

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Evolution of allelic dimorphism of the immunoproteasome subunit beta-type 8 gene (*PSMB8*) in the gnathostome MHC region.

(顎口類 MHC 領域に存在する免疫プロテアソーム  $\beta$  8 サブユニット遺伝子 (*PSMB8*) の二型性の進化)

氏名 藤戸 尚子

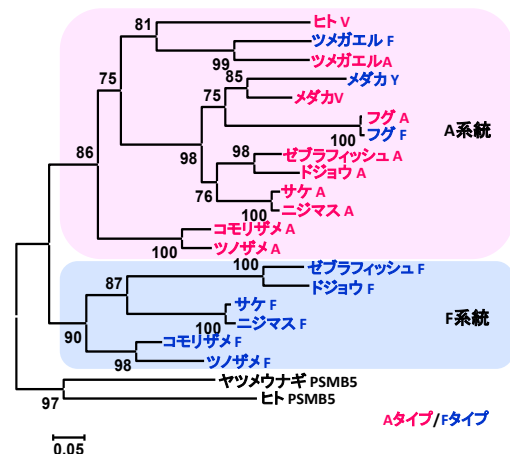
#### はじめに

獲得免疫は顎口類の共通祖先において確立された生体防御システムであり、そこではリンパ球による抗原の認識を契機として様々な体液性、細胞性の免疫反応が引き起こされる。細胞内在性抗原は、細胞質中の免疫プロテアソームによる断片化を受けた後、MHC クラス I 分子によって細胞表面に提示され、MHC 分子ごと T 細胞レセプターに認識される。免疫プロテアソームは顎口類のみに見られるプロテアーゼ複合体であり、全ての真核生物が共有する構成型プロテアソームの三つの活性サブユニット (PSMB5、PSMB6、PSMB7) が、インターフェロン $\gamma$ によって誘導される近縁なサブユニット (PSMB8、PSMB9、PSMB10) に置き換えられることにより形成される。免疫プロテアソームは構成型に比べ、キモトリプシン様活性が上昇しており、MHC クラス I 分子による提示に適した、疎水性アミノ酸を C 末端にもつペプチドを効率的に切り出すことが知られている。

サメ (Kandil et al. 1996)、ゼブラフィッシュ、ドジョウ、サケ、ニジマス、メダカ (Miura et al. 2010)、フグ、及びツメガエル (Nonaka et al. 2000) の *PSMB8* には二つのタイプが存在することが明らかとなっている。これは、S1 ポケットを形成し基質特異性を決定する 31 番目のアミノ酸残基として、アラニンやバリンなど比較的側鎖の小さな疎水性アミノ酸をもつ A タイプと、フェニルアラニンなど側鎖の大きな芳香族アミノ酸をもつ F タイプの二つであり、異なる C 末端をもつペプチドを生成すると考えられる。これらの配列に基づいた系統樹 (図 1) は *PSMB8* 遺伝子が以下に述べるような独特の進化を遂げていることを示唆した。

① *PSMB8* には、顎口類の共通祖先で確立され、一部の動物により現在まで受け継がれている二つの系統が存在する。図 1 において、サメ、ゼブラフィッシュ、ドジョウ、サケ、ニジマスの *PSMB8* 遺伝子は、A タイプと F タイプに分かれてクラスターを形成しており、これを A 系統と F 系統とよ

図 1. 既知の *PSMB8* 遺伝子の系統樹



ぶ。

②二系統の遺伝子はアリル/パラログ間の移行を少なくとも一度経験している。サメの二系統の遺伝子は独立した別個の遺伝子（パラログ）であるのに対し、ゼブラフィッシュの二系統は対立遺伝子（アリル）として存在することがゲノム PCR によって示されている。

