

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 18日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770232

研究課題名（和文） 自然免疫における祖先型TIRドメインをもつシグナル分子の機能と分子進化の解析

研究課題名（英文） Molecular evolution of ancient TIR containing gene family in innate immunity

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）：

後口動物の祖先のToll様受容体やTIRドメインを含むシグナル分子は、どのような遺伝子構成をしていたのかを明らかにするために、棘皮動物の系統でもっとも基部に位置づけられている有柄ウミユリ類トリノアシの胚・幼生cDNAの解析を行った。これまでに、トリノアシに6種類のToll様受容体（3種類のハエタイプ、3種類の脊椎動物タイプ）の存在を確認した。またMyD88-like, Sarm-likeといったウニとナメクジウオに共通した遺伝子だけでなく、ウニにはないがナメクジウオには存在するTIRドメインを含む遺伝子であるCARD-TIR、TPR-TIRがトリノアシに存在することが分かった。このことから、後口動物の祖先は多様なTIRドメインを含む遺伝子を保有していたが、その後TLRのシグナル伝達系が洗練されていくにつれて、それらの遺伝子は失われたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To unveil a repertoire of Toll-like receptors (TLRs) and TIR containing signaling molecules in a basal deuterostome, we analyzed EST of a stalked crinoid, *Metacrinus rotundas*, whose embryonic and larval cDNA have been sequenced by Next Gene Sequencing. So far, we identified 6 TLRs that consist of 3 genes of fly-type and 3 genes of vertebrate type TLRs. MyD88-like genes and Sarm-like genes were also identified in the cDNA of the sea lily, suggesting these genes exist in a basal deuterostome. We found unique TIR containing gene families, CARD-TIR and TPR-TIR, in the sequencing data of the sea lily, which have not been in the genome of the sea urchin, but in that of amphioxus. These data suggest a basal deuterostome could utilize multigenes of TLRs and various types of TIR containing genes. And the refinement of TLRs and signaling molecules could happen after the appearance of acquired immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、ウミユリ、棘皮動物、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫に関する近年の重点的な研究は、ショウジョウバエにおける Toll 遺伝子の発見から始まったといっても過言ではない。ショウジョウバエの Toll をもとにして、ヒトゲノムから類似したドメイン構造をもった Toll 様受容体が発見された。その後の研究により、脊椎動物の Toll 様受容体は、それぞれ異なる病原体の構成成分を特異的に認識し、細胞内の TIR ドメインを介して下流のサイトカインを誘導することや、獲得免疫系の開始を誘導することが明らかになってきている。今まで非特異的な認識と考えられてきた自然免疫システムは、実は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。このようなショウジョウバエとヒトにおける Toll 様受容体の研究を背景に、多くの動物から Toll 様受容体がクローニングされ、自然免疫と Toll 様受容体の進化プロセスに注目が集まっている。

アメリカムラサキウニの全ゲノム配列が解読され、私は Toll 様受容体のアノテーションを担当し、ウニゲノムには、222 種類の Toll 様受容体が存在していることを明らかにした(ref. 1, 2)。ヒトやショウジョウバエと比較すると、ウニでは Toll 様受容体数が 20 倍以上に膨らんでいた。分子系統解析により、ウニ Toll 様受容体は、最近ウニの系統で爆発的に遺伝子を重複していることが明らかになった。他の研究者によって、脊索動物ナメクジウオや環形動物ゴカイでも Toll 様受容体が多重遺伝子族を形成していることが報告されている(ref. 3, 4)。脊椎動物の Toll 様受容体は、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。

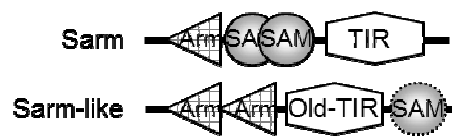
海産無脊椎動物において、爆発的に Toll 様受容体の重複が起こっていることは、海産無脊椎動物には、脊椎動物とは異なる多種の Toll 様受容体を介した独自の免疫システムが存在することを示唆している。そして Toll 様受容体の進化の側面から、この独自の自然免疫システムは、左右相称動物の共通祖先がもっていた状態だったのだろうか？という疑問が生じてきた。

そこで、Toll 様受容体を介したシグナル伝達系全体を見渡すことで、左右相称動物の祖先型自然免疫システムを解明することができるかもしれないと考えた。

本研究ではまず、ウニ、ナメクジウオ、ゴカイなど Toll 様受容体多重遺伝子族をもつ動物が保有し、ショウジョウバエや線虫、脊椎動物が保有していない祖先型 TIR ドメインをもつシグナル分子に着目し、分子進化や遺伝子の機能を解析した。

脊椎動物において Sarm, MyD88 は、Toll 様受容体の TIR ドメインと結合しシグナルを伝達する働きをしており、ほぼすべての動物に相同遺伝子が存在する。しかし、Sarm や MyD88 に類似した構造をもつ Sarm-like と MyD88-like は、ヒトやショウジョウバエのゲノムには見つからない。これらの TIR ドメインは、系統的に脊椎動物の Sarm, MyD88 とは異なっている。

