

一方、IFRG KO マウスのメスはすべて day 14 まで生存した。Rag2 KO マウスはオス、メスの両方で生存率が著しく低下し、day 14 までにすべてのマウスが死亡した。IFRG Rag2 double-KO マウスにおける生存率はさらに厳しく、day 5 の時点で 70% のマウスが死亡、day 7 までにすべてのマウスが死亡した。

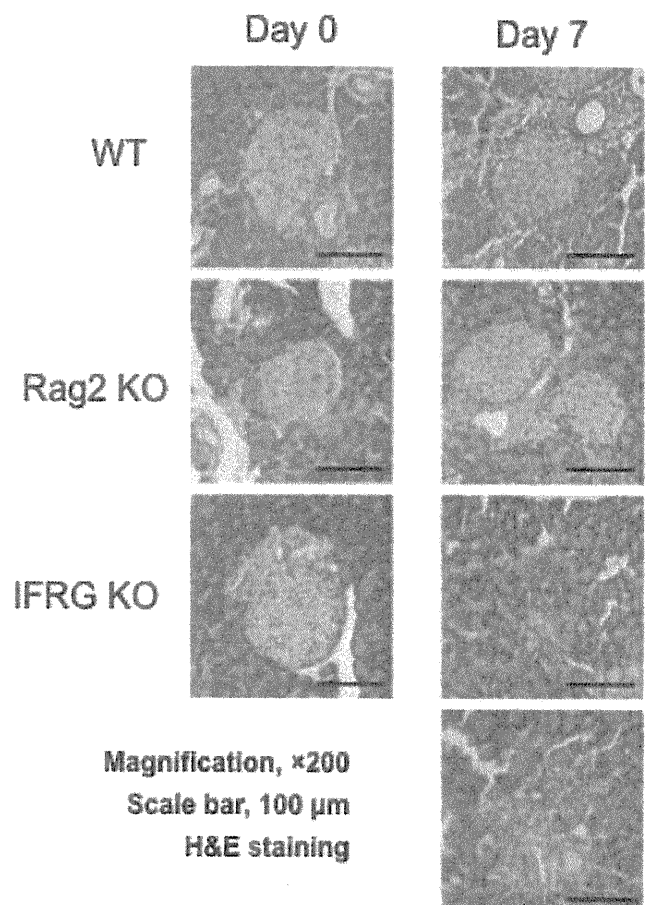
経時的血糖値について、WT マウスのオス、メスおよび IFRG KO マウスのメスでは、14 days を通して血糖値が安定しており、変化は認められなかった。IFRG KO マウスのオスは day 5 で血糖値が著しく上昇し、糖尿病を発症した。また、この高血糖状態は day 5 から day 10 まで持続し、その後 day 14 にかけて血糖値の回復が観察されたが、糖尿病判定基準である 250 mg/dl を下回るマウスは存在しなかった。Rag2 KO マウスはオス、メスともに day 7 から血糖値が低下し始め、糖尿病を発症する個体はいなかった。IFRG /Rag2 double-KO マウスの血糖値は一定の傾向を示さなかったものの、day 3 で 7 個体中 2 個体、day 5 で 7 個体中 1 個体が糖尿病を発症した (図)。

WT マウスのオス、メスおよび IFRG KO マウスのメスでは有意な体重変化は認められず、生存率、経時的血糖値と同様、EMCV 感染に対し抵抗性であることが示された。加えて、IFRG KO オスと WT オスで体重に有意差はなく、糖尿病発症と体重変化の関連は認められなかった。Rag2 KO マウスではオス、メスともに体重が著しい減少傾向を示し、マウスの明らかな衰弱が観察された。IFRG /Rag2 double-KO マウスの体重は血糖値と同様、一定の傾向を示さなかったが、マウスの衰弱が観察された。

以上の結果から、IFRG は EMCV 誘発糖尿病の感受性に関与し、さらにこの EMCV 感受性には性差があることが示された。これらの所見は、本研究室がこれまでにやってきた報告と一致している。また、Rag2 欠損マウス (Rag2 KO および IFRG /Rag2 double-KO マウス) は、リンパ球を欠如したことで獲得免疫が失われ、雌雄関係なく EMCV 感染に全身的な脆弱性を示すことが明らかとなった。

EMCV 感染マウスにおける組織病理学的検討

EMCV 感染による糖尿病発症と膵島障害の関連を明らかにするため、感染マウスにおける膵島組織病理を観察した。WT, IFRG KO および Rag2 KO マウスのオスに対し EMCV を接種し、感染前 day 0 および感染



後 day 3, 5, 7, 10 のマウスにおける膵島組織を HE 染色により評価した (図).

WT マウスでは, 周囲の外分泌腺とは明瞭に区別される楕円形の膵島が認められ, day 0 から day 10 にかけて目立った膵島障害は観察されなかった. Rag2 KO マウスは摘出した膵臓に萎縮傾向が認められたものの (data not shown); 膵島組織は WT マウスと同様, 観察期間を通して病理学的変化は起こらなかった. 他方, EMCV を感染させた IFRG KO マウスでは, day 5 から炎症性細胞の浸潤を伴う膵島の変形・崩壊・萎縮が観察され, 膵島の高度な障害を認め 7 日後にはほぼ完成した病理像を呈した (図). この所見は, IFRG KO マウスのオスが EMCV 感染後 day 5 に有意に高血糖状態を呈することと一致していた.

組織病理学的検討の結果から, IFRG KO マウスのオスでは EMCV 感染により膵島へ炎症性細胞が浸潤し, ウイルスによる直接障害に加えてこれら炎症性細胞が膵島細胞を広範囲に破壊することで糖尿病を発症したことが強く示唆された.

脾臓キメラマウスの作成

これまでの結果から, IFRG が EMCV 誘発糖尿病の感受性に深く関与していることが示された. 続いて, IFRG の役割が実質細胞または免疫担当細胞のどちらによるものかを明らかにするため, 脾臓キメラマウスを作成した. なお, 脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症はオス個体のみ検討した. 致死量 X 線照射した WT recipient および IFRG KO recipient マウスに対し, WT donor および IFRG KO donor 由来の脾細胞を養子移入した

(2.0×10^7 cells/0.2 ml PBS(-)/mouse). 移入リンパ球による獲得免疫の再構築を待って, リンパ球移入からウイルス接種までの期間を 7 days に設定した. この 7 days は, 本研究室における予備実験で検討された期間である.

最初に, WT 由来の脾細胞を有する WT recipient マウス (WT \ll WT) および IFRG KO recipient マウス (IFRG -/ \ll WT) について検討した. EMCV 接種後, WT \ll WT は day 5 で約 60%, day 7 で約 90% のマウスが死亡し, IFRG -/ \ll WT は day 5 で約 80%, day 7 ではすべてのマウスが死亡した. 加えて, WT \ll WT と IFRG -/ \ll WT の両方のマウスが Rag2 欠損マウスと同様の著しい体重減少を示し, マウスの衰弱が観察された. IFRG single-KO マウスにおける糖尿病発症が day 5 であったことを考慮すると, この条件では糖尿病発症における実質細胞および免疫担当細胞の意義は検討不可能であると考えられた.

以上の結果から, 移入後 7 days にウイルス接種を実施した場合, 移入リンパ球による獲得免疫の再構築が不十分であることが考えられた. 致死量放射線照射したマウスに同系マウスの造血細胞を静注した場合, 顆粒球や巨核球, リンパ球を含む脾コロニーは 12 日目に形成される, との報告がある. そこで, リンパ球移入後の再構築期間を 14 days に変更し, さらなる検討を試みた.

