

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370094

研究課題名(和文)免疫プロテアソームサブユニットPSMB8遺伝子の二型性の進化

研究課題名(英文)Evolution of the immunoproteasome PSMB8 gene

研究代表者

野中 勝(NONAKA, MASARU)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40115259

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文): T細胞に提示される抗原ペプチドの切り出しを行うPSMB8の遺伝子は、有顎脊椎動物のクラスI遺伝子に隣接してMHC領域内に存在する。これまでにPSMB8遺伝子は数億年にわたって二型を保持する興味深い進化をしてきたことが示されており、ここでは二型進化過程の全貌解明を目指した。上位条鰭類、両生類、は虫類に属する10種類以上を解析した結果、これらの動物は下位条鰭類において数億年間維持されている二型的一方を失った後、もう一方から二型を復活させているように見えた。いったん二型が喪失することを想定する説明は強い平衡選択の存在と矛盾しており、二型決定部位以外で配列の均一化する特異な進化が強く示唆された。

研究成果の概要(英文): The proteasome subunit beta type 8 gene (PSMB8) encodes one of the beta subunits of the immunoproteasome responsible for the generation of peptides presented MHC class I molecules. Phylogenetic analysis revealed the presence of dichotomous ancient lineages persisting more than 400 million years. To clarify the whole picture of evolution of the PSMB8 dimorphism, more than 10 species of teleost, amphibian and reptile were analyzed. Most of them seem to have lost one of the two lineages, and then have recovered dimorphism within the other lineage. However, this explanation is incompatible with the presence of a strong selective pressure to keep dimorphism, and interallelic sequence homogenization was proposed as a possible evolutionary mechanism for the apparent recurrent regeneration of PSMB8 dimorphism in these animals. An extremely strong balancing selection acting on PSMB8 dimorphism was implicated in an unprecedented pattern of allele evolution.

研究分野：進化免疫学

キーワード：進化 平衡選択 プロテアソーム 二型性 主要組織適合性抗原複合体

1. 研究開始当初の背景

Trans-species polymorphism (TSP) は、超優性、頻度依存性選択等に基づく平衡淘汰により、遺伝子多型が長期間維持され、祖先種から子孫種へと受け継がれてゆく現象である (Klein et al. 2007 *Annu Rev Genet*)。哺乳類の MHC 遺伝子において発見され、その後多くの例が報告されているが、いずれも少数の近縁種間でのみ確認されており、存続期間も長くても数千万年に留まっている。硬骨魚メダカ (*Oryzias latipes*) の MHC 領域の塩基配列を、HNI、Hd-rR 両近交系の間で比較する過程で、免疫プロテアソームサブユニット遺伝子 *PSMB8* が通常対立遺伝子間では見られない 20% ものアミノ酸の不一致を示すことを見いだした (Tsukamoto et al. 2005 *Immunogenetics*)。Hd-rR に認められた d 型と HNI に認められた N 型は、S1 ポケットの形成に関わる成熟ペプチドの N 末から 31 番目のアミノ酸がそれぞれ Val と Tyr であり、MHC クラス I 分子に C 末の異なるペプチドを提供する事により、抗原認識の多様性に寄与していると思われた。そこでメダカ野生集団における *PSMB8* 遺伝子の多型性を明らかにするために、メダカの北日本集団、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* 遺伝子のタイピングを行った。得られた全ての配列は d 型か N 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。またどの地域集団においても N 型の頻度は 0-27% と低く、*PSMB8* 遺伝子の二型性は d 型に偏った形でメダカの 4 集団の間で分岐が始まったとされる 2500 万年前から平衡淘汰によって保たれてきたことが示された (Tsukamoto et al. 2009 *Mol Biol Evol*)。更に *Oryzias* 属のメダカ近縁各種についても解析した結果、何れの種からも d 型、N 型が確認され、二型性の起源は *Oryzias* 属内での種分化が始まったとされる 6000-7000 万年前に遡ることが示された。また分子系統解析の結果は、両型の起源は 1 億年以上前に遡ることを示し、*PSMB8* 遺伝子の二型性はこれまでに報告された TSP のうちもっとも長く続いているものひとつである事が明らかになった (Miura et al. 2010 *Proc Natl Acad Sci USA*)。

