

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870007

研究課題名（和文）棘皮動物ゲノムにおけるToll-like receptor多重遺伝子族の分子進化

研究課題名（英文）Molecular evolution of multiplicity of Toll-like receptors in echinoderm genome

研究代表者 日比野 拓 (HIBINO TAKU)
埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号：60513835

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエとヒトは約10種類のToll-like receptor (TLR)を保有している。一方、ウニ・ナメクジウオ・ゴカイといった海産無脊椎動物は、70～200種類のTLRを持ち、多重遺伝子族を形成している。TLRや自然免疫関連遺伝子の分子進化を調べたところ、ハエ・ヒトには見られず、上記の海産無脊椎動物にのみ見られるIL-17遺伝子の重複とSarm-like遺伝子群を発見した。これら遺伝子群はTLR多重遺伝子族の形成と関わっている可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that approximately 10 Toll-like receptors (TLRs) in the genome of fruit fly and human. On the other hand the genomes of marine invertebrates such as a sea urchin, an amphioxus and a polychaete contain approximately 70 to 200 TLRs forming multigene family. We investigated molecular evolution of TLRs and innate immune related genes between human and fruit fly, and marine invertebrates. Multiplication of IL-17 and Sarm-like gene family that contains an old-TIR domain were found uniquely in these marine invertebrates. Appearance of these gene families may be related to multiplicity of TLRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：Toll-like receptor, ウニ、棘皮動物、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエで最初に見つかったTollは、その後ヒトから同様なドメイン構造を持ったToll-like receptor (TLR)の発見をもたらした。この発見がヒトにおける自然免疫研究の幕開けをもたらした。TLRはさ

まざまな病原体の構成成分を特異的に認識し、異なる免疫応答を誘導することや、自然免疫の活性化が獲得免疫の開始を誘導していることが明らかになってきた。つまり自然免疫は今まで考えられてきた以上に精巧なメカニズムを持っていることが示され

たのである。このようなハエとヒトにおける TLR の集中的な解析を背景にして、多くの動物から TLR ホモログがクローニングされ、進化過程における自然免疫と TLR の関連性に注目が集まっている。

ヒトとハエにはそれぞれ約 10 種類の TLR(Toll)が存在するが、ウニゲノム中には 222 種類の TLR が存在し、いくつかの TLR はゲノム上に直列で並ぶという多重遺伝子族を形成することが明らかになった。またナメクジウオやゴカイのゲノムからも TLR が多重遺伝子族を形成していることが報告されている。脊椎動物の系統では、TLR 数の爆発的な増大はこれまで見られていないことから、獲得免疫系をもたない無脊椎動物独自に繰り返し TLR 数の増加が起きていることが示唆された。

2. 研究の目的

本助成では、ウニで起きている TLR 遺伝子数の爆発的な増加は棘皮動物系統上どの時期に生じたのか？またそのイベントは棘皮動物の系統内で一度だけ起きたのか、あるいは頻繁に起きているのか？といった TLR 多重遺伝子の分子進化過程を解明する。

そこでまず、アメリカムラサキウニと近縁なウニゲノムの TLR 遺伝子数や遺伝子構造を比較し、TLR 多重遺伝子族の形成と生活史や生息環境の関連性を調べる。また棘皮動物の共通祖先に近いと考えられているウミユリを用いて TLR 遺伝子数の増加の起源や共通祖先が保有していた遺伝子の特徴を調べる。次に TLR 多重遺伝子において各々の発現パターンがどのように制御されているのか、分子進化と機能進化の関係を調べる上で明確にする必要がある。遺伝子発現を定量的に測定できる QPCR 法およびその発現部位を解析できる *in situ* hybridization 法を用いて、アメリカムラサキウニ 222 種類の TLR の時間的・空間的な発現パターンを特定する。

これらの研究をもとに、棘皮動物がどのように免疫機構を進化させて生存戦略を勝ち抜いてきたのか探る。

3. 研究の方法

(1) ウミユリゲノムから TLR のクローニング

ウミユリの精子からゲノム DNA を精製する。このゲノム DNA を鋳型として、PCR 法によりウミユリ TLR 遺伝子断片を単離する。ウニ、ナメクジウオ、ゴカイの TLR を比較したところ、細胞内 TIR ドメインにわずかに相同な塩基配列領域があるので、縮重プライマーを作成し遺伝子断片を単離する。Blastn 相同検索によりこの配列が TLR かどうかを確認する。

(2) ウニ発生過程と成体組織における TLR 発現プロファイルの作成

ウニゲノム上の 222 種 TLR を、塩基配列をもとにグループ分けをし、グループ毎に共通プライマーを構築した後、QPCR により成体の組織（体腔細胞、食道、腸、管足）やウニの正常発生ステージ（4 腕プルテウス期）における発現パターン、あるいは天然海水中でウニ幼生を飼育し、非特異的な病原体に感染させた後の発現パターンを調べる。