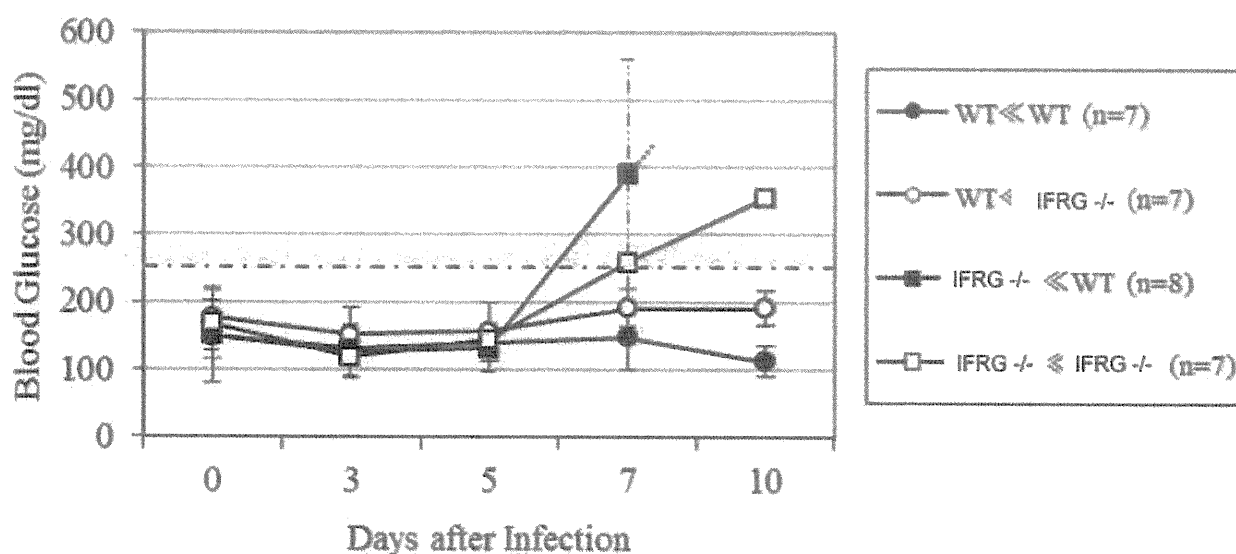
脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症

リンパ球移入からウイルス接種までの期間を 14 days とし, 再度検討を行った. WT donor 由来脾細胞を有する WT recipient

(WT \ll WT) および IFRG KO recipient (IFRG $-/-$ \ll WT) マウス, IFRG KO donor 由来脾細胞を有する WT recipient (WT \ll IFRG $-/-$) および IFRG KO recipient (IFRG $-/-$ \ll IFRG $-/-$) マウス, 以上 4 系統の脾臓キメラマウスを作成し, 糖尿病発症をモニターした (Fig. 7 and 8).

WT recipient マウスは, WT リンパ球を移入した場合 (WT \ll WT) と IFRG KO リンパ球を移入した場合 (WT \ll IFRG $-/-$) の両方で糖尿病を発症した個体はいなかった (図). 一方, IFRG KO recipient マウスでは,

/Rag2 double-KO マウスで見られたウイルス感染に対する脆弱性を補うため, リンパ球の移入実験を行った. WT マウスおよび IFRG KO マウスから採取されたリンパ球を養子移入することで, 獲得免疫の再構築が期待され, リンパ球の重要性が評価できる. Rag2 欠損マウスのオス個体に対し 1.0×10^7 cells/0.2 ml PBS(-)のリンパ球を移入し, 脾臓キメラマウス同様, 移入後 14 days でウイルス接種を行った (Fig. 9A). なお, IFRG KO リンパ球を有する IFRG /Rag2 double-KO マウス (IFRG



WT リンパ球を移入すると (IFRG $-/-$ \ll WT) day 7 で著しく血糖値が上昇し, 糖尿病を発症した (図). IFRG $-/-$ \ll IFRG $-/-$ では, 7 個体中 1 個体ではあるが, day 7 から緩やかに血糖値が上昇し始め, 糖尿病を発症した (図).

従って, 脾臓キメラマウスを用いた検討により, EMCV 誘発糖尿病の発症にはリンパ球ではなく実質細胞の IFRG 欠損が重要であることが明らかとなった.

Rag2 欠損マウスにおけるリンパ球の役割

Rag2 single-KO マウスおよび IFRG

$-/-$ Rag2 $-/-$ \ll IFRG $-/-$) は作成が間に合わず, 今回報告するに至らなかった. このマウス系統については, 今後作成次第検討したい.

Rag2 欠損マウスにリンパ球を移入すると, 明らかな生存率の改善が認められた. 何も移入していない Rag2 KO マウスの day 14 における生存率が 0%であったのに対し, WT リンパ球を移入した場合 (Rag2 $-/-$ \ll WT) は 70%, IFRG KO リンパ球を移入した場合 (Rag2 $-/-$ \ll IFRG $-/-$) でも 30%のマウスが生存した. 加えて, Rag2 $-/-$ \ll WT では体重の減少傾向が解消され, 目立ったマウスの衰弱はなかった. 経

時的血糖値は、Rag2^{-/-}≪WTでは day 0 から day 14 まで血糖値が安定していたのに対し、Rag2^{-/-}≪IFRG^{-/-}では 7 個体中 3 個体が day 10 から糖尿病を発症した (Fig. 9C and 10B). また、WT リンパ球を養子移入した IFRG /Rag2 double-KO マウス (IFRG^{-/-}Rag2^{-/-}≪WT) は、移入しない場合と比較して生存率が大幅に改善されたが、驚くべきことに、IFRG を欠損しているにも関わらず糖尿病を発症しなかった。

これらの所見から、Rag2 欠損マウスで見られたウイルス感染に対する脆弱性は、リンパ球を欠いたマウス体内で感染が全身性に広がったことに起因すると考えられた。また、IFRG KO リンパ球の移入により、一部のマウスが day 10 以降で中程度の高血糖状態を呈したことから、IFRG KO リンパ球が EMCV 誘発糖尿病の発症に部分的な役割を果たすことが示唆された。

D. 考察

本研究では、EMCV 誘発糖尿病における自然免疫および獲得免疫の意義を明らかにし、その発症メカニズムを解析することを目的として、KO マウスおよびキメラマウスを用いた検討を行った。

KO マウスにおける EMCV 誘発糖尿病の感受性と性差の検討では、IFRG KO マウスのオスが day 5 から高血糖状態を呈し、糖尿病を発症した。加えて、組織病理では day 5 以降に炎症性細胞の浸潤を伴う膵島構造の破壊を認めた。これらの所見は、本研究室におけるこれまでの報告と一致している。EMCV-D は膵島 β 細胞の表面レセプターに高い親和性を有するとされている。また、ウイルス誘発糖尿病の発症メカニズムとし

て、ウイルスが直接膵島 β 細胞を破壊することが報告されている。その一方で、集積された臨床的、実験的証拠により、エンテロウイルス感染においては、膵島を標的とした自己免疫機序が 1 型糖尿病の発症に作用することが示唆されている。これらの報告を踏まえて、IFRG KO マウスのオス個体が示した EMCV 誘発糖尿病に対する感受性は、EMCV が膵島特異的に感染し、膵島 β 細胞のウイルスによる直接的な破壊、またはウイルスを貪食するマクロファージ等炎症性細胞による間接的な破壊が起こり、インスリンの分泌障害・欠乏に陥ることに起因すると考えられる。今後、EMCV 感染マウスの各臓器におけるウイルス価の測定や、膵島組織における炎症性細胞の染め分けが有効であると考えられる。

本研究室・高上らは 2008 年の報告の中で、マクロファージ活性化免疫増強物質である *Corynebacterium parvum* (CP) を用い、CP 処理した DBA/2N マウス (EMCV 感受性系統) が EMCV 誘発糖尿病の発症を完全に防ぐものの、IFN 産生の活性は増強されていないことを示し、CP 処理マウスにおいては EMCV 感染防御と IFN 産生の関連が乏しいことを明らかにした。本研究で血清 IFN の測定は行っていないが、今後、IFRG を欠損した C57BL/6J マウスにおける血清 IFN のモニターや、IFRG KO マウス由来のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用い、IFN 刺激に対する抗ウイルスタンパクの産生を解析するなど、発症メカニズムの解明のために in vivo と in vitro の両方における詳細な検討が求められる。

