

論文審査の結果の要旨

氏名 塚本 健太郎

本論文は四部からなる。第一部では、メダカ野生個体を用いた免疫プロテアソームサブユニット遺伝子 (*PSMB8* と *PSMB10*) と MHC クラス IA 遺伝子の多型解析が、第二部ではメダカ近縁種における *PSMB8* と *PSMB10* の多型解析が述べられている。第三部では、メダカ属 *PSMB8* 二型間の機能的差異が、第四部では、有顎脊椎動物における *PSMB8* の二型の起源と進化が述べられている。

第一部では 10 地点から採取されたメダカ野生集団、合計 1245 個体を用い *PSMB8*、*PSMB10* 及び MHC クラス IA 遺伝子の多型解析が行われた。アミノ酸配列を用いた近隣接合法により分子系統樹を作成した結果、野生集団の *PSMB8* と *PSMB10* は N 型か d 型のいずれかに明確に分類され、この二型は解析された集団全てに確認された。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。一方、2つの MHC クラス IA 遺伝子 (*UAA* と *UBA*) は多型性を示し、*PSMB8/PSMB10* のように明確な二型性は認められなかった。以上のメダカ野生個体を用いた大規模な多型解析の結果は、硬骨魚類の *PSMB8* と *PSMB10* が二型性を示すことを初めて明らかにしたものと高く評価できる。

第二部ではメダカ属内での *PSMB8/PSMB10* 領域の二型性の進化過程を明らかにするため、5 種のメダカ近縁種の野生個体を用い *PSMB8* の多型解析が行われた。その結果、1 種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、野生集団では d 型が高頻度 (60-100%) で存在した。*PSMB10* の二型も解析された 3 種全てで確認され、*PSMB8* と *PSMB10* がハプロタイプとして二型性を示した。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* の二型間では一致していた。以上の解析結果は、*PSMB8* と *PSMB10* の二型はメダカ属内での種分化に先行して生じ、種を越えて数千万年に渡って受け継がれてきたことを明らかにしたものと評価できる。

第三部では、二型性を示すメダカ *PSMB8* の機能解析が行われた。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、メダカ培養細胞である HNI 細胞 (N 型が固定) と Hd-rR 細胞 (d 型が固定) の *PSMB8* の発現を誘導することを確認した。そこで、rIFN-g 添加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* によるプロテアーゼ活性の変化を検証した。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-rR 細胞では上昇したが、HNI 細胞では減少した。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され、*PSMB8* の二型間での機能的な差異を初めて明らかにした点が高く評価される。

第四部では、各種硬骨魚の EST データを用い *PSMB8* の blast 検索を行い、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。メダカ、両生類 *Xenopus* と軟骨魚サメの既知の二型配列に加え、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。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。以上の解析結果は、*PSMB8* の二型の起源と進化過程を明らかにし、その二型の一般性を示した点が高く評価できる。

なお、本論文第一部は、酒泉満ら 6 名との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。