同様な *PSMB8* 遺伝子の顕著な二型性は、軟骨魚類のサメ、両生類のアフリカツメガエルからも報告されていたが、系統解析の結果はこれらの二型性はそれぞれの系統で独立に生じたことを示唆していた。しかしながら最近データベースに登録されている *PSMB8* 遺伝子の配列を調べ直したところ、軟骨魚類と下位の条鰭類に共有される古い二系統の存在が明らかになった。この二系統は成熟ペプチドの 31 番

目の残基が側鎖の小さなアラニン、または側鎖の大きなフェニルアラニンであるため A 系統と F 系統と名付けられた。この二系統はサメ、下位条鰭類では 5 億年以上にわたって保存されてきており、メダカ、フグ、ツメガエルでは一度 F 系統が失われた後、A 系統から再度 31 番目の残基から判断して F 系統と同等な機能を示すと思われる型 (31 番目の残基はメダカでは Y、フグ、ツメガエルでは F) が復活されたことが示された。1 億年に及ぶ TSP、5 億年持続した 2 系統の存在は、*PSMB8* 遺伝子が、これまで他の遺伝子では知られていない特殊な進化を遂げていることを示している。

2. 研究の目的

脊椎動物全体で、*PSMB8* 遺伝子の二型性の存在状態を明らかにする。*PSMB8* 遺伝子は顎口類の共通祖先において、*PSMB5* 遺伝子から遺伝子重複によって生じたと考えられており、ヒトやマウス等の有胎盤類にはこのように顕著な二型は存在しないことが判明しているが、これは派生的な状態を表しているとは判断される。二型性の進化過程の全貌を、1) 古い二系統が保持されている分類群を特定して、その一方の喪失が生じた系統樹上の位置を明らかにし、2) その後残った系統からの二型性の復活が独立に何回起きたかを明らかにし、3) 古い二系統は当初対立遺伝子、パラログの何れであったかを推定し、対立遺伝子、パラログ間の移行の生じた系統樹上の位置を特定する事により解明したい。先ず系統樹上重要な位置を占める動物種を選定し、二型性の有無を調べ、二型性が確認された場合はそれぞれの分子系統樹上での位置を明らかにし、対立遺伝子、パラログの何れであるか検討する。そのためには複数の遺伝的な均一化が行われていない個体を調べる必要があり、その種のサンプルの入手可能な種を解析対象とする。最初は数種程度を選定して解析し、その結果に基づきさらに二型の喪失または復活のタイミングを絞り込める種を解析して、*PSMB8* 遺伝子の二型性の進化過程の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

これまで *PSMB8* 遺伝子の二型性に関して得られている知見は以下の様にまとめられる。サメと条鰭類の一部にはそれらの共通祖先に由来すると考えられる共通の二系統、A 系統と F 系統が存在する。メダカ、フグとツメガエルにはそれぞれ独特の二型が認められるが、それらの配列は全て A 系統に属し、進化過程のどこかで F 系統が失われた後、A 系統内で復活してきた二型と考えられる。ヒト、マウス等の哺乳類には A 系統のみが存在し、二型性は認められない。

ニワトリからは *PSMB8* 遺伝子が失われている。これらの断片的な情報からは、MHC の成立と時を同じくして顎口類の共通祖先で *PSMB5* 遺伝子から遺伝子重複により生じた *PSMB8* 遺伝子は、出現直後から二系統に分かれ、その二系統は一部の動物では 5 億年以上にわたって現在まで継承されており、また他の動物系統では F 系統の喪失、A 系統からの二型性の再生が複数回行われてきたことを示唆する。しかしながらこれらの事象の具体的な回数と系統樹上の位置は特定されていない。

