

比較ゲノム解析に基づくヒト MHC 領域の進化形成過程の解明

●椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

<研究の目的と進め方>

本研究課題ではヒトゲノムにおける進化形成過程を追跡するモデル領域として、主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) 領域の比較ゲノム解析を遂行している。この領域はヒトの MHC 領域 3.6 Mb の場合、遺伝子密度が極めて高く、進化学上保存されている遺伝子や免疫学上重要な遺伝子を多く含むこと、100 を超える疾患感受性を規定すること、ヒトゲノムで最高の多型を有すること、遺伝子重複の痕跡が多く観察されることなど、生物学から医学までの多岐に渡る重要な特徴を数多く有しており、ゲノムの動態や多様性を効率良く解析するには最適な領域である。脊椎動物門に位置する進化学的に興味深い 14 生物種間におけるこれまでの比較解析の結果、それらの基本的な遺伝子構造はよく保存されているが、それぞれの生活環境に適応するための MHC や MHC 関連遺伝子の birth and death により形成されてきたこと、MHC 遺伝子の誕生は脊椎動物の誕生時期と一致すること、ヒトとチンパンジーやマウス、ラットにおけるゲノム相違など数多くの知見を報告してきた。そこで本研究課題ではこれらの知見をさらに展開させるために、(1) MHC 領域のゲノム配列を決定すること、(2) 得られたゲノム配列と既知のゲノム配列情報を含めて、比較ゲノム解析に必要な情報を抽出することにより、現在のヒトの MHC 領域に至るまでの進化形成の過程を明確にすることを目的とする。

<2007 年度の研究の当初計画>

本研究課題では、ヒトと比較的近縁であり、霊長類 (マーモセット、キツネザル) ならびにオキゴンドウをはじめとするその他の生物種 MHC 領域の BAC コンティグを作成し、それらのクローンのゲノム配列を決定する。次いで、得られたゲノム配列と既知の配列情報を含めて、比較ゲノム解析に重要な情報を抽出することにより、ほ乳類 MHC 領域におけるゲノムの保存性や遺伝子重複の過程を表示する比較ゲノム地図を完成させ、MHC 領域のゲノム進化の過程について考察することを計画する。比較解析の際の具体的な手法としては、系統樹による遺伝的距離の推定や多様性プロファイルによる相同性解析をおこなう。特に最近形成されたであろう遺伝子重複領域間の比較には、ドットマトリックス解析や反復配列を用いた比較解析を用いる。

<2007 年度の成果>

1) ほ乳類 MHC 領域の比較ゲノム解析

MHC 領域のゲノム配列が完全あるいはほぼ決定されており、かつ公的データベースに登録されているほ乳類 11 種の比較ゲノム地図を作成した。この地図における顕著な特徴の一つとして、オポッサムを除く 10 種では MHC クラス II 領域の構造はよく保存されているのに対して、MHC クラス I 領域は種に特有な構造を有することが挙げられる。当初、ほ乳類では古くからヒトとマウスのみの MHC 領域の遺伝子地図が知られていたため、その他のほ乳類にも各クラス I 領域 (MHC-A/-G/-F 領域、MHC-

E/-L 領域、MHC-B/-C 領域) にクラス I 遺伝子を有すると考えられていた。ところが、ブタ、ウシ、イヌ、ネコの MHC-A/-G/-F 領域には発現クラス I 遺伝子は認められないことから、元々この領域にはクラス I 遺伝子は存在せずに、後にマウス、ラットや霊長類にクラス I 遺伝子が誕生したと推定された。二番目の特徴として、ほ乳類の MHC 領域内に動原体や転座点が観察された。すなわち、ブタではクラス II 領域とクラス III 領域の境界に、ネコではクラス I 領域の TRIM26 遺伝子近傍にそれぞれ動原体が存在し、イヌでは同じく TRIM26 遺伝子近傍に転座点が存在する。霊長類のレムールにおいても、この TRIM26 遺伝子近傍を境に他の染色体上への転座が認められるが、動原体形成や転座を引き起こす配列や構造は不明である。これらに対して、約 120 個の非 MHC 遺伝子については種間にてよく保存されていた。

2) 霊長類 MHC 領域の比較ゲノム解析

カニクイザル MHC (Mafa)