Toll様受容体シグナル分子



ナメクジウオは Toll 受容体多重遺伝子族以外に、Sarm-like, MyD88-like 遺伝子が発見されている。そのほか、ナメクジウオのゲノムにはウニのゲノムには発見されていない、TIR ドメインを含む遺伝子が発見されている。以下の表は Huang S. et al. (2008) (ref. 4) の抜粋である。

ドメイン構成	ハエ	ウニ	ナメクジウオ
Toll/TLR	9	222	71
CARD-TIR	0	0	11
TPR-TIR	0	0	13

CARD-TIR, TPR-TIR といったナメクジウオの遺伝子モデルはナメクジウオだけに存在し、TLR が同じく多重遺伝子族を形成するウニでは現在まで報告がない。このような TIR アダプター遺伝子は、ヒトでは 5 種類、ウニでは 26 種類に対して、ナメクジウオでは 95 種類と非常に多い。このことから、ナメクジウオではウニとは異なり、受容体のレベルとアダプターレベル両方で遺伝子増加がおこり、下流の細胞レベルの特異性を制御しているのではないかと考えられている(ref. 4)。しかし、ナメクジウオにおいて TIR アダプタ

ーが増加しているのか、あるいはウニにおいて TIR アダプターが減少しているかは、これら 2 つの動物の比較からでは導くことはできない。

棘皮動物の中でもっとも原始的であることが系統解析においても発生様式においても明らかになっている有柄ウミユリ類トリノアシ *Metacrinus rotundus* を用いることは、後口動物の祖先型がどのような TLR と TIR を保有するシグナル分子を保有していたのかを推測するのにより手がかりになると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 後口動物の祖先型が保有していた Toll 受容体の遺伝子構成を明らかにする。次に、ほぼすべての左右相称動物が保有する MyD88, Sarm 遺伝子と現在までにナメクジウオとウニのみが持つ MyD88-like, Sarm-like の系統関係を明らかにする。そこで、原始的棘皮動物有柄ウミユリ類トリノアシからこれらの遺伝子を特定し、系統解析を行う。次に、これらの遺伝子がどのような発現をするのか、ウニにおいて時間的・空間的発現パターンを明らかにする。

(2) TIR アダプター遺伝子は、ヒトでは 5 種類、ウニでは 26 種類に対して、ナメクジウオでは 9 種類とナメクジウオにおいて、遺伝子数が増加している。これはナメクジウオの系統で生じたイベントなのか、あるいは後口動物の基部で起こったイベントで、ウニでは消失したのかを探るために、原始的棘皮動物有柄ウミユリ類トリノアシにおいて TIR アダプター遺伝子の同定を行う。特に、ナメクジウオにしか見つかっていない CARD-TIR, TPR-TIR というドメイン構成をもつ遺伝子が存在するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) トリノアシ EST の解析方法

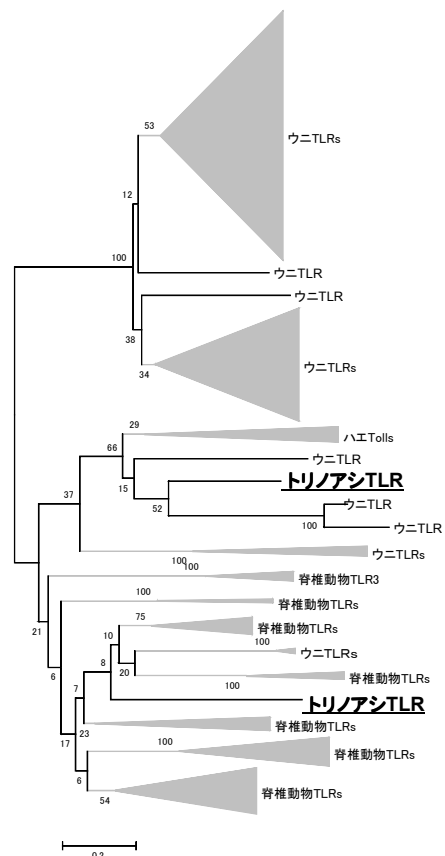
トリノアシ胚・幼生の RNA サンプルを筑波大学生命科学研究科和田洋教授に送り、次世代シーケンスによる EST 解析をしていただき、アセンブルしたデータをいただいた。EST 塩基配列データベースを 6 フレームに翻訳し、隠れマルコフモデルを用いて TIR ドメインと、自ら定義した old TIR ドメインをもつ配列を検索した。得られた配列を SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) によるドメイン構成の確認を行った。ドメイン配列をもとに、MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>) によって、アライメントと近隣結合法を用いて系統樹の作成を行った。

(2) ウニにおける MyD88-like, Sarm-like の時間的・空間的発現パターンの解析

ムラサキウニの遺伝子モデルの配列をもとに、degenerate primer を構築し、ウニ幼生から RT-PCR 法で遺伝子断片をクローニングした。このクローニング断片をもとに DIG-RNA プローブを作成し、Whole-mount in situ hybridization 法を行い、時間的・空間的な発現パターンを調べた。

