

論文内容の要旨

論文題目 Effector Mechanisms and Regulatory Components of the Primitive
Complement System of Ascidians

(尾索動物ホヤ原始補体系の効果機構と活性調節)

氏名 宮澤 清太

補体系は高等脊椎動物において特に感染初期の生体防御に重要な役割を担う自然免疫機構の1つである。哺乳類の補体系は30種以上の因子よりなる複雑なシステムであり、そこでの反応は、非自己である外来病原菌の認識、中心因子C3の活性化と外来異物表面への共有結合、およびそれに続く溶菌作用や貪食促進などの効果機構に大きく分けられる。近年の分子生物学的研究によって、中心因子C3、およびC3活性化経路の複数の因子が棘皮動物のウニや尾索動物のホヤにも存在していることが遺伝子レベルで明らかとなり、補体系が新口動物の進化の初期段階において既に存在していたということが示唆された。高等脊椎動物に見られる獲得免疫のシステムは軟骨魚類の分岐以降に出現したと考えられることから、これらの無脊椎動物および下等脊椎動物において、補体系を始めとする自然免疫が生物個体の生存に果たしてきた役割は小さくないと考えられる。しかしながら、そのような原始補体系の機構、とくに効果機構の詳細については、これまでのところほとんど知見が得られていない。これら原始補体系の機構を解明することは、高等脊椎動物へつづく補体系の進化過程を明らかにする上でも重要である。また、哺乳類の補体系においては、その強力な潜在的攻撃力が誤った活性化によって自己組織の損傷へ向かうことを防ぐため、さまざまな補体制御因子が存在し、厳密かつ適正な活性化の制御に働いている。このよう

な「安全装置」が、いつ、どのような形で獲得されたかという問題も、免疫系の進化を考える上で興味深い。本論文では、脊索動物の中でも進化的に興味深い位置を占める尾索動物のホヤを材料とし、その原始補体系の効果機構と活性調節に関して研究を行った。

第一部 ホヤ体腔液補体成分の溶血活性の検討

哺乳類補体系においては、構造的に類似した C5 から C9 までの一群の後期因子が存在する。これらは C3 の異物表面への結合に引き続いて病原菌細胞膜上で重合し、膜障害複合体を形成して細胞を破壊する（溶菌作用）。その活性はウサギ・ヒツジ等の赤血球を異物として用いた溶血活性として示され、これは哺乳類補体系の主要な活性測定系である。ホヤ補体系の溶血活性について検討するため、非感作ウサギ赤血球を用いてマボヤ体腔液の溶血活性を測定した。ヒト血清の第二経路による溶血活性と比較したところ、約 20%程度と弱いながらも、溶血活性が認められた。しかしながらこのマボヤ体腔液の溶血活性は、熱処理による補体成分の失活や、抗ホヤ C3 抗体を用いた C3 の吸収によっても阻害されなかったことから、補体には依存しない独立の機構によるものであることが明らかとなった。

第二部 ホヤインテグリン α サブユニット遺伝子の単離と機能解析

哺乳類補体系において溶菌作用とともに重要な効果機構が、マクロファージ等の貪食細胞上に存在する補体受容体を介した貪食促進活性である。ホヤ血球細胞上でこの貪食作用を担う分子の同定を目的として、細胞接着分子インテグリンファミリーに属する補体受容体遺伝子の単離およびその機能解析を行った。インテグリンはそれぞれ独立な遺伝子がコードする α と β の2つのサブユニットから構成される膜受容体であるが、ここではまず α サブユニットについて解析した。他種動物インテグリン配列をもとにした相同性 PCR によりマボヤ血球 RNA から2種類のインテグリン α サブユニット遺伝子を単離し、全長配列を決定した。うち1種 (α_{Hr1}) は、哺乳類以外の動物から発見されたインテグリンとしては初めて1ドメイン (VWA ドメイン) と呼ばれる挿入配列を持つものであり、分子系統樹から、哺乳類補体受容体 CR3/CR4 の α サブユニットを含む1ドメイン含有インテグリン α 遺伝子のグループの中で最も古く分岐したものであることが明らかとなった。マボヤ α_{Hr1} mRNA は血球特異的に発現しており、組換えタンパク質に対して作成した抗 α_{Hr1} 抗体を用いた免疫染色によっても、 α_{Hr1} サブユニットがマボヤ血球部分集団の細胞膜上に発現して

いることが観察された。さらに酵母を用いてマボヤ血球の貪食活性を測定したところ、マボヤ体腔液処理によって見られる補体依存性の貪食促進活性が抗 α_{Hr1} 抗体で阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、マボヤインテグリン α_{Hr1} サブユニットがホヤ血球上で哺乳類のCR3/CR4に相当する補体受容体分子を形成していることが示唆された。

第三部 ホヤインテグリン β サブユニット遺伝子の単離と機能解析

続いて、このマボヤ α_{Hr1} と結合してホヤ補体受容体を形成し得るインテグリン β サブユニットを同定するため、マボヤ血球から相同性PCRによってインテグリン β サブユニット遺伝子2種(β_{Hr1} , β_{Hr2})を単離し、全長配列を決定した。分子系統樹から、 α サブユニットの場合と異なり、ほとんどの脊椎動物 β サブユニットは脊椎動物のみでクラスターを形成し、無脊椎動物の β サブユニットはその外側に位置することが明らかとなった。マボヤ β_{Hr1} , β_{Hr2} サブユニットはゲノム配列から推定されたカタユウレイボヤ β サブユニットと1つのクラスターを形成したため、これら β サブユニット遺伝子はホヤの系統で独自に起こった遺伝子重複の結果生じた特殊なものであることが示唆された。一方カタユウレイボヤゲノム配列中にはさらに2種のインテグリン β サブユニット遺伝子が存在しており、うち1種はウニ β とともに無脊椎動物における一般的な β サブユニットのグループに属することが明らかとなった。マボヤ β_{Hr1} , β_{Hr2} mRNAはともにマボヤ血球に特異的な発現が見られた。組換えバキュロウイルスを作成して昆虫細胞上でマボヤ α β サブユニットを共発現させ、抗 α_{Hr1} 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、 β_{Hr1} , β_{Hr2} とも昆虫細胞上で α_{Hr1} と結合していることが明らかとなった。さらに、組換えタンパク質に対して作成した抗 β_{Hr1} 抗体を用いてマボヤ血球の免疫沈降を行ったところ、 α サブユニットと見られるタンパク質が β_{Hr1} サブユニットと共沈した。抗 α_{Hr1} 抗体を用いたウェスタンブロットにより、この α サブユニットが α_{Hr1} であることを確認した。抗 β_{Hr1} 抗体を用いた免疫染色により、 β_{Hr1} サブユニットはマボヤ血球のうち、Phago-amoebocyte, Fusogenic phagocyte, Vacuolated cell等の貪食活性をもつとされる細胞上に発現していることが明らかとなった。これらの観察と第二部の結果から、マボヤ血球上で α_{Hr1} β_{Hr1} インテグリンが補体受容体として機能していることが示された。このことは、原始補体系において既にC3依存性の異物貪食促進作用が存在していたことを示唆するものである。

第四部 ホヤ補体制御因子候補遺伝子の探索

ホヤ原始補体系において活性調節に関わると考えられる因子を探索するため、哺乳類補体制御因子群に共通に見られる特徴的な構造である SCR (Short Consensus Repeat) を指標として、相同性 PCR を用いたマボヤ SCR 含有遺伝子の増幅を試みた。また、マボヤ受精卵 EST データベース (MAGEST データベース) およびカタユレイボヤ EST データベースに対して BLAST 検索を行い、SCR 様配列を持つクローンの探索を行った。さらに、マボヤ肝臓 EST ライブラリを作成し、約 1200 クローンについて 5' 側領域の配列を解析して、補体制御因子遺伝子の探索を行った。これらの結果、マボヤから SCR 配列を持つ 3 つの新規遺伝子(HrSCR-1,-2,-3) を同定した。マボヤ SCR 因子はそれぞれ 5 個、9 個、1 個の SCR を持ち、HrSCR-1 には C 末端側に膜貫通領域と約 380 アミノ酸からなる細胞内領域が存在した。また、HrSCR-2 は C タイプレクチン様領域を、HrSCR-3 は SCR を挟む 2 つの EGF 様配列と C 末の膜貫通領域を持っていた。RT-PCR を用いた発現解析により HrSCR-1 遺伝子はすべての組織で発現が確認されたが、HrSCR-3 遺伝子は鰓嚢、消化腺、生殖腺でのみ発現が見られ、HrSCR-2 遺伝子は肝臓、生殖腺に弱い発現が見られた。HrSCR-1 は、哺乳類の DAF、MCP や近年同定されたニワトリの補体制御因子 Cremp などと構造上の類似性を持ち、すべての組織で発現が見られる膜タンパク質であることから、マボヤ各組織の細胞表面で補体活性化の制御を担っている可能性が高いものと考えられる。この他、カタユレイボヤからも 19 個の SCR よりなる Factor H 様因子を見出した。さらにマボヤからは SCR を含まない別の補体制御因子とされる Clusterin 遺伝子を単離した。Clusterin はこれまで脊椎動物でのみ発見されている糖タンパク質であり、その正確な機能については未知の部分が多い。脊椎動物の Clusterin はさまざまな組織で発現していることが知られているが、マボヤ Clusterin 遺伝子は鰓嚢で顕著な発現が見られた。これらホヤ補体制御因子と推定される因子の機能についてはより詳細な解析が必要であるが、ホヤ原始補体系においても哺乳類と同様の機構によって補体活性の調節が行われている可能性は極めて高いものと考えられる。