

論文内容の要旨

Physical Analysis of the Medaka (*Oryzias latipes*) MHC Class I Region (硬骨魚類メダカ (*Oryzias latipes*) MHC クラス I 領域のゲノム構造解析)

松尾 恵

序論

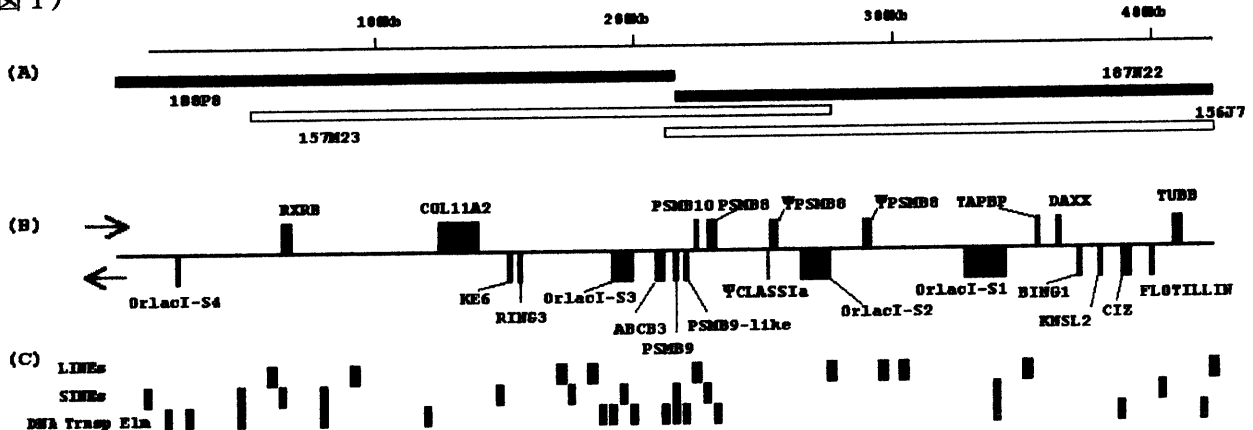
ヒト主要組織適合性抗原複合体 (MHC ; Major Histocompatibility Complex) は、100 を超える遺伝子が存在している 4Mb におよぶ領域である。本領域は便宜的にクラス I、II、III の三亜領域に分けることができる。クラス I 領域に存在するクラス IA 遺伝子と、クラス II 領域に存在するクラス IIA、B 遺伝子は、T 細胞に抗原を提示するという獲得免疫 (あるいは、適応免疫) において中心的な役割を果たしている。一方、クラス III 領域には自然免疫の主要構成成分である補体系の遺伝子 (例 ; C2、C4、Bf) を始めとして、多くの免疫関連遺伝子が存在している。MHC 領域に見られる免疫系遺伝子の連鎖の進化的、あるいは生理的な意義の解明を目指して系統発生的な解析が行われた結果、これら MHC 三亜領域はヒトを含めた哺乳類の他、ニワトリ (鳥類)、ゼノバス (両生類)、サメ (軟骨魚類) でも単一の連鎖群を形成することが判明した。このうち軟骨魚類のサメは、MHC (或いは獲得免疫系) を有する最古の脊椎動物であると考えられており、クラス I、II、III 亜領域の連鎖は MHC の成立当初から存在していた可能性が高い。しかしながら数種の硬骨魚類での解析によると、クラス IA 遺伝子とクラス IIA、B 遺伝子、補体遺伝子 C4、Bf は互いに連鎖していなかった。にも関わらず、クラス IA 遺伝子とその抗原提示に直接関わるいくつかの遺伝子は連鎖していることが示され、これらの遺伝子が MHC の中枢部分を形成することが示唆された。本研究では MHC の中枢部分の遺伝子構成を明らかにする目的で、扱いが容易であり、近交系が確立され遺伝的背景が均一な系が利用可能なメダカをもちいて塩基配列レベルでの解析を行った。