先ず古い F 系統はこれまで軟骨魚類とポリプテルス、コイ目、サケ目の下位の条鰭類のみで確認されていることから、少なくとも 2 回独立に、条鰭類の系統と肉鰭類の系統で失われたと考えられる。そこでウナギ目のアナゴ、タラ目のタラ、及び肉鰭類の根元に位置するハイギョを解析して、これらの事象の生じた時期を特定する。また、一度 F 系統が失われた後の、A 系統からの二型性の復活については出来るだけ多くの肉鰭類及び高等な条鰭類を調べる必要があるが、先ずこれまで二型に関する情報が全く存在しないは虫類のヤモリ、ワニ、及び両生類有尾目のイモリを解析する。最後に対立遺伝子、パラログ間の移行の時期の特定のためには、軟骨魚類の根元に位置する全頭類のギンザメを解析する。

実際の解析は、これまでに知られている全ての *PSMB8* 配列に対応できるユニバーサルなディジェネレートプライマーを用いてゲノム DNA を鋳型とした PCR、または脾臓 RNA を用いた RT-PCR によって行う。これまでに解析された全ての動物の *PSMB8* 遺伝子において、イントロンの挿入位置は完全に保存されており、また各エクソンは比較的短いため、ユニバーサルプライマーはエクソン 2、3 上に二型の判定に使う成熟ペプチドの 31 番目の残基を挟む様に設計してある。入手できる場合は 50 頭程度までの出来るだけ多くの野生個体、または多様性が期待される飼育個体から、ゲノム DNA を抽出する。それを鋳型に PCR を行い、単一のバンドが得られた場合はそのまま、複数のバンドが得られた場合はゲル電気泳動で分離精製した後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定し、31 番目の残基に基づくタイピングをおこなう。ユニバーサルプライマーの使用により、成熟ペプチドの C 末部分の情報が欠損してしまうため、A 型または F 型のホモとタイピングされた個体から、RNA が利用できる場合は 3'RACE により、利用できない場合はインバース PCR により成熟ペプチドの全アミノ酸配列を決定し、既知の配列と系統樹解析を行うことにより、祖先的な二系統がどの種で保存されているか、

あるいは新たに形成されたと思われる二型が存在するかどうかを明らかにする。二型の存在が確認された場合は、対立遺伝子がパラログかの検討を以下の様に行う。野生個体を使用する場合は、出来るだけ血縁関係の濃いものを避けるサンプリングをおこない、全ての個体が二型の両者の遺伝子を有するかどうかで判定する。一方、飼育個体を使用する場合は、出来るだけ血縁関係が明らかになっているものを使用し、二型が対立遺伝子の場合に期待される分離を示すかどうかで判定する。

4. 研究成果

PSMB8 遺伝子の二型の進化パターンを解明する第一歩として、四足類を解析した。両生類のアカハライモリ、爬虫類のニホンヤモリ、アカミミガメ、スッポン、イリエワニ、メガネカイマンを調べ、全種が A, F 両方のアリルを有することを明らかにした。系統解析の結果では、全てのアリルが A 系統に属し、これらの動物の共通祖先で F 系統が失われたこと、及びイモリ、ヤモリ、カメ、ワニで 4 回独立に A 系統内での二型の回復が生じたことを示唆した。この結果は二型性に対する極めて強い平衡選択の存在を示しているが、共通祖先での F 系統の喪失から、各分類群における二型性の回復まで、長期にわたり二型が存在しないことを想定しなければならない矛盾がある。カメ、ワニにおいてエクソン毎に二型間、種間での類似度を比較した所、遺伝子の前半では種毎の二型間の類似度が高く、遺伝子の後半では二型毎の種間の類似度が高くなっており、各種の二型間において遺伝子の前半部分の sequence homogenization が起っていることが示された。前述の見かけ上の F 系統の喪失も、実は 31 番目付近を除いて F 系統の配列が A 系統の配列に置換されただけで、二型性は持続していた可能性が示唆され、これまでに全く知られていなかった二型の進化過程が明らかになった。次に条鰭類を解析を行ったが、まずウナギ目において *PSMB8* 遺伝子の二型性の新たな進化パターンが見つかり、この二型性はこれまでに知られていたものとは比較にならないくらい強い平衡淘汰を受けている事が明らかになった。さらに上位条鰭類に着目し特にフグ目各種の解析をおこなった。フグ目に属する 7 種を解析し、4 種からは A, F 両型の、残りの 3 種からは A 型のみ *PSMB8* が確認された。これらの配列はすべて A 系統に属し、二型を示す場合でも二型間の配列の違いは 1% 以下で、フグ属の共通祖先の段階で既に F 系統は失われており、その後最近になって何度も独立に A 系統内で F 型が復活し、結果として二型が再現したことが示唆された。以上の結果は非常に強い平

