

獲得免疫系起源の研究

●名川 文清¹⁾ ◇高橋 宜聖²⁾

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 国立感染症研究所

<研究の目的と進め方>

獲得免疫系は、外界から侵入してくる病原体を特異的に認識・排除するために脊椎動物が持つ高度なシステムであり、ゲノム再編成により多様化される抗原受容体が重要な役割を果たしている。軟骨魚類からヒトに至るまでの生物では、イムノグロブリン (Ig) 型の抗原受容体の遺伝子を V (D) J 組み換えにより再編成し、多様な抗原受容体を創り出している (図)。一方、軟骨魚類より下等なヤツメウナギ等の無顎類では、Ig 型とは異なる抗原受容体 variable lymphocyte receptor (VLR) の遺伝子を、V (D) J 組み換えとは全く異なるゲノム再編成システムによって多様化している事が最近明らかとなってきた (図)。本研究課題では、これら2つの抗原受容体遺伝子系についてゲノム構造と遺伝子再編成システムを解析することにより獲得免疫系の起源と進化について明らかにすることを目的とする。

Ig 型抗原受容体遺伝子多様化に主要な役割を果たす V (D) J 組み換えは、動く遺伝子因子であるトランスポゾンとの類似性が発見当初より指摘され、トランスポゾン由来ではないかと考えられてきた。実際、V (D) J 組み換えの過程で切り出された DNA が他の DNA に転移することが *in vitro* で示され、このモデルが実験的にも支持されてきている。V (D) J 組み換えはサメなどの軟骨魚類からヒトに至るまでの高等な動物でその存在が認められており、進化の過程で軟骨魚類が分岐するときに、原始抗原受容体にトランスポゾンが偶然に挿入されることにより、始まったと考えられている。原始抗原受容体遺伝子の中に挿入されたと考えられるトランスポゾンが一体どこから来たのかについては、現在のところ明らかではない。この組み換えには recombination activating genes (RAG1 及び RAG2 遺伝子) が必要である。そのうちの一つである RAG1 に似た遺伝子は昆虫の持つ Transib トランスポゾンに存在していることが明らかになっている。また、最近ウニのゲノムが解明された結果、ウニには RAG1/RAG2 に似た遺伝子が存在していることが明らかとなっている。しかし、これらの遺伝子の機能については現在のところ明らかではなく、トランスポゾンとの関係も明確ではない。

獲得免疫系は、サメより下等な脊椎動物であるヤツメウナギなどの無顎類からその存在が知られていた。しかしながら無顎類は獲得免疫系は持つものの、V (D) J 組み換えによって多様化される Ig タイプの抗原受容体は持たず、一体どのようにして多様な病原体を認識しているのかについては謎であった。ところが最近、無顎類において、ヒトなどに見られる抗原受容体とは全く異なるタイプの抗原受容体 VLR が報告された。VLR は、複数の leucine-rich repeat (LRR) を含み、それぞれの分子は LRR の数とその配列において極めて大きな多様性を示す。VLR のもつ LRR の数は少ないものの、その細胞外領域の基本的な構造は、自然免疫系でパターン認識にかかわる TLR (Toll-like receptor)

の細胞外ドメインに類似している。VLR 遺伝子はリンパ細胞において、V (D) J 組み換えとは異なるゲノム再編成機構により多様性を創出している。再編成前の定常領域には LRR は認められず、周辺に多数存在する germline LRR 遺伝子セグメントからいくつかのセグメントが選ばれ持ち寄られることにより機能型遺伝子が創出される (図)。本研究課題では、2つの異なる抗原受容体を用いた獲得免疫系が、脊椎動物の進化の過程でどのように生じたのかについて検討する。VLR システムと Igs システムの比較は、獲得免疫系の起源とその進化についての謎を解くための大きな手がかりになると期待される。

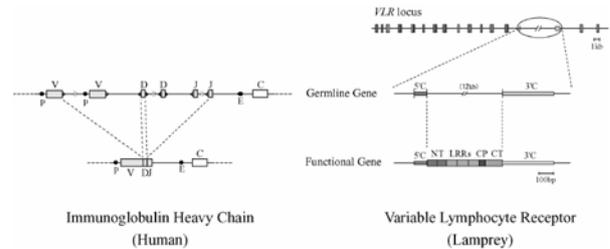


図 V (D) J 組み換えと VLR 遺伝子の再編成

V (D) J 組み換え (左) は DNA トランスポゾンから進化してきたと考えられており、切断と結合という過程を経て、多様な抗原受容体遺伝子を創出する。一方、VLR 遺伝子 (右) の場合は、周辺に散在する遺伝子セグメントをコピーして持ち寄ることにより多様な遺伝子を創出している。無顎類と有顎類は全く異なる構造と遺伝子再編成機構を持つ抗原受容体遺伝子を進化させてきたが、興味深いことに、どちらも、遺伝子セグメントの組み合わせとつなぎ目を変化させることによって、極めて多様な抗原受容体遺伝子を作り出している。

