

メダカ属 MHC ゲノム領域の多型と進化

●野中 勝

東京大学大学院理学系研究科

<研究の目的と進め方>

有顎脊椎動物の MHC (主要組織適合性抗原複合体) は獲得免疫に重要な役割を果たす多くの遺伝子が集積した興味深いゲノム領域であるが、この領域がいかに形成され進化してきたかについては未だ十分に解明されていない。我々は MHC の進化過程を明らかにする目的で硬骨魚類メダカの MHC のゲノム構造を解析し、他の有顎脊椎動物では単一のゲノム領域に存在する MHC 遺伝子が数個の染色体に分散して存在していること、にもかかわらず2つのメダカ MHC クラス I 遺伝子とその抗原提示に直接関わる4つの免疫プロテアソームサブユニット遺伝子、*TAP2* 遺伝子、*TAPBP* 遺伝子は他の遺伝子の介在なしに緊密なクラスターを形成していることを見いだした。構造的には異なりながら、機能的に密接な関係を有する遺伝子群の緊密な連鎖はそれ自体興味深かったが、約 400 kb に及ぶこの領域の塩基配列を2種の近交系 (Hd-rR と HNI) 間で比較すると、MHC クラス I 遺伝子 (*UAA* と *UBA*) と免疫プロテアソームサブユニット遺伝子 (*PSMB8* と *PSMB10*) を含む約 100 kb の亜領域には、アラインする事も不可能なほどの著しい塩基配列の違いが認められた。これほど著しい多型はこれまでいかなる種の MHC からも報告されておらず、その起源と進化過程を明らかにすることにより、有顎脊椎動物 MHC のゲノム構造の生理的な意義の理解につながる事が期待された。メダカには系統関係の明らかな近縁種が東南アジアに約 20 種存在するという利点があるため、これら近縁種の MHC のゲノム構造を決定し、同時に野生集団を用いた多型解析を行う事により *Oryzias* 属における MHC の構造と多型の進化過程を解明する。

<2008 年度の研究の当初計画>

ルソンメダカ、インドメダカの MHC クラス I 領域の完全解説: 応募者はすでに両種の BAC ライブラリーより、メダカの MHC クラス I 遺伝子、*PSMB8* 遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行い、それぞれ数個の BAC クローンを単離してある。メダカの様々な遺伝子プローブ、及び BAC 末端配列決定の結果から、それぞれの種からメダカ MHC クラス I 領域の中心部分約 200 – 300 kb をカバーする2個ずつの BAC クローンを選択した。そこでこれら4個の BAC クローンを *Sau3AI* で不完全切断し、アガロースゲルで2 – 4kb の断片を精製し、pGEM3 ベクターに入れ両端の配列を決定する。約 1000 クローン読んだ時点で、PhredPhrap によるアセンブルを試みる。10 – 20 程度のギャップの存在が予想されるので、ギャップを跨ぐ PCR プライマーを合成してその部分の配列を決定し、最終的には 200 – 300kb の完全塩基配列を得る。メダカの MHC 領域には G/C の連続配列、AT リッチ領域等塩基配列の決定を妨げる配列が多く存在し、その問題はルソンメダカ、インドメダカでも同様であることが予想される。メダカでの経験を生かし、これらの配列に強いシーケンス反応試薬の使用や、シーケンス反応の際のアニーリング温度を上げる事により、これらの問題に対処する。メダカの場合、他の脊椎動物の MHC と共通な遺伝子は約 450 kb にわたって存在して

いる。支援班による塩基配列決定の支援が受けられる場合は、ルソンメダカ、インドメダカ MHC についても隣接する BAC クローンを単離して塩基配列の決定を行う。3種の配列を比較することにより、*Oryzias* 属 MHC の進化過程を、メダカ種群とジャワメダカ種群が分かれて以来、あるいはメダカ種群内の種分化過程という二つのタイムスケールで、一塩基レベルの精度を持って比較する事が可能になる。

セレベスメダカ BAC ライブラリーの構築: 支援班の支援を得て、*Oryzias* 属3種群のうち未だ BAC ライブラリーが存在しないセレベスメダカ種群の代表種セレベスメダカより BAC ライブラリーを構築する。3D プールを作成して PCR によるスクリーニングを可能にする。

