

## 獲得免疫系起源の研究

●名川 文清<sup>1)</sup> ◇高橋 宜聖<sup>2)</sup>

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1)。一方、最も下等な脊椎動物である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 (図1)。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の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) が必要であるが、そのうちの一つである RAG1 に似た遺伝子が昆虫の持つ 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、ウニのゲノムには 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、最も下等な脊椎動物であるヤツメウナギなどの無顎類も持っていることが知られていた。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 の細胞外領域の基本的な構造は、自然免疫系で病原体の認識にかかわる Toll-like receptor (TLR) 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1)。VLR 遺伝子には *VLR<sub>A</sub>* 及び *VLR<sub>B</sub>* の2種類が存在することが北大の笠原らによってヌタウナギにおいて明らかにされていたが、最近、ヤツメウナギにおいて、*VLR<sub>A</sub>* を発現するリンパ細胞は T 細胞に、一方 *VLR<sub>B</sub>* を発現する細胞は B 細胞に相当するのではないかというモデルが Max Cooper らのグループによって報告された。これらの細胞が免疫系においてどのような役割を果たしているのかについて興味を持たれる。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。

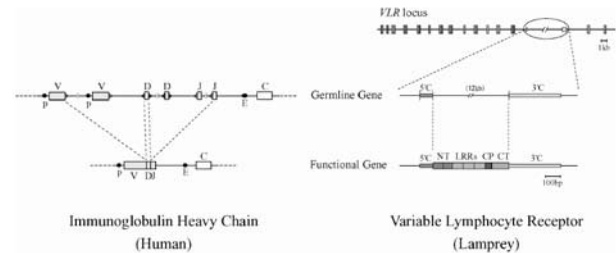


図1 V(D)J組み換えとVLR遺伝子の再編成

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 (Nagawa et al. *Nature Immunol.* 8: 206-213, 2007)。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。

### <研究開始時の研究計画>

- 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、allelic exclusionは成立しているのか somatic hypermutation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とヌタウナギ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。

### <研究期間の成果>

- i) VLR遺伝子再編成とその制御：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<sub>A</sub>* 及び *VLR<sub>B</sub>*) 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、介在配列と置き換え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<sub>A</sub>及びVLR<sub>B</sub>どちらの遺伝子の介在配列も短いので、再編成前の遺伝子と再編成後の遺伝子とをPCRにより同時に増幅することが可能である。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<sub>A</sub>、VLR<sub>B</sub>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、我々は、VLR遺伝子の転写についてsingle-cell RT-PCRを用いて解析した。その結果、転写に関してもVLR<sub>A</sub>及びVLR<sub>B</sub>は相互排他的に起こっていることが判明した。一方、alleleの制御については、再編成の状況とは異なり、ほとんどの細胞で、両方のalleleが転写されていることが判明した。たとえば、一方のalleleのみでVLR<sub>A</sub>を再編成している細胞では、再編成したalleleも再編成していないgermlineの遺伝子も同様なレベルで転写されていた。VLR<sub>B</sub>を再編成している細胞についても同様であった。従って、VLR<sub>A</sub>及びVLR<sub>B</sub>遺伝子座は、相互排他的に遺伝子再編成と転写を行うが、転写に関しては両alleleが活性化されるのに対し、遺伝子再編成に関しては基本的に片方のalleleだけで起こることが判明した。これらの制御が、どのような分子機構で行われているかについては今後の課題である。

上にのべたように、ほとんどのリンパ細胞では、一方のalleleだけで遺伝子再編成が起こっていたが、多数のリンパ細胞(約千個)を調べた結果、両方のalleleを再編成している細胞が少数ではあるが存在していることが判明した。これらの遺伝子の構造を

詳細に解析したところ、多くの場合、片方の遺伝子のcoding領域の配列に異常があることが見出された。これらの遺伝子のvariable領域の中には、フレームシフトあるいはstop codonが存在していた。この様にcoding配列が異常であるVLR遺伝子は、両方のalleleが再編成している細胞だけでみだされ、一方のalleleだけで再編成が起こっているリンパ細胞では、functionalな構造を持つVLR遺伝子だけが検出された。これらの結果は、VLR遺伝子は、両方のalleleで再編成を起こすことが可能であること、また、遺伝子再編成によりdefectiveなVLR遺伝子が出来る場合があることを示しているだけでなく、functionalな再編成が起こったときには、更に再編成が起こらないようにするフィードバック制御が働いていることを示唆している。defectiveな遺伝子がたまたま作り上げられてしまったときには、もう一方のalleleでもう一度再編成を行っている可能性がある(図2)。

また、single cell PCRによって得られたVLR<sub>A</sub>遺伝子に関して塩基配列を解析したところ、可変領域が全く同じ配列であるものが多数見つかった。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。なお、somatic hypermutationについては、現在のところその存在を示す結果は得られていない。

ii) VLR遺伝子座の解析:

ヌタウナギのゲノムの配列は分かっていないので、まず、シーケンスキャプチャー法(Roche Diagnostics)を用いて、germline LRR遺伝子セグメント(VLR<sub>A</sub>及びVLR<sub>B</sub>合わせて推定約千種、alleleを区別すると2千種)の配列を濃縮し、それらの配列を明らかにすることを目指している。single-cell PCR解析で得られた、多数の再編成後のVLR遺伝子の配列を基に、キャプチャー用アレイを設計・作製し、これを用いてヌタウナギのgermline LRR遺伝子セグメントを濃縮した。用いたヌタウナギのゲノムDNAは上記のsingle-cell PCRで用いたものと同じ個体から抽出したものである。シーケンスキャプチャーによりgermline LRR遺伝子セグメントを約1000倍に濃縮した。キャプチャーされたDNAの配列を2009年中に決定する予定である。

