

ゲノム再構成の制御機構

●名川 文清 ◆西住 裕文

東京大学大学院理学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

本研究課題では、哺乳類における2大受容体遺伝子ファミリーである抗原受容体および嗅覚受容体遺伝子ファミリーに着目し、これらがいかんして形成され、現在その機能を高度に発揮しているのかを明らかにすることを目的とした。抗原受容体多重遺伝子に関しては、遺伝子の発現と多様性の発揮に重要な働きをするV(D)J組み換えの分子機構を中心に解析した。このDNA組み換えは、108を越える抗原の多様性を102オーダーの受容体遺伝子を使っていかに識別するのかという、免疫成立におけるパラドックスを解くkeyメカニズムとして極めて重要である。本研究では、この組み換えの分子機構解明を目指し、組み換え複合体の構造と機能について解析を進めた。

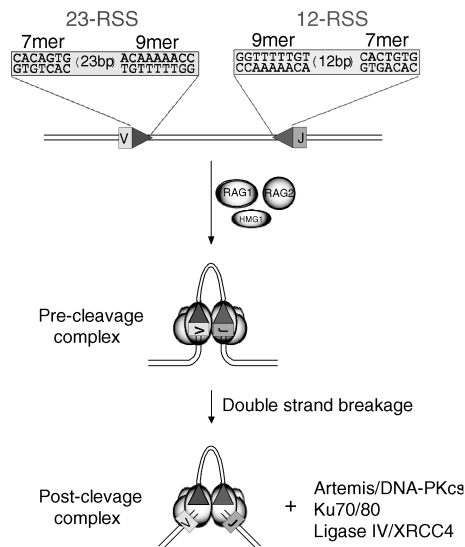
一方、嗅覚受容体多重遺伝子に関しては、この受容体遺伝子ファミリーがいかんして形成され、現在その機能を高度に発揮しているのかを明らかにすることを目的とした。哺乳類には103オーダーの嗅覚受容体 (odorant receptor:OR) 遺伝子が存在し、個々の嗅神経細胞においてはこれらの中から一種類のOR遺伝子が選ばれて発現することが示されており、進化の過程でOR遺伝子がどのようにしてリガンドや軸索投射の特異性を維持しながら、現在のクラスターを形成してきたのかは極めて興味深い問題となっている。本研究では、OR遺伝子の構造を比較することによりこの問題に取り組んだ。

1) 抗原受容体遺伝子

免疫系においてゲノム情報は積極的に再構成され最大限に利用されている。このゲノム再構成に大きく関わるのが抗原受容体遺伝子に見られるV(D)J組み換えである。V(D)J組み換えは、抗原受容体遺伝子の多様化と活性化に重要な役割を担っている。V(D)J組み換えは、脊椎動物の進化の過程で抗原受容体遺伝子に偶然挿入されたトランスポゾンの切り出し反応を利用したものと考えられ、他のトランスポゾンなどとの間に様々な類似点が見出される。この組み換えでは、V, D, Jの各セグメントに隣接する組み換えシグナル配列(RSS)が基質として働き、RSSは2つのコンセンサス配列、7mer (CACAGTG)と9mer (ACAAAAACC)、更にこれらを隔てる12bpあるいは23bpのスペーサーから構成される。V(D)J組み換えは12bpのスペーサーをもつ12-RSSと23bpのスペーサーをもつ23-RSSの間でのみ生じ、同じ長さのスペーサーを持つRSSどうしの組み換えは起こらない(12/23スペーサールール)。一方、V(D)J組み換え酵素に関してはRAG1及びRAG2タンパク質が知られている。これらのタンパク質は、組み換え酵素の主要因子として働くことが明らかにされ、組み換え酵素の実態と組み換えプロセスの解明が進んできている。我々は、V(D)J組み換えの前半に焦点をあてて研究を進め、RAG/RSS複合体のフットプリント解析、9merシグナルとHinホモドメインの相互作用、DNA湾曲タンパク質HMG1の役割等につ

いて独自の成果を挙げてきた。本研究では、12/23ルールを満たす高次複合体の解析を更に進め、高次複合体の構造を解析することを目指した。

V(D)J recombination



2) 嗅覚受容体遺伝子

哺乳類には、約千個の嗅覚受容体 (odorant receptor:OR) 遺伝子がクラスターをなしてほぼすべての染色体に見いだされる。個々の嗅神経細胞においてはこれらの中から一種類のOR遺伝子が選ばれて発現する。また、OR遺伝子の種類と嗅神経細胞の投射先に相関のあることが示されており、進化の過程でOR遺伝子がどのようにしてリガンドや軸索投射の特異性を維持しながら、現在のクラスターを形成してきたのかは極めて興味深い問題となっている。本研究では、OR遺伝子の構造を比較することによりこの問題に取り組んだ。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 抗原受容体遺伝子に見られるV(D)J組み換えの分子機構を解析するため、組み換え酵素と組み換え基質との高次複合体の構造を解析する。
- 3) OR遺伝子に関してマウスおよびヒトのゲノム情報を利用して比較ゲノム解析を行う。

