

論文内容の要旨

論文題目 Evolution of the complement components with unique domain combination structure

(固有のドメイン構造を持つ補体系因子の進化)

氏名 木村 鮎子

哺乳類補体系は、血中自然免疫系において中心的な役割を果たす複雑な生体防御系であり、主に肝臓で作られる約30の因子から構成されている。補体系の活性化には、抗原に結合した抗体分子や病原体表面の多糖などによって引き起こされる、古典経路・第二経路・レクチン経路の3経路が働いている。これらの活性化経路は、基質特異性をもつ一連の補体系セリンプロテアーゼによる蛋白質限定加水分解のカスケードによって進行し、最終的にはいずれも中心成分 C3 分子を活性化する。活性化された C3 は、病原体に共有結合することによってこれを異物として標識し、貪食細胞による貪食反応の促進や、膜障害経路による細胞溶解反応を引き起こす。補体系において中心的な役割を担う因子をコードする遺伝子の多くは、特有のドメイン構造をもつ以下の5つのファミリーに分類される。C3 ファミリー: C3・C4・C5、Factor B (*Bf*) ファミリー: *Bf*・C2、MASP ファミリー: *MASP-1/2/3*・C1-*r/s*、C6 ファミリー: C6・C7・C8-*a/b*・C9、Factor I (*If*) ファミリー: *If*のみ。これらの遺伝子ファミリーは、多細胞動物の蛋白質に見られる様々なドメインが複雑な組み合わせで連なったモザイク型蛋白質をコードしており、エクソンシャプニングによって固有のドメイン構造を獲得した祖先型遺伝子が、さらに遺伝子重複/機能分化を起こして進化してきたものと考えられている。遺伝子重複/機能分化は、進化的な起源の古い自然免疫的な活性化経路から抗体依存的な古典経路を創出し、また膜障害経路を誕生させたと考えられている。しかしながら、補体系の発展に大きく寄与したこれらの分子進化が起きた時期は、明確でなかった。

そこで本研究では、固有のドメイン構造をもつ補体系遺伝子の起源を明らかにするため、中心成分 C3 遺伝子の存在が報告されている動物のうち、哺乳類との分岐が最も古い刺胞動物(二胚葉動物)に着目し、イソギンチャク的一种であるネマトステラ(*Nematostella vectensis*)のゲノム情報に基づく補体系遺伝子の網羅的なクローニング、およびこれらの因子の機能解明を目指した遺伝子発現部位の同定を行った。また、原始的な後生動物である海綿動物・平板動物および系統的にこれらの動物に最も近い単細胞動物とされる、立襟鞭毛虫のゲノム情報の検索もあわせて行った。

次に、哺乳類補体系の形成に重要な役割を果たした各遺伝子ファミリー内での遺伝子重複/機能分化の起きた時期を明らかにするために、進化的に重要な位置を占めながら、これまで補体系遺伝子に関する情報の乏しかった円口類ヤツメウナギ(*Lethenteron japonicum*)に着目し、補体系遺伝子の体系的な探索を行う目的で肝臓 EST 解析を行った。

さらに、これらの動物から見つからなかった C6 遺伝子ファミリーについては、軟骨魚類ホシザメ(*Mustelus manazo*)およびギンザメ(*Chimaera phantasma*)を用いて、C6 ファミリーに共通する配列を元に作成した縮退プライマーによる RT-PCR を行い、その起源の解明を試みた。

<第一章: ゲノム情報に基づく PCR による二胚葉動物ネマトステラ補体系遺伝子の単離と遺伝子発現部位の解析>

ヒト補体系因子のアミノ酸配列を用いて、ネマトステラのドラフトゲノムデータベースに対する BLAST 検索を行った。得られた断片的なゲノム配列を参考に RT-PCR・RACE-PCR を行い、正確な完全長配列を決定した。これらの配列について、固有のドメイン構造とヒト補体系因子において活性に必須であるとされるアミノ酸配列の保存の有無を確認した。また、Clustal X によりこれらの遺伝子と他の動物の補体系遺伝子のアミノ酸配列のマルチプルアライメントを行い、全長配列情報を用いて近隣結合法により分子系統樹を作成し、遺伝子の系統関係を推定した。また、三胚葉動物の補体系因子の分泌部位である体腔・血管に相当する腔所・機能的な循環系を欠く二胚葉動物における、補体系の作用部位を明らかにするために、補体系遺伝子の発現部位の同定を行った。まずネマトステラの成体ポリプを用いて Whole mount *in situ* hybridization (WISH)を行い、さらに WISH サンプルの切片化により発現組織の特定を行った。また、これらの遺伝子の発現時期、発現部位と、病原体構成成分による誘導の有無を明らかにするために、それぞれ RT-PCR を行った。