結論および考察

1. メダカMHCクラス I領域の塩基配列レベルでの解析

南日本集団由来の近交系 (Hd-rR 系統) メダカの BAC ライブラリーをクラス IA 遺伝子、PSMB9 遺伝子の一部をプローブとしてスクリーニングしたところ、4 つのポジティブなクローンが得られた。これらのクローンをサザンハイブリダイゼーション、制限酵素地図により解析したところ、オーバーラップレコングを形成した (図 1A)。このうち 188P8、187N22 の BAC クローンの全塩基配列をショットガンシーケンシング法によって決定した。その結果、187N22 は 209,134bp、188P8 は 216,734bp のインサートを有し、末端の *Hind*III サイト 6 bp のみでオーバーラップしていた。これらの配列をつなぎ合わせる事により 425,862bp の連続した配列が得られたが、これは現在ヒトについて 2 番目に長い MHC 領域の配列である。この領域の GC 含量は 39.4 %で、全体を通じて GC 含量に大きな変化は見られなかった。Genbank/EMBL/DDBJ /PDB をデータベースとした Blast 解析、および GrailEXP、GENSCAN エクソントロン予測プログラムを併用した解析から、本塩基配列には 20 個の発現していると考えられる遺伝

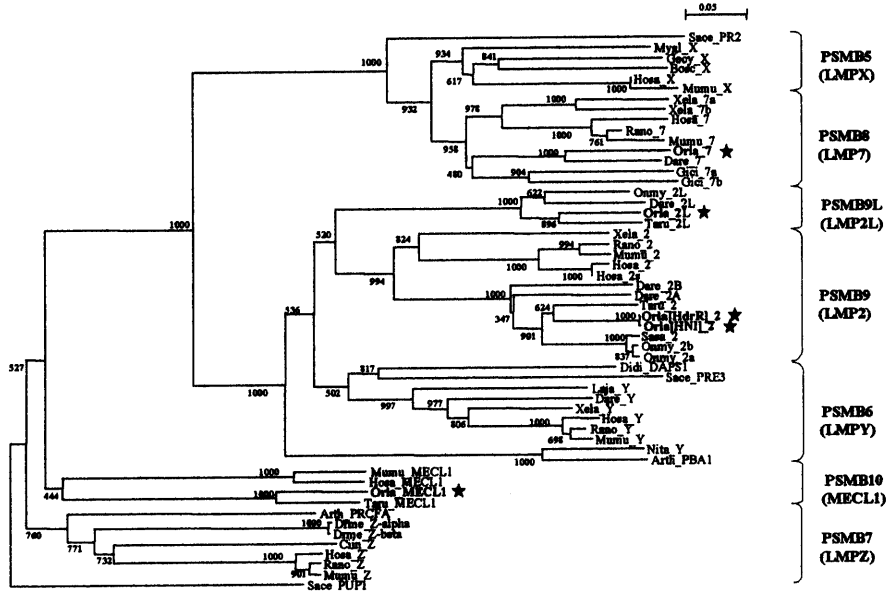
(図 1)



