DRB4	DRB*0107	DRB*0107	DRB*0103	DRB*0301	DRB*0103	DRB*0301
				DRB_007		DRB_007
FLA-DRB5			DRB_005		DRB_005	

Table 4. Family 1 continued

Simplified name	09		10	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.8	Hp-0.5	Hp-0.1	Hp-0.7
FLA-DRB1	DRB*n05		DRB*n05	
FLA-DRB3	DRB_006	DRB_002	DRB*n06	DRB_006
FLA-DRB4	DRB*0107	DRB*0103	DRB*0107	DRB*0301
				DRB_007
FLA-DRB5		DRB_005		

Table 4. Family 2

Simplified name	11		12		13	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.3	Hp-0.3	Hp-0.1	Hp-0.6	Hp-0.5	Hp-0.6
FLA-DRB1			DRB*n05	DRB*0401		DRB*0401
FLA-DRB3			DRB*n06	DRB_003	DRB_002	DRB_003
FLA-DRB4	DRB1-rr6	DRB1-rr6	DRB*0107	DRB*0301	DRB*0103	DRB*0301
	DRB1-rr7	DRB1-rr7				
FLA-DRB5					DRB_005	

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	14		15	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.3	Hp-0.8	Hp-0.1	Hp-0.3
FLA-DRB1		DRB*n05	DRB*n05	
FLA-DRB3		DRB_006	DRB*n06	
FLA-DRB4	DRB1-rr6	DRB*0107	DRB*0107	DRB1-rr6
	DRB1-rr7			DRB1-rr7
FLA-DRB5				

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	16		17		18	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.3	Hp-0.6	Hp-0.8	Hp-0.5	Hp-0.3	Hp-0.5
FLA-DRB1	DRB*0401		DRB*n05			
FLA-DRB3	DRB_003		DRB_006	DRB_002	DRB_002	
FLA-DRB4	DRB1-rr6 DRB1-rr7	DRB*0301	DRB*0107	DRB*0103	DRB1-rr6 DRB1-rr7	DRB*0103
FLA-DRB5				DRB_005	DRB_005	

Table 4. Family 2 continued

Simplified name	19		20	
FLA-DRB Hp.	Hp-0.3	Hp-0.6	Hp-0.3	Hp-0.5
FLA-DRB1	DRB*0401			
FLA-DRB3	DRB_003		DRB_002	
FLA-DRB4	DRB1-rr6 DRB1-rr7	DRB*0301	DRB1-rr6 DRB1-rr7	DRB*0103
FLA-DRB5				DRB_005

Red letter indicates novel allele.

Table 5. Average read numbers in each gene and lineage

FLA Allele	For each Allele			FLA lineage	For each lineage			
	Allele frequency (2n=40)	Average reads	±SD		Sequence Num.	Sequence frequency	Average reads	±SD
DRB*0401	4	46,326	9,404					
DRB*n05	13	21,014	2,527	DRB1	3	19	25,228	12,376
DRB_004	2	10,426	3,433					
DRB*0203	1	39,908	0					
DRB*n06	7	17,167	2,861					
DRB_001	3	18,338	5,193	DRB3	6	33	14,701	6,085
DRB_002	8	10,850	2,539					
DRB_003	4	10,972	3,139					
DRB_006	10	13,937	3,082					
DRB*0103	8	9,605	1,763					
DRB*0107	13	13,794	6,528					
DRB*0301	8	2,360	654	DRB4	6	49	14,340	10,954
DRB1-rr6	8	31,156	9,080					
DRB1-rr7	8	8,530	1,312					
DRB_007	4	27,538	3,981					
DRB_005	8	41,605	6,353	DRB5	1	8	41,605	6,353

Red letter indicates novel allele.

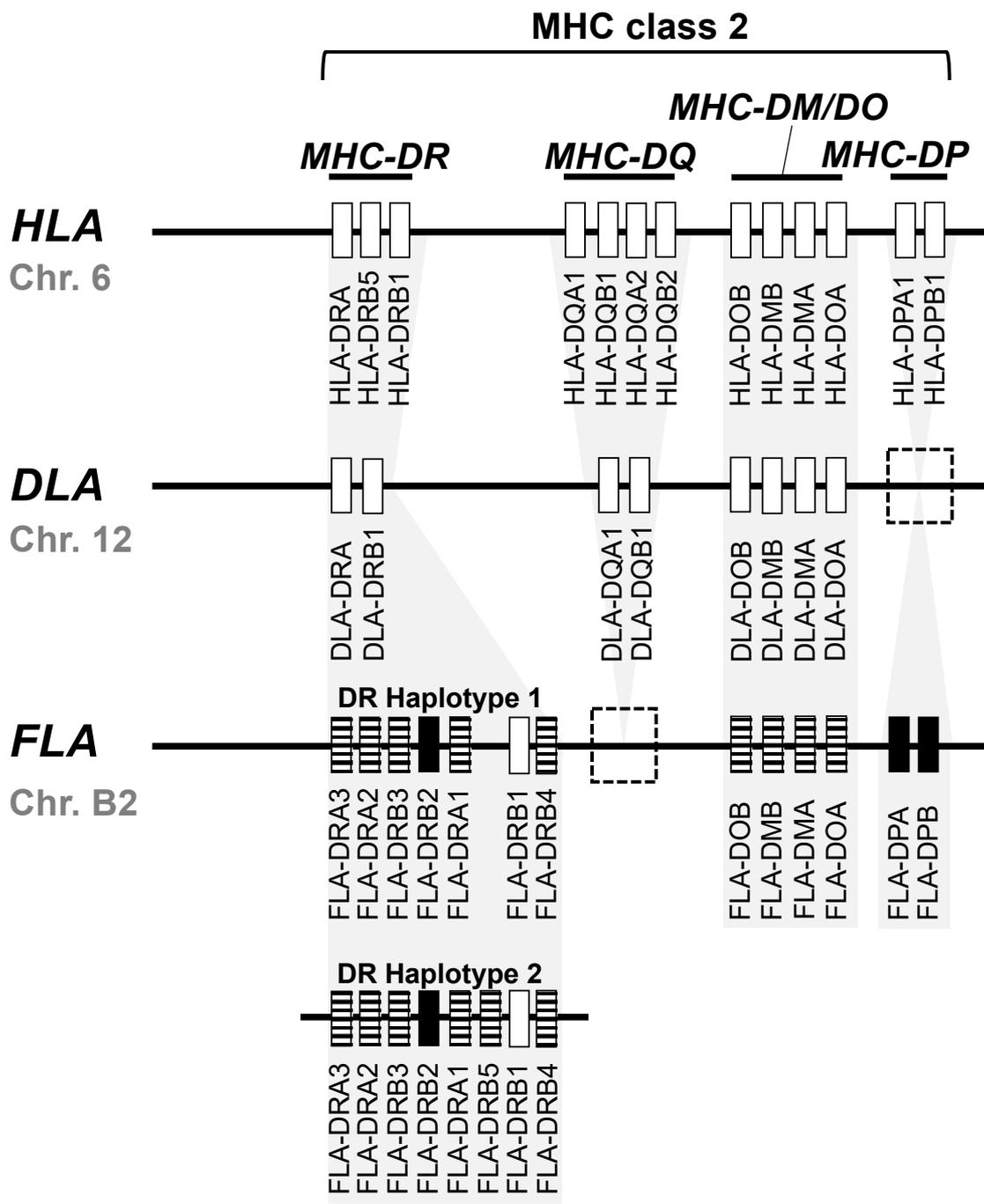


Figure 1. Comparative genome map of FLA, HLA and DLA genomic regions. This map shows the approximate locations of MHC genes based on the HLA (NC_000006.12), DLA (CM000018.3) and FLA genomic information (EU153401 and Beck et al., 2001). The genomic structure of the DR haplotypes 1 is based on the genomic sequence EU153401, whereas the DR haplotype 2 is based on the description

of a published report (Yuhki et al., 2008) because its nucleotide sequence has not been published as yet. White, striped and black boxes indicate transcribed genes, gene candidates and pseudogenes, respectively, after our classification in this study. In the HLA map, only the expressed genes are described. Gray highlights indicate orthologous genomic regions where the number of MHC genes differs between HLA, DLA and FLA.