また、Rag2 欠損マウス (Rag2 KO および IFRG /Rag2-double KO マウス) が EMCV

感染後、雌雄関係なく激しい生存率低下と体重減少を示すことが明らかになったが、これはマウスが先天性にリンパ球を欠くことで獲得免疫が機能せず、全身性にウイルス感染が広がった結果、衰弱したものと考えられた。そこで、後に行った Rag2 欠損マウスに対するリンパ球移入実験には、この脆弱性に対するレスキュー実験としての意味も含めて検討した。

IFRG が EMCV 誘発糖尿病の感受性に関与することを示した次のステップとして、この IFRG の役割が、実質細胞に発現する IFRG、または免疫担当細胞に発現する IFRG のどちらによるものかを検討した。本研究では、脾臓キメラマウスの作成と Rag2 欠損マウスに対するリンパ球移入実験の 2 つの実験系を組合せることで、EMCV 誘発糖尿病における自然免疫および獲得免疫の意義を解析した。脾臓キメラマウスの作成は、X 線照射により体内のほぼすべての免疫担当細胞の影響を排除できる。しかし、致死量 X 線照射は、免疫細胞を除去する他、マウス身体に与える物理的なダメージが大きいと考えられる。一方、Rag2 欠損マウスは先天性にリンパ球を欠損しているため、X 線照射などの障害を与えずにリンパ球を移入できる。しかしながら、Rag2 欠損マウスの体内にはリンパ球以外の免疫細胞も存在するため、これらの影響を無視できず、移入したリンパ球単独の役割を評価することは難しい。以上の理由から、本研究では脾臓キメラマウスと Rag2 欠損マウスの結果を合せて評価した。

脾臓キメラマウスにおける EMCV 誘発糖尿病の発症は、recipient が IFRG KO の場合に限って認められた。これは、糖尿病発

症において、実質細胞に発現する IFRG が重要であることを示す所見である。これと一致して、IFRG KO リンパ球を有する WT recipient はウイルス誘発糖尿病に抵抗性を示した。しかし、Rag2 KO マウスへの移入実験では、IFRG KO リンパ球の移入により、一部のマウスが day 10 以降で中程度の高血糖状態を呈した。IFRG KO リンパ球に関するこれら 2 つの結果を統合すると、免疫細胞上の IFRG と糖尿病発症の関連は完全には否定できず、免疫細胞上の IFRG が EMCV 感染防御に部分的な役割を果たす可能性は残った。また、Rag2 KO マウスの体内では、獲得免疫の欠損により代償性に自然免疫が亢進され、マクロファージや NK 細胞などが自己免疫性に機能している可能性もある。神経親和性コロナウイルスの研究では、養子移入による RAG1 欠損マウスの免疫再構成後、急速にマクロファージの遊走およびミエリンの破壊が起こることが示された。また、C57BL/6N の遺伝背景を有する Rag1 欠損マウスでは、肺と肝臓における NK 細胞の割合と数が増加していることを示し、この増加が T 細胞欠損マウスの NK 細胞活性化につながる可能性に言及した。驚くべきことに、IFRG /Rag2 double-KO に WT リンパ球を移入した系が糖尿病を発症しなかった。この現象を解明するには IFRG KO リンパ球を有する IFRG /Rag2-double KO マウスにおける検討が待たれるが、遺伝的にマウス体内の免疫機構が非常に複雑な系であることから、得られる結果の解釈も多少困難なものになるかもしれない。

加えて、WT リンパ球を移入した Rag2 KO マウスでは、生存率が大幅に改善され

たことから、Rag2 欠損マウスの脆弱性は、やはりリンパ球欠損による全身性のウイルス感染が原因であった可能性が高い。いずれにせよ、Rag2 欠損マウスに元来備わっているリンパ球以外の免疫細胞の影響を無視することはできず、今後の EMCV 感受性の検討における有用性はそれほど高くないことが推測される。

本研究により、IFRG がマウスにおけるウイルス誘発糖尿病の感受性に深く関与することが明らかとなった。さらに、IFRG 遺伝子の役割は実質細胞による自然免疫に依存することが強く示唆された。今後、感染マウス体内におけるウイルス増殖の観察、膵島組織の免疫染色による評価、血清検査、MEF を用いた *in vitro* の解析、マクロファージの機能分析等、発症メカニズムに関するさらなる検討が必要である。これらの検討が進みウイルス誘発糖尿病の発症メカニズムが解明されることを期待したい。

E. 結論

本研究により本研究で得られた結論は以下の通りであり、IFRG 遺伝子変異がマウスにおけるウイルス誘発糖尿病の感受性を担っていることが証明された。また、IFRG 遺伝子のウイルス糖尿病発症制御には、膵島実質細胞における発現が重要であることが示唆された。

1. MIP-IFRGトランスジェニックマウスに関する研究

分担者 勝田仁：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・
講師

研究要旨

これまでの研究により、IFRG 遺伝子が EMCV 誘発糖尿病感受性に関与していることが強く示唆されている。しかしながら、マウス体内のいずれの細胞における IFRG 遺伝子の発現あるいは、その機能障害がこの感受性を左右しているのかは明らかになっていない。本研究では、膵β細胞における IFRG 遺伝子発現の有無が EMCV 誘発糖尿病の感受性にどう影響するのか明らかにすることを目的とした。

EMCV 誘発糖尿病の感受性において IFRG 遺伝子の膵β細胞での発現が重要なのか否かを検討するため、膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスを作成し、EMCV-D を用いて感染実験を行った。

結果、膵β細胞特異的 Tyk2 発現マウスではほぼ糖尿病は誘発されず、膵β細胞における IFRG 遺伝子発現の重要性が示唆された。ただ、今回の実験ではマウスの頭数が少なく、また実際に膵β細胞でのみ IFRG が発現しているかの確認を行っていないため、さらなる追加実験が必要である。

A. 研究目的

1 型糖尿病は膵β細胞の破壊によりインスリン欠乏に陥る自己免疫疾患である。しかしその中には、自己免疫所見に乏しく発症前に風邪症状を伴う症例が存在する。1 型糖尿病患者の約 20%、特に劇症 1 型糖尿病患者の約 70%の症例に、発熱や上気道炎などの風邪症状を先行することから、ウイルス感染が 1 型糖尿病発症の原因の 1 つであることが疑われている。

ウイルス誘発糖尿病の研究において、脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus; EMCV) をはじめとして、コクサッキーB4 ウイルス、mengo ウイルス、レオウイルス、レトロウイルスなど多くのウイルスが、マウスに

対して実験的に糖尿病を誘発できることが知られている²⁾。特に EMCV の D 株 (EMCV-D) は、感受性のマウスに接種すると高頻度に糖尿病を誘発することが知られており、ウイルス誘発糖尿病の研究に広く用いられている。そして、ウイルス誘発糖尿病発症の機序には T 細胞や B 細胞を介した獲得免疫系よりもむしろ、マクロファージやインターフェロンを介した自然免疫系が重要であるとの報告があり⁴⁾、ウイルスレセプターやシグナル伝達分子などを対象に様々な研究が行われ、ウイルス誘発糖尿病感受性遺伝子の探索が進められている。

1 型糖尿病の感受性に関与するとされる遺伝子座 (IDDM) は現在 20 種以上報告

されているが、臨床免疫学研究室ではその遺伝子座に存在する遺伝子の中でも特に IFRG (Interferon receptor related gene) に焦点を当てて研究が進めている。IFRG はインターフェロンシグナル分子として自然免疫系の一役を担っている。