〈研究期間の成果〉

本研究課題では、抗原受容体多重遺伝子系と嗅覚受容体多重遺伝子系に関する研究について以下の様な成果を挙げる事が出来た。

1. 12/23ルールを満たすRAG/RSS高次複合体の形成には、7merシグナルが重要な役割を果たす (Nagawa et al., 2002.)
V(D)J組み換えが一般のトランスポゾンと異なる点は、7merの存在であり、12/23ルールという組み換え基質の

組み合わせに対する制約である。我々は、切断前および切断後に形成される12-RSS/RAGと23-RSS/RAGが対合した高次複合体を磁気ビーズで分離精製する事に成功した。これらの複合体をフットプリント法により解析したところ、単一のRSSを含む一次複合体の場合とは対照的に、この高次複合体では、9merに加えて7merとRAGタンパク質との間に強い相互作用が検出された。更に、この7merとRAGの相互作用が高次複合体を維持しており、7merを起点にして12/23ルールを満たす位置に9mer配列があるかどうかをスキャンされている事が示された。これらの結果は、12/23ルールの分子レベルでの裏付けが初めて具体的に示されたという点で極めて興味深い。

2. 嗅覚受容体遺伝子の中には進化の過程で遺伝子変換を起こしたものがある (Nagawa et al., 2002)

進化の過程でOR遺伝子がどのようにしてリガンドや軸索投射の特異性を維持しながら、現在のクラスターを形成してきたのかは極めて興味深い問題となっている。我々は、ヒト及びマウスのゲノムを比較することにより、OR遺伝子が進化の過程で遺伝子変換 (gene conversion) を起こし、リガンドの特異性を維持してきた可能性を示すデータを得た。遺伝子変換は嗅覚系の進化を考える上で今後重要なファクターになると考えられる。

3. RAGのjoining mutantは切断後coding末端を複合体中に保持できない (Nagawa et al., 2004.)

これまでRAGと基質との相互作用は、RSSを中心に様々な報告がなされてきたが、coding領域については殆ど調べられていなかった。我々は切断後に形成されるpost-cleavage複合体を再構成し、フットプリント法により解析したところ、coding領域にも十数塩基対にわたって強いRAGとの相互作用があることを見出した。興味深いことに、RAGの結合変異体では、RAGとcoding endとの相互作用が低下しており、coding末端をpost-cleavage複合体中に保持できないことが明らかとなった。これらの結果から、RAGとcoding領域との相互作用が基質の切断後も複合体内で保持され、coding末端の3'末端プロセシングやcoding joint (CJ)の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

示すことが出来た。遺伝子変換は嗅覚系の進化を考える上で今後重要なファクターになると考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉
特になし

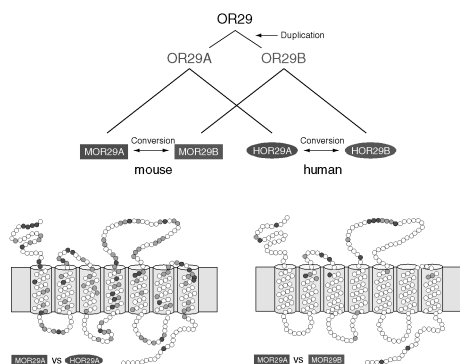
〈今後の課題〉

- 1) V(D)J 組み換え高次複合体のX線結晶構造解析
- 2) 種々の生物のゲノム情報を利用した嗅覚受容体遺伝子の比較ゲノム解析

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0301250944
Nagawa, F., Kodama, M., Nishihara, T., Ishiguro, K., and Sakano, H. (2002). Footprint Analysis of Recombination Signal Sequences in the 12/23 Synaptic Complex of V(D)J Recombination. *Mol Cell Biol* 22, 7217-7225.
2. 0301250949
Nagawa, F., Yoshihara, S., Tsuboi, A., Serizawa, S., Itoh, K., and Sakano, H. (2002). Genomic analysis of the murine odorant receptor MOR28 cluster: A possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. *Gene* 292, 73-80.
3. 0409091624
Nagawa F, Hirose S, Nishizumi H, Nishihara T and Sakano H. (2004). Joining mutants of RAG1 and RAG2 that demonstrate impaired interactions with the coding-end DNA. *J.Biol.Chem.* 279: 38360-38368.

Gene Duplication and Conversion in the OR-gene Cluster



〈国内外での成果の位置づけ〉

- 1) 高次複合体のフットプリントは本研究によって初めて示され、今まで検出が困難であった7merとRAGタンパク質の強い相互作用が観察された。12/23ルールを理解するために重要な成果だと考えられる。これらの成果に関しては、2003年1月のKeystone Symposium "B Cells and Antibodies: Laboratory to Clinic"でワークショップの演題として採択された。
- 2) OR遺伝子系において遺伝子変換が起こった可能性を