結果として BLAST 検索により、C3・Bf・MASP ファミリー遺伝子の断片配列を得たが、C6・Ifファミリー遺伝子は見つからなかった。また C3 遺伝子ファミリーについては、C3・C4・C5 遺伝子の重複以前に分岐した A2M・CD109 遺伝子の配列も見つかり、A2M 遺伝子、CD109 遺伝子、および C3・C4・C5 遺伝子の共通祖先型遺伝子の遺伝子重複/機能分化が、二胚葉/三胚葉動物の分岐に先立って生じたことが確認された。また、同様の検索で海綿動物および立襟鞭毛虫のドラフトゲノム配列中には中心成分 C3 を構成するドメインそのものが全く見つからなかったのに対し、平板動物からはドメイン構造および分子系統の点から CD109 遺伝子と思われる配列が見つかった。他の補体系遺伝子ファミリーに関しては、調べた 3 つの動物とも、構成ドメイン自体は見られるものの補体

系因子に固有の組み合わせでは保持していなかった。これらの結果から、補体系が、海綿動物を除いた後生動物(真性後生動物)に固有のものであることが推測された。

得られたネマトステラ *C3-1*, *C3-2*, *Bf-1*, *Bf-2*, *MASP* 遺伝子は、ヒトのオルソログ遺伝子とのアミノ酸アイデンティティーが 12~33%と低いにも関わらず、全ての三胚葉動物の補体系遺伝子に共通する固有のドメイン構造と、補体活性に必須とされるアミノ酸残基をほぼ完全に保持していた。また分子系統解析の結果、ネマトステラの遺伝子を最外群としたとき *MASP* ファミリーについては動物の系統を反映した樹形が得られたのに対し、*C3 \cdot β* ファミリーについては無脊椎動物における *C3 \cdot β* 遺伝子の進化過程が複雑であったことを示す、動物の系統とは矛盾した樹形が得られた。

また WISH-RT-PCR の結果、ネマトステラ *C3 \cdot β* *MASP* 遺伝子は、孵化前の幼生の段階から発現し、成体ポリプでは特に触手先端部の内胚葉と、食物の消化吸収を行う隔膜系に共通して発現すること、病原体構成成分によって発現誘導を受け発現部位が内胚葉全体に拡大することが分かった。内胚葉特異的な発現パターンは、これらの因子が体外ではなく、二胚葉動物唯一の腔所である胃体腔や触手内腔に分泌される可能性が高いことを示した。また、補体系遺伝子の発現が特に触手の先端や貪食細胞の局在する隔膜系に限局されていることは、これらの部位が明確に分化した循環系を持たない二胚葉動物の補体系の主要な機能部位であることを示唆した。

<第二部：円口類ヤツメウナギの肝臓 EST 解析による補体系遺伝子の網羅的な単離>

脊椎動物の補体系遺伝子の主要な発現部位である肝臓の RNA をヤツメウナギから単離し、これを元に 2 種の cDNA ライブラリを作成して、計 12,483 クローンの塩基配列を解読した。これらをクラスタリングしたものを BLAST 検索にかけて遺伝子を同定し、新規補体系遺伝子については RACE-PCR で完全長配列を決定した。得られた補体系遺伝子についてドメイン構造を確認し、また、全長アミノ酸配列を他の動物の補体系因子のアミノ酸配列とアラインして近隣結合法による分子系統樹を作成し、遺伝子ファミリー内での系統関係を推定した。

結果として、3 種の *C3* 様遺伝子を 103 クローン、2 種の *Bf* 様遺伝子を 26 クローン、*MASP* 様遺伝子を 7 クローン、*If* 様遺伝子を 3 クローン得たが、*C6* 様遺伝子は見つからなかった。