EMCV 誘発糖尿病に対して SJL/J 系統のマウスが感受性、C57BL/6J 系統のマウスが抵抗性を示すことが知られている。これまでの研究で、EMCV 誘発糖尿病感受性の SJL/J マウスには IFRG 遺伝子に変異が存在し、抵抗性の C57BL/6J マウスには存在しないことが明らかとなった。また、C57BL/6J 背景の IFRG ノックアウト (KO) マウスにおいても EMCV 誘発糖尿病の発症が認められた。さらに、抵抗性 C57BL/6J 背景で IFRG 遺伝子変異を有するコンジェニックマウスでは EMCV 誘発糖尿病の発症を認め、感受性 SJL/J 背景で野生型 IFRG 遺伝子を有するコンジェニックマウスでは発症が認められていない。これらの知見から IFRG 遺伝子が EMCV 誘発糖尿病感受性に関与していることが強く示唆されている。しかしながら、マウス体内のいずれの細胞における IFRG 遺伝子の発現がこの感受性を左右しているのかは明らかになっていない。したがって、本研究では、膵 β 細胞での IFRG 遺伝子発現の有無が EMCV 誘発糖尿病の感受性にどう影響するのか明らかにすることを目的とした。

B. 方法

膵 β 細胞特異的 IFRG 発現マウスの作成

EMCV 誘発糖尿病の感受性において IFRG 遺伝子の膵 β 細胞での発現が重要なのか

否かを検討するための材料となる、C57BL/6J 背景の膵 β 細胞特異的 IFRG 発現マウスを、IFRG ノックアウト (KO) マウスと MIP (mouse insulin promoter) -IFRG トランスジェニック (Tg) マウスを用いて作成した。MIP-IFRG 遺伝子は IFRG 遺伝子の cDNA 上流に MIP を組み込んだトランスジーンであり、膵 β 細胞にのみ IFRG を発現する。したがって、IFRG KO マウスに MIP-IFRG 遺伝子を導入することにより、膵 β 細胞特異的 IFRG 発現マウスを作成することができる。

マウス

IFRG KO マウスは宮崎大学医学部医学科内科学講座消化器血液学分野下田和哉教授より、MIP-IFRG Tg マウスは慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター小林隆志准教授より分与いただき、総合研究棟 8F 吉開研究室感染実験室 (コンベンショナル施設) で飼育維持、繁殖を行い使用した。

交配

まず、IFRG hetero KO マウス (Tyk2^{+/-}) と MIP-IFRG Tg マウス (内在性 IFRG は wild type) を交配し、MIP-IFRG (hetero) を有する IFRG hetero KO マウス (IFRG^{+/-}/MIP-IFRG^{+/-}) を作成した。そして、この遺伝子型のマウス同士を交配し MIP-IFRG (hetero or homo) を有する IFRG KO マウス (IFRG^{-/-}/MIP-IFRG^{+/-} or ^{+/+}) を作成した。このマウスに MIP-IFRG を有していない IFRG KO マウス (IFRG^{-/-}) を交配することで、目的の MIP-IFRG (hetero) を有する IFRG KO マウス (IFRG^{-/-}/MIP-IFRG^{+/-}) を作成した (図 1)。

遺伝子検定

マウス作成に際し、交配の各段階で産まれた仔マウスに対して遺伝子検定を行い、目的の遺伝子型を有するマウスを選別し次段階の交配に用いた。検定の手順を以下に示す。

①マウス tail からの DNA 抽出

検定を行うマウスの tail を約 1cm 採取した。tail 1 サンプルあたり DNA Extraction Premix 380 μ l、Proteinase K 20 μ l を加え、55°C で一晩溶解した。フェノール(和光純薬工業株式会社)を 400 μ l 加え、ローテーターで 1 時間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール層を除去し、上清にフェノールを 400 μ l 加え、ローテーターで 1 時間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール層を除去し、上清にフェノール 200 μ l とクロロホルム(和光純薬工業株式会社)200 μ l を加え、ローテーターで 30 分間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。フェノール、クロロホルムを除去し、上清にクロロホルムを 400 μ l 加え、ローテーターで 5 分間転倒混和後、15000rpm で 5 分間遠心した。上清 250 μ l に 100% エタノールを 650 μ l 加え、転倒混和し DNA を凝集させた。15000rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を捨て、70%エタノールを 1ml 加え、転倒混和後、15000rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を取り除き、30 分風乾後、10mM TE を 100 μ l 加え、4°C で保存した。

②PCR

PCR を用いて IFRG および MIP-IFRG についてそれぞれ検定を行った。試薬は TaKaRa Taq(タカラバイオ株式会社)、PCR 用チューブは MicroAmp 8-Tube

Strip(Applied Biosystems)、サーマルサイクラーは TaKaRa Thermal Cyclor Dice Gradient TP600(タカラバイオ株式会社) および Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)を使用した。

DNA 濃度測定は Nano Drop Spectrophotometer ND-1000(Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。プライマーの合成は株式会社ジーンネットの受託サービスを利用した。

IFRG

1 サンプル当たり、滅菌水 9.9 μ l、10×PCR Buffer 2 μ l、2.5mM dNTP Mixture 2 μ l、25mM MgCl₂ 1.6 μ l、forward primer(wild allele 用) 1 μ l、forward primer(KO allele 用) 1 μ l、reverse primer 1 μ l、TaKaRa Taq 0.5 μ l を混合し PCR 用チューブに分注し、100~200ng/ μ l に調整した DNA を 1 μ l 加え、サーマルサイクラーにかけた。PCR サイクル条件は、94°C 10 分、(94°C 1 分、62°C 1 分、72°C 2 分)×30 サイクル、72°C 16 分である。プライマーの配列を表 1 に示す。

MIP-IFRG

1 サンプル当たり、滅菌水 12.6 μ l、10×PCR Buffer 2 μ l、2.5mM dNTP Mixture 2 μ l、25mM MgCl₂0.8 μ l、forward primer 0.6 μ l、reverse primer 0.6 μ l、TaKaRa Taq 0.4 μ l を混合し PCR 用チューブに分注し、100~200ng/ μ l に調整した DNA を 1 μ l 加え、サーマルサイクラーにかけた。PCR サイクル条件は、MIP-IFRG 結合部が 94°C 2 分、(94°C 45 秒、52°C 45 秒、72°C 1 分)×30 サイクル、72°C 1 分、IFRG -hGH 結合部が 94°C 2 分、(94°C 45 秒、60°C 45

秒、72°C 1分)×30 サイクル、72°C 1分である。プライマーの配列を表1に示す。

③電気泳動による判定

PCR産物を2%アガロースゲルにアプライし100Vで30分間泳動し、エチジウムブロマイド(EtBr)に20分浸漬後、泳動像を撮影した。アガロースゲルはUltra Pure Agarose (Invitrogen)を1×TAE溶液を溶媒に作成し、泳動槽はMupidミニゲル泳動槽(コスモバイオ株式会社)を用いた。

IFRGについてのプライマーはforward primer(wild allele用)、forward primer(KO allele用)、reverse primerの3本が設定してあり、KO allele用のforward primerはIFRG遺伝子をノックアウトするために組み込まれたネオマイシン耐性遺伝子カセット内に設定してある。したがって、IFRG KOマウスのPCR産物のサイズは、wild typeのものよりネオマイシン耐性遺伝子のサイズ分大きくなり、両者の判別ができる。wild typeは810bp、KOは1100bp、hetero KOはその双方のサイズのバンドが確認できる。

MIP-IFRG遺伝子はトランスジーンであり、大元のプラスミドに組み込む際にhGH(human Growth Hormone)遺伝子と一緒にMIP-IFRG-hGHの順に組み込まれている。したがって、MIP-IFRG遺伝子の検定は、プライマーをMIP-IFRG結合部およびIFRG-hGH結合部それぞれを挟む形で設定し、その双方のバンドが確認できたものをMIP-IFRG遺伝子を有すると判断した。PCR産物のサイズはMIP-IFRG結合部が687bp、IFRG-hGH結合部が372bpである。

