

論文内容の要旨

論文題目 Molecular Biological Studies on the Complement Genes of Urochordate Ascidians

尾索動物ホヤ補体系遺伝子群の分子生物学的研究

氏名 山西（吉崎） 史子

補体系は自然免疫の一員で、感染初期の生体防御に重要な役割を果たす。哺乳類では補体系は 30 以上の血清蛋白質および膜蛋白質から構成され、外来異物の認識、中心因子 C3 の限定加水分解による活性化および異物表面への C3 沈着による貪食促進、異物表面での膜破壊複合体形成による溶菌等の生理機能を有する。補体系遺伝子はこれまでに調べられた全ての脊椎動物とウニ、マボヤ、ナメクジウオ、さらにはカブトガニ等の無脊椎動物から同定されており、補体系の起源は前口動物と後口動物の分岐以前に遡ることが示唆されている。また、哺乳類の補体遺伝子には何組もの遺伝子重複の産物と考えられる遺伝子族が存在し、遺伝子重複が補体系の機能拡大に重要な役割を果たしてきたことが示唆されている。系統発生的な研究から、全ての有顎脊椎動物は哺乳類のものとほぼ同じ補体系を有することが判明しつつあるが、それ以前の補体系の進化の詳細は不明のままに残されている。

ホヤの属する尾索動物亜門は、脊椎動物亜門、頭索動物亜門とともに脊索動物門を構成しており、脊椎動物の進化を考える上で貴重な情報を提供しうるグループである。これまでに、尾索動物マボヤから複数の補体遺伝子が単離されており、複数成分よりなる補体系が尾索動物に存在することが示唆されている。しかしながら補体系全体としての進化の様

子を明らかにするために必要な、補体系遺伝子の網羅的な解析は行われていない。本研究では、尾索動物の段階での補体系の全貌を遺伝子レベルで明らかにすることを目的として、ゲノム情報に基づいたヒト補体遺伝子のホヤ・オルソログの網羅的な同定と、補体 B 因子 (Bf) の遺伝子・ゲノム構造の解析を行った。

第一部 カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*) ドラフトゲノム配列からのヒト補体遺伝子オルソログの同定

マボヤ補体遺伝子、ヒト補体遺伝子のアミノ酸配列を問い合わせ配列とした相同性検索、および補体因子に特徴的なドメインの組み合わせを指標とした検索により、カタユウレイボヤゲノムから補体遺伝子の候補を選出した。内柱と胃の cDNA ライブラリを作成しておこなった EST 解析、および京都大学で行われた発生段階をおよびの EST 解析の情報をあわせて遺伝子候補の配列を修正し、アミノ酸配列およびドメイン構造の予測を行った。オルソログの認定は補体遺伝子に固有のドメイン構造、及び ClustalX によるアラインメントに基づいて近隣結合法で作製した分子系統樹により行った。

ほとんど全てのヒト補体遺伝子について、ホヤ・ホモログが存在することが確認された。中心因子 C3 とその近縁分子 C4/C5、セリンプロテアーゼ Bf/C2, セリンプロテアーゼ Mannose binding protein (MBP)-associated serine protease (MASP)1/2/C1r/s, 膜溶解に働く C6/C7/C8/C9 の各遺伝子族 (以下、C3 族、Bf 族、MASP 族、C6 族と略記) については、ドメイン構造だけではなく分子系統樹でも複数のヒト側のメンバーと複数のホヤ側のメンバーの間に明確なオルソログの関係が認められた。一方、異物認識に関わる MBP, C1q, ficolin の各族については、ヒト側のメンバーに補体以外の遺伝子も含まれており、必ずしも明確なオルソログ関係は認められなかった。前者に属するもののなかには哺乳類のものとは比べてドメイン構造が完全に一致するもの(C3 族と MASP 族)と、ドメイン構造が一部異なるものが認められた。ホヤ Bf 族オルソログは N 末側に Short consensus repeat (SCR)、Low-density lipoprotein receptor (LDLR)、SCR の 3 ドメインを余分に持ち、ホヤ C6 族オルソログは C 末側の SCR、factor I MAC(FIM)ドメインを欠いていた。

補体制御因子である I 因子は、FIM, Scavenger receptor, LDLR, Serine protease からなるユニークなドメイン構成を示すが、このドメインの組み合わせはカタユウレイボヤゲノム中には認められず、I 因子はホヤには存在しないと結論された。トリプシン型セリンプロテアーゼのみからなる D 因子、SCR ドメインの繰り返しからなる制御因子についてはドメイン構造の特徴が乏しく、ホヤにも多くのホモログが存在したものの、オルソログの同定

には至らなかった。

多くの遺伝子族についてはホヤに複数の遺伝子の存在が認められたが、分子系統樹による解析からはいずれの分子もカタユレイボヤ単独あるいはマボヤの分子と共に単系統のクラスターをつくり、これらの遺伝子族は尾索動物、脊椎動物の分岐後に、それぞれの系統で独立の遺伝子重複によりメンバーを増やしたことが示唆された。