<2008 年度の研究の当初計画>

- i) VLR 遺伝子再編成とその制御：VLR 遺伝子システムにおいて、再編成における allelic exclusion は成立しているのか somatic hypermutation や clonal selection はあるのか、などについて解析し、高等動物の獲得免疫系と比較する。
- ii) VLR 遺伝子座の解析：無顎類であるヤツメウナギやヌタウナギ等のゲノムを比較することにより、VLR 遺伝子系がどのようにして構築されてきたのかについて明らかにする。

<2008 年度の成果>

我々は、VLR 遺伝子再編成がどのように制御されているのかについて調べるため、ヌタウナギの VLR 遺伝子 (VLR_A 及び VLR_B) の再編成を single-cell PCR を用いて解析した。ヤツメウナギの遺伝子と同様、再編成前のヌタウナギの VLR 遺伝子は 5' 及び 3'

定常領域とその間に存在する介在配列からなっており、リンパ球の分化の過程で、周辺に多数存在する germline LRR 遺伝子セグメントからいくつかのセグメントが選ばれて持ち寄られ、介在配列と置き換わることにより機能型遺伝子が創出される。ヌタウナギでは、*VLR_A* 及び *VLR_B* どちらの遺伝子の介在配列も短いので、再編成前の遺伝子も再編成後の遺伝子と同様、PCR により増幅することが容易である。単離したリンパ細胞を用いて single-cell PCR を行った結果、1つのリンパ細胞は *VLR_A*、*VLR_B* のどちらか一方の遺伝子しか再編成しておらず、これら2つの遺伝子の再編成は相互排他的に起こっていることが明らかとなった。また、遺伝子再編成において allele がどの様に使われているのかについて、定常領域遺伝子座に見られる single nucleotide polymorphisms (SNPs) を利用して調べたところ、ほとんどの場合でどちらか一方の allele だけが完全に再編成し、機能型遺伝子になっていた。従って、*VLR* 遺伝子系においても、Ig 型の抗原受容体遺伝子と同様、allelic exclusion が基本的に成立していると考えられる。また、現在のところ *VLR_A* 遺伝子に関して、可変領域が同じ配列であるものが複数見ついている。遺伝子再編成により偶然に同じ可変領域の配列が作り上げられる確率は極めて低いので、これら同じ可変領域の配列を持つ細胞は、*VLR* 遺伝子を再編成した後、クローナルに増殖したものであると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

VLR 遺伝子再編成がどの様に制御されているのかについては、ヤツメウナギを含め不明の点が多く残っている。我々は、今回ヌタウナギの *VLR* 遺伝子の再編成を、*VLR_A* と *VLR_B*、更にそれぞれの allele を区別し、single-cell PCR を用いて解析した。この様に1つのリンパ細胞において4つの *VLR* allele (*VLR_A* の paternal と maternal、及び *VLR_B* の paternal と maternal) を同時に解析することにより、*VLR* 遺伝子再編成がどの様に制御されているのかについて明らかにすることができた。また、*VLR_A* 遺伝子に関しては、可変領域が同じ配列であるものを複数同定した。この結果は、無額類においても、リンパ細胞が抗原受容体遺伝子を再編成により完成させた後、クローナルに増殖するシステムが存在する事を示唆する。これらの結果は、single-cell PCR を用いて解析することにより、初めて得ることの出来るものであり、*VLR* 遺伝子再編成も V (D) J 組み換えと同様に極めて巧妙に制御されている事を示す重要な結果である。

<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>

本研究課題では、獲得免疫系が脊椎動物の進化の過程でどの様に生じたのかについて検討している。無額類の *VLR* システムと有額類の Ig システムとの比較は、獲得免疫系の起源とその進化についての謎を解くための大きな手がかりになると期待されるが、*VLR* システムについてはまだ不明の点が多く残っているのが現状である。今後も引き続き、ヌタウナギやヤツメウナギを用いて *VLR* システムの解析を進めていく必要がある。具体的には以下の課題について研究を進めていく予定である。

- i) ヌタウナギの germline LRR セグメントの配列を更に解析し、ヤツメウナギのものと比較する。
- ii) somatic hypermutation が *VLR* の系で起こっているのかどうか

について明らかにする。

- iii) *VLR* 遺伝子の転写制御について解析する。
- iv) *VLR* 遺伝子の再編成の仕組みを解析する。
- v) 2種類のリンパ細胞 (*VLR_A* 発現細胞と *VLR_B* 発現細胞) の機能的相違を明らかにする。

<成果公表リスト>

なし