

## 論文内容の要旨

論文題目 The polymorphism and evolution of the MHC class I region genes of a teleost medaka,

*Oryzias latipes*

### メダカ MHC クラス I 領域遺伝子の多型と進化

氏名 塚本 健太郎

獲得免疫は高度な特異性を特徴とする生体防御システムであり、抗原認識に関与する主要な遺伝子は有顎脊椎動物にのみ存在する。主要組織適合性抗原複合体 (MHC) は獲得免疫において中心的な役割を果たす多くの遺伝子が集積した領域であり、軟骨魚類から哺乳類に至るまで有顎脊椎動物の進化過程を通してその基本構造は保存されている。しかしながら硬骨魚は例外で、MHC 遺伝子は複数の染色体上に分散している。にもかかわらず MHC クラス IA 遺伝子とそのクラス I 抗原提示系に直接関与する遺伝子 (*ABCB*, *PSMB*, *TAPBP*) は密接に連鎖し MHC クラス I 領域を形成している。免疫機能に関連した遺伝子が集積する MHC 領域がいかにか形成されたかは進化上興味深い問題であり、硬骨魚 MHC の構造解析はその解明の手がかりを与えることが期待される。

メダカ *Oryzias latipes* は、遺伝的な大きな隔たりを有する北日本集団、南日本集団、東韓集団及び中国-西韓集団から構成されている。修士課程においては、メダカ近交系 HNI 系統 (北日本集団由来) の MHC クラス I 領域の塩基配列 (約 540 kb) を決定し、Hd-rR 系統 (南日本集団由来) の既知配列との比較を行ない、MHC クラス IA 遺伝子 (*UAA* と *UBA*) とこの抗原提示系に直接関与する免疫プロテアソームサブユニット遺伝子 (*PSMB8* と *PSMB10*) を含む約 100 kb の亜領域が、他の脊椎動物 MHC では知られていない驚異的な塩基配列の違いを系統間で示すことを明らかにした。

本研究ではメダカ MHC クラス I 領域の進化過程を明らかにする目的で、メダカ野生集団を用いて近交系間で著しい塩基配列の違いを示した亜領域に存在する *PSMB8*、*PSMB10*、MHC クラス IA 遺伝子について多型解析を行い、更にメダカ近縁種を用いてメダカに認められた *PSMB8* と *PSMB10* の二型性の起源を探った。また、メダカ *PSMB8* 分子の二型間での機能的な差異を検証するため、プロテアソームのプロテアーゼ活性測定を行った。最後に、有顎脊椎動物における *PSMB8* の二型性の起源と進化を明らかにするため、既存の EST データも用いた *PSMB8* の blast 検索及び分子系統解析を行った。

### 第一部 メダカ野生集団を用いた *PSMB8*、*PSMB10* 及び MHC クラス IA 遺伝子の多型解析

*PSMB8* は第 1 エクソンと第 6 エクソン上に、*PSMB10* は第 1 エクソンと隣接する *PSMB8* の第 2 エクソン上に設計したプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型として増幅した。メダカ野生集団は北日本集団から 3 地点、南日本集団から 6 地点、中国-西韓国集団から 1 地点を選び、合計 1245 個体について PCR を行い、各

集団内で得られた PCR 産物をバンドサイズでタイピングし、各サイズのバンドの全塩基配列を決定した。コード領域より推定されたアミノ酸配列を用い NJ 法により分子系統樹を作成した結果、*PSMB8* と *PSMB10* は N 型 (HNI 系統に固定) か d 型 (Hd-rR 系統に固定) のいずれかに明確に分類され、この二型は北日本、南日本、中国-西韓国集団全てに確認された (図 1)。また、解析した全ての個体において同型の *PSMB8* と *PSMB10* が常に連鎖しハプロタイプとして二型 (N 型と d 型ハプロタイプ) を示し、各野生集団において d 型ハプロタイプが高頻度 (73-100%) で存在していた。以上の結果からメダカ *PSMB8* と *PSMB10* は二型性を示し、この起源はメダカの各集団の分岐以前に遡ることが示された。

MHC クラス IA 遺伝子でも同様に二型性を示し、*PSMB8/PSMB10* と特定の組み合わせでハプロタイプを形成しているか否か検証した。*UAA* と *UBA* の  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  ドメインをコードする第 2、第 3 のエクソンの多型を新潟集団 (北日本集団) と前沢集団 (南日本集団) について解析した。アミノ酸配列 (150 残基) を用い NJ 法により分子系統樹を作成した結果、*UAA* と *UBA* は多型性を示し、明確な二型性は認められなかった (図 2)。