哺乳類の補体因子のセリンプロテアーゼ (SP) ドメインには、活性中心セリンのコドンが TCN で、触媒ヒスチジンの周囲に保存されたシステイン (ヒスチジンループ) を持つ、トリプシン型 SP に一般的な TCN タイプ (Bf/C2, MASP1) と、活性中心セリンのコドンが AGY、ヒスチジンループを欠き、さらに SP ドメインをコードする領域にイントロンがない AGY タイプ (MASP2,3,C1r/s) があり、後者はこれまでに哺乳類補体 MASP 族のみから見つかっている。カタユレイボヤの MASP は全てが TCN タイプだったのに対して Bf は AGY タイプの配列だがコードする領域にイントロンがあった。この分断エクソンでコードされた CiBf の SP ドメインは、脊椎動物 C1r、C1s、MASP2、MASP3 に見られるイントロンレスの SP ドメインをコードする領域が出来る際にレトロポジションのドナーとなった可能性も考えられる。

以上の結果から、尾索動物でも外来異物の認識、中心因子 C3 の限定加水分解による活性化、膜破壊複合体の形成という各反応に関わる遺伝子が存在することが明らかになり、哺乳類補体系に使われている遺伝子の基本セットは尾索動物と脊椎動物の分岐以前に確立されたことが示唆された。一方、ホヤ C6 族オルソログでは他の補体成分との相互作用に必要と考えられるドメインを欠くことや、認識分子では系統的に哺乳類補体系遺伝子と直接対応が見つからないことなどから、ホヤでこれら遺伝子の産物が一つの系として働いているとは考えにくい。従って、脊椎動物の補体系は、尾索動物との分岐後の遺伝子重複と新たなドメインの獲得により、一つの反応系として完成したものと思われる。一方、カタユレイボヤにおいても補体系遺伝子は独自の遺伝子重複により、哺乳類に匹敵するほど数を増やしており、獲得免疫非存在下でホヤの補体系が独自の発展を遂げたことを示唆している。

第二部 カタユレイボヤ Bf 遺伝子の構造とゲノム構成

哺乳類の MHC(Major Histocompatibility Complex)領域には、リンパ球への抗原提示という獲得免疫の中心的な反応に関与する遺伝子がクラスター構造を形成しており、その遺伝子の並び方は有顎脊椎動物を通じてよく保存されている。このなかのクラス III 領域にヒトでは、補体 C4、C2、Bf の 3 遺伝子が存在し、軟骨魚類サメでも MHC 領域にこれら補

体遺伝子の連鎖があることが明らかになっている。MHC の進化上の起源を明らかにする目的で、リンパ球や抗原提示システムの存在しない尾索動物ホヤで、*Bf/C2* オルソログの詳細な構造解析を行い、*C3/C4/C5* オルソログとの連鎖の有無を検討した。

カタユウレイボヤ EST データベースに対する相同性検索、cDNA ライブラリのスクリーニング、ゲノム配列からの予測に基づく RT-PCR により、3 種の哺乳類 MHC クラス III 補体遺伝子 *Bf* オルソログ、*CiBf-1*、*CiBf-2*、*CiBf-3* を得た。それぞれ、999、998、963 残基のアミノ酸をコードすると予測された。

Bf 遺伝子領域および周辺の塩基配列をゲノムデータベースからの情報及び単離した BAC クローンの解析により決定し、詳細な解析を行ったところ、3 つの *Bf* 遺伝子はゲノムの約 50kb の領域に存在し、遺伝子間で非常に保存性の高い領域がモザイク状に存在することが明らかになった。

タンデムな遺伝子重複により生じたと考えられる 3 つの *Bf* 遺伝子だが、発現様式は 3 遺伝子の間で異なることがノザンブロットィング、RT-PCR の結果から明らかになった。獲得免疫非存在下でホヤの補体系が独自の遺伝子重複によって成分を増やし、発展したという第一部の考察を支持する結果である。

脊椎動物 MHC 領域に存在する補体遺伝子 *Bf*、*C2* のカタユウレイボヤオルソログ *CiBf* と、*C3/C4/C5* のオルソログ *CiC3-1*、*CiC3-2* は連鎖していないことがホヤ初期発生胚から作成した染色体標本を用いた染色体 FISH 法により明らかになった。この結果は両遺伝子の連鎖は、尾索動物の分岐後に脊椎動物の系統で成立したことを示唆する。同じ時期に生じたとされる補体古典経路では、第二経路 C3 転換酵素の *Bf*、C3 からそれぞれ生じたとされる C2 と C4 から C3 転換酵素が構成される。したがって、*C2*、*C4* 遺伝子の連鎖は、重複により生じた両遺伝子が共進化を遂げ新たな反応形を確立することに寄与した可能性が示唆される。

本研究では脊椎動物以外の動物で初めて補体系の全体像を明らかにした。さらに、遺伝子構造の詳細な解析から尾索動物 *Bf* 遺伝子がドメイン・シャフリング、遺伝子重複を経験したこと、*C3* 遺伝子との連鎖を示さないことを明らかにした。以上の結果から、補体系の原型は尾索動物と脊索動物が分岐する以前に確立され、その後、尾索動物と脊索動物の補体系は各々独自の進化を遂げたことが示された。