			FLA-DRB_F			
			SP region (Exon 1)			
FLA-DRB1	1	ATGGTGTGCCTGTGTTTCATGGGAGGCT CCTGGATGACAGCTCTGATG TTGATATTGATGATGCTGAGCCCTCCCCTGGCCTGGGCCAGGGACACCTCAC			100	
FLA-DRB3	1C.....			100	
FLA-DRB4	1	...CA.....G...CCTA...T.T..T...G.....G.A..GC...G.....T...C...			100	
			β1 domain (Exon 2)			
FLA-DRB1	101	CACATTTCTTGCTCCTGTGGAAGGGCGAGTGCCATTTACCAACGGGACGGAGCAGGTGCGATTCTCGGAGAGACACTTCTATAACGGGGAGGAGTTTGT			200	
FLA-DRB3	101AAC.A.....TT.....T...ATC.....G.....A.....TC...T.T.....C.....A.C			200	
FLA-DRB4	101AAATA...T.....C.....TC...TGT.....A...			200	
FLA-DRB1	201	GGCTTCGACAGCGAAGTGGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGGGCGCCTGCTGCCAAGTACCGGAACGAGCAGAAGGACTTCATGGAGCGGAAG			300	
FLA-DRB3	201	T.....T.....A.AC.....T.....G.....GG.C.....			300	
FLA-DRB4	201T.....A.....T.....CA.C.....A.GC.			300	
			β2 domain (exon 3)			
FLA-DRB1	301	CACGCCGAGGTGGACACCGTCTGCAGACACAACCTACGGTGTGTTTGACAGCTTCACGGTGCAGCGCGAG TTGAGCCGACAGTGACCGTGTCCCCTCGA			400	
FLA-DRB3	301CT.....C.....			400	
FLA-DRB4	301	.GGA.A.C.....CGGA.....GG..G.....			400	
			FLA-DRB_R			
FLA-DRB1	401	AGACGCAGCCCTGCAGCAC CACAACCTCCTGGTCTGCTC CGTGAATGGTTTCTATCCAGGCCACATTGAGGTCAAGTGGTTCCGGAACGGCCAGGAGGA			500	
FLA-DRB3	401			500	
FLA-DRB4	401			500	
FLA-DRB1	501	GGAGACTGGGGTCTGTCCACAGCCTGATCCGTAATGGAGACTGGACCTTCCAGACCCTGGTATGCTGGAACAGTTCTCAGAGTGGAGAGGTCTAC			600	
FLA-DRB3	501			600	
FLA-DRB4	501C.....			600	
FLA-DRB1	601	ACCTGCCACGTGGAGCATCCAAGTGCACGAGCCCTATCACCCTGGAGTGA			652	
FLA-DRB3	601C.....			652	
FLA-DRB4	601A.....			652	

Figure 2. Nucleotide alignment for FLA-DRB cDNA sequences and primer locations. Figure shows the nucleotide alignment of seven FLA-DRB genes and primer locations for genotyping of FLA-DRB genes (Table 2). The nucleotide alignments were constructed by using the 2.98 Mb genomic sequence (EU153401). 5'UTR, SP and 3'UTR indicate 5' untranslated region, signal peptide and 3' untranslated region, respectively. Locations of primers are indicated by boxes and red letters. Arrows shows direction of primers.

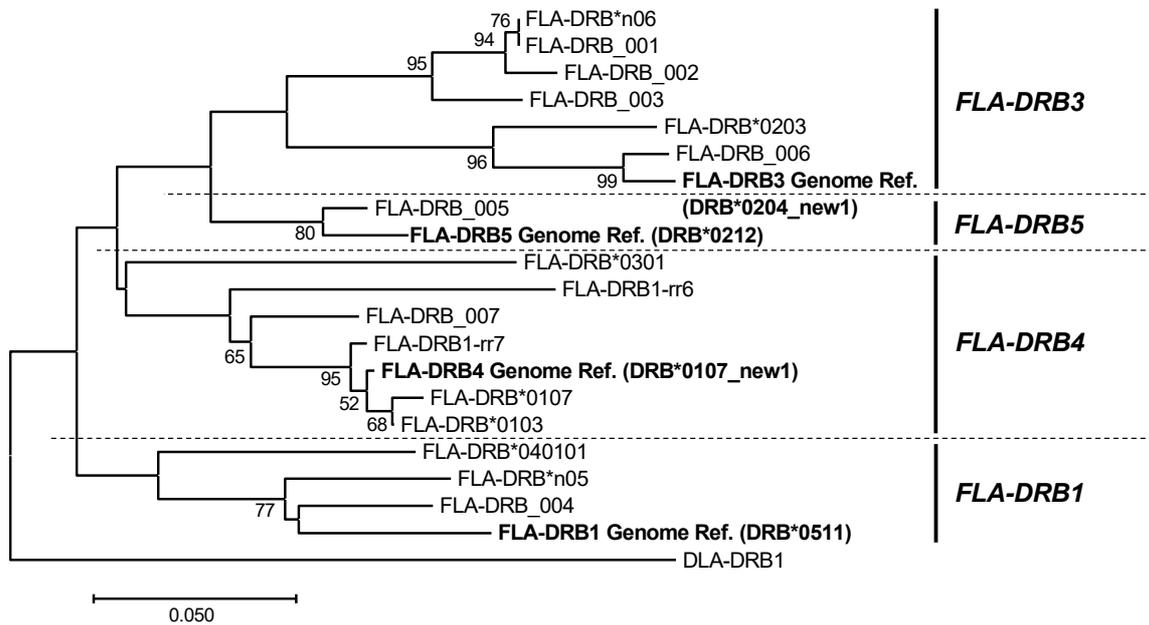


Figure 3. Amino acid sequence-based phylogenetic trees of FLA-DRB sequences by the Neighbor joining method. The trees were constructed by the neighbour-joining method. Numbers at branches indicate bootstrap values over 50. FLA-DRB tree based on 21 amino acid sequences, 16 FLA-DRB translated from nucleotide sequences that were identified in this study, five FLA-DRB reference sequences (EU153401 and U51506) (bold letters) and a DLA-DRB1 sequence (NM_001014768) that was used as an outgroup.

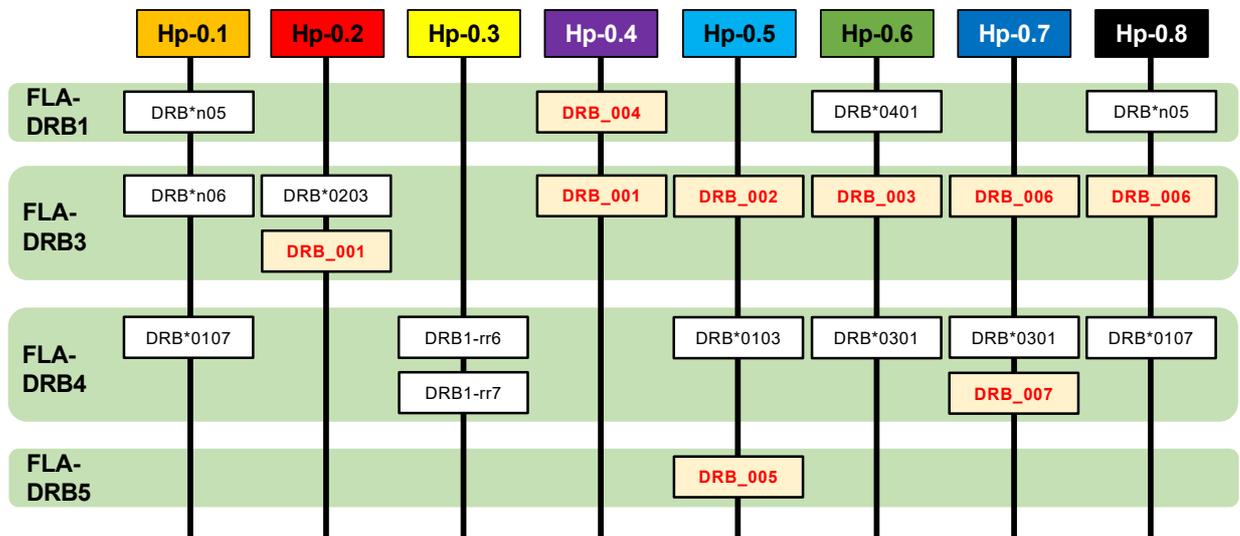
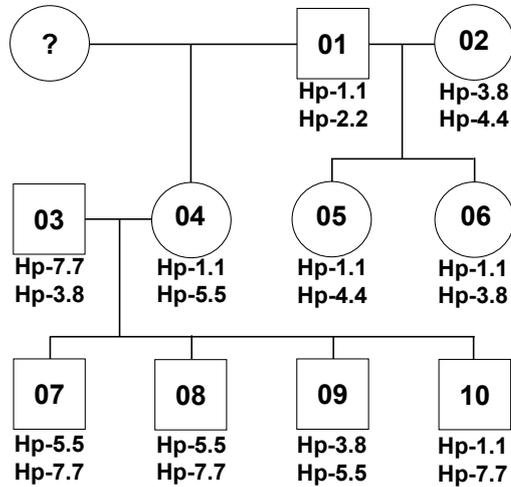


Figure 4. Haplotype structures of the FLA-DRB subregions. The haplotypes that are composed of the different types of transcribed FLA-DRB loci and alleles. The lineage of the FLA-DRB sequences were classified and inferred from the phylogenetic analyses. Novel sequences identified in this study are indicated by red letters and a yellow background.

Family 1



Family 2

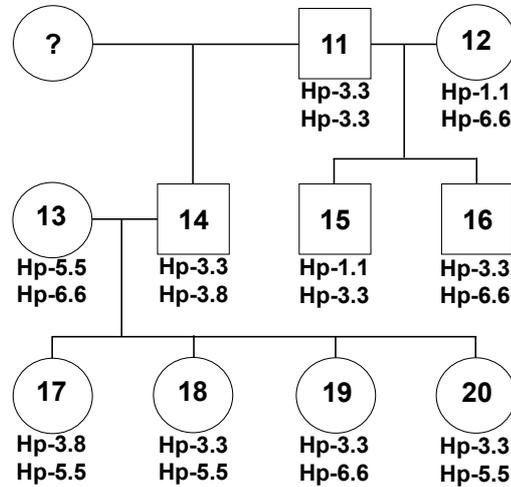


Figure 5. A summary for the inheritance of FLA haplotypes in two cat families.