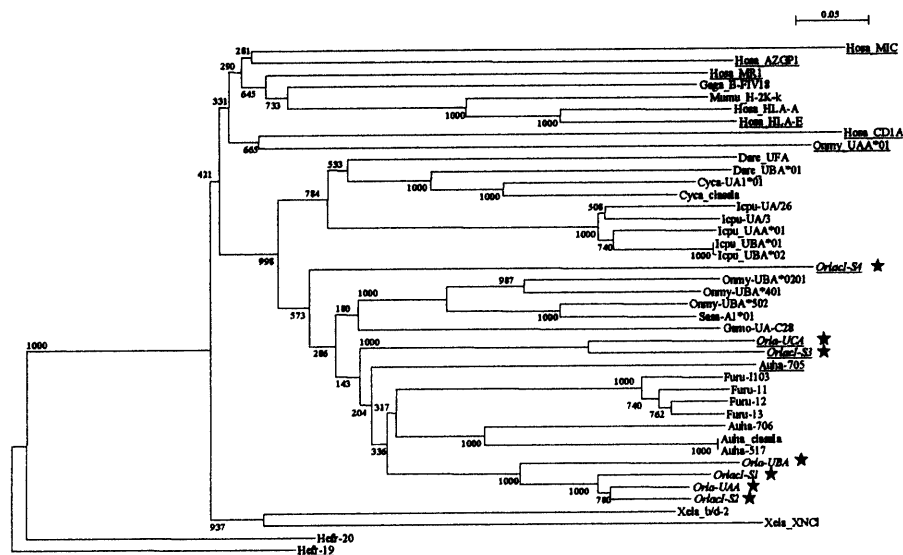
子と、3 個の一部のエクソンを欠失した偽遺伝子が同定された (図 1B)。遺伝子密度は平均 18.5kb に 1 遺伝子と計算され、16kb に 1 遺伝子というヒトMHCの遺伝子密度とほぼ同じであった。ただし、メダカゲノムMHC領域の偽遺伝子の割合は 13%に過ぎず、43%の偽遺伝子を有するヒトMHC領域に比べると発現する遺伝子の密度は高かった。偽遺伝子は全てクラス IA 遺伝子の近傍で見つかり、クラス IA 遺伝子と PSMB8 遺伝子が組になって 3 回縦列重複し、そのうち 2 つの PSMB8 遺伝子と 1 つのクラス IA 遺伝子が偽遺伝子となったことが推測された。

Repeatmasker による反復配列の探索の結果 (図 1C)、15LINE (1.919%)、11SINE (0.937%)、17DNA 転移因子 (0.789%)、69 マイクロサテライト (1.064%)、11 トランスポゾン (7.02%) が同定された。マイクロサテライトは、454b に 1 つの割合で出現することになり、ヒトゲノムでの約 2kb に 1 つの出現に比べると高い頻度で存在していた。Repeatmasker では既知の反復配列しか同定できず、両生類・魚類といった下等脊椎動物の反復配列はあまり知られていないことから、メダカの反復配列の予測には十分機能しない可能性が考えられた。そこで、メダカ特異的反復配列を得るため、北日本集団由来 (HNI 系統) の 1785 の BAC クローンの末端配列と相同性解析を行なったところ、83 にのぼる反復配列が得られ、MHC 領域の 3.237%を占めた。

メダカMHCクラスI領域をゼブラフィッシュ・フグのクラスI領域、およびヒトMHC領域と比較したところ、硬骨魚類間ではMHC領域は遺伝子のメンバーおよび本領域のコンパクトなサイズの2点(約400kb)において高度に保存されていた。硬骨魚類MHCの遺伝子は、PSMB9-like、PSMB10、CIZを除く全てがヒトMHC領域に連鎖していた。PSMB9-like遺伝子は硬骨魚類でのみ同定されており、系統樹作成による比較から、有顎脊椎動物の共通祖先においてPSMB9遺伝子の重複により生じその後四足動物の系統で失われた遺伝子であることが示された(図2)。



(図2) PSMBのアミノ酸配列全長をclustalWによりアライメントした後作成したNJ-Tree。今回MHC領域に同定したメダカPSMBは★印にて示した。



(図3) クラスIAのアミノ酸配列全長をclustalWによりアライメントした後作成したNJ-Tree。下線が付記してあるものは非古典的クラスIA遺伝子。メダカクラスIA遺伝子は★印にて示した。

