

# 〔最新情報：“玉手箱”〕 新アレルがみつかったら

柏瀬 貢一

日本赤十字社中央血液センター，研究部

WHO命名委員会は、新抗原（アレル）の受理条件として第11回国際組織適合性学会を境に塩基配列の解析を義務付けた。当時、遺伝子解析は困難であったが、DNAタイピングが組織適合性検査室に定着しつつある昨今、新アレルの塩基配列の解析はさして困難ではない。さらにIT時代を向かえ、誰もがインターネットを用いた様々な遺伝子解析ツールを簡単に扱える時代となった。そこで本稿では、塩基配列の解析手順やインターネットを用いたDNAデータベースの登録方法、WHO命名委員会の申請の流れに沿って紹介する。また、最近日本人に検出された新アレルについても紹介する。

## キーワード

新アレル，WHO HLA Nomenclature Committee，DNAデータベース，ダイレクトシーケンス

## 1. 塩基配列の解析

### 1.1. WHO HLA Nomenclature Committee（以下WHO命名委員会）

WHO命名委員会より遺伝子解析に関する新アレルの受理条件は以下の通りである。なお、詳細なガイドラインは以下のWebサイトに記載されているので参照されたい（[http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/subs/sub\\_guide.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/subs/sub_guide.html)）。

要約すると

#### ①材料および方法

- ・cDNAからシーケンス
- ・PCR産物をサブクローニング後、複数のクローンからシーケンス
- ・PCR産物から直接シーケンスを行う場合、少なくとも2つの独立したPCR反応産物をシーケンス

これらをForward，Reverseの両方向行う。

#### ②新しいシーケンスの確認

新アレルに新しいシーケンス（報告されているアレルにないユニークな配列）が存在する場合、PCR-SSOP法やPCR-SSP法のDNAタイピング法で確認する。

#### ③全長のシーケンスが望ましいが、最低限度として、HLAクラスI遺伝子は第2，3エクソン，HLAクラスII遺伝子は第2エクソンを行う必要がある。

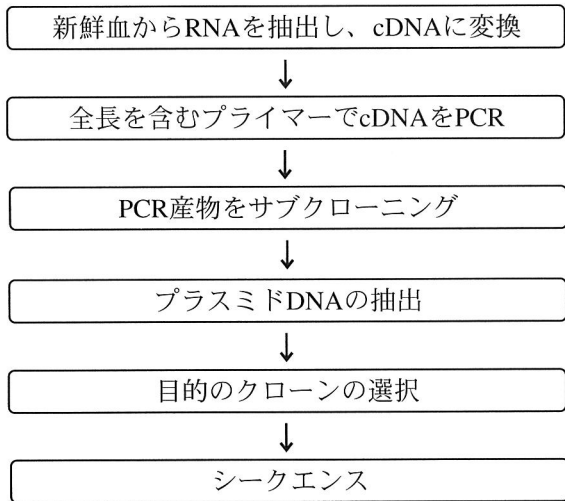
#### ④DNAデータベースに登録する。

### 1.2. 塩基配列の解析手順

従来、新アレルの塩基配列は一般的に以下の手順で解析された。

筆者連絡先 〒150-0012 渋谷区広尾4-1-31  
日本赤十字社中央血液センター研究部  
柏瀬 貢一

電話 03-5485-6009  
ファックス 03-3406-7892  
E-mail kasiwase@cbc.jrc.or.jp



しかし、検査室で新アレルの塩基配列の解析を行う場合、いくつかの問題点がある。

- ・サブクローニングは煩雑であり、なおかつ遺伝子組み替えを行うため施設の物理的制約がある
- ・全長（約1.1kb）をシークエンスすることは現時点で意味があるか？
- ・必要な新鮮血（mRNAを抽出するために必要）を確保することは通常困難である
- ・プラスミドDNA（非常に増幅しやすい）を扱うため、コンタミネーションに細心の注意が必要である

そこで、我々はクローニングせず、材料として確保し易いgDNAを用いて塩基配列の解析が簡単に行えるよう手順を見なおした。新アレルが特異的に増幅するようなプライマーを設計することが重要なポイントである。