The family charts with the FLA haplotype information were summarized based on the FLA haplotype structures described in **Chapter 3, Figure 5** and **Table 4**. Circles and squares indicate females and males, respectively, and numbers in the circles and squares indicate the identification number of the 20 cats. Question marks indicate individuals with unknown FLA genotypes.

第 5 章

様々な品種における FLA-DRB 遺伝子の多型解析

—ネコの品種と FLA クラスIIハプロタイプとの関連性の検討—

5.1 序論

ネコの MHC クラス II 遺伝子である FLA-DRB 遺伝子の多型解析は、現在までに 149 個体のネコに対して行われてきた(Kuwahara et al., 2000;Kuwahara et al., 2001;Kennedy et al., 2002;Kennedy et al., 2003b)。この結果、70 種類の FLA-DRB アレルが報告されている。これは、イヌの MHC クラス II 遺伝子が約 2500 頭から 200 以上のアレルが同定されていることと比較して、乏しい(EBI)。ネコの獣医臨床分野にて、アレルやハプロタイプなど FLA-DRB 遺伝子の情報は、疾患関連性の解析および移植獣医療の際のドナーとレシピエント間の組織適合性検査に必要である。第 3 章にて筆者が開発した FLA-DRB 多型解析法から、アレルやハプロタイプなど FLA-DRB 遺伝子の情報を収集することが可能となった。

第 3 章と第 4 章にて、筆者は FLA クラス I およびクラス II 遺伝子の多型解析法を開発した。どちらの多型解析もアンプリコンシーケンシングの手法（アンプリコン法）を用いたものであった。アンプリコン法は、個体毎のリードを用いてアレルを同定するため、リード数が多いほど容易に解析ができる。このため、より多くのリード数を取得し、多型解析を行うことが求められるが、NGS 装置から一度に出力される総リード数には限りがある。これまでの結果から、FLA-DRB 遺伝子と FLA クラス I 遺伝子のアレルの数を比較すると、1 個体あたり FLA-DRB アレルは 2~6 種類であり、FLA クラス I アレルの 7~14 種類と比較して少ない。つまり、個体毎のリードのうち、1 つのアレルの同定に用いることができるリード数は、FLA-DRB 遺伝子のアレルの同定のほうが FLA クラス I 遺伝子よりも多い。このことから、FLA-DRB アレルの同定は、FLA クラス I アレルと比較して容易である。加えて、FLA-DRB 遺伝子群と

FLA クラスI遺伝子群は、同一染色体上の近傍に位置していることから、連鎖する遺伝子領域と考えられる。このことから、FLA-DRB ハプロタイプから、FLA クラスIハプロタイプを推定することも容易である。

そこで本章では、アレルおよびハプロタイプなど FLA-DRB 遺伝子の情報を収集することを目的とした。また、本邦にて飼育されてきた雑種と欧米で系統が確立された洋品種ネコの比較解析を通して、FLA-DRB アレルおよびハプロタイプとネコの品種との関連性を明らかにした。

5.2 材料と方法

5.2.1 供試検体

ANMEC およびマーブル動物医療センターから供された雑種ネコおよび様々な洋品種ネコ 150 個体の全血由来 RNA (cDNA) を用いた。供試されたネコは、品種に従って雑種群と洋品種群の二つに分類した (Table 1)。具体的には、87 個体の雑種ネコ (Domestic short hair, DSH) は雑種群 (DSH group) とした。また、63 個体の洋品種ネコを洋品種群 (Purebred group) に分類した。

Table 1 に示したように、計 11 品種を洋品種群に分類した。

5.2.2 アンプリコンシーケンス法による FLA-DRB 多型解析の PCR 増幅

計 150 個体を全 4 回に分けて、マルチプレックス PCR を行った。このマルチプレックス PCR に用いたプライマーは、第 4 章と同様に、FLA-DRB 多型解析用プライマーの 5' 末端に個体識別用のバーコードを付加し、設計された。

5.2.3 PCR 増幅産物の精製および定量

PCR 産物の精製および DNA 濃度の定量は第 4 章と同様の方法で行った。

5.2.4 エマルジョン PCR、NGS のシーケンスおよびデータ処理

FLA-DRB 多型解析の emPCR、シーケンシングおよびデータ処理は第 4 章と同様の方法を用いて行った。NGS から出力されたリードデータは、個体毎に fastq ファイルに分類された。

5.2.5 リード選別およびトリミング

個体毎の fastq ファイルからのリード選別およびトリミングは第 4 章と同様の方法を用いた。

5.2.6 新規 FLA-DRB アレルの同定

選別およびトリミング後のリードを用いた新規 FLA-DRB アレルの同定は、第 4 章と同様の方法を用いた。

5.2.7 配列の相同性検索と分子系統解析による FLA-DRB アレルの分類

塩基配列および推定アミノ酸配列の相同性検索および分子系統解析は、第 4 章と同様の方法を用いた。

5.2.8 マッピング解析による各個体の FLA-DRB アレルの同定

マッピング解析は第 4 章と同様の方法で行い、各個体の FLA-DRB アレルを同定した。

5.2.9 FLA-DRB ハプロタイプの推定

同定された各個体の FLA-DRB アレルの組み合わせに基づいて、FLA-DRB ハプロタイプの推定を行った。具体的には、**Figure 1** に示すように、ある特定のハプロタイプ (Hp-A) のホモ接合体 (Cat-1) のアレルの組み合わせと同一のアレルの組み合わせが、他の個体 (Cat-2 および-4) にて認められる。Cat-2 および-4 に認められるアレルのうち Hp-A 以外のアレルの組み合わせは、他のハプロタイプ (Cat-2 の Hp-B および Cat-4 の Hp-C) と推定される。このよ

うに、2 個体以上に認められる共通のアレルの組み合わせに基づいて、FLA-DRB ハプロタイプを推定した。加えて、第 4 章で認められた FLA-DRB ハプロタイプも参照し、各個体のハプロタイプを推定した。

5.2.10 新規 FLA-DRB アレルおよびハプロタイプの命名方法

多型解析において同定された新規 FLA-DRB アレルは、系統樹の分類、アミノ酸および塩基配列に従って命名した。具体的には、アレル名のうちアンダーバー (_) よりも前には、系統樹から分類した DRB の系統名を示した。例えば、DRB5 系統に分類された DRB5_00101 アレルでは、“DRB5”を表記した。また、アンダーバー (_) より後ろの 5 桁の数字のうち、前半 3 桁はアミノ酸配列の違いに基づいて通し番号を付した。また、同一アミノ酸に翻訳されるが、異なる塩基配列（同義置換）のアレルが認められた場合、後半 2 桁は塩基配列の違いに基づいて通し番号を付した。加えて、推定された FLA-DRB ハプロタイプは、第 4 章の命名法に従って、一時的な通し番号を付した。

5.3 結果

5.3.1 150 個体から同定された FLA-DRB アレルの分子系統解析

150 個体から、計 43 種類の FLA-DRB アレルが同定された。これら計 43 種類のアレルの相同性検索の結果、35 種類は既知のアレルであったが、16 種類は新規のアレルであった (**Figure 2**)。この新規の FLA-DRB アレルは **Figure 2** 内の赤文字で示す。

これら計 43 種類のアレルを、系統樹に基づいて分類した。作成した系統樹から、大きく 7 つの系統 (*FLA-DRB5* 系統, *DRB6* 系統, *DRB4* 系統, *DRB7* 系統, *DRB8* 系統, *DRB1* 系統および *DRB3* 系統) が認められた。このうち、4 つの系統は、第 4 章で分類した 4 つの系統 (*FLA-DRB5* 系統, *DRB4* 系統, *DRB1* 系統および *DRB3* 系統) と同一であった。しかしながら、3 つの系統 (*FLA-DRB6* 系統, *DRB7* 系統および, *DRB8* 系統) は、第 4 章では認められなかった新たな系統であった。この新たな 3 つの系統には、**Figure 2** 内の下線を付す。

これら 7 つの系統に基づいて、計 43 種類の FLA-DRB アレルを分類した。具体的には、*DRB5* 系統に 8 種類 (*DRB5_00101*, *DRB5_00102*, *DRB5_00201*, *DRB5_00301*, *DRB5_00401*, *DRB5_00501*, *DRB5_00601* および *DRB5_00701*) のアレルを分類した。同様に、*DRB6* 系統に 5 種類、*DRB4* 系統に 8 種類、*DRB7* 系統に 3 種類、*DRB8* 系統に 3 種類、*DRB1* 系統に 6 種類および *DRB3* 系統に 10 種類を分類した。

各 FLA-DRB 系統に分類された 43 種類のアレルのうち、*DRB5_00101* と *DRB5_00102* は、異なる塩基配列であったが、相同なアミノ酸配列に翻訳されたことから同義置換のアレルであった。同様に、*DRB6_01901* と *DRB6_01902* および *DRB1_02601* と *DRB1_02602* も同義置換のアレルであっ

た。以上のことから、150 個体から同定されたアミノ酸配列は計 40 種類であった。このため、以降のアレルの同定およびハプロタイプの推定は、計 40 種類の FLA-DRB アレルとして解析を行った。