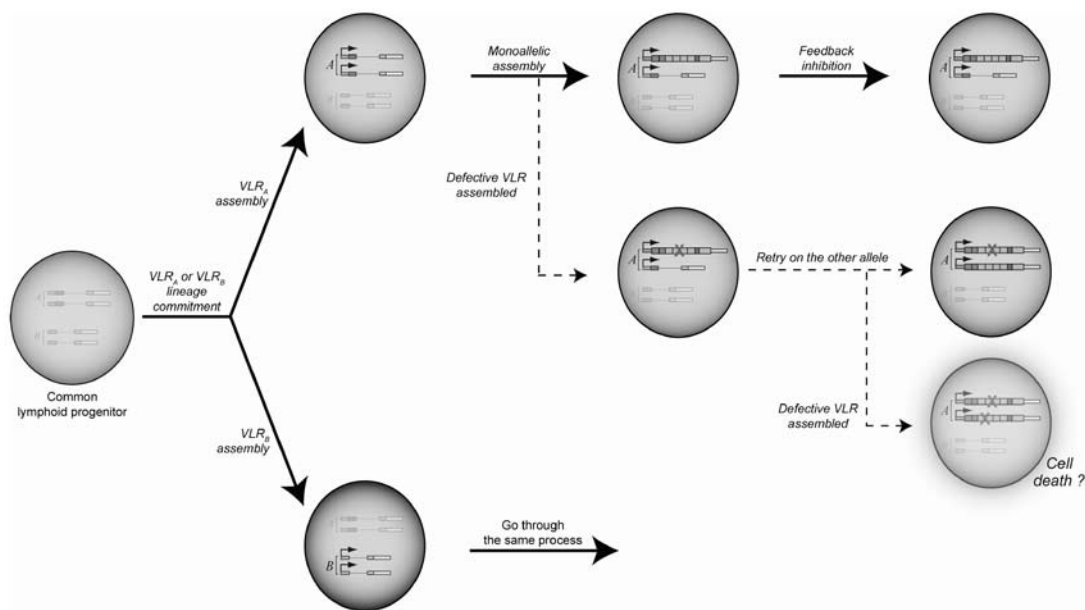


図2 ヌタウナギにおけるVLR遺伝子再編成の制御

名川文清、無顎類における抗原受容体遺伝子の再編成とその制御、日本進化学会、2009年9月4日、札幌

名川文清、無顎類における抗原受容体遺伝子の再編成とその制御、日本比較免疫学会、2009年8月5日、藤沢

#### <国内外での成果の位置づけ>

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は、ヤツメウナギを含め不明の点が多く残っている。本研究課題で我々は、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。また、転写に関しても single-cell RT-PCR により解析した。その結果、ヌタウナギにおいても、 $VLR_A$  と  $VLR_B$  とは相互排他的に遺伝子再編成および転写することが判明し、リンパ細胞には  $VLR_A$  を発現するものと  $VLR_B$  を発現するものの2種類が存在することが明らかとなった。また、allele の間における制御に関しては、VLR 遺伝子再編成のシステムにおいても V(D)J 組み換えと同様に、feedback 阻害によって、リンパ細胞において単一の抗原受容遺伝子が発現するようになっていることが示唆された。すなわち、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、機能的な受容体タンパク質が作られると、もう一方の allele の遺伝子再編成を阻害するシステムが無顎類においても存在する事が示唆された。ヤツメウナギの VLR 遺伝子の再編成において allelic exclusion が存在することはすでに我々のグループが明らかにしていたが、本研究では、更にこの調節が feedback 阻害によるものであることを示した。本研究で得られたこれらの結果は、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している。また、本研究で材料として用いたヌタウナギはヤツメウナギよりさらに下等な生物であると考えられており、ヌタウナギに於ける VLR 遺伝子再編成の解析は、免疫系の進化を考える上で重要であると考えられる。

#### <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、展望>

- i) ヌタウナギの germline LRR セグメントの配列を、ヤツメウナギのものと比較し、VLR 遺伝子系がどのように構築されてきたのかについて明らかにする。
- ii) VLR 遺伝子の再編成の仕組みを明らかにし、V(D)J 組み換えと比較する。
- iii) 相互排他的な VLR 遺伝子再編成がどのように保障されているのか、その分子機構を明らかにする。
- iv) VLR 遺伝子の再編成における allelic exclusion の分子機構を明らかにする。
- v) 得られた結果を総括し、抗原受容体遺伝子再編成の制御システムがどのようにして進化してきたのかを明らかにする。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

Kishishita, N., Matsuno, T., Takahashi, Y., Takaba, H., Nishizumi, H. and Nagawa, F.: Regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. *EMBO Rep.* in press.

##### 2) 学会発表

Kishishita, N., Takaba, H., Nishizumi, H. Sakano, H. and Nagawa, F.: Allelic regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. 日本分子生物学会、2009年12月12日、横浜