平衡選択の存在を示している様に見えるが、F系統が失われてから最近になって二型性が復活するまでに要した長い時間は強い平衡選択と矛盾する。そこでフグ目内の塩基置換のパターンを分析したところ、何度も独立に二型が再生したと考えるよりは、二系は持続的に存在し、二型を決定する残基以外の部分で二型間での sequence homogenization が生じている可能性が高いことが明らかになった。両生、は虫類の結果とあわせて、PSMB8 は他の遺伝子では知られていないきわめてユニークな進化過程をたどっていることが確立された。

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 9 件)

1. Nonaka, M. I., Zsigmond, E., Kudo, A., Kawakami, H., Yoshida, K., Yoshida, M., Kawano, N., Miyado, K., Nonaka, M., & Wetsel, R. A. (2015) Epididymal C4b-binding protein is processed and degraded during transit through the duct and is not essential for fertility. *Immunobiology* 220, 467-475. (査読有り)
2. Sekiguchi, R. & Nonaka, M. (2015) Evolution of the complement system in protostomes revealed by *de novo* transcriptome analysis of six species of Arthropoda. *Dev. Comp. Immunol.* 50, 58-67. (査読有り)
3. Noro, M., & Nonaka, M. (2014) Evolution of dimorphisms of the proteasome subunit beta type 8 gene (PSMB8) in basal ray-finned fish. *Immunogenetics* 66, 325-334. (査読有り)
4. Bannai, H. P., & Nonaka, M. (2013) Comprehensive analysis of medaka major histocompatibility complex (MHC) class II genes: Implications for evolution in teleosts. *Immunogenetics* 65, 883-895. (査読有り)
5. Huang, C. H., Tanaka, Y., Fujito, N. T., & Nonaka, M. (2013) Dimorphisms of the proteasome subunit beta type 8 gene (PSMB8) of ectothermic tetrapods originated in multiple independent evolutionary events. *Immunogenetics* 65, 811-821. (査読有り)
6. Hibino, T. & Nonaka, M. (2013) A novel third complement component C3 gene of *Ciona intestinalis* expressed in the endoderm at the early developmental stages. *Invertebrate Survival Journal* 10, 29-37. (査読有り)
7. Horiuchi, T., Ohi, H., Ohsawa, I., Fujita, T., Matsushita, M., Okada, N., Seya, T., Yamamoto, T., Endo, Y., Hatanaka, M., Wakamiya, N., Mizuno, M., Nakao, M., Okada, H., Tsukamoto, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Nonaka, M., & Kinoshita, T. (2012) Guideline for hereditary angioedema (HAE) 2010 by the Japanese Association for Complement Research-secondary publication. *Allergol Int.* 61, 559-562. (査読有り)
8. Tsukamoto, K., Fujito, N. T., Yoshizaki, G., & Nonaka, M. (2012) Long-lived dichotomous lineages of the proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) gene surviving more than 500 million years as alleles or paralogs. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3071-3079. (査読有り)
9. Fujito, N. T., & Nonaka, M. (2012) Highly divergent dimorphic alleles of the proteasome subunit beta type-8 (PSMB8) gene of the bichir *Polypterus senegalus*. *Immunogenetics* 64, 447-453. (査読有り)

[学会発表](計 16 件)