5.3.2 同定された FLA-DRB アレルの頻度

計 40 種類のアレル毎の出現頻度は、アレルによって異なっていた (Table 2)。具体的には、DRB5_001 は、雑種群で 19 個体に、洋品種群で 16 個体に、計 35 個体に同定されたアレルであった。このように、40 種類のアレルの出現頻度は 1~80 個体であり、アレル毎に様々であった。このうち、最も出現頻度が高いアレル (主要アレル) は DRB4_019 であり、150 個体中 80 個体 (53.3%) に認められた。その一方で、最も出現頻度が低いアレルは DRB6_010 および DRB1_030 の 2 種類であり、わずか 1 個体から同定された。

また、雑種群と洋品種群の間で、出現頻度が大きく異なるアレルも認められた。特に、DRB5_003 は、雑種群の 21 個体に認められ、洋品種群の 1 個体と比較して出現頻度が高かった。その一方で、DRB8_024 は、洋品種群の 24 個体に認められ、雑種群の 7 個体と比較して出現頻度が高かった。

5.3.3 推定された FLA-DRB ハプロタイプ毎の比較

各個体に同定されたアレルの組み合わせに基づいて FLA-DRB ハプロタイプの推定を行った。このハプロタイプ推定では、少なくとも 2 個体に認められたアレルの組み合わせをハプロタイプとした。この結果、150 個体中 139 個体から計 41 種類の FLA-DRB ハプロタイプが推定された。残る 11 個体は、他の個体と共通したアレルの組み合わせが認められず、ハプロタイプの推定がで

きなかった。このことから、以降の解析は、139 個体の計 41 種類の FLA-DRB ハプロタイプを用いた。

推定された計 41 種類から、ハプロタイプに含まれるアレルと、アレルが分類された系統を **Table 3** に示した。例えば、Hp-0.1 は、*DRB5* 系統の 001 アレル、*DRB4* 系統の 019 アレルおよび *DRB1* 系統の 027 アレルの計 3 種類のアレルが含まれていた。同様に、各 41 種類のハプロタイプには、様々な種類のアレルが含まれていた。これら 41 種類のうち、11 種類のハプロタイプには、主要アレルの *DRB4_019* が含まれていた (**Table 3** にて下線を付したハプロタイプ)。

これら 41 種類のうち、第 3 章と同一のハプロタイプ (既知ハプロタイプ) は、7 種類 (Hp-0.1, Hp-0.2, Hp-0.3, Hp-0.4, Hp-0.5, Hp-0.7 および Hp-0.8) 認められた (**Table 3** にてハプロタイプ名を赤文字で示した)。その一方で、第 3 章の Hp-0.6 と同一のハプロタイプは、本章では認められなかった。以上のことから、計 41 種類のうち 34 種類は新規ハプロタイプであった。これら新規ハプロタイプの名前は、本章で認められたものとして 2 桁番号の 11 番から始まる通し番号を付した (Hp-0.11~Hp-0.44)。

これら 41 種類のハプロタイプを比較すると、ハプロタイプに含まれるアレルの数に違いが認められた。具体的には、ハプロタイプに含まれるアレルの数が 4 個であるハプロタイプは、Hp-0.18 の 1 種類であった。また、3 個であるハプロタイプは 18 種類、2 個であるハプロタイプは 22 種類であった。このことから、FLA-DRB ハプロタイプのコピー数多型が認められた。

5.3.4 雑種群と洋品種群間の FLA-DRB ハプロタイプ出現頻度の比較

計 41 種類のハプロタイプの出現頻度は、ハプロタイプが推定できた計 139 個体中 2～23 個体と大きな差が認められた (**Table 4**)。このうち、最も出現頻度が高いハプロタイプは、**Hp-0.40** であり、23 個体に認められた。その一方で、最も出現頻度が低いハプロタイプは、**Hp-0.39**, **Hp-0.30** および **Hp-0.3** であり、2 個体に認められた。また、計 41 種類のハプロタイプと品種群との関連性を検討したところ、品種群に基づいて 3 つに分類された。すなわち、雑種群に認められ、洋品種群には認められないハプロタイプが 12 種類 (**Table 4** の 1 行目から 12 行目) であった。同様に、洋品種群に特異的な 9 種類 (**Table 4** の 13 行目から 20 行目) と、両群が共有する 21 種類 (**Table 4** の 21 行目から 41 行目) に分類された。このように、ハプロタイプは品種に基づいて雑種特異的、洋品種特異的または両群共有の 3 つのグループに分類された。

5.4 考察

本章では、本邦にて飼育されてきた雑種ネコと欧米で系統維持されてきた洋品種ネコの計 150 個体の FLA-DRB 多型解析を行った。その結果、同定された 43 種類の FLA-DRB アレルのうち新規アレルは 16 種類であった。この同定されたアレルのうち新規アレルが占める割合が 39.0%と高率であった。本章で用いたサンプルは、すべて神奈川県内の動物病院に来院したネコから採取されたものである。このため、様々な都道府県や異なる国で飼育されているネコを今後の実験の対象とすることで、さらに多くの FLA-DRB アレルが収集されると考えられる。

また本章にて、主要アレルの DRB4_019 は、150 個体から 53.3%と高率に同定され、雑種群と洋品種群のどちらのグループにおいても認められた。また、DRB4_019 アレルは、最も多くのハプロタイプ間で共有されていた。これらのことから、DRB4_019 は品種形成の過程で保存された祖先 FLA-DRB アレルであると考えられた。

ヒトにおいて、HLA 遺伝子群は、アジア、ヨーロッパおよびアフリカなど様々な地域にて多型解析が行われており、極めて多型に富むことから遺伝的な指標となる。このことから、HLA 遺伝子のアレルおよびハプロタイプは、人類集団の比較解析に用いられた。この結果、HLA アレルやハプロタイプの分布は、東北アジア集団、東南アジア集団およびインド人など地域差・集団差が認められた(Tokunaga et al., 2001)。さらに、この HLA アレルやハプロタイプの違いに基づいた集団遺伝学的解析から、日本人の成立過程が推定された(徳永勝士, 2014)。本章から、雑種群や洋品種群に特異的な FLA ハプロタイプが推定された。これより、日本に土着している雑種ネコと欧米で系統維持されてきた洋

品種ネコとの間に遺伝的な隔たりが示唆された。その一方で、日本の雑種ネコと洋品種ネコが共有するハプロタイプも数多く推定された。これらの要因として二つの理由が考えられる。一つは、ネコの家畜化、世界への拡散および洋品種ネコの系統管理の歴史が浅いために、日本のネコとの遺伝的な隔たりが小さいという考えである。二つ目は、近代になって日本へ洋品種ネコが移入され、野に放たれた結果として、日本に土着しているネコと交雑したという考えである。これらを明らかにするためには、世界中の様々な地域で飼育されているネコや様々な洋品種において、より多くの個体数を用いたハプロタイプ解析が必要である。今後の様々なネコの比較解析によって、ネコの家畜化、品種の形成過程および日本に移入された過程の解明が期待される。

Table 1. Breeds and the number of cats

Breed Group	Breed	Number of cats	
Domestic Short Hair (DSH) Group	Domestic Short Hair	87	
	Scottish Fold	15	
	American Short Hair	12	
	Abyssinian and Somali	8	
	Russian Blue	8	
	Norwegian Forest	7	
	Purebred Group	Munchkin	6
	Ragdoll	3	
	American Curl	1	
	Bengal	1	
	Persian	1	
	Egyptian Mau	1	
Total		150	

Table 2. FLA-DRB alleles identified in the DSH and Purebred Groups

Phylogentic Group	Allele	Number of cats		
		DSH	Purebred	Total
DRB5	001	19	16	35
	002	2	0	2
	003	21	1	22
	004	5	13	18
	005	2	11	13
	006	2	0	2
	007	4	2	6
DRB6	008	9	3	12
	009	7	0	7
	010	0	1	1
	011	18	3	21
	012	4	5	9
DRB4	013	3	9	12
	014	3	7	10
	015	3	3	6
	016	3	8	11
	017	2	1	3
	018	14	10	24
	019	56	24	80
DRB7	020	3	3	6
	021	6	14	20
	022	10	2	12
DRB8	023	7	5	12
	024	7	24	31
	025	13	5	18

Table 2. continued

Phylogentic Group	Allele	Number of cats		
		DSH	Purebred	Total
DRB1	026	8	3	11
	027	3	0	3
	028	10	5	15
	029	4	3	7
	030	1	0	1
	031	29	15	44
DRB3	032	6	2	8
	033	7	22	29
	034	10	25	35
	035	10	22	32
	036	9	0	9
	037	7	1	8
	038	4	2	6
	039	9	5	14
	040	6	9	15

Table 3. FLA-DRB alleles estimated in haplotypes

Haplotype	FLA-DRB Phylogenic Group							Number of alleles
	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	
	5	6	4	7	8	1	3	
<u>Hp-0.1</u>	001		<u>019</u>			027		3
Hp-0.4	001					028		2
Hp-0.2	001						035	2
Hp-0.11	001	008	016					3
Hp-0.12	001	008						2
Hp-0.13	001			022				2
Hp-0.14	001				025			2
Hp-0.5	002	006	018					3
<u>Hp-0.15</u>	003		<u>019</u>					2
Hp-0.16	004				024		033	3
Hp-0.17	004				024		034	3
Hp-0.18	005		016		024		033	4
Hp-0.19	005				024		033	3
Hp-0.20	007			022				2
<u>Hp-0.21</u>		008	<u>019</u>				036	3
Hp-0.22		009	018				031	3
Hp-0.23		009					031	2
<u>Hp-0.24</u>		011	<u>019</u>				031	3
Hp-0.25		011					031	2
<u>Hp-0.26</u>		012	<u>019</u>				031	3