(3) 海産無脊椎動物に特徴的な免疫関連遺伝子の特定

自然免疫に関連する遺伝子の中には、共通のドメインを保有しているケースが多い。たとえば、TIR ドメインは、TLR の細胞内領域やそのシグナル分子が保有している。TIR ドメインと類似した配列をもつ SEFIR ドメインはインターロイキン 17 レセプター

(IL-17R) とそのシグナル分子が保有している。IL-17R のリガンド分子であるインターロイキン-17 (IL-17) 遺伝子群は特徴的な IL-17 ドメインをもつ。これらのドメインは自然免疫系で機能する遺伝子で主に見られる。隠れマルコフモデル (HMM) 法を用いて、ウニゲノムから推測された全タンパク質に対してドメイン検索を行う。同様の手法を用いて、すでに全塩基配列が決定している動物であるショウジョウバエ、ヒト、無脊椎の脊索動物ナメクジウオ、環形動物ゴカイ、淡水性イソギンチャクであるネマトステラの全タンパク質に対しても検索を行う。

4. 研究成果

(1) ウミユリゲノムから TLR のクローニング

有柄ウミユリ類トリノアシから CTAB 法により精子ゲノム DNA を精製し、これを鋳型とした。ウニ・ナメクジウオ TLR の細胞内ドメイン TIR アミノ酸配列を参考に、縮重プライマー(5' 側プライマー10 種類、3' 側プライマー6 種類)を作成し、PCR を行った。得られた DNA 断片をクローニングした 14 サンプルの塩基配列を決定し、相同性検索を行ったが、TLR と相同な配列は得られなかった。この結果から、縮重 PCR を元にした手法では限界があり、トリノアシゲノムの全塩基配列を決定後にコンピュータを用いて TLR を探索する方法がもっとも有効であると考えられた。

(2) ウニ発生過程と成体組織における TLR 発現プロファイルの作成

ウニ成体組織（体腔細胞、食道、腸、管足）を切り出し精製した後、QPCR によって

ウニ TLR のそれぞれのグループの発現量を調べた。体腔細胞、食道、腸、管足で強く発現するいくつかの遺伝子グループが見られたが、グループ毎に発現部位が異なることが明らかになった。またどの部位でも発現が見られないグループもあった。発生過程におけるウニ TLR 遺伝子群の発現は、人工海水飼育でも、天然海水飼育でも TLR ファミリーとその細胞内シグナルである MyD88, Sarm の発現は著しく低いことが分かった。TLR は微量に存在してもシグナルを伝達することができ、発生過程における発現パターンのみでは、TLR の働きの有無を言及できないと考えられた。

(3) 多重遺伝子族を形成する免疫関連遺伝子の特定

HMM ドメイン検索を用いて、IL-17R とそのリガンドである IL-17 をウニゲノム上で探索したところ、IL-17R は 2 種類存在していたのに対し、IL-17 は 35 種類が見つかり (図 1)、その多くはウニゲノム上で直列に重複していた。他の動物のゲノム内に IL-17 遺伝子数がいくつあるか調べたところ、ヒトでは 6 種類、ショウジョウバエにはひとつも見つからなかった (図 1)。一方、TLR が多重遺伝子族を形成しているナメクジウオやゴカイといった海産無脊椎動物では、IL-17 はそれぞれ 19 種類、13 種類と遺伝子数が増大していることが分かった。系統解析を行ったところ、IL-17 はウニ、ナメクジウオ、ゴカイそれぞれ独自の系統で遺伝子を増大していたことが明らかになった。これらの結果から、TLR の多重遺伝子族形成と IL-17 遺伝子数の増大は関連している可能性が高いことが示唆された。

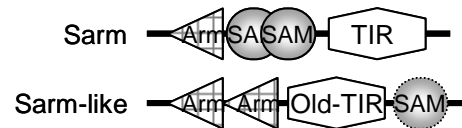
(図 1)

	IL-17	IL-17R	TLR
ヒト	6	5	10
ナメクジウオ	19	6	72
ウニ	35	2	222
ゴカイ	13	1	105
線虫	3	2	1
ショウジョウバエ	0	0	9
イソギンチャク	1	3	1

後生動物において TLR の細胞内シグナル分子は保存されており、Sarm や MyD88 といったシグナル分子は、TLR 同様に TIR ドメインをもち、TIR ドメイン同士が結合し、シグナルを伝達する。ウニゲノムの全タンパク質

に対し TIR ドメインを HMM 検索したところ、脊椎動物やハエ・線虫とオーソログな TIR ドメインをもつ Sarm や MyD88 のほかに、オーソログではない TIR ドメインをもつ Sarm-like や MyD88-like が存在することを発見した。Sarm と Sarm-like のドメイン構造の比較を以下図 2 に示す。共通したドメインを保有しているものの、順序が異なっている。オーソログではない TIR ドメインを Old-TIR と名づけた。