③F 系統の消失、F タイプの回復がそれぞれ独立に複数回起きている。図 1 において、メダカとツメガエルの二タイプの *PSMB8* 遺伝子は A 系統のクラスターの中にそれぞれ独立にクラスターを作っている。これらの動物では、F 系統が失われ、A 系統の遺伝子から、F 系統に似た機能的特性をもつ F タイプの遺伝子が再生されたと思われる。メダカとツメガエルの二タイプの遺伝子はアリルの関係にあることが先行研究により示されている。

そこで本研究では、5 億年以上保存されている *PSMB8* 遺伝子の二つの系統に注目し、その進化過程の全容を理解することを目標とした。まず、進化的に重要な位置にある動物を用いて、この二系統の *PSMB8* 遺伝子を探索し、そこではアリル/パラログのいずれであるのかを明らかにすることにした。

## 第一章 A/F 二系統のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) *PSMB8* 遺伝子についてのアリル/パラログの検討

ゼブラフィッシュを含むコイ目から 3 億年ほど前に分岐したとされるサケ目に属するニジマスについては、二系統の *PSMB8* 遺伝子配列がデータベースに登録されている。しかし、ニジマスではゲノムの四倍体化に伴って *PSMB8* 遺伝子座も重複していることが知られており、これら二系統の遺伝子相互の関係は明らかになっていない。本研究では、ニジマスの二系統の *PSMB8* 遺伝子がいずれかの遺伝子座にアリルとして存在する可能性を検討するため、ゲノム PCR による解析を行った。データベースに登録されているニジマスの二系統の *PSMB8* 配列をもとに、イントロンを挟むエキソンに各系統に特異的なプライマーを作成し、これを用いて五組のペアのゲノム PCR を行い、得られたバンドの長さ、及びイントロン配列の違いにより次世代におけるアリルの分離を見ることができると期待される二組のペアを選び出した。この二組のペアの次世代個体を各々 41 個体と 40 個体用いて同様のゲノム PCR を行い、ニジマスの二つの *PSMB8* 遺伝子座の一方は配列の相同性の高い A 系統のアリルに占められていること、もう一方では A 系統と F 系統の遺伝子がアリルとして期待される頻度で分離していることを示した。二系統の *PSMB8* 遺伝子はコイ目（ゼブラフィッシュ）とサケ目（ニジマス）の共通祖先において既にアリルとして確立されており、平衡淘汰により約 3 億年の間維持されてきたことが示唆された。

## 第二章 古代魚ポリプテルス (*Polypterus senegalus*) の *PSMB8* 遺伝子の単離、及びアリル/パラログの検討

平衡淘汰が更に長期にわたる可能性を検証するため、現存の条鰭類の中で、最も早期に分岐したとされる古代魚、ポリプテルスの *PSMB8* 遺伝子の単離を試みた。他動物の *PSMB8* 遺伝子配列をもとに、両系統を増幅し得る縮退プライマーを設計し、ポリプテルスの脾臓から抽出した total RNA を鋳型に RT-PCR を行うことにより、31 番目のアミノ酸としてフェニルアラニンをもつ F タイプと、バリンをもつ A タイプの二種類の遺伝子断片を得た。RACE 法により cDNA の全長配列を決定し、系統解析を行ったところ、この 2 種類の *PSMB8* は A/F 二系統のそれぞれに属することが判明した（図 2）。この二系統の遺伝子がアリルであるのか、パラログであるのかを検討するため、同じペアを親とする 27 個体のポリプテルスの

ゲノム PCR を行ったところ、二系統の遺伝子はアレルとして期待される頻度で分離した。これにより、二系統の *PSMB8* 遺伝子は条鰭類の共通祖先において既にアレルとして確立されていたことが示唆された。これまでに知られてきた、平衡淘汰によって維持されてきたとされる<種を超えて保存された多型> (Trans-species polymorphism, TSP) の存続期間は、最長のものでも数千万年程度である。これに対し本研究は、種どころか<亜綱>を超えて、約 4 億年にわたって平衡淘汰により維持されてきたと考えられる二型の存在を示した。

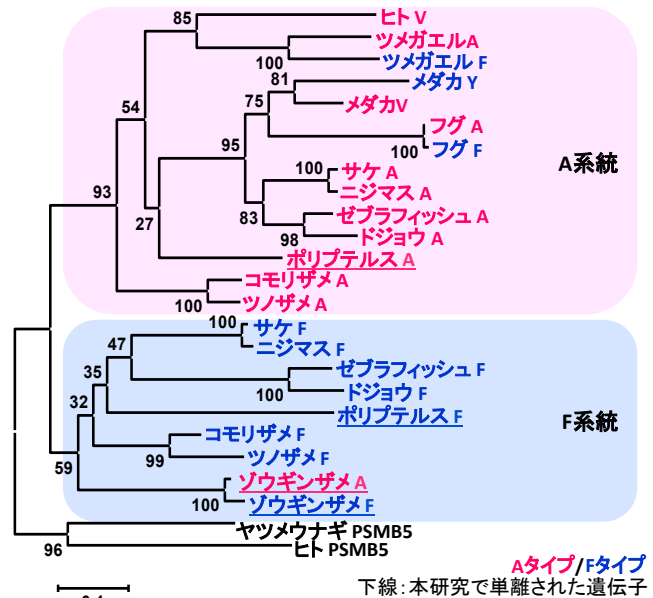


図 2. *PSMB8* 遺伝子の系統樹

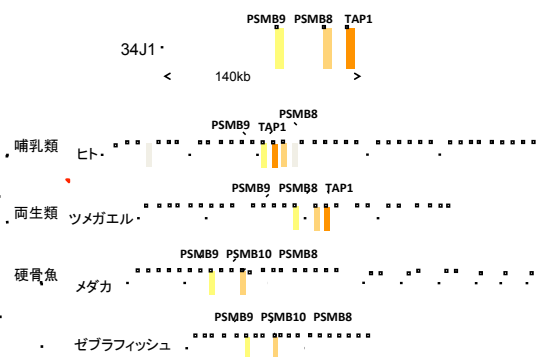
### 第三章 ポリプテルス、及びゼブラフィッシュの MHC 領域の解読

二系統の *PSMB8* アレルが組換えによる均質化を受けることもなく長期にわたり維持されるには、なんらかのゲノム構造上の基盤を必要とするはずである。本研究ではポリプテルスとゼブラフィッシュについて、それぞれ二系統の *PSMB8* アレルに連なるゲノム領域を解読、比較することを計画した。

*PSMB8* 遺伝子は、MHC 領域とよばれるゲノム領域に存在することが知られている。MHC 領域は、免疫関連遺伝子が高密度に存在する領域であり、その基本構造は、軟骨魚類のサメからヒトに至る顎口類の各系統において保存されている。硬骨魚のみは例外で、MHC 遺伝子が異なる染色体上に分散しているが、その硬骨魚においても、*PSMB8* 遺伝子などクラス I の抗原提示に直接関わる遺伝子と、MHC クラス I 遺伝子は緊密に連鎖し、硬骨魚の MHC クラス I 領域を形作っている。

ゼブラフィッシュについては A 系統のアレルを含む MHC 領域の配列が既に解読されているため、本研究ではゼブラフィッシュの F 系統、及びポリプテルスの A/F 系統の *PSMB8* 遺伝子近傍のゲノム配列を決定することにした。現在、F 系統の *PSMB8* 遺伝子を含む約 140kb のポリプテルス BAC クローン (34J1) の解読が終了したところである。この結果、このクローン上には、*PSMB8* 遺伝子を挟む位置に *PSMB9* 遺伝子と *TAP1* 遺伝子が存在することが判明した。この配置はこれまでに MHC 領域の構造が知られている硬骨魚とは大きく異なり、ツメガエルにおける並び方と一致する (図 3)。ポリプテルスは条鰭類におけるゲノム倍加以前に分岐した動物であるとも言われており、MHC 領域における遺伝子の配置が上位の条鰭類とは大きく異なることが考えられる。

図 3. ポリプテルス BAC クローン (34J1) と他の顎口類 MHC 領域の比較



### 第四章 ゾウギンザメ (*Callorhynchus milii*) の *PSMB8* 遺伝子の単離、及びアレル/パラログの検討

二系統の *PSMB8* 遺伝子の祖先型がアレルとパラログのいずれであるのかを知るために、パラログであ

ることが判明しているドチザメ、及びコモリザメの属する板鰓類とは4億2千万年前に分岐したとされる全頭類のゾウギンザメを解析した。ポリプテルスと同様の手法により、31番目にフェニルアラニンをもつFタイプとアラニンをもつAタイプの二種類の *PSMB8* 遺伝子の部分配列を得、その cDNA 配列全長を決定した。これをもとに系統解析を行ったところ、この二つの遺伝子はいずれも F 系統に属するという予想外の結果を得た (図 2)。ゾウギンザメは A 系統を消失し F 系統から A タイプを回復したと考えられる。18 匹のゾウギンザメ野生個体を用いてゲノム PCR を行い、この二タイプの遺伝子はアリルであるとの結論を得た。全頭類のゾウギンザメで板鰓類と全く異なる結果が得られたため、軟骨魚類の共通祖先における二系統の *PSMB8* 遺伝子の存在態様を推測することはできなかった。しかしながら、一系統の喪失と残る系統からの二型の復元が、ゾウギンザメにおいても起きているという知見は、各所で二型を生み出す *PSMB8* 遺伝子の興味深い進化が顎口類全体に及んでいることを示している。

### 結論 (図 4)

顎口類の共通祖先で確立された二系統の *PSMB8* 遺伝子は軟骨魚類・板鰓類のサメ、下位の条鰭類であるポリプテルスやニジマスで今日まで伝えられていた。5 億年にわたって維持されてきたこの二系統の遺伝子はサメではパラログとして存在するものが、ポリプテルス、ニジマスではアリルとして存在することが本研究により示された。これにより、二系統のアリルとしての起源は条鰭類の共通祖先まで遡ることができ、その後約 4 億年という長期にわたって平衡淘汰によって維持されてきたことが示唆された。

軟骨魚類・全頭類のゾウギンザメでは A 系統は失われ、同様の機能的特性をもつ A タイプのアリルが F 系統内で回復されていた。同系統に属する二タイプをもつ動物は他に、メダカやフグ、ツメガエルが知られており、*PSMB8* 遺伝子の二型性保持に向けた強力な選択圧の存在が示唆される。

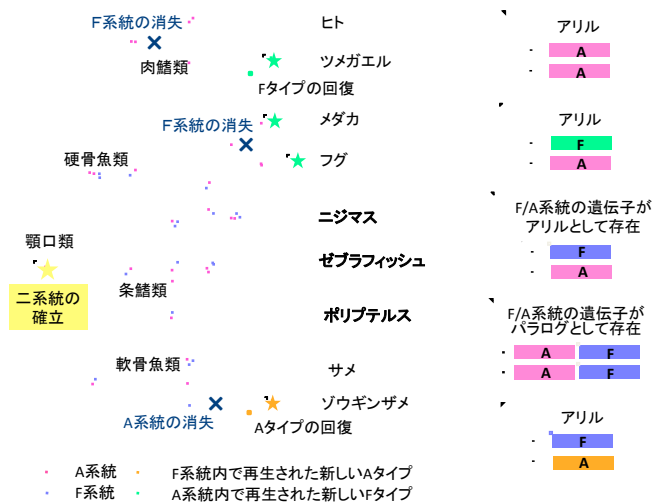


図 4. *PSMB8* 遺伝子の進化過程