Table 3. continued

Haplotype	FLA-DRB Phylogenic Group							Number of alleles
	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	DRB	
	5	6	4	7	8	1	3	
Hp-0.3			013 015					2
Hp-0.27			013 018					2
<u>Hp-0.28</u>			013 018 <u>019</u>					3
Hp-0.29			014				040	2
Hp-0.30			014 016				040	3
Hp-0.7			014		020		040	3
Hp-0.31			014			025		2
Hp-0.32			015				030	2
Hp-0.33			015			023		2
Hp-0.34			018			025	037	3
<u>Hp-0.35</u>			<u>019</u>				026 039	3
Hp-0.8			<u>019</u>				027 040	3
<u>Hp-0.36</u>			<u>019</u>				031	2
<u>Hp-0.37</u>			<u>019</u>				036	2
<u>Hp-0.38</u>			<u>019</u>				039	2
Hp-0.39					020 023		032	3
Hp-0.40					021		034 035	3
Hp-0.41					022		038	2
Hp-0.42							026 039	2
Hp-0.43							027 040	2
Hp-0.44							034 035	2

Table 4. Frequency of FLA-DRB haplotypes estimated in two Breed Groups

No.	Haplotype	Number of cats		
		DSH	Purebred	Total
1	Hp-0.15	21	0	21
2	Hp-0.24	13	0	13
3	Hp-0.37	4	0	4
4	Hp-0.13	4	0	4
5	Hp-0.43	3	0	3
6	Hp-0.42	3	0	3
7	Hp-0.31	3	0	3
8	Hp-0.21	3	0	3
9	Hp-0.5	2	0	2
10	Hp-0.23	2	0	2
11	Hp-0.32	2	0	2
12	Hp-0.39	2	0	2
13	Hp-0.18	0	6	6
14	Hp-0.28	0	3	3
15	Hp-0.38	0	3	3
16	Hp-0.33	0	3	3
17	Hp-0.7	0	3	3
18	Hp-0.17	0	3	3
19	Hp-0.14	0	2	2
20	Hp-0.30	0	2	2

Table 4. continued

No.	Haplotype	Number of cats		
		DSH	Purebred	Total
21	Hp-0.40	10	13	23
22	Hp-0.16	5	12	17
23	Hp-0.44	5	10	15
24	Hp-0.35	8	2	10
25	Hp-0.25	6	2	8
26	Hp-0.26	3	5	8
27	Hp-0.34	7	1	8
28	Hp-0.29	2	4	6
29	Hp-0.36	3	5	8
30	Hp-0.19	2	4	6
31	Hp-0.1	4	1	5
32	Hp-0.11	5	1	6
33	Hp-0.12	3	2	5
34	Hp-0.8	2	3	5
35	Hp-0.22	3	1	4
36	Hp-0.2	1	3	4
37	Hp-0.41	2	2	4
38	Hp-0.27	1	2	3
39	Hp-0.20	2	1	3
40	Hp-0.4	1	2	3
41	Hp-0.3	1	1	2