クラスI遺伝子とクラスII遺伝子とでは、以下の理由でプライマーの設計部位が異なる。

	解析対象エクソン	解析対象の近傍イントロン
クラスI遺伝子	第2、第3エクソン	短い、配列情報は多い
クラスII遺伝子	第2エクソン	長い、配列情報は少ない

したがって、クラスI遺伝子では、第2および第3エクソン外にプライマーの設計が容易だが、クラスII遺伝子では解析対象となる第2エクソン外に新アレル特異的なプライマーの設計が容易ではな

い。

### 1.2.1. クラスI遺伝子

#### ローカス特異的なPCR、シークエンス

市販のHLAタイピングSBTキットやCereb et al. (1) が報告しているローカス特異的な増幅でタイピングを行う。この結果、新アレルの塩基配列は推定できるが、新アレルがhomozygoteでない限りWHO命名委員会に申請する事はできない。なぜなら、頻度が低いと考えられる新アレルがhomozygoteで存在することは極めて希で、一般的には他のアレルとのheterozygoteとして存在する。その場合、塩基配列は複数個所がダブルピークとなり、新アレルと他方のアレルとではsis/transの関係が確定できない。したがって、ダイレクトシークエンスを行う場合、新アレルを特異的に増幅する必要性が生じる。

#### 新アレル特異的なプライマーでPCR

新アレルが今まで報告されているどのアレルに最も近いかを考慮し、他のアレルが増幅しないようプライマーを設計する。2つの事例を紹介する。

##### 1) B\*4801V (B\*4804) ,\*51011について

B\*4801V特異的なプライマーを設計してみよう。IMGT/HLAのWebサイト <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> にアクセスした後 “Alignments” (図1) を用いてB\*4801と

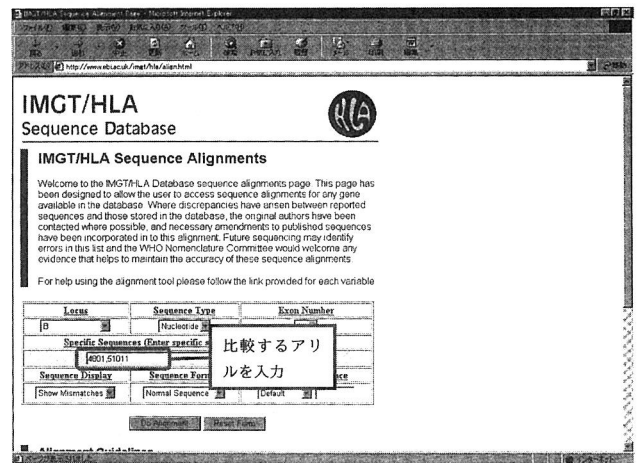


図1：IMGT/HLAによるAlignmentツール

B\*51011の塩基配列を比較し、B\*4801Vだけが増幅するようプライマーの位置を設定する。この場合、WHO命名委員会の指示に従い増幅領域には、クラスI遺伝子では少なくとも第2、3エクソン全域が含まれていることが必要である。

第1エクソンの48、49番目に連続してB\*4801とB\*51011に塩基の違いが見られる。また第5エクソンの900番目に両者の塩基の違いが見られる(図2A)。これらをプライマー

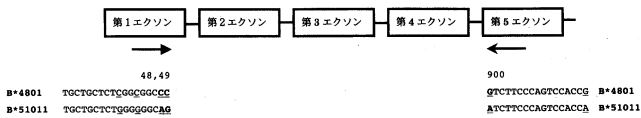


図2A: B\*4801とB\*51011との塩基配列の比較

の3'末端としそれぞれForward, Reverseのプライマーを設計する。

プライマーの設計に際し、プライマー設計支援ツール“Oligo Calculator”などを用いて正確なTm値を計算すると特異性の高いPCRが行える(<http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>)。

2) B\*4002V (B\*4029), \*3501について

B\*4002V特異的プライマーを設計してみよう。Cereb et al. (2)により第1イントロンにHLA-Bローカスを2つのグループに分けるプライマーが報告されている。それによるとB\*3501はTAグループにB\*4002はCGグループに属していることがわかる。5BIN1-CGと第3イントロンのHLA-Bローカス特異的プライマー(3BIN3-37)を組み合わせることでB\*4002Vだけを増幅することが可能である(図2B)。