ヒト MHC 領域を網羅する合計 54 個の PCR プライマーセットを設計し、それらを用いてカニクイザル BAC ライブラリーをスクリーニングした。その結果、計 114 個の陽性クローンが得られ、これらクローンの詳細なマッピングより、4.3 Mb の BAC コンティグが得られた。その後、ヒト、チンパンジー、アカゲザルなどの霊長類との多様性について非 MHC 遺伝子ならびに MHC クラス I 遺伝子に分けて実施した。その結果、Mafa-A/G/F 領域と Mafa-B 領域を除けば、ヒト、チンパンジー、アカゲザルの間でゲノム構造がよく保存されていた。この保存領域に位置する 34 個の非 MHC 遺伝子におけるアカゲザル、ヒト、チンパンジーとの多様性は塩基配列レベルでそれぞれ 0.48%、4.15% および 4.10% であり、これらは既知の報告と矛盾しなかった。一方、Mafa-A/G/F 領域と Mafa-B 領域における多様性解析から、2 個、2 個、2 個、1 個、10 個、2 個の Mafa-A、-AG、-G、-F、-B、-E 遺伝子座をそれぞれ同定した。これらのうち、Mafa-AG、-G、-B 遺伝子座の数は近縁種であるアカゲザルよりも極めて少なかったことから、マカク属サルには、HLA-DRB 領域のように MHC クラス I 遺伝子の増減に起因する MHC ハプロタイプの存在が示唆された。

マーモセット MHC (Caja)

上記の PCR プライマーセットを用いて、マーモセット BAC ライブラリーをスクリーニングした結果、120 個の陽性クローンが得られ、これらの位置関係から MHC クラス I 領域の MOG 遺伝子から MHC クラス II 領域の RXRB 遺伝子までの約 4.2 Mb を網羅する BAC コンティグを作成した。MHC クラス I 領域の重複領域はヒトの 3~4 倍の長さを有していたが、この領域除いたクラス I、クラス II およびクラス III 領域はヒト、チンパンジー、アカゲザルと比較してよく保存されていた。また、プローブとして用いた 28 遺伝子の PCR 産物の塩基配列を決定し、その他の霊長類との塩基配列レベルにおける相同性解析をおこなった結果、マーモセットはヒト、チンパンジー、アカゲザルともに平均 6% の違いを有していた。この値は既知の報告 (11% ± 5%) と矛盾し

なかった。

クラス I 遺伝子についてはアカゲザル同様に高度な遺伝子重複が認められた。すなわち、Caja-B 領域における 1.1 MB の BAC シークエンシングから、少なくとも 10 個のクラス I 遺伝子の存在が示唆されており、これらのうち、発現可能な構造を有する 6 個の Caja-B 遺伝子における RT-PCR 解析から、いずれとも mRNA の発現が認められず、これらは非古典的な機能あるいは偽遺伝子である可能性が考えられた。アカゲザルの MHC-B 領域は基本的に MHC-B 遺伝子を含む約 70 kb を 1 ユニットとした 19 回の縦列重複により形成されているのに対して、マーモセットでは 20 ~ 40 kb を 1 ユニットした縦列重複により形成されているようである。興味深いことに、すべての Caja-B 遺伝子の CDS は 8 個のエクソンから構成されるのに対して、アカゲザルでは 8 個と 7 個のエクソンから成るクラス I 遺伝子が混在しており、ヒトやチンパンジーではすべて 7 個のエクソンから構成される。このことから、MHC-B 祖先遺伝子は 8 個のエクソンから構成されていたが、ヒトに至る過程でこの遺伝子が欠落し、代わりに 7 個のエクソンの遺伝子を有するようになったと考えられた。これは MHC-B 祖先遺伝子は 8 個のエクソンから構成される MHC-A 領域からの重複により誕生したという仮説と矛盾しない。一方、Caja-G/F 領域の BAC シークエンシングから、4 個の遺伝子座が同定され、いずれともヒトの古典的クラス I 遺伝子である HLA-A、-B、-C と近縁であったことから、これらは古典的な機能を有すると考えられた。

