

無顎類のゲノムと免疫系

● 笠原 正典

北海道大学大学院医学研究科

<研究の目的と進め方>

メクラウナギとヤツメウナギによって代表される無顎類は、脊椎動物の一員でありながら、顎をもった脊椎動物とは、多くの点で根本的に異なっている。本計画では、この差異を比較ゲノム学的アプローチにより明らかにする。具体的には、メクラウナギ類に属する日本産ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* を主として用いることにより、以下の2課題に取り組む。

1) 2R (two-round) ゲノム重複仮説 (論文3, 4) を検証するためのモデル領域として、ゲノムパラロジを示す典型領域であるMHC (主要組織適合遺伝子複合体) 領域を選び、BACクローニングにより、MHC前駆領域のゲノム構造を解析する。これにより、無顎類と有顎類ではゲノムの複雑性が異なることを実証する。

2) 免疫系遺伝子の解析として、①再構成能を有する新規抗原レセプター様遺伝子VLR (variable lymphocyte receptor)、②リンパ球抗原レセプターの祖先と目されるAPAR (agnathan paired receptors resembling antigen receptors) 遺伝子群の詳細なゲノム解析を行う。さらに、マイクロアレイ解析により、免疫刺激によって誘導される白血球発現遺伝子を網羅的に同定する。これらの研究により、無顎類の免疫系が顎をもった脊椎動物のそれとは大きく異なっていることを明らかにする。

<2007年度の研究の当初計画>

1) *E. burgeri* のゲノム解析

2R ゲノム重複仮説を検証するためのモデル領域としてMHC領域を選び、BACクローニングと2006年度に開発したFISH法を用いて、*E. burgeri* のMHC前駆領域を解析する。BACクローンは、2004年度に作成したBACライブラリーより単離する。

2) 無顎類の免疫系の解析

① Leucine-rich repeats (LRR) をmoduleとして遺伝子再構成を行う抗原レセプター遺伝子VLR (VLR-A, VLR-B) のゲノム構造機能解析を行う。これにより、VLRが膨大な多様性を生み出すゲノム基盤を解明する。さらに、あらたに同定されたVLR様遺伝子について解析を進める。

② リンパ球抗原レセプターの祖先と目されるAPAR多重遺伝子族のゲノム構造解析・発現解析・染色体局在決定を行う。本年度はBACクローンを用いたゲノムレベルでの構造解析、染色体局在決定、特異的抗体の作製、タンパク質レベルでの解析を行う。

3) メクラウナギ Para-Hox クラスターの解析 (オックスフォード大学 Peter Holland 教授との共同研究)

4) ウミヤツメ *Petromyzon marinus* のゲノム解析

ヤツメウナギ類に属するウミヤツメのゲノム解析が進行中である。Annotation teamの一員として参加し、免疫系とゲノム重複について解析する。

<2007年度の成果>

1) *E. burgeri* ゲノムにおけるMHCパラロガス領域の解析

まず、*E. burgeri* 血球の metaphase spread を用いたFISH法を開発した (北海道大学 創成科学研究機構ゲノムダイナミクス研究部門 松田洋一教授との共同研究、論文2)。次いで、BACクローンをプローブとして、FISH法によりMHCパラロガス領域アンカー遺伝子のマッピングをおこなった。この結果、*E. burgeri* ゲノムには少なくとも2個のパラロガス領域が存在することを示唆する結果を得た。パラロガス領域1にはRXR、BRD、PBX、TN遺伝子が、パラロガス領域2にはTN、BAT1遺伝子が存在する。したがって、無顎類のゲノムでは少なくとも1回のゲノム重複が起きていることが示唆された。さらに、10個程度のアンカー遺伝子をマッピングする予定である。