また、MIP-IFRG遺伝子中のIFRGはcDNAであり、IFRG KO判定用のプライマーは

IFRG遺伝子のイントロン上に設定されているため、このプライマーがMIP-IFRG遺伝子の配列と結合し非特異的反応を起こすことはない。

EMCV-D 感染実験

作成した膵β細胞特異的Tyk2発現マウスおよび、比較対照として、IFRG wild type(+/+)マウス、IFRG KO(-/-)マウス、IFRG hetero KO(+/-)マウス、MIP-IFRG(hetero)を有するIFRG hetero KOマウスを用いてEMCV-Dを用いた感染実験を行った。今回の実験に使用したマウスの遺伝子型を表2に示した。

EMCV-D 接種

-80°C凍結保存されたウイルス液を滅菌PBSで希釈し、6~12週齢のマウスに 1.0×10^3 PFU/mouseとなるように、腹腔内接種を行った。注射器は29Gマイジェクター(テルモ株式会社)を用いた。EMCV-Dはカルガリ大学故J. W. Yoon教授、米国NIH、Notkins博士から分与されたものである。

血糖値測定

感染後0日、3日、5日、7日、10日、14日の2週間、血糖値のモニターを行った。尾静脈から採血し、非絶食条件下の全血随時血糖値を測定した。測定機器はグルテストPRO R(三和化学株式会社)を用いた。糖尿病判定閾値は250mg/dlに設定した。

C. 研究結果

膵β細胞特異的IFRG発現マウスのEMCV誘発糖尿病感受性

EMCV誘発糖尿病の感受性においてIFRG遺伝子の膵β細胞での発現が重要なのか否かを検討するため、作成したC57BL/6J背景の膵β細胞特異的IFRG発現マウスに

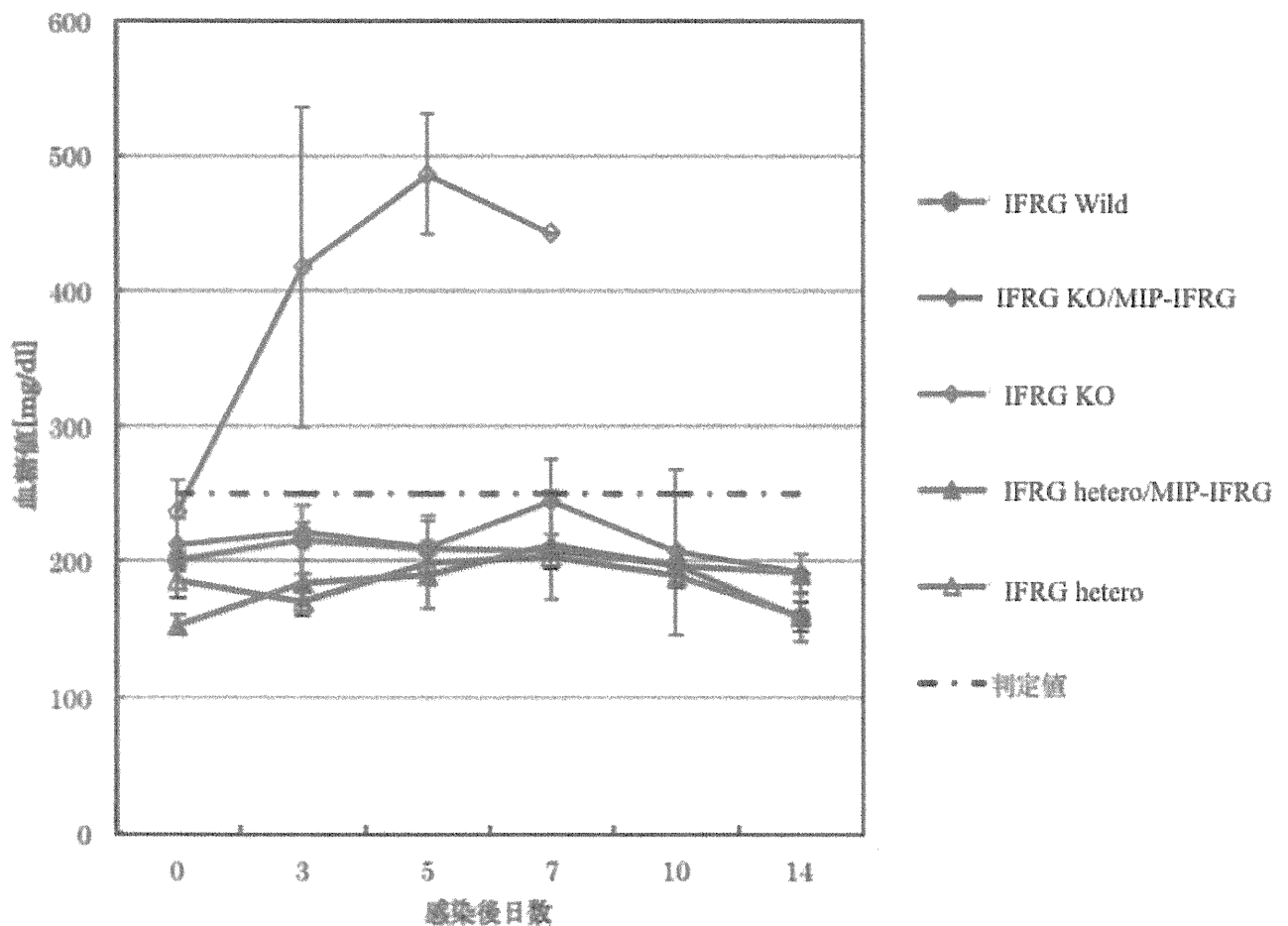
EMCV-D を接種し、糖尿病を誘発させ、感染後 0、3、5、7、10、14 日目の随時血糖値を測定した。比較対照として、IFRG wild type マウス、IFRG KO マウス、IFRG hetero KO マウス、MIP- IFRG (hetero) を有する IFRG hetero KO マウスに対しても同様に EMCV-D 接種および血糖測定を行った。結果を遺伝子型ごとの平均値 (図) と遺伝子型別の個々の値 (図) についてそれぞれグラフ化して示した。また、遺伝子型ごとの生存率を求めグラフ化した。

EMCV-D 感染後の遺伝子型ごとの平均値をグラフ化したものである。Y 軸誤差は $SE=SD/\sqrt{n-1}$ を用いた。またマウス同士の闘争により瀕死状態となった個体は除外した。

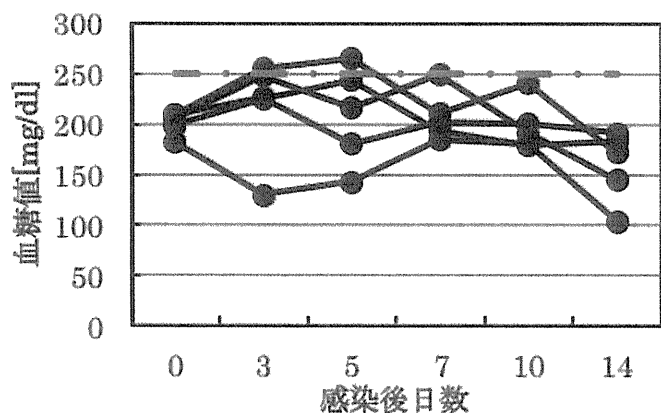
糖尿病判定閾値 250mg/dl を一点鎖線で示した。凡例の n 数の表示は感染後 0 日目のものである。