3) 鯨類 MHC 領域のゲノム解析

鯨類の MHC 構造は水中の生活環境に適応した MHC 構造を有すると予想されることから、鯨類 MHC 領域と他の陸棲哺乳類とのゲノム構造の比較解析を進めている。ハンドウイルカについて MHC クラス I 領域の一部のゲノム配列 100 kb を決定したところ、ウシやブタなどの偶蹄類との塩基配列上の違いは 8%、霊長類とは 11%、マウスやラットとは 23% であった。この配列における GC% や反復配列の割合は陸棲ほ乳類とほぼ同様な値を示した。一方、オキゴンドウにおける MHC 領域の BAC シークエンシングを理化学研究所の黒木陽子先生、豊田敦先生グループと進めており、これまでに MHC 領域全体の 95% に相当する約 2 Mb のゲノム配列を決定した。この領域に相当するヒトゲノム配列の長さは 4.3 Mb であることから、オキゴンドウの MHC 領域は極めてコンパクトなゲノム構造を有することが明らかとなった。とりわけ、ヒトの MHC 領域には偽遺伝子を含めて 18 個の MHC クラス I 遺伝子が位置するが、オキゴンドウでは 6 個のみが同定されたことから、そのゲノム構造についてさらに詳細な解析を進めている。

4) サメ MHC 領域のゲノム構造

ヒトの祖先と 4.4 億年前に種分岐した軟骨魚類は MHC 抗原の発現が確認されている最も古い有顎動物であり、その MHC 領域はその他の硬骨魚類よりも原始的なゲノム構造を有すると考えられる。そこで、ネズミザメ上目に属するコモリザメの MHC 領域、400 kb のゲノム配列を決定した結果、古典的クラス I 遺伝子、TAP1、TAP2、LMP、BRD2 は硬骨魚類と同様に同定されたが、興味深いことに、ヒトをはじめその他の生物種では MHC 領域と連鎖しない、MHC クラス I 抗原と結合する B2M (β 2 ミクログロブリン) がこの領域に位置した。さらに、コモリザメが属するネズミザメ上目 20 種に、より原始的な形態、運動能力を有するツノザメ上目 10 種を含めてシトクローム b 遺伝子における系統関係を調べた結果、生きていた化石に指定されているラブカ (ツ

ノザメ上目カグラザメ目) は板鰓類の中で最も古くに種分岐したと考えられ、今後、そのゲノム解析を実行することは MHC を含む適応免疫の起源やその進化過程を理解する上で生物学的に極めて意義があると考えられた。本年度にラブカ BAC ライブラリーならびに cDNA ライブラリーを作成するための良質なサンプルを既に入手した。

<国内外での成果の位置づけ>

2 ~ 3 種間における MHC 領域の比較ゲノム解析は数多くの研究機関にて進められているが、脊椎動物門に位置する多生物種における比較ゲノム解析の包括的な実施は本研究課題のみである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

マーモセットの MHC-B/C 領域の BAC コンティグには 1 箇所のギャップが存在するために、この領域のゲノム配列の完全決定は達成できなかった。

<今後の課題>

ほ乳類間の比較ゲノム地図はおおむね完成しつつあるので、次の段階として、MHC 領域に位置する約 140 個の遺伝子それぞれにおけるスプライスバリエーションの保存性や進化速度などを明らかにし、ほ乳類 MHC 領域の進化形成過程を明らかにすることを今後の課題とする。また、鯨類の MHC 構造は水中の生活環境に適応した MHC 構造を有すると予想されることから、オキゴンドウを含めた比較ゲノム解析を進めることにより、陸棲ほ乳類と海棲ほ乳類のゲノムの差異を明確にすることを課題とする。さらに既に入手したラブカの mRNA やゲノム DNA より、BAC ライブラリーならびに cDNA ライブラリーを作成すること、それらライブラリーを用いたスクリーニングにより、現在我々が使用しうる究極の有顎類における適応免疫関連遺伝子やそのゲノム領域の特徴付けをその他の生物種と比較しながら明らかにすることを課題とする。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1, 0702141054:

Watanabe A, Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Yanagiya K, Kita YF, Kimura T, Soeda E, Torii R, Ogasawara K, Kulski JK, *Inoko H. A BAC-based contig map of the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) major histocompatibility complex genomic region. *Genomics* 89: 402-412, 2007.

2, 0705030849:

Dijkstra JM, Katagiri T, Hosomichi K, Yanagiya K, Inoko H, Ototake M, Aoki T, Hashimoto K, Shiina T. A third broad lineage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II linkage and processed genes. *Immunogenetics* 59: 305-321, 2007.

3, 0705030849:

Shiina T, Briles WE, Goto RM, Hosomichi K, Yanagiya K, Shimizu S, Inoko H, Miller MM. Extended gene map reveals tripartite motif, C-type lectin, and Ig superfamily type genes within a subregion of the chicken MHC-B affecting infectious disease. *J Immunol.* 178: 7162-7172, 2007.

2) データベース/ソフトウェア

なし