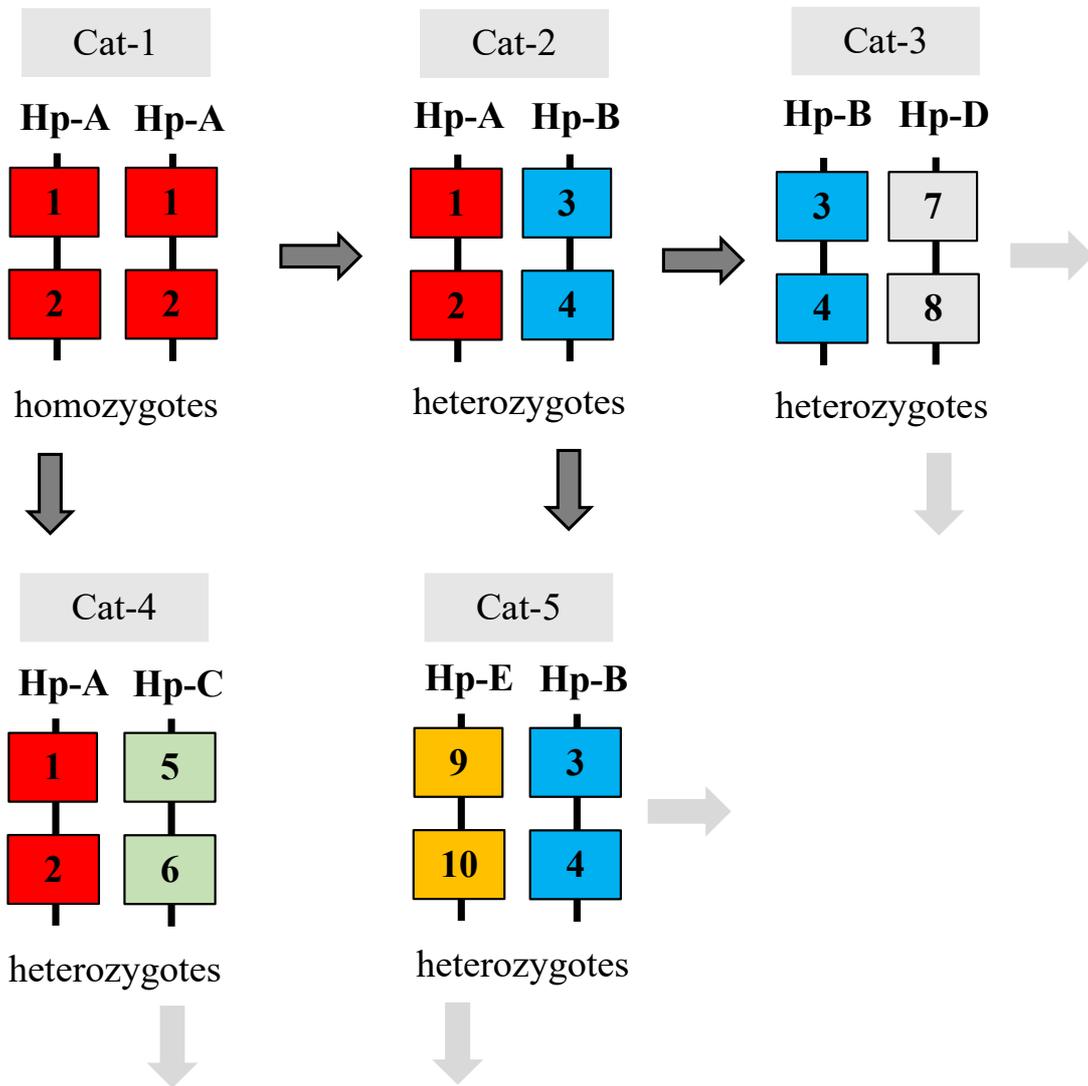


Figure 1. Introduction of methods for estimating FLA-DRB haplotype

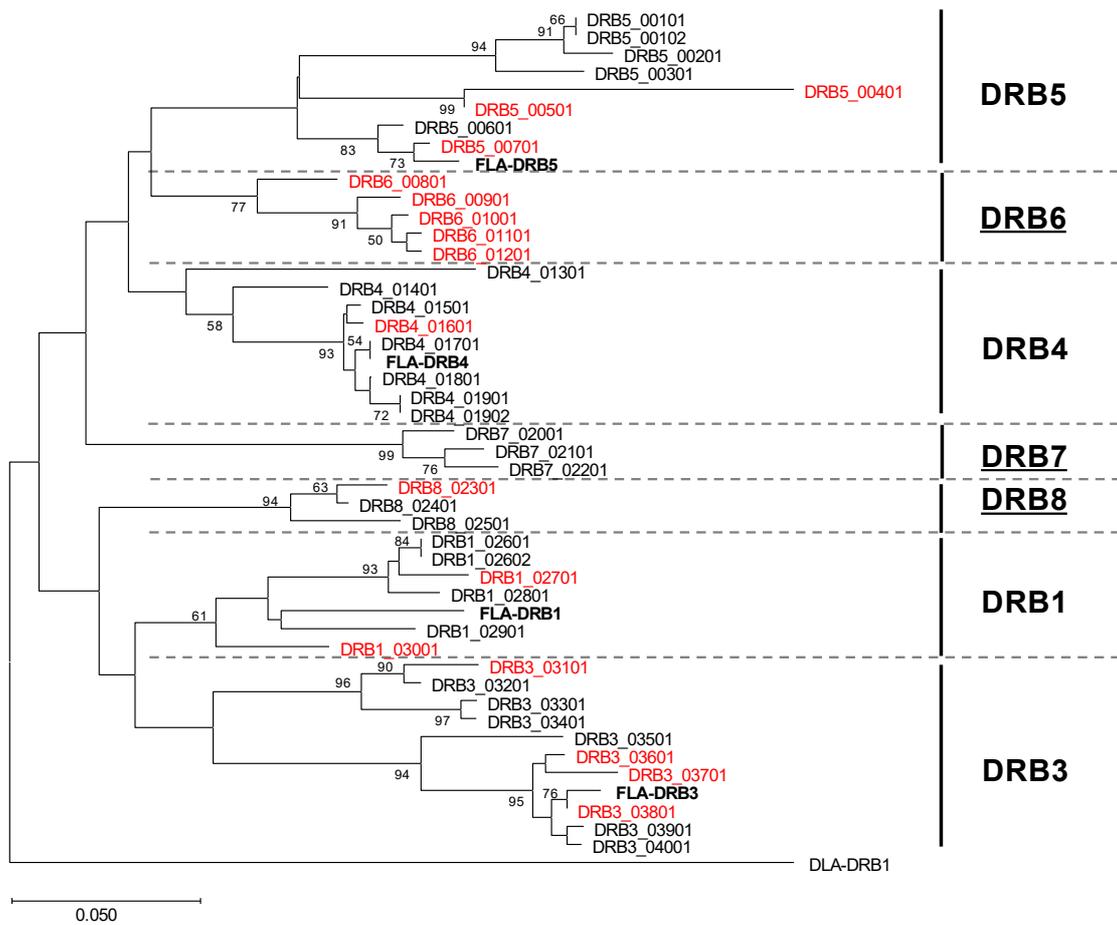


Figure 2. Amino acid sequence-based phylogenetic trees of FLA-DRB sequences by the Neighbor joining method. The trees were constructed by the neighbour-joining method. Numbers at branches indicate bootstrap values over 50. FLA-DRB tree based on 21 amino acid sequences, 43 FLA-DRB translated from nucleotide sequences that were identified in this study, five FLA-DRB reference sequences (EU153401 and U51506) (red letters) and a DLA-DRB1 sequence (NM_001014768) that was used as an outgroup.

第 6 章

総括

ネコは、主要な伴侶動物であるが、MHC 遺伝子の多型解析法は開発されていなかった。このために、ネコの MHC 遺伝子と、感染症や自己免疫疾患との関連性および移植の際の組織適合性に関する研究報告は、他の哺乳類と比較し極めて乏しかった。そこで本学位論文では、ネコの MHC 遺伝子の多型解析法の開発を研究の課題とした。そのためにまず、遺伝子発現する FLA クラス I 遺伝子を同定し、FLA クラス I およびクラス II 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。また、様々な品種のネコ 150 個体から FLA 遺伝子の多型性を解析した。これらの研究の結果、FLA クラス I およびクラス II 遺伝子の多型解析法が世界で初めて開発された。また、FLA クラス I およびクラス II 遺伝子のコピー数多型や、ネコの品種特異的なハプロタイプが認められたことから、FLA 遺伝子の多型の特徴が明らかにされた。

第 2 章 FLA クラス I 遺伝子の転写産物の同定

MHC は、細胞表面に発現される分子であり、T 細胞への抗原提示を行うことから、獲得免疫の発動に重要な役割を担っている。この MHC をコードする MHC 遺伝子は、比類なき多型を有することが知られている。この特徴から、MHC は感染症および自己免疫疾患の発症や重症化といった免疫反応の個人差に深く関わっている。また、臓器移植の際にドナーの HLA がレシピエントの T 細胞に非自己と認識され免疫拒絶が引き起こされることが知られている。ネコでは、先行研究において FLA クラス I 領域のゲノム配列が明らかになっており、19 個の FLA クラス I 遺伝子 (*FLA-A*~*FLA-S*) が同定されていた。

第 2 章では、個々の遺伝子の塩基配列解析によって、これら 19 個のうち 8 個 (*FLA-A*, *-E*, *-H*, *-J*, *-K*, *-L*, *-M* および *-O*) が機能的な遺伝子構造、すなわち遺伝子発現が期待できることをつきとめた。また、ネコ 5 個体の RNA

(cDNA) の PCR 増幅および NGS を用いた解析から、7 個の FLA クラス I 遺伝子 (*FLA-A, -E, -H, -J, -K, -L* および *-O*) の配列が同定され、ネコの MHC クラス I 遺伝子として機能することが証明された。また、ハプロタイプ毎に FLA-I 遺伝子組成が異なるコピー数多型が示唆された。

第 3 章 FLA クラス I 遺伝子の多型解析法の開発

—FLA クラス I アレルの同定およびハプロタイプ推定—

第 2 章にて、機能的な FLA クラス I 遺伝子が同定されたことから、FLA クラス I 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。血縁関係の明確な 2 家系 20 個体のネコの RNA (cDNA) の PCR 増幅および NGS を用いて解析した。PCR では、遺伝子発現が認められた 7 個すべての FLA クラス I 遺伝子の多型が集中する領域 (エキソン 2 とエキソン 3) を増幅した。また、各個体のアレルの組み合わせと、個体の血縁関係に基づいて FLA クラス I ハプロタイプを推定した。その結果、計 32 種類の FLA クラス I アレルが同定され、計 7 種類の FLA-I ハプロタイプ推定された。このアレルおよびハプロタイプは、血縁関係との矛盾がなかったことから、多型解析は正確であったと考えられた。また、計 7 種類ハプロタイプはそれぞれ 4~8 種類の FLA クラス I アレルを含んでいたことから、FLA クラス I 遺伝子のコピー数多型が認められた。

第 4 章 FLA クラス II 遺伝子の多型解析法の開発

—FLA クラス II アレルの同定およびハプロタイプ推定—

HLA-II は、3 種類 (HLA-DR, HLA-DQ および HLA-DP) に分類され、それぞれをコードする遺伝子領域は、ヒトゲノムの HLA-II 領域に同定されている。一方、ネコゲノムの FLA クラス II 領域は、HLA-DQ および DP 領域に相

当する領域が欠失しており、DR 領域のみから構成されている。ネコの DR 領域に同定された遺伝子のうち、4 個の FLA-DRB 遺伝子 (*FLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4* および *-DRB5*) は遺伝子発現が認められ、多型を有することも知られている。しかしながら、FLA-II 遺伝子の多型解析法は確立されていない。本研究では、FLA-DRB 遺伝子の多型解析法の開発を試みた。

第 4 章では、第 3 章の同 20 個体の cDNA を用い PCR 増幅後、NGS を用いて解析した。PCR では、4 個すべての FLA-DRB 遺伝子の多型が集中する領域（エキソン 2 を増幅した。また、各個体のアレルの組み合わせと、個体の血縁関係に基づいて FLA-DRB ハプロタイプを推定した。その結果、計 16 種類の FLA-DRB アレルが同定され、計 8 種類の FLA-DRB ハプロタイプ推定された。このアレルおよびハプロタイプは、血縁関係との矛盾がなかったことから、多型解析は正確であったと考えられた。また、計 8 種類ハプロタイプには、遺伝子重複、欠失および遺伝子組換えの結果、生成されたと考えられるハプロタイプも認められた。

第 5 章 様々な品種における FLA-DRB 遺伝子の多型解析

—ネコの品種と FLA クラス II ハプロタイプとの関連性の検討—

前述のように、FLA クラス II 遺伝子である FLA-DRB 遺伝子の多型情報の収集が可能となった。そこで我々は、FLA-DRB 遺伝子において、雑種および洋品種ネコ計 150 個体を対象にした多型解析を行い、FLA-DRB 多型とネコの品種との関連性を解析した。

ANMEC およびマーブル動物医療センターに来院した計 150 個体のうち、雑種ネコ 87 個体は雑種群、洋品種ネコ 63 個体は洋品種群の二つの品種群へ分類した。これらのネコの RNA (cDNA) を鋳型とし、第 4 章の FLA-DRB

遺伝子の多型解析法による FLA-DRB アレルの同定および FLA-DRB ハプロタイプの推定を行った。

150 個体から計 43 種類の FLA-DRB 配列が同定された。推定された FLA-DRB ハプロタイプは計 41 種類であり、いずれも 2~4 種類の FLA-DRB アレルから構成されていた。さらに、推定された 41 種類のハプロタイプのうち、12 種類は雑種群に、8 種類は洋品種群に特異的であったものに加え、21 種類は両群が共有するハプロタイプへ分類された。

本学位論文によって開発された多型解析法は、FLA クラス I およびクラス II 遺伝子を網羅した世界初の方法である。本研究の対象としたネコは、イヌなどとは異なる過程でヒトによって家畜化され、世界中に拡散し、近年になって品種の管理が行われ始めた伴侶動物である。その一方で、ネコは、ヒトに依存しない生活も可能であるために、様々な地域で自由に繁殖し、複数の世代を経てきた動物である。このような家畜化の過程および現在の生息状況の哺乳類は、ネコの他にはいない。このため、ネコは、動物の進化および家畜化や集団遺伝学的な研究の対象として、興味深い動物種である。本研究で解析した FLA 遺伝子およびハプロタイプには、FLA 遺伝子の重複と欠失に加えて、FLA クラス I 遺伝子のエキソン 2 内、FLA-DRB 遺伝子および FLA クラス I -DRB 領域間における DNA 組換えが認められた。これら FLA 遺伝子の多型性や FLA ハプロタイプの多様性の生成に関わるような、興味深い結果を多数認めることができた。また、日本のネコと洋品種のネコを比較した結果、2 つの集団間の遺伝的な隔たりを示すハプロタイプ頻度の違いも認められた。これら本研究の成果によって、ネコの遺伝学的研究の発展に有用な FLA 遺伝子の情報基盤が構築された。