1. 関口玲生、野中勝 節足動物における補体系の進化、第51回補体シンポジウム、2014年8月22日、23日、神戸常盤大学
2. 野中 勝 MHCとプロテアソームPSMB8 遺伝子の二型性の進化、日本比較免疫学会第25回学術集会、2013年8月26日-28日、岡山理科大学
3. 野呂 恵、野中 勝 条鰭類における免疫プロテアソームサブユニットPSMB8 遺伝子の二型性の進化、日本比較免疫学会第25回学術集会、2013年8月26日-28日、岡山理科大学
4. 野中真弓、野中勝 MHCクラスIIA 遺伝子 1、2、3ドメインの異なる進化パターンについて、第35回日本分子生物

- 学会年会、2012年12月11日-14日、マリンメッセ福岡
5. Ming-Hsuan Yu, Masaru Nonaka, The evolution of The Proteasome Subunit Beta Type 8 (PSMB8) Gene in Non-eutherian Mammals, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日-14日、マリンメッセ福岡
 6. Reo Sekiguchi, Masaru Nonaka “Evolution of the thioester-containing protein genes in Arthropoda” The 24th International Complement Workshop, Crete Greece (October 10-15, 2012)
 7. Mayumi I. Nonaka, Akihiko Kudo, Hayato Kawakami, Kaoru Yoshida, Manabu Yoshida, Natsuko Kawano, Kenji Miyado, Masaru Nonaka “Involvement of the murine epididymal C4BP in the reproductive system but not in the complement system” The 24th International Complement Workshop, Crete Greece (October 10-15, 2012)
 8. 坂内英美, 野中勝, 鱗移植片の急性拒絶反応に関わるメダカMHC遺伝子の同定, 第21回日本組織適合性学会大会, 2012年9月15～17日、明治大学駿河台キャンパス
 9. 関口玲生, 野中勝 節足動物におけるTEPファミリー遺伝子の進化, 第49回補体シンポジウム, 2012年8月24日、25日、大阪府立成人病センター
 10. 遠藤契, 関口玲生, 野中勝 節足動物におけるTEPファミリー遺伝子の進化, 第49回補体シンポジウム, 2012年8月24日、25日、大阪府立成人病センター
 11. 藤戸尚子 塚本健太郎 Chris T Amemiya 野中勝 条鰭類MHC領域におけるPSMB8遺伝子の二型性の進化 日本進化学会第14回東京大会 2012年8月21 首都大学東京
 12. 源島裕祐, 山野上祐介, 野中勝 フグ目におけるPSMB8遺伝子の二型性の進化 日本進化学会第14回東京大会 2012年8月21 首都大学東京
 13. Naoko Fujito, Kentaro Tsukamoto, Chris Amemiya, Masaru Nonaka “Long-term trans-species dimorphism of the PSMB8 gene in the actinopterygian MHC region” The 12th international congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology Fukuoka (July 9-July 13, 2012)
 14. Ching-Huei Huang, Yuta Tanaka, Masaru Nonaka “Recurrent revival of dimorphism of the PSMB8 gene during tetrapod evolution” The 12th international congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology Fukuoka (July 9-July 13, 2012)

15. Hidemi Bannai, Masaru Nonaka “Evolution of teleost MHC class II genes revealed by comprehensive analysis of medaka” The 12th international congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology Fukuoka (July 9-July 13, 2012)
16. Mayumi I. Nonaka and Masaru Nonaka “Different Evolutionary Patterns of Three Alpha Domains of the MHC Class IA Genes” The 12th international congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology Fukuoka (July 9-July 13, 2012)

〔図書〕(計 2件)

1. Nonaka, M. Evolution of the complement system in “MACPF/CDC Proteins-Agents of Defence, Attack and Invasion” (2014) pp.31-43 Springer
2. Nonaka, M. & Sekiguchi, R. Complement System: Evolution. In: eLS 2013 (2013) John Wiley & Sons Ltd.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
野中 勝 (NONAKA MASARU)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：40115259

(2)研究分担者 ()

(3)連携研究者 ()