2. メダカ MHC クラス I 領域に同定された遺伝子

クラス IA 遺伝子

Hd-rR 系統のメダカ MHC 領域には 4 つのクラス IA 遺伝子と 1 つのクラス IA 偽遺伝子が同定された (*OrlacI-S1~S4* ; *Oryzias latipes class I from Southern population*)。これまでに cDNA レベルで同定されたメダカ HNI 系統クラス IA 遺伝子である UAA、UBA、UCA とあわせて解析した。*OrlacI-S1*、*S2*、*OrlaUAA*、*UBA* は古典的クラス IA 遺伝子 (class Ia) に特徴的な構造として、種を越えて高度に保存されている抗原ペプチド結合に重要な 9 つのアミノ酸残基を保持していた。それに対し、*OrlacI-S3*、*S4*、*OrlaUCA* ではいくつかのアミノ酸残基に置換が見られ古典的クラス IA 遺伝子とは機能を異にする非古典的クラス I 遺伝子 (class Ib) であることが示唆された。次いでクラス IA 遺伝子の系統樹作成により解析したところ (図 3)、*OrlacI-S1*・*S2* は *OrlaUAA*・*UBA* と、*OrlacI-S3* は *OrlaUCA* とクラスターを形成した。以上の結果から *OrlacI-S1*・*S2*・*OrlaUAA*・*UBA* は class Ia 遺伝子、*OrlacI-S3*・*S4*・*OrlaUCA* は class Ib 遺伝子であると判断した。すべてのメダカクラス IA 遺伝子は硬骨魚類のクラス IA 遺伝子のクレードに属し、これら class Ia 遺伝子と class Ib 遺伝子との分化は硬骨魚類の系統で起きたと考えられた。哺乳類では MHC に連鎖した class Ib と MHC に連鎖しない class Ib 遺伝子が存在し、class Ib 遺伝子は class Ia 遺伝子とは異なり多様な機能をもつことが知られている。哺乳類以外からの MHC に連鎖した class Ib 遺伝子の同定は本研究が初めてでありその機能に興味もたれる。

CIZ 遺伝子

CIZ (Cas-interacting zinc finger protein) は、ラットで発見されたマトリックスメタロプロテアーゼの発現を上昇させる転写因子であり、8 個の zinc-finger モチーフをもっている。ヒト相同遺伝子は 12 番染色体 (12p13.31) に存在し MHC 領域には連鎖していなかった。これまでに遺伝子構成が解析されたフグ、ゼブラフィッシュの MHC から CIZ は見つかっていない。ただし、完全塩基配列のレベルで硬骨魚の MHC が精査されたのはメダカが初めてであり、CIZ の MHC との連鎖がメダカに特異的なものか、硬骨魚に共通のものかは今後明らかにされるべき課題である。

クラス I 抗原提示に直接的に関与する遺伝子群

硬骨魚類 MHC 領域に特徴的な事は、ヒト MHC 遺伝子のオーソログの多くを含まないにも関わらず、クラス I 抗原ペプチドのプロセッシングおよび輸送に関わる遺伝子を保持している点である。免疫プロテアソームの構成成分と考えられる PSMB8, PSMB9, PSMB9-like, PSMB10, 抗原ペプチドの ER 内部への輸送に関わるトランスポーターである ABCB3、及びトランスポーターとクラス IA 分子の橋渡しをすると考えられる TAPBP をコードする遺伝子がメダカ MHC 領域に連鎖していた。これらは、遺伝子及びペプチド構造上は全く無関係でありながら、クラス I 抗原提示という機能の点で密接に関わっている遺伝子群である。PSMB9-like, PSMB10 以外の上記の遺伝子とクラス I 遺伝子の連鎖は軟骨魚類から哺乳類に至る有顎脊椎動物で保持されている。さらにメダカ MHC 内では、これらの遺伝子が他の遺伝子の介入無しに並んでいることから、クラス I 抗原提示関連の遺伝子群が MHC の中枢部分であることが示唆された。以上の事から、MHC 領域における機能は密接に関係があるものの構造上無関係な遺伝子間の連鎖は、クラス I 抗原提示システムの環境に適応した変化を保証する機構であると考えられた。