メダカ野生集団における MHC クラス I 領域多型の解析: *Oryzias* 属内での MHC クラス I 領域の進化を種内多型も含めて明らかにするための基礎的な情報を得るために、まずメダカの各地の野生集団を用いてこの領域の多型の様子を明らかにする。これまでの *PSMB8* 遺伝子をもちいた予備的な解析により、約 500 万年前に分岐したとされる北日本集団、南日本集団のいずれから、Hd-rR 型、HNI 型の両者がみつかっており、この顕著な二型は南北両集団の分岐に先駆けて成立していたことが明らかになっている。この解析を隣接する *PSMB10*, *UAA*, *UBA* 遺伝子にも拡大することによって顕著な二型の範囲を明らかにするとともに、これら緊密に連鎖する遺伝子がハプロタイプを形成して、共進化してきた可能性を検討する。また、Hd-rR 型、HNI 型の中に亜型が存在する可能性を検討し、後に近縁種での多型解析を行う際に、種間で共有される多型と、各種に固有の多型を識別することを可能にする。これらの解析は基本的に、各遺伝子の両端のエクソン上に設計したプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型にした PCR を行ってイントロンを含む全遺伝子領域を増幅して行う。*PSMB8* 遺伝子と *PSMB10* 遺伝子の間の間隙は極めて短いため、両遺伝子は一緒に増幅して解析する。これによって遺伝子配置の多型が存在した場合にも、それを含めた多型の検出が可能になり、*Oryzias* 属における MHC クラス I 領域の多型の進化をより包括的に理解することが可能になる。

<2008 年度の成果>

ルソンメダカ、インドメダカの MHC クラス I 領域の完全解説: ルソンメダカは2つの一部重複する BAC クローンから、193,474bp の連続配列が得られ、*PSMB8* 遺伝子は Hd-rR 型であった。インドメダカは2つの BAC ライブラリーを使い、一方のライブラリーからは Hd-rR 型の *PSMB8* 遺伝子を含む一つの BAC 配列、141,664bp を決定した。もう一方のライブラリーからは2つの BAC クローンから 340,769bp の連続配列を決定したが、*PSMB8* 遺伝子は HNI 型であった。これまでインドメダカの属するジャワメダカ種群からは HNI 型 *PSMB8* 遺伝子は確認されておらず、この結果により初めて *PSMB8* 遺伝子の二型性は数千万年前とされるメダカ種群、ジャワメダカ種群の分岐以前から存在

し、trans-species に伝えられてきたことが明らかになった。ここで明らかにした3つのMHCクラスI領域の配列と、これまでメダカで明らかにされていた2つの配列を互いに比較した結果、*PSMB10*, *PSMB8* 及びいくつかの *class IA* 遺伝子を含む領域は配列間で大きな違いを示し、MHC 領域特有の進化をしているが、それ以外の領域は比較的高い保存性を保ち、通常非 MHC 領域と同様の進化をしていることが示唆された。また、MHC 特有の進化を示す領域のうち、*PSMB10*, *PSMB8* 遺伝子は種を超えた二型性を示すのに対して、*class IA* 遺伝子はそれぞれの種に固有なコピー数を示し、メダカには *UAA* と *UBA* が各1コピー存在したのに対して、ルソンメダカには *UAA* が3コピー *UBA* が1コピー、インドメダカには *UAA* が4コピー *UBA* が0コピー存在した。*class IA* 遺伝子の系統樹は、同種の遺伝子がクラスターを形成し、それぞれの種内で homogenization が行われていることが示唆された。以上の結果はメダカ属のMHCクラスI領域は3つの亜領域に分かれ、それぞれが異なる淘汰圧を受けていることを示した。

セレベスメダカ BAC ライブラリーの構築：基礎生物学研究所の成瀬班員と協力して、基礎生物学研究所で保持しているセレベスメダカについて *PSMB8* 遺伝子のタイピングを行い、Hd-rR 型、HNI 型をヘテロに有する個体から培養細胞を確立して DNA を抽出した。現在支援班に依頼して、この DNA から BAC ライブラリーの構築が進行中である。

メダカ野生集団における MHC クラス I 領域多型の解析：メダカ野生集団における多型性を明らかにするために、4つ存在するメダカの地域集団のうち北日本集団、南日本集団、中国西韓集団に属する10地点からの1245個体の *PSMB8*, *PSMB10* 遺伝子のタイピングを行った。得られた全ての配列は Hd-rR 型か HNI 型のいずれかに明確に分類され、メダカのこれらの遺伝子は多型性ではなく、二型性を示すことが明らかになった。また両遺伝子の型は常に一致してハプロタイプを形成していた。更にどの地域集団においても HNI 型の頻度は 0-27% と低く、これら2つの遺伝子を含むハプロタイプの二型性は Hd-rR 型に偏った形の balancing selection によって保たれていることが示された。その原因については、超優性や頻度依存性選択よりも時間、場所により変化する淘汰圧による可能性が強いことが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