2) *E. burgeri* VLR の解析

無顎類の抗原レセプターであるVLRはT/B cell receptor以外で遺伝子再構成をおこなうことが示された唯一の脊椎動物遺伝子である。VLRの多様性はLRR moduleの組換えによって生み出され、有顎類の抗原レセプターであるT/B cell receptorと構造的類似性をもたない。われわれは、1) VLRがヤツメウナギのみならず、ヤツメウナギとは5億年以上前に分岐したと考えられる*E. burgeri*にも存在すること、2) ヤツメウナギには1コピーしか存在しないVLR遺伝子が、*E. burgeri*には2コピー (VLR-A遺伝子とVLR-B遺伝子) 存在すること、3) ヤツメウナギのVLRは、*E. burgeri*のVLR-Bに相当すること、4) *E. burgeri*においてもヤツメウナギにおけると同様、germlineのVLR遺伝子は蛋白質をコードする能力をもたない不完全な構造をしていること、5) VLR-A、-B遺伝子は同一染色体上の離れた部位に位置していることを明らかにした (Alabama大学 Max D. Cooper 教授との共同研究)。さらに、韓国 KAIST の Jie-Oh Lee 准教授との共同研究により、*E. burgeri* VLR-A、-B分子の結晶化に成功し、その構造を決定した。1) VLR-A、-B分子はLRRファミリーに特有の構造

を有していること、2) VLR-A, -B 分子の立体構造は互いによく似ていること、3) VLR 分子は多様な LRR 配列を有するにもかかわらず、そのフレームワーク構造は非常によく保存されていること、4) VLR は凹面で抗原を認識すると考えられることなどを明らかにした (論文 1)。これらはいずれも世界初の研究成果である。

3) ナメクジウオの免疫系遺伝子、特に LLR module を有する遺伝子族の網羅的解析

ナメクジウオのドラフトゲノム配列を使用して、LLR module を有する遺伝子族の網羅的解析をおこなった。ナメクジウオでは VLR と類似した構造をもった intronless LRR-containing genes がきわめて多数存在することが明らかになった。これらの遺伝子は生体防御において重要な役割を果たしていることが示唆された。

4) メクラウナギ Para-Hox クラスターの解析

2種のメクラウナギ *E. burgeri* と *Myxine glutinosa* の ParaHox gene cluster をコードする BAC クローンを単離し、詳細なゲノム配列解析をおこなった。その結果、メクラウナギは他の脊椎動物と異なり、*Xlox* 遺伝子を欠損していることが判明した (論文 5)。

<国内外での成果の位置づけ>

無顎類はゲノム進化、免疫系の進化を理解する上で重要な位置を占める生物である。われわれは、早くから無顎類の重要性に着目し、そのゲノムと免疫系に焦点を当てて、研究を進めてきた (Trends Immunol. 25, 105-111, 2004)。本研究計画は、これらの実績に立脚し、比較ゲノムの観点から、無顎類のゲノムならびに免疫系の包括的理解を目指すものである。国内はもとより、国際的にも無顎類を対象とする研究者は少なく、オリジナリティの高い貢献が可能である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ウミヤツメ *P. marinus* のゲノムプロジェクトは現在なお進行中であり、免疫系遺伝子の annotation を開始するには至らなかった。また、APAR 分子に対する抗体を 2007 年度に作成する予定であったが、時間的な制約のため達成できなかった。

<今後の課題>

E. burgeri ゲノムにおける MHC パラロガス領域の解析に関しては、FISH 法によるマッピングをできるだけ迅速におこない、MHC パラロガス領域がいくつ存在するのか結論を出したい。VLR 遺伝子ファミリーに関しては、今後は機能的な解析を視野に入れ、入手しやすく飼育が容易であるヤツメウナギ *Lethenteron japonica* を用いて解析を進めていく予定である。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0701121206

Kim, H. M., Oh, S. C., Lim, K. J., Kasamatsu, J., Heo, J. Y., Lee, H., Yoo, O. J., Kasahara, M. and Li, J.-O.: Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. J. Biol.

Chem. 282, 6726-6732 (2007).

2. 0701291210

Kasamatsu, J., Ishijima, J., Matsuda, Y. and Kasahara, M.: Two variable lymphocyte receptor genes of the inshore hagfish are located far apart on the same chromosome. Immunogenetics 59, 329-331 (2007).

3. 0707110745

Kasahara, M.: The 2R hypothesis: An update. Curr. Opin. Immunol. 19, 547-552 (2007).

4. 0707110801

Kasahara, M.: Polyploid origin of the human genome. In: D. N. Cooper and H. Kehrler-Sawatzki (eds.): Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Chichester, UK, DOI: 10.1002/9780470015902.a0005071.pub2 (2007).

5. 0801110934

Furlong, R. F., Younger, R., Kasahara, M., Reinhardt, R., Thorndyke, M. and Holland, P. W. H. A degenerate ParaHox gene cluster in a degenerate vertebrate. Mol. Biol. Evol. 24, 2681-2686 (2007).

2) データベース/ソフトウェア

なし