4. 研究成果

(1) トリノアシ EST を 6 フレーム翻訳したデータベースからドメイン検索により、TIR を含有する 30 種類のコンティグを発見した。NCBI BLASTP 検索により、重複を除き 6 種類の TLR 遺伝子候補を発見した。このうち 3 種類が節足動物 Toll ファミリーと高い相同性を持ち、残り 3 種類は脊椎動物 TLR と高い相同性を持っていた。トリノアシ TLR 遺伝子候補のうち、アライメント可能なアミノ酸の長さを持つコンティグを用いて、系統解析を行ったところ、以下の図のような結果になった。



この系統樹から言えることは、

(a) トリノアシ TLR はウニ 2 2 2 種類の 大

部分を占める TLR グループとは異なり、脊椎動物 TLR 近くに位置づけられた。このことは、ウニ TLR の爆発的な増加は、ウミユリ綱とウニ綱が分岐後に、ウニ綱で起こったイベントであると考えられる。ウニにも脊椎動物 TLR に近い TLR も存在することから、棘皮動物には進化速度の遅い脊椎動物タイプ TLR ファミリーと進化速度の速い脊椎動物タイプ TLR ファミリーが存在する。

(b) トリノアシにもハエ Toll と同じグループの TLR が存在することから、後口動物の祖先は、ハエタイプ TLR, 脊椎動物タイプ TLR の両方を保有していると考えられる。これは、ウニの結果から推測された考えと一致する。

現在、これらの遺伝子の全長配列を決めるために、5' RACE と 3' RACE を行っている。TLR の細胞外のドメイン構成がわかれば、ハエタイプと脊椎動物タイプの TLR の区別がより明確になり、後口動物 TLR の分子進化に関してよりはっきり見えてくるはずである。

トリノアシ EST からドメイン検索により得られた TIR 含有遺伝子の中から、ウニとナメクジウオがもつ MyD88-like, Sarm-like と類似したドメイン構成をもつ遺伝子を発見した。それに加えて、ウニにはないがナメクジウオには存在する TIR ドメインを含む遺伝子である CARD-TIR, TPR-TIR が、トリノアシに存在することが分かった。そのほか、TIR ドメインの一部しかもたない断片配列であるが、ウニよりもナメクジウオやギボシムシと高い相同性をもつ配列が存在した。ナメクジウオは多くの TIR ドメイン遺伝子がシグナル分子として働いているが、今回トリノアシにおいても TIR シグナル分子が数多くみられたことから、TIR シグナル分子の多くのレパートリーは、ナメクジウオから生じたのではなく、後口動物の祖先が保有している可能性が高いと考えられた。つまり、後口動物の祖先は多様な TIR ドメインを含む遺伝子を用いていたが、その後 TLR のシグナル伝達系が洗練されてくるにつれて、それらの遺伝子は失われたのではないかと推測された。

(2) 脊椎動物の MyD88, Sarm とドメイン構成は同じものの、ortholog ではない遺伝子 MyD88Like と Sarm-like の発現がウニの発生過程にみられるかどうかを Transcriptome, Microarray データに照合した。発生過程において発現が確認できた 1 種の MyD88-Like と 5 種の Sarm-like 遺伝子の cDNA 断片をクローニングした。cDNA 断片をもとに Whole-mount in situ hybridization (WMISH) 法で発現解析を行ったが、現在までに特徴的な発現パターンは見られていない。

(Referene)

1. Hibino T. et al. Dev. Biol. 300(1): 349-65 (2006)
2. Rast J.P. et al. Science 314(5801): 952-6 (2006)
3. Davidson C.R. et al. Dev. Comp. Immunol. 32(6): 608-12 (2008)
4. Huang S. et al. Genome Res. 18(7): 1112-26 (2008)

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. 能城 光子, 日比野 拓
バフンウニにおけるアルカリ性ホスファターゼの活性局在の解析
日本動物学会 第 82 回大会 2011 年 9 月 22 日 旭川市 (大雪クリスタルホール)
2. 橋本 拓磨, 日比野 拓
バフンウニにおける抗菌ペプチドをコードする遺伝子のクローニングと発現
日本動物学会 第 82 回大会 2011 年 9 月 21 日 旭川市 (大雪クリスタルホール)
3. 日比野 拓
ウニ幼生における貪食作用の解明に向けて
水腔動物 (Ambulacraria) の発生生物学
2010 年 11 月 20 日 東京大学三崎臨海実験所
4. 日比野 拓, 中 大輔
貪食細胞の一部はユニプルテウス幼生の骨に沿って移動する
第 22 回日本比較免疫学会学術集会 2010 年 8 月 2 日 九州大学西新プラザ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

アウトリーチ活動

1. 日比野 拓, 他
キッズユニバーシティ「ゲームで知ろう! 海の危険な生物」埼玉大学教育学部
2011 年 12 月 28 日

上記のアウトリーチ活動のマスメディア報道

1. 東京新聞地方版インタビュー記事掲載
2011年12月31日
2. テレ玉 イブニング NEWS イベントの様子を紹介 2011年12月28日

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