また、*PSMB8* と *PSMB10* を含む領域の二型の維持機構として組換え抑制の可能性を検証した。共に北日本集団由来の近交系 HNI (N 型ハプロタイプが固定) と Kaga (d 型ハプロタイプが固定) の F1 と HNI との戻し交配個体 1088 個体での組換えを観察した。この結果、隣接する約 100 kb の領域では組換えが確認されたにもかかわらず、*PSMB8* と *PSMB10* を含む約 100 kb の領域では組換えが一例も観察されなかった。

## 第二部 メダカ属 *PSMB8/PSMB10* 領域の二型の起源

メダカ属内での *PSMB8/PSMB10* 領域の二型性の進化過程を明らかにするためメダカ近縁種 *O. celebensis* (190 個体)、*O. marmoratus* (106 個体)、*O. matanensis* (106 個体)、*O. javanicus* (60 個体) 及び *O. dancena* (150 個体) の野生個体についてメダカと同様な方法により *PSMB8* の多型解析を行った。メダカ属は *latipes*, *celebensis*, *javanicus* グループの 3 つの種群からなり *celebensis* と *javanicus* グループが姉妹群であることが示唆されており、上記 5 種は *celebensis/javanicus* グループに、メダカは *latipes* グループに属す。*O. dancena* を除く解析した全ての種でメダカ同様に *PSMB8* の二型が確認され (図 3A)、野生集団では d 型が高頻度 (60-100%) で存在した。また、*O. celebensis*、*O. marmoratus*、*O. matanensis* では *PSMB10* の二型も確認され (図 3B)、*PSMB8* と *PSMB10* がハプロタイプとして二型性を示した。以上のことから、*PSMB8* と *PSMB10* の二型はメダカ属内での種分化に先行して生じ、平衡選択により種を越えて受け継がれてきたことが示された。また、*PSMB8* の二型間では切断特異性を規定する S1 ポケットを形成する 31 と 53 番目の残基に置換が見られ、*PSMB10* の二型間では S1 ポケットを形成する残基は一致していた。

## 第三部 メダカ *PSMB8* 分子の二型間におけるプロテアーゼ活性

哺乳類 *PSMB8* はキモトリプシン様のプロテアーゼ活性を有し、MHC クラス I 分子によって細胞傷害性 T 細胞へ提示される抗原ペプチドの C 末端残基を決定している。また IFN-g により発現誘導され、構成的に発現している *PSMB5* と置換しプロテアソームに取り込まれ、免疫プロテアソームを形成する。まず、*PSMB8* の発現を誘導するため、メダカ組換え IFN-g (rIFN-g) を作製した。2 種のメダカ培養細胞、HNI lot2 (N 型が固定) と Hd-rRe3 (d 型が固定)、では *PSMB5* と *PSMB8* の RNA 発現量の割合はそれぞれ 2:1、1:0 であったが rIFN-g 添加後 48 時間で、1:4、1:1 とそれぞれ *PSMB8* の発現量が上昇した。また、クラス I 抗原提示系に関与する他の遺伝子も rIFN-g により発現誘導されることが硬骨魚で初めて確認された。そこで、rIFN-g 添

加 120 時間後のプロテアソームのプロテアーゼ活性を添加前と比較することで、PSMB8 分子によるプロテアーゼ活性の変化を検証した。培養細胞の可溶化液をグリセロール密度勾配遠心により 32 画分にわけ、それぞれの画分の合成基質に対するプロテアーゼ活性を測定した。その結果、キモトリプシン様活性基質である Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA に対する活性が IFN-g 添加後の Hd-rRe3 細胞では上昇したが、HNI lot2 細胞では減少した。一方、Z-Val-Lys-Met-MCA に対する活性は、IFN-g 添加後の両細胞では上昇した。以上のことから、基質の C 末端側残基の側鎖の大きさによって、PSMB8 の二型間でキモトリプシン様活性に差異があることが示唆された。