メダカ以外の魚類を用いた MHC 領域の構造、多型の解析は国内外で行われているが、クラス I 遺伝子のように重複して、しかも多型を示す遺伝子ではアレルとアイソタイプの区別すら容易でなく、しかも産業的に重要で解析の進んでいるサケ科やコイ科の魚は最近の4倍体化を経験しているために MHC 領域の解読は困難を極めている。ここで述べたような高精度の解析は BAC ライブラリーや近交系等の基盤が整備されているメダカでのみ可能となっており、既に発表済みの2種の近交系の MHC 配列の論文も他種の研究者から高い評価を受けている。更に系統関係が明らかにされている近縁種の存在、及び支援班によって進められている近縁種での BAC ライブラリーの整備は、メダカを進化的な側面の研究に圧倒的に優れた対象としている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

マレー半島とインドに分布するインドメダカの野性集団の入手を試み、前者に関してはマレーシアの研究者の協力のもと現地での採集することができた。しかし、後者に関してはインド政府に申請した採集許可が却下されてしまい入手することができなかった。現在インドの研究者とコンタクトを試み、資料の提供を受けるべく努力しているが、楽観できる状況ではない。また、ルソン

メダカ、メコンメダカについても野生集団の入手が望まれるが、これまでの所コンタクト先を特定することもできない状態にある。

<今後の課題>

セレベスメダカの Hd-rR、HNI 両型 MHC クラス I 領域の完全解読：現在支援班に依頼して構築中の MHC クラス I 領域が Hd-rR/HNI 型のヘテロ個体からの BAC ライブラリーより、各々の型の MHC クラス I 領域をカバーするクローンを単離し、その塩基配列の完全解読を行う。その結果を今年度明らかにしたインドメダカの両型の配列、及び既に発表されているメダカの両型の配列と比較することにより、*Oryzias* 属内における MHC クラス I 領域の進化の全貌を明らかにする。これらの3種は、数千万年前に分岐したとされる *Oryzias* の3つの種群にそれぞれ属しており、さらに trans-species な二型の両者を比較することが可能であるため、この比較により二型性を示す亜領域を含む MHC クラス I 領域の数千万年に及ぶ進化過程が明らかにできる。これは MHC に二型性が認められない哺乳類においては不可能な解析であり、脊椎動物の MHC の進化過程を明らかにする上で、極めて貴重な情報を提供するのみならず、一般的なゲノム進化の観点からも trans-species な二型性を示す亜領域が含まれることから極めてユニークな情報が得られるものと注目される。

ジャワメダカ、セレベスメダカ種群の野生集団を用いた MHC クラス I 領域の多型解析：今年度メダカ野生集団を用いて行った解析をジャワメダカ種群のインドメダカ、ジャワメダカ、及びセレベスメダカ種群のセレベスメダカについて行う。これらの種はメダカと数千年前に分かれたばかりでなく、生息域もメダカの温帯に対して、亜熱帯から熱帯と大きく異なっている。これらの種において MHC の二型の有無、相対頻度を明らかにすることにより、棲息環境によって異なることが想定される淘汰圧の実態を解明することを試みる。

MHC クラス I 領域の二型性の起源と進化過程の解明：メダカで発見された *PSMB8* 遺伝子の二型性はこれまでの所 *Oryzias* 属内でのみ認められており、ハゼ、サヨリを用いた予備的な解析では Hd-rR 型のみが検出された。一方、系統的には orthologous な関係は示さないものの、機能的には Hd-rR/HNI 型の二型性に対応すると考えられる *PSMB8* 遺伝子の二型性が軟骨魚類のサメと両生類のゼノバスで報告されている。これらの二型が本当に独立に生じたものなのかどうかを、主に初期に分岐した硬骨魚類を調べることにより明らかにしたい。この解析を通して、脊椎動物を貫く MHC の進化過程が明らかになることが期待される。

<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. 0812251442

Tsukamoto, K., Sakaizumi, M., Hata, M., Sawara, Y., Eah, J., Kim, C.B. and Nonaka, M.: Dichotomous haplotypic lineages of the immunoproteasome subunit genes, *PSMB8* and *PSMB10*, in the MHC class I region of a teleost medaka, *Oryzias latipes*, *Mol.Biol. Evol.*, doi: 10.1093/molbev/msn305 (2009) .