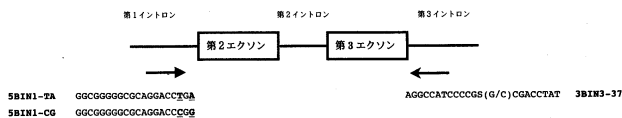


図2B: HLA-Bローカスの塩基配列解析用プライマー

PCR産物のシーケンス

cycle-sequencing反応に用いるプライマーを

表1にまとめた。

表1 cycle sequencing反応に用いたプライマー

A-locus primer	5'-3'	S/A	position
5Aint1-99	CCGCGCCKGAGGAGGGT	S	intron1
3Aint2-18	AGRGGTCTGACCTGCGCCCC	A	intron2
5Aint2-257	ACYGGGCTGACCKYGGGG	S	intron2
3Aint3-12	GGCGATCAGGKAGGCGCYGTG	A	intron3
5Aint3-599	GGAGTGTCCCATGACAGATGC	S	intron3
3Aint4-62	CAGAGAGGCTCTCTTCTCTAA	A	intron4

B-locus primer	5'-3'	position
5Bint1-99	CCGCGCCGGGAGGAGGGT	S intron1
3Bint2-18	GGGAGTCTGACCTGCGCCCC	A intron2
5Bint2-257	ACGGGGCTGACCGGGGG	S intron2
3Bint3-12	GGAGATGGGGYAGGCTCCCACT	A intron3

S: sense primer  
A: anti-sense primer  
B-locusのexon4はPE社のSBTキットのcycle sequencing試薬を用いた

シーケンサーがない場合は、塩基配列の解析を外委託することも可能である。

グループ特異的なPCR、シーケンス

1.2.2 クラスII遺伝子

現在、クラスII遺伝子はタイピングに使用しているプライマーが第2エクソン内に設定されているため、これらのプライマーにより解析された塩基配列ではWHO命名委員会の受理条件(第2エクソン全域を含める)を満たさない。したがって、新アレルが特異的に増幅するよう第2エクソン外にプライマーを設定しなければならない。2つの事例を紹介する。

1) DRB1\*1401V(DRB1\*1426),\*15について

第1イントロンのDRB特異的プライマー(GH46を一部変更)(3)イントロンのDRB1\*15が増幅しないDRB1特異的プライマー(CRX-37)(4)わせることで、DRB1\*1401Vだけが増幅される(図2C)。

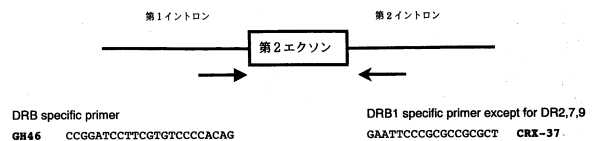


図2C: HLA-DRB1ローカスの塩基配列解析用プライマー

2) DRB1\*08032V(DRB1\*0823),\*1405について

上記1)と同じプライマーの組み合わせで、DRB1\*08032VとDRB1\*1405を増幅させSSCP法を行う。この場合、レーンの隣にDRB1\*1405のhomozygoteを同じプライマーで増幅した産物

を泳動し、他方のバンド (DRB1\*08032Vに相当) のゲルを切り出す。切り出したゲルをすり潰し、再度同じプライマーで増幅し、その産物をシークエンスすることでサブクローニングを必要とせずDRB1\*08032Vの塩基配列が可能である。

**PCR産物のシークエンス**

cycle-sequencing反応にはPCRに用いたプライマーを使用する。

**2. DNAデータベースの登録方法**

塩基配列の解析が終了後、次はDNAデータベースの登録である。国際的には下記の3箇所がCollaborationしてDNAデータベースが構築されている。

- EBI: EMBL Nucleotide Sequence Database (UK)
- NCBI: GenBank (USA)
- DDBJ: DNA Database of Japan (Japan)