EMCV-D 感染後の遺伝子型別の各個体の随時血糖値

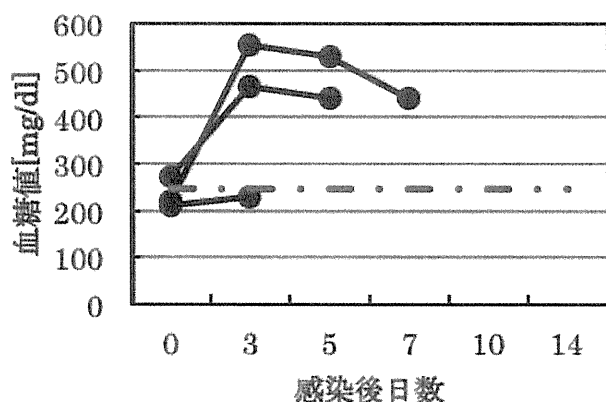
EMCV-D 感染後の遺伝子型別の各個体の随時血糖値をグラフ化したものである。糖尿病判定閾値 250mg/dl を赤一点鎖線で示した。



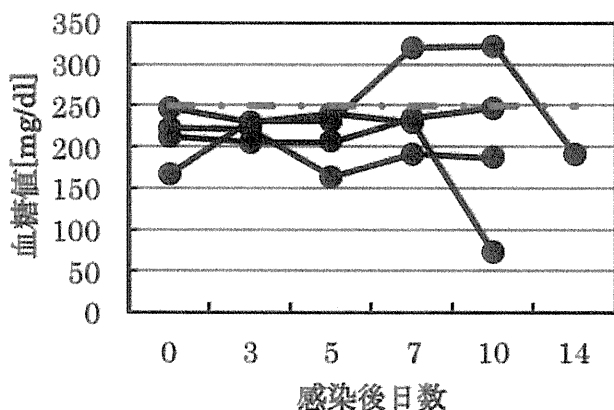
(A) IFRG^{+/+} (n=5)



(B) IFRG^{-/-} (n=3)



(C) IFRG^{-/-} / MIP-IFRG^{+/-} (n=4)



平均血糖値では、MIP-IFRG 遺伝子を有していない IFRGKO マウスのみには明らかな血糖値の上昇がみられ、7 日目で 3 頭とも死亡した。ただ、その内の 1 頭は感染後 3 日目~5 日目の間に血糖の上昇を呈することなく死亡した。その他 4 つの遺伝子型については、感染後 14 日間平均血糖値に大きな変動は認められなかった。MIP-IFRG 遺伝子を有した IFRG KO マウスすなわち膵 β 細胞特異的 IFRG 発現マウスについては、4 頭中 1 頭が 7 日目に高血糖を呈した。残りの 3 頭は高血糖を呈さなかったのだが、感染から 14 日目にかけて明らかな体重減少が見られ、3 頭とも 14 日目に死亡した。wild type マウスについては、5 日目 250mg/dl を超える血糖値を呈した個体が 1 頭存在したが、その上昇もわずかで他に高血糖を呈する個体も存在しなかった。IFRG hetero KO マウスは、MIP-IFRG 遺伝子の有無に関係なく、wild type マウスとほぼ同じような血糖値の推移を見せ、MIP-IFRG2 遺伝子を有した IFRG hetero KO マウスのうち 1 頭だけ高血糖を呈した個体が存在した。wild type マウスと MIP-IFRG 遺伝子を有した IFRG hetero KO マウスは感染後 14 日目まで死亡した個体は存在しなかった。MIP-IFRG 遺伝子を有さない IFRG hetero KO マウスは 11 頭のうち 10 日目と 14 日目で死亡した個体が 1 頭ずつ存在した。

D. 考察

臨床免疫学研究室のこれまでの研究によりウイルス誘発糖尿病の感受性遺伝子であることが濃厚となっている IFRG 遺伝子であるが、そのウイルスに対する感染

防御の機構、いかに IFRG 遺伝子がマウス体内でウイルス誘発糖尿病の発症を抑えているのかはまだ明らかになっていない。本研究では、IFRG 遺伝子によるウイルス感染防御機構解明の第 1 歩として、膵β細胞における IFRG 遺伝子の発現に焦点を当てて実験、検討を行った。

EMCV 誘発糖尿病抵抗性の C57BL/6J 系統のマウスであるが、IFRG 遺伝子をノックアウトすることでその抵抗性を失うことが分かっている。この IFRGKO マウスに MIP-IFRG 遺伝子を持たせ、膵β細胞でのみ IFRG を発現するマウスを作成し、感染実験を行うことにより、膵β細胞における IFRG 遺伝子発現の重要性を検討した。

結果、IFRGKO マウスに MIP-IFRG 遺伝子を持たせた膵β細胞特異的 Tyk2 発現マウスは 4 頭中 1 頭が高血糖を呈したが、残りの 3 頭は全く血糖の上昇を示さなかった。その 1 頭は 7 日目、10 日目と 320mg/dl を超す高血糖を呈したが、14 日目には 250mg/dl 以下に回復した。逆に、残りの 3 頭は高血糖を呈さなかったものの、感染後徐々に体重の減少が見られ、14 日目には 3 頭とも死亡した。比較対照の MIP-IFRG 遺伝子を有さない IFRG KO マウスは、3 頭中 2 頭が 450mg/dl を超す顕著な高血糖を呈し、その後 7 日目、10 日目にそれぞれ死亡した。残りの 1 頭は高血糖を呈さぬまま、5 日目に死亡した。この個体については、おそらく EMCV-D により高血糖が誘発される前に感染症により死亡したと考えられる。以上の 2 群の結果を比較してみると、MIP-IFRG 遺伝子を有する IFRG KO マウス 4 頭のうち 1 頭しか高血糖を呈していないのに対し、

MIP-IFRG 遺伝子を有さない IFRG KO マウスは 3 頭中 2 頭が高血糖を呈しており、両群の高血糖の程度には明らかな差が認められる。n 数が少ないため断定的なことは言えないが、この結果から膵β細胞における IFRG 遺伝子の発現の有無がウイルス誘発糖尿病の感受性に影響を与えている可能性が示唆された。すなわち、膵β細胞における IFRG 遺伝子の発現が、ウイルス誘発糖尿病の発症を抑制している可能性が推測された。また、生存数を見ると MIP-IFRG 遺伝子を有さない IFRGKO マウスは 3 頭中 3 頭が死亡、MIP-IFRG 遺伝子を有する IFRG KO マウスも 4 頭中 3 頭が死亡している。この結果から、IFRG 遺伝子は EMCV に対する感染防御において、膵島での糖尿病の抑制だけでなく、EMCV による脳炎や心筋炎を抑制することによって、マウスが死に至るのを防いでいるという可能性も考えられる。しかし今回の実験は n 数が少なく、これらの見解はまだ推測の段階でしかない。この実験系でさらに n 数を増やし、検討を続ける必要がある。また、この実験では、MIP-IFRG 遺伝子に対して PCR による検定しか行っていない。つまり、ゲノム上に MIP-IFRG 遺伝子が存在するということを確認しただけで、実際に MIP が機能し IFRG が膵β細胞でのみ発現しているのかは確認できていない。MIP-IFRG 遺伝子はトランスジーンであるため、ゲノム上のどこに組み込まれているのか分からず、組み込まれた場所によっては、IFRG が発現しない場合や膵β細胞以外で発現する場合も考えられる。したがって、この実験系において MIP-IFRG 遺伝子由来の IFRG の発現の

確認をすることは必須だと言える。今後、real-time PCR や western blot、免疫染色などの方法を用いて、膵β細胞でのIFRG mRNA および IFRG タンパクの発現を確認する必要がある。

また、wild type マウス、IFRG hetero KO マウス、MIP-IFRG 遺伝子を有する Tyk2 hetero KO マウスに対しても感染実験を行ったが、wild type マウスはこれまでの報告通り、高血糖を呈することなく、死亡した個体も存在しなかった。IFRG hetero KO マウスも高血糖を呈した個体は1頭も存在せず、観測終盤の10日目、14日目に1頭ずつ死亡した個体が存在した。MIP-IFRG 遺伝子を有する IFRG hetero KO マウスについては、高血糖を呈した個体が1頭存在したが、死亡した個体は存在しなかった。以上のように、IFRG hetero