#### 第四部 有顎脊椎動物における PSMB8 遺伝子の二型性の起源と進化

メダカ属で認められた *PSMB8* の二型の起源を明らかにするため、メダカ属と同じダツ目に属すサヨリ、*Dermogenys montanai*、の野生個体 (67 個体) について *PSMB8* の多型解析を行った。第 2 から第 3 エクソンに渡る領域をゲノム PCR により増幅し、第 3 エクソンにコードされる 31 番目の残基を指標としてタイピングを行った結果、全ての配列が Ala または Val を有し、メダカで認められた Tyr は確認されなかった。また、硬骨魚各種の EST データを用い *PSMB8* の blast 検索を行った。この結果、コイ目のゼブラフィッシュとドジョウ、サケ目のニジマスとサケから既知配列 (31 番目残基が Ala) に加え、新たな配列 (31 番目残基が Phe) が確認された (図 4)。また *PSMB8* の二型性は、硬骨魚メダカ以外にも両生類 *Xenopus* と軟骨魚サメでもその存在が報告されており、31 番目残基が Ala または Phe である (図 4)。有顎脊椎動物の *PSMB8* のコード領域 (591 bp) を用いて最尤法により分子系統樹を作製した結果、サメとコイ目/サケ目の 31 番目残基が Phe である配列を含むクレード (F 型) と、それらの 31 番目残基が Ala である配列、メダカと *Xenopus* の二型配列及び哺乳類配列を含むクレード (A 型) が形成された (図 5)。この系統樹から有顎脊椎動物の共通祖先で二型 (F 型と A 型) が確立され、サメと一部の硬骨魚で両型が維持されており、メダカや *Xenopus* の二型は F 型を一度失ったあと A 型からそれぞれの系統で再び二型性を確立したことが示唆された (図 5)。また、ゲノム PCR と交配実験によりゼブラフィッシュでは F 型と A 型が対立遺伝子であることが明らかとなった。一方、ドチザメとネコザメではゲノム PCR と RT-PCR により F 型と A 型のそれぞれの遺伝子座が存在し、二型がパラローガスであることが確認された。

#### まとめと考察

今回、メダカとその近縁種の野生集団を用いた解析及びプロテアソームのプロテアーゼ活性測定により初めて以下のことを明らかにした。(1) *PSMB8* と *PSMB10* がハプロタイプを形成して二型性 (N 型と d 型) を示すこと、(2) メダカ属内でその二型が平衡選択により種を越えて数千万年に渡り維持されてきたこと、(3) 野生集団内では d 型が N 型に比べ高頻度で存在すること、(4) 二型間では、基質の C 末端残基の側鎖の大きさによってキモトリプシン様活性に差異が見られることを含めて二型性の詳細を明らかにすることができた。また分子系統解析により、有顎脊椎動物の共通祖先で *PSMB8* の二型 (F 型と A 型) が確立され、サメとコイ目/サケ目で両型が維持されており、メダカや *Xenopus* の二型は F 型を一度失ったあと A 型から再びそれぞれの系統で二型性を確立したことが示唆された。*PSMB8* 遺伝子の二型性が、哺乳類を除く解析の行われた有顎脊椎動物に存在することから、この二型に基づいた抗原認識が有顎脊椎動物におけるクラス I 抗原提示系の基本であると思われる。

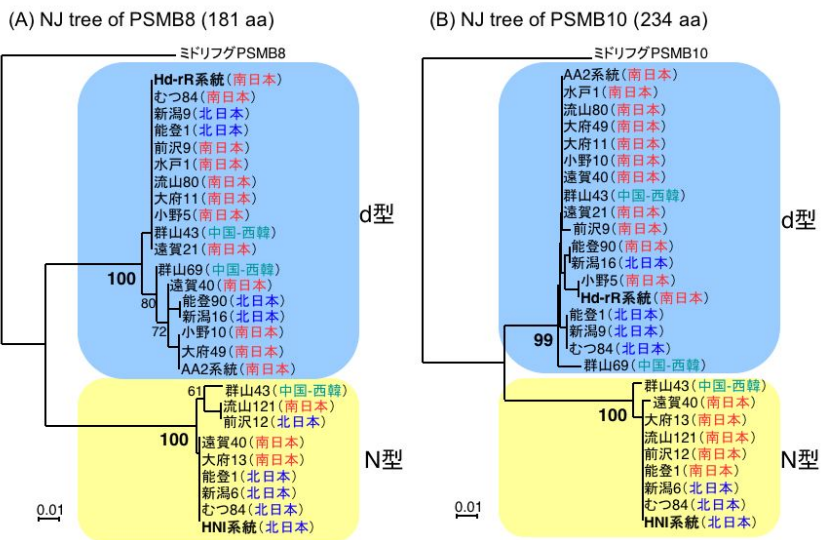


図 1. メダカ野生集団の PSMB8 (A) と PSMB10 (B) の分子系統樹

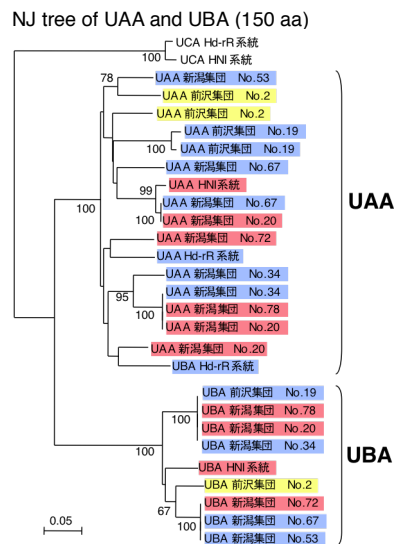


図 2. メダカ野生集団における UAA と UBA の分子系統樹 *PSMB8/PSMB10* が d 型または N 型のホモ接合体、ヘテロ接合体由来の配列をそれぞれ青、赤、黄色で示した。