他の哺乳類にて、MHC 遺伝子は、感染症および自己免疫疾患と関連し、移植の際の組織適合性においても重要であることが明らかとされている。今後ネコにおいても、他の哺乳類と同様に FLA 遺伝子との関連解析が行われ、ネコの臨床分野への応用が期待される。以上のことから、本研究にて開発された FLA 遺伝子の多型解析法および明らかにされた FLA 遺伝子の多型情報は、ネコの獣医学および獣医療の発展に大きく寄与すると考えられる。

謝辭

本研究を遂行するにあたり、研究室への受け入れを許可して頂き、さらには終始ご指導、ご鞭撻を賜った東海大学医学部基礎医学系分子生命科学ゲノム医科学研究室の椎名隆 教授に心より感謝申し上げます。

また、直接のご指導を賜りました現岡山理科大学獣医学部獣医学科獣医免疫学講座の宮前二郎 助教および東海大学医学部基礎医学系分子生命科学ゲノム医科学研究室の鈴木進悟 助教に心より厚く御礼申し上げます。また、研究材料の提供にご協力頂いたマーブル動物医療センターの難波信一 院長ならびに日本大学生物資源科学部獣医学科の亘敏広 教授、中山智宏 教授、枝村一弥 准教授、坂井学 教授、伊藤大介 准教授、関真美子 専任講師、丸山治彦 准教授、高橋朋子 専任講師、北川勝人 教授および山谷吉樹 教授に深く感謝いたします。加えて、日本大学生物資源科学部動物病院にて研究材料の収集にご協力頂いた富士フィルム VET システムズ株式会社日本大学動物病院検査室の井澤治彦 技師および同検査室の諸氏に深く感謝いたします。さらには、実験の補助をしてくださった魚病／比較免疫学研究室の諸氏並びに日本大学動物医科学研究センターの大学院生の皆様には深く感謝いたします。

最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

引用文献

- American Veterinary Medical Association. (2018). "U.S. Pet Ownership Statistics".
- Ballingall, K.T., Bontrop, R.E., Ellis, S.A., Grimholt, U., Hammond, J.A., Ho, C.S., Kaufman, J., Kennedy, L.J., Maccari, G., Miller, D., Robinson, J., and Marsh, S.G.E. (2018). Comparative MHC nomenclature: report from the ISAG/IUIS-VIC committee 2018. *Immunogenetics* 70, 625-632.
- Beck, T.W., Menninger, J., Voigt, G., Newmann, K., Nishigaki, Y., Nash, W.G., Stephens, R.M., Wang, Y., De Jong, P.J., O'brien, S.J., and Yuhki, N. (2001). Comparative Feline Genomics: A BAC/PAC Contig Map of the Major Histocompatibility Complex Class II Region. *Genomics* 71, 282-295.
- Budde, M.L., Wiseman, R.W., Karl, J.A., Hanczaruk, B., Simen, B.B., and O'connor, D.H. (2010). Characterization of Mauritian cynomolgus macaque major histocompatibility complex class I haplotypes by high-resolution pyrosequencing. *Immunogenetics* 62, 773-780.
- Burge, C.B., and Karlin, S. (1998). Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8, 346-354.
- Chikata, T., Murakoshi, H., Koyanagi, M., Honda, K., Gatanaga, H., Oka, S., and Takiguchi, M. (2017). Control of HIV-1 by an HLA-B*52:01-C*12:02 Protective Haplotype. *J Infect Dis* 216, 1415-1424.
- Dagher, E., Simbault, L., Abadie, J., Loussouarn, D., Campone, M., and Nguyen, F. (2020). Identification of an immune-suppressed subtype of feline triple-negative basal-like invasive mammary carcinomas, spontaneous models of breast cancer. *Tumour Biol* 42, 1010428319901052.
- Dai, S., Crawford, F., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2008). The structure of HLA-DR52c: comparison to other HLA-DRB3 alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11893-11897.
- Davies, C.J., Andersson, L., Ellis, S.A., Hensen, E.J., Lewin, H.A., Mikko, S., Muggli-Cockett, N.E., Poel, J.J.V.D., and Russell, G.C. (1997). Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics* 28, 159-168.
- Everly, M.J., and Terasaki, P.I. (2009). Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol* 70, 655-659.
- Geffrotin, C., Crechet, F., Le Roy, P., Le Chalony, C., Leplat, J.J., Iannuccelli, N., Barbosa, A., Renard, C., Gruand, J., and Milan, D. (2004). Identification of five chromosomal regions involved in predisposition to melanoma by genome-wide scan in the MeLiM swine model. *International journal of cancer* 110, 39-50.

- Gorman, N.T., and Werner, L.L. (1986). Immune-mediated diseases of the dog and cat. I. Basic concepts and the systemic immune-mediated diseases. *British Veterinary Journal* 142, 395-402.
- Greer, K.A., Wong, A.K., Liu, H., Famula, T.R., Pedersen, N.C., Ruhe, A., Wallace, M., and Neff, M.W. (2010). Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 76, 110-118.
- Harley, R., Gruffydd-Jones, T.J., and Day, M.J. (2011). Immunohistochemical characterization of oral mucosal lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *Journal of comparative pathology* 144, 239-250.
- Herdegen, M., Babik, W., and Radwan, J. (2014). Selective pressures on MHC class II genes in the guppy (*Poecilia reticulata*) as inferred by hierarchical analysis of population structure. *Journal of evolutionary biology* 27, 2347-2359.
- Ho, C.S., Lunney, J.K., Ando, A., Rogel-Gaillard, C., Lee, J.H., Schook, L.B., and Smith, D.M. (2009). Nomenclature for factors of the SLA system, update 2008. *Tissue Antigens* 73, 307-315.
- Holmes, J.C., Holmer, S.G., Ross, P., Buntzman, A.S., Frelinger, J.A., and Hess, P.R. (2013). Polymorphisms and tissue expression of the feline leukocyte antigen class I loci FLAI-E, FLAI-H, and FLAI-K. *Immunogenetics* 65, 675-689.
- The European Pet Food Industry. (2017). "European Facts & Figures 2017". European Bioinformatics Institute. *Immuno Polymorphism Database* [Online]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/>.
- Kennedy, L.J., Angles, J.M., Barnes, A., Carter, S.D., Francino, O., Gerlach, J.A., Happ, G.M., Ollier, W.E.R., Thomson, W., and Wagner, J.L. (2001). Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *HLA* 58, 55-70.
- Kennedy, L.J., Ryvar, R., Brown, J.J., Ollier, W.E., and Radford, A.D. (2003a). Resolution of complex feline leukocyte antigen DRB loci by reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). *Tissue Antigens* 62, 313-323.
- Kennedy, L.J., Ryvar, R., Brown, J.J., Ollier, W.E.R., and Radford, A.D. (2003b). Resolution of complex feline leukocyte antigen DRB loci by reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). *Tissue Antigens* 62, 313-323.
- Kennedy, L.J., Ryvar, R., Gaskell, R.M., Addie, D.D., Willoughby, K., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W.E., and Radford, A.D. (2002). Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom. *Immunogenetics* 54, 348-352.

- Kita, Y.F., Ando, A., Tanaka, K., Suzuki, S., Ozaki, Y., Uenishi, H., Inoko, H., Kulski, J.K., and Shiina, T. (2012). Application of high-resolution, massively parallel pyrosequencing for estimation of haplotypes and gene expression levels of swine leukocyte antigen (SLA) class I genes. *Immunogenetics* 64, 187-199.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Kuwahara, Y., Kitoh, K., Kobayashi, R., Iwata, J., Ohne, R., Hosokawa-Kanai, T., Matsumoto, Y., Kitagawa, H., and Sasaki, Y. (2000). Genotyping of feline MHC (FLA) class II DRB by PCR-RFLP method using group-specific primers. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1283-1289.
- Kuwahara, Y., Kitoh, K., Kobayashi, R., Iwata, J., Ohne, R., Kitagawa, H., and Sasaki, Y. (2001). Effects of genotype matching of feline major histocompatibility complex (FLA) class II DRB on skin-allograft transplantation in cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 63, 1097-1101.
- Lewin, H.A., Wu, M.-C., Stewart, J.A., and Nolan, T.J. (1988). Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics* 27, 338-344.
- Liang, R., Sun, Y., Liu, Y., Wang, J., Wu, Y., Li, Z., Ma, L., Zhang, N., Zhang, L., Wei, X., Qu, Z., Zhang, N., and Xia, C. (2018). Major Histocompatibility Complex Class I (FLA-E*01801) Molecular Structure in Domestic Cats Demonstrates Species-Specific Characteristics in Presenting Viral Antigen Peptides. *Journal of virology* 92, e01631-01617.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., 3rd, Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., Dejong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., Decaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T.,

- Daza, R., Decktor, K., Degray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., Fitzgerald, M., et al. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819.
- Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y., and Mikami, T. (2003). Seroprevalence of Bartonella henselae, Toxoplasma gondii, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology and immunology* 47, 147-153.
- Mishina, M., Watanabe, T., Maeda, H., Fujii, K., Wakao, Y., Takahashi, M., and Ejima, H. (1996). Renal transplantation in cats with chronic renal failure. *J Vet Med Sci* 58, 655-658.
- Miyamae, J., Suzuki, S., Katakura, F., Uno, S., Tanaka, M., Okano, M., Matsumoto, T., Kulski, J.K., Moritomo, T., and Shiina, T. (2018). Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64. *Immunogenetics* 70, 237-255.
- Miyamae, J., Yagi, H., Sato, K., Okano, M., Nishiya, K., Katakura, F., Sakai, M., Nakayama, T., Moritomo, T., and Shiina, T. (2019). Evaluation of alloreactive T cells based on the degree of MHC incompatibility using flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay in dogs. *Immunogenetics*.
- Miyasaka, T., Takeshima, S.N., Jimba, M., Matsumoto, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Sentsui, H., and Aida, Y. (2013). Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* 81, 72-82.
- Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., Jones, M.C., Horton, R., Hunt, S.E., Scott, C.E., Gilbert, J.G.R., Clamp, M.E., Bethel, G., Milne, S., Ainscough, R., Almeida, J.P., Ambrose, K.D., Andrews, T.D., Ashwell, R.I.S., Babbage, A.K., Bagguley, C.L., Bailey, J., Banerjee, R., Barker, D.J., Barlow, K.F., Bates, K., Beare, D.M., Beasley, H., Beasley, O., Bird, C.P., Blakey, S., Bray-Allen, S., Brook, J., Brown, A.J., Brown, J.Y., Burford, D.C., Burrill, W., Burton, J., Carder, C., Carter, N.P., Chapman, J.C., Clark, S.Y., Clark, G., Clee, C.M., Clegg, S., Cobley, V., Collier, R.E., Collins, J.E., Colman, L.K., Corby, N.R., Coville, G.J., Culley, K.M., Dhimi, P., Davies, J., Dunn, M., Earthrowl, M.E., Ellington, A.E., Evans, K.A., Faulkner, L., Francis, M.D., Frankish, A., Frankland, J., French, L., Garner, P., Garnett, J., Ghorri, M.J.R., Gilby, L.M., Gillson, C.J., Glithero, R.J., Grafham, D.V., Grant,

- M., Gribble, S., Griffiths, C., Griffiths, M., Hall, R., Halls, K.S., Hammond, S., Harley, J.L., Hart, E.A., Heath, P.D., Heathcott, R., Holmes, S.J., Howden, P.J., Howe, K.L., Howell, G.R., Huckle, E., Humphray, S.J., Humphries, M.D., Hunt, A.R., Johnson, C.M., Joy, A.A., Kay, M., Keenan, S.J., Kimberley, A.M., King, A., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leongamornlert, D.A., Leversha, M., et al. (2003). The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425, 805 - 811.
- Nakamura, T., Shirouzu, T., Nakata, K., Yoshimura, N., and Ushigome, H. (2019). The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage. *Int J Mol Sci* 20.
- Nei, M., Gu, X., and Sitnikova, T. (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 7799–7806.
- O'brien, S.J., Troyer, J.L., Roelke, M., Marker, L., and Pecon-Slattery, J. (2006). Plagues and adaptation: Lessons from the Felidae models for SARS and AIDS. *Biological Conservation* 131, 255-267.
- Oka, S., Furukawa, H., Kawasaki, A., Shimada, K., Sugii, S., Hashimoto, A., Komiya, A., Fukui, N., Ito, S., Nakamura, T., Saisho, K., Katayama, M., Tsunoda, S., Sano, H., Migita, K., Suda, A., Nagaoka, S., Tsuchiya, N., and Tohma, S. (2014). Protective effect of the HLA-DRB1*13:02 allele in Japanese rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* 9, e99453.
- Ollier, W.E., Kennedy, L.J., Thomson, W., Barnes, A.N., Bell, S.C., Bennett, D., Angles, J.M., Innes, J.F., and Carter, S.D. (2001). Dog MHC alleles containing the human RA shared epitope confer susceptibility to canine rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 53, 669-673.
- Olmsted, R.A., Langley, R., Roelke, M.E., Goeken, R.M., Adger-Johnson, D., Goff, J.P., Albert, J.P., Packer, C., Laurenson, M.K., Caro, T.M., and Et Al. (1992). Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virol* 66, 6008-6018.
- Ozaki, Y., Suzuki, S., Kashiwase, K., Shigenari, A., Okudaira, Y., Ito, S., Masuya, A., Azuma, F., Yabe, T., Morishima, S., Mitsunaga, S., Satake, M., Ota, M., Morishima, Y., Kulski, J.K., Saito, K., Inoko, H., and Shiina, T. (2015). Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics* 16, 318.

- Paulin, M.V., Couronne, L., Beguin, J., Le Poder, S., Delverdier, M., Semin, M.O., Bruneau, J., Cerf-Bensussan, N., Malamut, G., Cellier, C., Benchekroun, G., Tiret, L., German, A.J., Hermine, O., and Freiche, V. (2018). Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC Vet Res* 14, 306.
- Pedersen, N., Liu, H., Millon, L., and Greer, K. (2011). Dog leukocyte antigen class II-associated genetic risk testing for immune disorders of dogs: simplified approaches using Pug dog necrotizing meningoencephalitis as a model. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 68–76.
- Peiravan, A., Allenspach, K., Boag, A.M., Soutter, F., Holder, A., Catchpole, B., Kennedy, L.J., Werling, D., and Procoli, F. (2016). Single nucleotide polymorphisms in major histocompatibility class II haplotypes are associated with potential resistance to inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 182, 101-105.
- Radwan, J., Zagalska-Neubauer, M., Cichon, M., Sendekca, J., Kulma, K., Gustafsson, L., and Babik, W. (2012). MHC diversity, malaria and lifetime reproductive success in collared flycatchers. *Molecular ecology* 21, 2469-2479.
- Sato, K., Miyamae, J., Sakai, M., Okano, M., Katakura, F., Shibuya, H., Nakayama, T., and Moritomo, T. (2020). The utility of DLA typing for transplantation medicine in canine models. *The Journal of Veterinary Medical Science* 20-0142.
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.
- Sebastian, A., Herdegen, M., Migalska, M., and Radwan, J. (2016). AMPLISAS: a web server for multilocus genotyping using next-generation amplicon sequencing data. *Mol Ecol Resour* 16, 498-510.
- Shiina, and Blancher (2019). The Cynomolgus Macaque MHC Polymorphism in Experimental Medicine. *Cells* 8.
- Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., and Kulski, J.K. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54, 15-39.
- Shiina, T., Inoko, H., and Kulski, J.K. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 64, 631-649.
- Shiina, T., Yamada, Y., Aarnink, A., Suzuki, S., Masuya, A., Ito, S., Ido, D., Yamanaka, H., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Ishigaki, H., Itoh, Y., Ogasawara, K., Kulski, J.K., and Blancher, A. (2015). Discovery of novel MHC-class I alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing: Mafa-class I polymorphism. *Immunogenetics* 67, 563-578.

- Smith, D.M., Lunney, J.K., Ho, C.S., Martens, G.W., Ando, A., Lee, J.H., Schook, L., Renard, C., and Chardon, P. (2005). Nomenclature for factors of the swine leukocyte antigen class II system, 2005. *Tissue Antigens* 66, 623-639.
- Tokunaga, K., Ohashi, J., Bannai, M., and Juji, T. (2001). Genetic link between Asians and native Americans: evidence from HLA genes and haplotypes. *Human Immunology* 62, 1001-1008.
- Wiseman, R.W., Karl, J.A., Bimber, B.N., O'leary, C.E., Lank, S.M., Tuscher, J.J., Detmer, A.M., Bouffard, P., Levenkova, N., Turcotte, C.L., Szekeres, E., Jr., Wright, C., Harkins, T., and O'connor, D.H. (2009). Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing. *Nat Med* 15, 1322-1326.
- Yuhki, N., Beck, T., Stephens, R.M., Nishigaki, Y., Newmann, K., and O'brien, S.J. (2003). Comparative Genome Organization of Human, Murine, and Feline MHC Class II Region. *Genome research* 13, 1169-1179.
- Yuhki, N., Mullikin, J.C., Beck, T., Stephens, R., and O'brien, S.J. (2008). Sequences, annotation and single nucleotide polymorphism of the major histocompatibility complex in the domestic cat. *PLOS ONE* 3, e2674.
- Yuhki, N., and O'brien, S.J. (1997). Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. *The Journal of Immunology* 158, 2822-2833.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunology Today* 18, 14 - 17.
- 一般社団法人ペットフード協会 (2019). 2019年(令和元年)全国犬猫飼育実態調査結果 [Online]. Available: <https://petfood.or.jp/topics/img/191223.pdf>.
- 黒木喜美子, 喜多俊介, および 前仲勝実 (2016). HLA の立体構造と免疫制御受容体の分子認識機構. *日本組織適合性学会誌* 23, 80-95.
- 湯沢賢治 (2014). 腎移植の現況と組織適合性検査のかかわり. *日本組織適合性学会誌*.
- 徳永勝士 (2014). HLA 遺伝子群の多型データの活用. *日本組織適合性学会誌* 21, 87-95.