我々は、DDBJを通して塩基配列を登録しているので、そこで使われている塩基配列登録システム“SAKURA”を紹介する。

下記のアドレスに接続を行う前にexon毎の塩基配列のテキストデータを準備する。DDBJのWebサイト <http://www.ddbj.nig.ac.jp/> にアクセスした後“SAKURA” (図3) のメニューバーをクリックし、それぞれの指示にしたがって登録作業を行う。

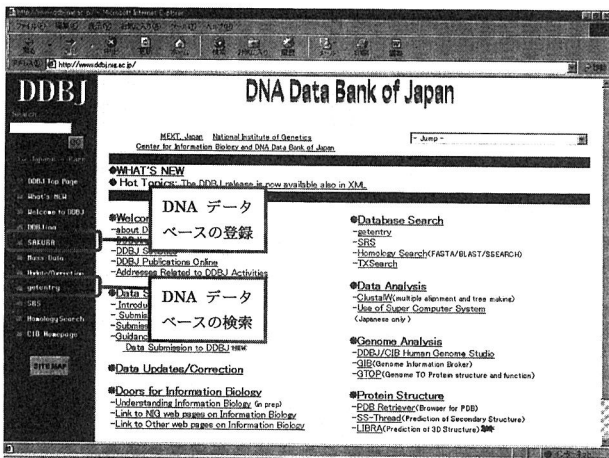


図3：DDBJのWebサイト

ここで登録上の注意点をあげておく。

クラスI遺伝子のように塩基配列の解析をexon毎に行った場合、それぞれをエントリーし、連続Accession番号を取得することが必要である。これにより個別のexonがjointされアミノ酸配列が表示される。例として3つのexonがjointされ、exon 4にアミノ酸が表示されたB\*4804についてDDBJの塩基配列検索システム“getentry” (図3) を参照されたい (AB063626 {exon2}, AB063627 {exon3}, AB063628 {exon4})。

**3. WHO命名委員会の申請方法**

DNAデータベースからAccession番号の交付後、次はWHO命名委員会の申請である。

下記のアドレスに接続を行う前に、塩基配列のテキストデータ、PCRに用いたプライマーの配列、HLAフェノタイプ情報を準備する。

IMGT/HLAのWebサイト <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> にアクセスした後“SUBMISSIONS” (図4) のメニューバーをクリックし、それぞれの指示にしたがって登録作業を行う。

**4. 日本人に検出された新抗原について**

最近我々が、日本人集団から見出したHLA-A, -B, -DRB1の新アリルについて表2にまとめた。IMGT/HLAのWebサイト“Alleles” (図4) に最新の情報がのっているので参照されたい。