KO マウス系においては MIP-IFRG 遺伝子の有無によるウイルス糖尿病感受性および生存率への影響はほとんどなく、wild type マウスと同じような経過をたどった。n数をさらに増やして検討を行えば、これらの間にも差が現れてくるかもしれない。IFRG hetero KO マウスは、理論上 wild type マウスの半量の内在性 Tyk2 遺伝子を有しており、その半量の IFRG 遺伝子が機能することで、糖尿病の発症と感染症による死亡を防いでいると考えられる。

E. 結論

本研究において、IFRG KO 膵β細胞特異的 IFRG 発現マウスは EMCV 誘発糖尿病に対して明らかな抵抗性が認められ、IFRG の膵β細胞での発現の重要性が示唆された。

2. ヒト劇症1型糖尿病感受性遺伝子変異の探索と意義に関する研究

分担者 栗崎宏憲：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・助教

研究要旨

ヒト劇症1型糖尿病のウイルス原因説を解明する目的で、遺伝的感受性要因を明らかにする目的で、インターフェロン受容体関連シグナル分子である IFRG(interferon receptor related gene) 遺伝子多型と劇症1型糖尿病、1型糖尿病、健常対照を対象に Exon 部位およびプロモーター部位の多型解析を行った。その結果、Exon 部位の多型は50%程度の頻度で健常対照と差がなかった。一方、プロモーター領域、Exon1, Exon2 の3つの非翻訳領域のうち、プロモーター領域と Exon1 にそれぞれ3カ所の1塩基置換を認めた。プロモーター領域では4071G/A, 4072T/A, 4897A/Cを認め、Exon1では5001A/G, 5062G/A, 5063G/Aを認めた。1型糖尿病、2型糖尿病、健常対照で比較検討したところ、驚くべきことにすべての糖尿病群で対照群より、明らかに有意なリスク因子であると判定された。また、特に、風邪症状先行例、自己抗体陰性例で危険率(オッズ比)が高かった。このことも、この遺伝子がウイルス糖尿病の感受性遺伝子であることを示唆していると結論づけた。一方、花房班の協力も得て、劇症1型糖尿病患者で検討したところ、対照群よりこの多型の頻度は高かったが、統計的な有意差は認められなかった。

A. はじめに

1型糖尿病は膵β細胞の破壊によるインスリンの絶対的不足を示す病態である。さらに、1型糖尿病は自己免疫性か否かによって、1A型と1B型に分類される。1A型は自己免疫性であるとされ、1B型は非自己免疫性の特発性糖尿病であるとされる。1B型ではさらに、亜型として劇症型が存在する。急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に、発熱、上気道炎などの風邪症状を伴うことから、ウイルス感染が糖尿病発症の原因であることが示唆されている。しかしそのメカニズムあるいは感受性遺伝子は不明である。

さて、IFNはウイルス感染防御の主要な

因子である。IFN α レセプターの下流に存在する INFRRG 遺伝子は IFN α の産生によって活性化され、抗ウイルスタンパクを産生する。このように T INFRRG は抗ウイルス作用に関与している。

そこで本研究では、ウイルス感染と関連の認められた、ヒト1型糖尿病患者の INFRRG プロモーター領域、Exon1 および Exon2 の遺伝子変異、多型の有無を検索し、その意義を検討した。対象は、ウイルス先行感染を認めた1型糖尿病患者末梢血液検体22例の末梢血液検体である。

B. 方法

血液検体収集

大分大学付属病院, 岡田内科クリニック, 九州大学病院心療内科, 九州大学病院第一および第二内科, 早良病院, 新小倉病院, 内科阿部病院, 福岡市立こども病院, 松山赤十字病院, 南昌江内科クリニック, 山口赤十字病院(以上, 五十音順)において1型糖尿病患者の末梢静脈血採血を依頼し, 血液検体を収集した。

血液検体到着後, 血清分離剤入り採血管中の血液を2,500rpmで20分間遠心し, 2

本の2mlアシストチューブに均等に分注した。また, 全血は転倒混和後, 0.5mlアシストチューブに420 μ l分注し, 残りを2本の2mlアシストチューブに均等に分注した。これら血清と全血の検体は-30 $^{\circ}$ C下で保存した。収集した患者の血液検体のうち, 1型糖尿病の発症が急性または劇症型であり, 1型糖尿病発症前にウイルス感染の先行が認められた患者22名(男性11名, 女性11名)の検体を選択し, DNA抽出を行った。このとき選択した患者の情報を表に示す。

表 IFRG 遺伝子解析の対象とした患者の情報

患者番号	年齢	性別	発症様式	家族歴	備考
1	49	M	劇症	なし	
2	47	F	急性	なし	
3	61	F	劇症	長男と次男(1型糖尿病)	
4	31	F	急性	なし	
5	36	F	急性	なし	
6	40	F	劇症	なし	
7	59	F	劇症	なし	
8	9	M	急性	なし	
9	10	M	急性	なし	
10	43	M	急性	なし	
11	52	M	急性	なし	
12	53	M	劇症	なし	
13	34	F	急性	なし	
14	24	F	急性	なし	
15	62	F	劇症	なし	
16	35	M	急性	なし	
17	25	M	急性	なし	
18	30	M	急性	なし	
19	48	F	急性	不明	
20	40	F	急性	なし	
21	24	M	急性	なし	
22	27	M	急性	母(甲状腺疾患)	

DNA 抽出

全血から DNA を抽出した。

- ① 1.5ml マイクロチューブに Protease(EDB)を 30 μ l, 全血を 200 μ l, Lysis Buffer(LDB)を 250 μ l 分注した。なお, EDB および LDB は核酸抽出キット (Quick Gene DNA whole blood kits Cat.No. DB-S FUJIFILM 社製)に含まれたものを使用した。
- ② Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ③ 56°C で 2 分間加温した。
- ④ 99.9%エタノールを 250 μ l 加えた。
- ⑤ 再び Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ⑥ 自動核酸抽出システム QuickGene-800(FUJIFILM 社製)上のカートリッジへ, 完成したライセート(全量 730 μ l)を添加し稼動させて DNA の抽出を行った。
- ⑦ 抽出した DNA 濃度は, RNA/DNA Calculator(Gene Quant pro)を用いて, 230nm, 260nm, 280nm で吸光度を測定し, 確認した。

プロモーター領域の仮定

ヒト IFRG 遺伝子のプロモーター領域は

まだ完全には解明されていない。また, プロモーター領域は mRNA 転写開始点の上流 1kb の領域に存在することが多いと考えられている。そこで mRNA 転写開始点データベース (DBTSS) を用いてヒト INFRRG 遺伝子の mRNA の転写開始点を予測したところ, いくつかの候補点が予測された。この転写開始予測点のうち, 5' 側から上流 1kb の地点から, Exon1 の開始点までをプロモーター領域だと仮定した。

PCR の条件

PCR Thermal Cycler Dice(TaKaRa)を使用して PCR を行った。

以下に反応液の内容を示した。なお, 用いた試薬は 10×buffer(TOYOB0), 反応液の酵素は TaKaRa LA Taq®である。PCR のプロトコルは図 2 に示し, 使用した primer の塩基配列は表に示した。PCR 終了後には 2%Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System(ADVANCE)を使用し, 100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際, PCR 産物 4 μ l と 10×Loading Buffer 1 μ l を混和し, ゲルに注入した。また, マーカーは Stable 1kb DNA Ladder(GENOSYS, SIGMA)を使用した。

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列(Forward)	5' -3' 塩基配列(Reverse)
プロモーター	GCCAGACCCCATCTCTACAAA	GGAAGACAAGCTCGAACC