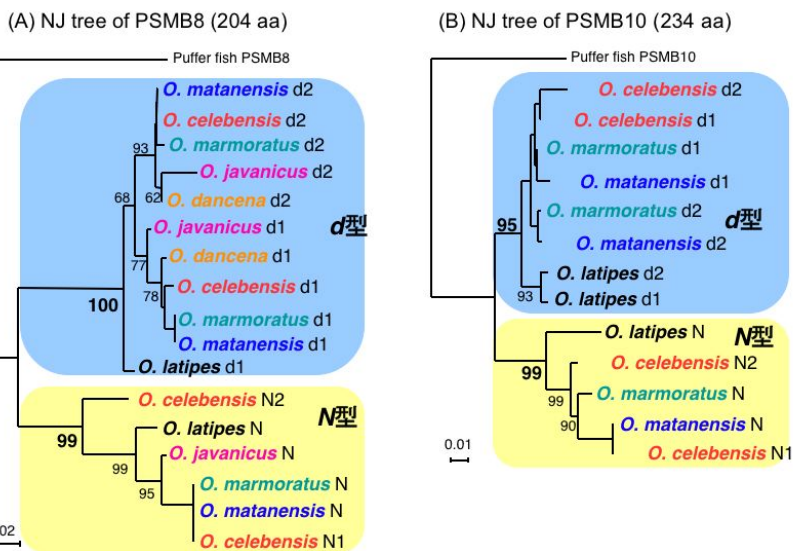


図 3. メダカ属における PSMB8 (A) と PSMB10 (B) の分子系統樹

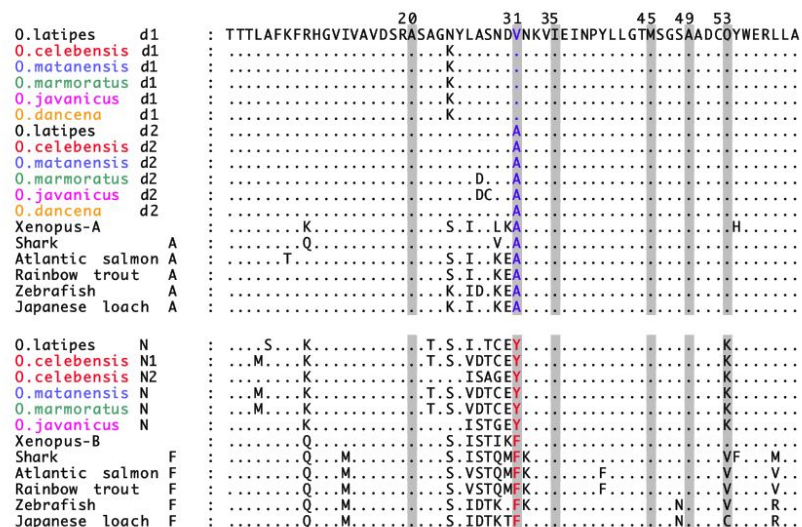


図 4. PSMB8 のアミノ酸配列のアライメントの一部。S1 ポケットを形成する残基を灰色で、その位置を数字で示した。31 番目残基について d 型/A 型は青で N 型/F 型は赤で示してある。

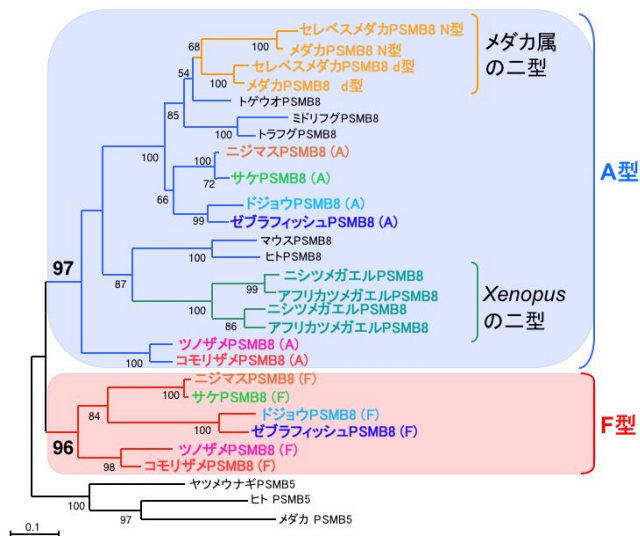


図 5. 有顎脊椎動物における PSMB8 の分子系統樹