得られた *C3* 様遺伝子配列と他の動物の *C3* ファミリー遺伝子のアミノ酸配列を Clustal X によりアラインし、全長配列を用いて分子系統樹を作成すると、軟骨魚類サメの *C3*, *C4*, *C5* 遺伝子はそれぞれ哺乳類 *C3*, *C4*, *C5* 遺伝子を含むクレードに入るのに対し、ヤツメウナギ *C3* 様遺伝子は全て *C3* 遺伝子のクレードに入り、*C4*, *C5* 遺伝子のクレードに入るものは 1 つもなかった。哺乳類の *C4*, *C5* の血中濃度は *C3* の 1/2, 1/20 程度であることから、*C3* 遺伝子のみが 103 クローン得られた今回の結果は、円口類に *C4*, *C5* 遺伝子が存在しない可能性の高いこと、*C4*, *C5* 遺伝子の誕生につながる遺伝子重複/機能分化は有顎脊椎動物の系統で起きたことを示唆した。*Bf*, *MASP* 遺伝子ファミリーについても同様の結論が得られた。これまでの遺伝子・蛋白質レベルでの研究により、軟骨魚類には重複/機能分化後のタイプの補体系遺伝子が一通り揃っていると考えられるため、今回の解析から、全ての補体系遺伝子ファミリーにおける遺伝子重複/機能分化は、有顎脊椎動物の

系統において、円口類の分岐後、軟骨魚類の分岐前に起きたことが示唆された。

また、*If*・*C6* 遺伝子ファミリーが尾索動物のゲノム中に存在しないことと今回の EST 解析の結果とを統合すると、*If* 遺伝子・*C6* ファミリー遺伝子はそれぞれ円口類の分岐前・分岐後の脊椎動物の系統で出現したものと考えられた。

<第三部：軟骨魚類サメの *C6* 遺伝子のクローニングと一次構造解析>

二種のサメおよびヤツメウナギの肝臓 RNA を鋳型として、*C6* ファミリー分子内で保存されているアミノ酸配列を参考に作成した縮退プライマーを用いて、RT-PCR を行った。

結果として、ホシザメから *C6*、ギンザメから *C8B* に相同性をもつ部分遺伝子配列がそれぞれ得られたが、ヤツメウナギからは *C6* ファミリー遺伝子が全く得られなかった。RACE-PCR により決定されたホシザメ *C6* 遺伝子の全長配列からは、活性化した他の補体系成分との相互作用に関わる CCP・FIM ドメインを含む、ヒト *C6* と完全に一致するドメイン構造が予測された。このことから、補体系の活性化に連動した膜障害経路に関わる *C6* の機能が軟骨魚類でも保存されていることが示唆された。また、これら 2 つの配列および既報のコモリザメの *C8A* 遺伝子を他の動物の *C6* ファミリー遺伝子とアラインして分子系統樹を作成すると、サメの 3 つの *C6* ファミリー遺伝子はいずれも 100% のブーツストラップ値でそれぞれ対応する哺乳類遺伝子のクレードに分配された。これらの結果から、軟骨・硬骨魚類の分岐以前に、補体系膜障害経路を誕生させた *C6* ファミリーの出現と遺伝子重複が完了していた可能性が示された。

<結論>

固有のドメイン構造を持ち、補体系活性化カスケードの基本骨格を成す *C3*・*Bf*・*MASP* の少なくとも 3 因子からなる補体系の起源は非常に古く、二胚葉/三胚葉動物の分岐前に遡ること、二胚葉動物ではこれらの因子が胃体腔内における独自の生体防御系を構成する可能性の高いことが分かった。これら 3 因子から構成され、自然免疫的な 2 つの活性化経路と病原体のオプソニン化を中心とする原始的な補体系は、一部の旧口動物などでは二次的に失われている一方で、新口無脊椎動物においては広く保存されている。

その後、哺乳類へと至る脊椎動物の進化過程において、尾索動物の分岐後・円口類の分岐前に制御因子 *f1* が出現し、補体系活性化の厳密な制御が可能になったと考えられる。さらに円口類の分岐後・軟骨魚類の分岐前に膜障害経路因子 *C6* の出現、*fB*・*MASP* のセリンプロテアーゼドメインの構造特化、および全ての補体系遺伝子ファミリー内での遺伝子重複/機能分化という 3 つのイベントが集中して起こり、原始的な補体系にさらに 2 つの経路、古典的経路と膜障害経路をつけ加えたことが分かった。免疫グロブリン、MHC 分子、T 細胞受容体遺伝子の出現による獲得免疫系の誕生と同時期に起こったこれらのイベントは、それまでの自然免疫的な原始補体系を、獲得免疫系とも連動するより複雑で洗練された哺乳類型の補体系へと転換させたと思われる。