Exon1 の PCR の条件

以下の表 3 に反応液の内容を示した。なお, 用いた試薬は 10×buffer(TOYOB0), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase(TOYOB0)である。PCR のプロト

コルは図に示し, 使用した primer の塩基配列は表 4 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System(ADVANCE)を使用し, 100V, 30 分間

の電気泳動を行った。その際、PCR産物 4 μ l と 10×Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable

100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]			
10×buffer	2	Hold	94°C	5min
2.5mM dNTP	1.6	Cycle	94°C	15sec
25mM MgCl ₂	1.2		62°C	30sec
5U/ μ l rTaq	0.2		72°C	1min
10ng/ μ l DNA	3	Hold	72°C	7min
10 μ M Primer(F)	0.4		4°C	30sec
10 μ M Primer(R)	0.4		25°C	store
蒸留滅菌水	up to 20	Ex1 PCR プロトコル		
Total	20			

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列(Forward)	5' -3' 塩基配列(Reverse)
Ex1	AATCGCGGCTGAGTGACGAATG	GACCCAGACCCAGCTTTGAAGA

Exon2 の PCR 条件

以下に反応液の内容を示した。なお、用いた試薬は 10×buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) である。PCR のプロトコルは図 4 に示し、使用した primer の塩基配列は表 6 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し、100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際、PCR 産物 4 μ l と 10×Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable 100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]	Hold	94°C	5min
10×buffer	2	Cycle	94°C	15sec
2.5mM dNTP	1.6		56°C	30sec
25mM MgCl ₂	1.2		72°C	1min
5U/ μ l rTaq	0.2	Hold	72°C	7min
10ng/ μ l DNA	3		4°C	30sec
10 μ M Primer (F)	0.4		25°C	store
10 μ M Primer (R)	0.4	Ex2 PCR プロトコル		
蒸留滅菌水	up to 20			
Total	20			

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
Ex2	CTGGACATAAACTCTCCTAGGC	GACCATCTTGACCAACATGGTG

PCR 産物の精製

QIA quick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して, PCR 産物の精製を行った.

- ① 1.5ml マイクロチューブに PCR 産物を 15 μ l, Buffer PB を 75 μ l 分注した.
- ② 全量をカラムへ移し, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ③ カラムを通った Buffer を捨て, Buffer PE をカラムへ 750 μ l 加え, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ④ 再びカラムを通った Buffer を捨て, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ⑤ 1.5ml マイクロチューブにカラムをセットし, Buffer EB を 30 μ l 分注し, 1 分間静置した後, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ⑥ カラムを通った DNA を -30°C に保存した.

遺伝子配列の決定

精製して得られた PCR 産物濃度を吸光度計 NanoDrop[®] (ナノドロップ) ND-1000 にて確認した. 滅菌蒸留水を用いて精製して得られた PCR 産物を約 10ng/ μ l に調整し, シークエンス用反応液を作製した (表 7 参照). また, 反応液には 5 × Sequencing buffer (Applied Biosystems) を使用し, 酵素は Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した. なお, シークエンスはジデオキシ法である. 図にシークエンスのプロトコルを示した.

プロモーター領域のシーケンス

増幅範囲が約 1.3kb と大きかったこと、さらに 4051-4070 および 4897-4909 にそれぞれ poly-A 配列が存在することを考慮して、以下のようにシーケンス用のプライマー(1.6pM)を設定した(表).

表 シーケンス用 primer の塩基配列

Primer No.	5' -3' 塩基配列	Primer の向き	解析部位
seq primer1	TGGAGTTTCGCTCTTGTCGC	R	3736-3900
seq primer2	GCCAGACCCCATCTCTACAAA (PCR用のprimerと同一のものを使用した)	F	3901-4050
seq primer3	CGTGCTGTGGAATTGGGTCA	R	4071-4500
seq primer4	GCGGGATGTCCAAGCTGCTA	F	4501-4897

4910-5000 の領域については 2.6.2 Ex1 のシーケンスの項で述べるように、Ex1 のシーケンスと同時に解析している。表に示した 4 種類の primer でシーケンス解析を行ったところ 3ヶ所の SNP が確認できた。そこで確かに SNP が存在することを逆側の primer を設定して確かめようとしたが、図 6 にも示したようにそれぞれの SNP が poly-A 配列の非常に近くに存在していたため、逆側の primer から変異を確認することはできなかった。そこで両方向から変異を確認することは断念し、SNP の確認できた検体についてはもう 1 度同じ primer を使用して、あるいは同じ向きからでも新たな primer を設定して同じようにシーケンス解析を行い、再現性が得られた場合には確かに SNP の存在が確認できると考えた。4071G/A, 4072T/A の 2ヶ所の SNP は新たに設定した seq primer5(図 7 中に示している)を使用して、4897A/C の SNP は再び同じ primer(seq primer4)を使用して再現性を見て、確実に SNP が存在していることを確認した。

gccaga

3721 ccccatctct acaaaaattt aaaattagc
cacaaaattt aaaattaac aacaaaggg

3781 ccgggtgagg tggtcacgc ctgtaatccc
agcgctttgg gaggggtgat cacgaggtca

3841 ggagttcgag accagcctgg ccaagatggt
gaaatcccat ctctactaaa aatacaaaaa
3901 ttagccgggc gtggtggcgg gcgcctgttg
tcccagctac ccaggaggct gaggcaggag
3961 aatcgcttga atccgggagt ctgaggttgc
agtgagccga gatcgcagca ttgcaactcca
4021 gcctgggcca caagagcga actccatctt
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gtggaagatg
4081 aggaagtga tcagacatca aggatgagcg
gatgacttaa taggcttctt tgctaagact
4141 tggctgggca ggtgaaagac aaagtcgagg
agtggttatg gtgtggcaca gaagaagggg
4201 cagaggacgg tctttgttac ctcttcagtc
ctgagtttct tctctgtga aatggggata
4261 ataagagcgg ccatacaggg aattgctgct
aggatcaaat gagataatgt atgtgaaacg
4321 ctctggctgt aggtcttctca gcaaatgggc
acgacttgcg gactggggat ttgaattcac
4381 gtctggcggg atgtccaage tctaccctg
accgctaggg agcttcagag gacagggctg
4441 caggtgatca ggaagaggac tggggcaggt
gggcgaggaa tgctccag gagtgaagga
4501 gggggaattc tagtcagcag gatggagtgc
gccaggtaga aacgagggaa aggagacagg
4561 accgatgga acggggaagc caaagggcag
ggcgtcggag gttgaaatgg tggccggctg
4621 agctttgaac accgaggtga ggacatgcag
ctgtgtctca gggtcaggac cgtacacgcc
4681 tgacccaatt ccacagcagc gaggggaact
ccaggatcgg gccgcgttgc ccacacactt
4741 cgctctcct cccgcctctc gcaagccct
ccccgtctc cgtccaccga gtgccagcca
4801 atagcagaag cgacagcgca tctgggtgcc
gactcagcca atcgcggtg agtgacgaat
4861 gagccccagg accaatgaga gtgccgccac
catggcaaaa aaaaaaaaaat ccaatggtga
4921 cgagcaggga gaacagagca gctgccaatg
ggcgtgtgag tttcaggcgg ccaatgggag
4981 gaggcgtctc ggccggggac aagcagtagc
taccgcgggg agcggggagg ggtccgggt
5041 cgagcttgtg ttccc

図 ヒト IFRG 遺伝子におけるプロモーター領域(仮定)の塩基配列

プロモーター増幅の PCR の際に用いた primer () 部位, シーケンス用 primer () 部位, 変異を確認するために新たに設定したシーケンス用 seq primer5 () 部位, poly-A 配列の部位 (), Exon1 の部位の一部 (), SNP の部位を赤文字で、それぞれ示している。