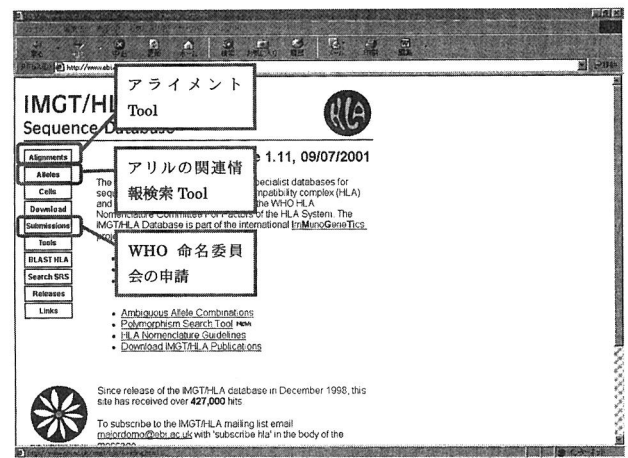


図4：IMGT/HLAのWebサイト

表2 日本人から見出した新アレル

HLA alleles	Previous equivalents	Phenotype				Accession number	References
		A	B	C	DRB1		
A*0242	A*0201V2	*0242,11	*1501,*1518	4,7	*0401,*0406	AB032594	
A*02016	A*0201V3	*02016,24	35,60	n.t	*1501,*1202	AB032595,AB048347	
A*2420	A*2402V	*2420,*3303	35,61	9	*1101,*1405	AB032596	Scheltinga SA et al. <i>Tissue Antigens</i> 55: 65-7, 2000
A*3105	A*3101V	*3105,*0207	39,46	1,7	*08,*15	AB032597	
B*1307	B*1301N	11,*2601	*1307,*1501	n.t	*0901,*1202	AB032598	
B*1546	B*1501V2	*02,*11	*1546,*1501	7,9	*02,*12	AB036049	Elsner HA et al. <i>Tissue Antigens</i> 55: 83-5, 2000 Williams TM et al. <i>Tissue Antigens</i> 55: 455-9, 2000
B*1560	B*1501V4	2,31	*1560,*1501	9	*1403,*1502	AB036050	
B*15112	B*1511V	24,26	*15112,*15111	9	*04,*15	AB036051	
B*3535	B*3501V	2,24	*3535,*0702	n.t	*0101,*1101	AB032093	
B*3923	B*3902V	24,*2601	*3923,52	n.t	*1502,*1406	AB032097	Akesaka T et al. <i>Tissue Antigens</i> 57: 169-72, 2000
		24,31	*3923,51	n.t	*0802,*1406		
		24,31	*3923,52	n.t	*1403,*1406		
B*4029	B*4002V2	24,26	*4029,*52011	10	*09,*15	AB032599	
B*4602	B*4601V	2,24	*4602,48	1	*0901,*14	AB032091	Akesaka T et al. <i>Tissue Antigens</i> 55: 460-2, 2000
B*52xxN	B*5201N	24	*5201N,*4002	10	*1501,*1502	AB030573	
B*5402	B*5401V	*2402101,*31012	*5402,*4006	1	*0405,*1201	AB032095	
B*5510	B*5501V	2,24	*5510,*4002	1,9	*1501,*1405	AB032094	
B*5605	B*5601V	2,24	*5605,*1301	10	*1201,*1403	AB030574	
DRB1*0105	DRB1*0101V	24,26	7	n.t	*0105,*0101	AB015184	
DRB1*0428	DRB1*0405V1	2,24	7,35	7,9	*0428,*0101	AB007635	
DRB1*0429	DRB1*0405V2	2,24	54,61	n.t	*0429,*0901	AB007636	
DRB1*0430	DRB1*0405V3	11,1,24	52,54	n.t	*0430,*1502	AB015185	
DRB1*0823	DRB1*08032V	24	54,*4002	n.t	*0823,*1405	AB049829	
DRB1*1205	DRB1*1201V	24	54,62	1,4	*1205,*0901	D86503	
DRB1*1329	DRB1*1302V	24,33	44,52		*1329,*02	D87822	
DRB1*1347	DRB1*1307V	2,11,1	7,48	7	*1347,*0101	AB049459	
DRB1*1426	DRB1*1401V	24,33	44,52		*1426,*15	D86502	
DRB1*1429	DRB1*1406V	24,33	44,52		*1429,*0901	D88310	
DRB1*1439	DRB1*1401V2	2,24	46,52	1	*1439,*1502	AB049831	
DRB1*1440	DRB1*1403V2	24	51,52		*1440,*1502	AB049832	
DRB1*1508	DRB1*15021V	2,24	51,52		*1508,*1403	AB007634	

\*遺伝子解析による結果

B\*5201NはNullの原因が同定されていないため、WHO命名委員会に未申請

## ■おわりに

正確な検査を行う過程でこそ新たなアレルは見つかる。これこそ“serendipity”である。この“serendipity”を有効に生かすためにも、公共のデータベースに登録することは我々の責務ではないだろうか。

本稿は、清水 まり恵（日赤中央血液センター）、野田 岳（国立佐倉病院）および明坂 珠生（東京大学医学部・人類遺伝学）各氏の協力によるものです。

## 参考文献

1. Cereb N, Kong Y, Lee S, et al.: Nucleotide sequences

of MHC class I introns 1, 2, and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates. *Tissue Antigens* 47: 498-511, 1996.

2. Cereb N, Yang SY: Dimorphic primers derived from intron 1 for use in the molecular typing of HLA-B alleles. *Tissue Antigens* 50: 74-76, 1997.3. Scharf SJ, Long CM, Erlich HA: Sequence analysis of the HLA-DR beta and HLA-DQ beta loci from three Pemphigus vulgaris patients. *Hum. Immunol.* 22: 61-69, 1988.4. Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA: Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum. Immunol.* 30: 190-201, 1991.