(図 2)



Old-TIR ドメインの定義を作成し、HMM 検索を行ったところ、Sarm-like と MyD88-like は、TLR 多重遺伝子族をもつナメクジウオやゴカイといった海産無脊椎動物のみが保有し、ヒト、ショウジョウバエには発見できなかった。TLR 多重遺伝子族形成と Sarm-like と MyD88-like の出現には関連性があることが示唆された。

脊椎動物の TLR は、病原体の保存された構成成分を認識するため、最低限のバリエーションで十分機能するはずである。海産無脊椎動物において、爆発的に TLR の重複が起こっていることは、海産無脊椎動物には、脊椎動物とは異なる多種の TLR を介した独自の免疫システムが存在することを示唆している。今回の解析から、多種の TLR をもつ海産無脊椎動物は TLR 以外の自然免疫関連遺伝子にも独自性が見られることが明らかになった。独自のメカニズムではあるが、既存のシステムを若干変更して生み出した可能性が考えられる。Sarm-like, IL-17 がどのように TLR と機能面で関連しているのか、詳細な研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Ghosh J, Buckley KM, Nair SV, Raftos DA, Miller C, Majeske AJ, Hibino T, Rast JP, Roth M, Smith LC. Sp185/333: A novel family of genes and proteins involved in the purple sea urchin immune response. Dev Comp Immunol. 査読有. 34(3), 235-245. 2010.

(2) 日比野 拓. ウニ幼生の左右非対称性が

ら後口動物の体軸の進化を考える. 海鞘. 査読無. 第 21 号, 3-6. 2009.

(3) 日比野 拓. ウニの左右非対称性からみる後口動物の体軸の進化. 細胞工学. 査読無. Vol. 27 (6), 548-52. 2008.

[学会発表] (計 7 件)

(1) Taku Hibino. Extreme multiplicity of Toll-like receptors in sea urchin genome. Darwin 200 Program, International Symposium on Marine Genomics. 2009 年 12 月 17 日 沖縄.

(2) 日比野 拓. ウニ幼生の左右非対称性から後口動物の体軸の進化を考える. 日本動物学会第 80 回大会. 2009 年 9 月 17 日 静岡.

(3) 日比野 拓, Jonathan Rast. 海産無脊椎動物におけるインターロイキン 17 遺伝子数の増大. 第 21 回日本比較免疫学会学術集会. 2009 年 8 月 3 日 神奈川.

(4) Buckley KM, Hibino T, Rast JP. Genomic organization, evolution, and expression of the toll-like receptor gene family from the purple sea urchin. 11th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. 2009 年 7 月 2 日 プラハ.

(5) Rast JP, Messier C, Ho E, Wang G, Buckley K, Kandola S, Ling A, Hibino T. Characterizing developmental and protective immune gene regulatory networks in the sea urchin larva. 11th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. 2009 年 7 月 2 日 プラハ.

(6) 日比野 拓. ウニゲノムからみる免疫機構の進化. 第 324 回 Zoological Conference. 2008 年 10 月 8 日. 東京大学

(7) 日比野 拓, Jonathan Rast. ウニ幼生に感染する細菌の特定と免疫関連遺伝子の発現解析. 第 20 回日本比較免疫学会. 2008 年 8 月 27 日. 東京

[その他]

アウトリーチ活動情報

未来の科学者養成講座 科学者の芽育成プログラムの講師
土曜ジュニアセミナー 「ウニの受精の観察」
2010 年 2 月 6 日 埼玉大学.

参加者: 小学 3, 4, 5, 6 年生 35 名

サイエンスパートナーシッププログラム (SPP) の講師

「ウニの受精・発生体験」

2010 年 1 月 23 日, 2 月 1 日, 2 月 2 日, 2 月 10 日 南稜高校.

参加者: 高校 1, 2, 3 年生 12 名

未来の科学者養成講座 科学者の芽育成プログラムの講師

冬休み集中講座 「ウニのたんじょう」

2010 年 1 月 5 日 大宮ソニックシティ.

参加者: 高校 1, 2 年生 15 名

出張授業「ハスノハカシパン、たまご、精子の観察」講師

2009 年 11 月 4 日 さいたま市立野田小学校

参加者: 小学 5 年生 26 名, 6 年生 31 名

平成 21 年度「新学習指導要領対応『観察、実験だ!』研修会の講師

「生物分野の指導 ~遺伝について、ウニ(カシパン)の受精の観察~」

2009 年 8 月 6 日 さいたま市立教育研究所.

参加者: 小・中学校教員 28 名

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比野 拓 (HIBINO TAKU)

埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号: 60513835

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし