

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659218

研究課題名(和文)獲得免疫系における自己識別の起源と進化

研究課題名(英文)Origin and evolution of non-self discrimination in adaptive immunity

研究代表者

名川 文清(Nagawa, Fumikiyo)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10241233

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):脊椎動物で最も下等なヤツメウナギやヌタウナギなどの無顎類は、イムノグロブリン型の抗原受容体を持たず、leucine rich repeat(LRR)からなる抗原受容体variable lymphocyte receptor(VLR)を持ち、その遺伝子を哺乳類のV(D)J組み換えとは異なるゲノム再編成により多様化している。本研究課題では、免疫系における自己識別をその起源と進化の観点から解明することを目指し、VLR遺伝子再編成を解析した。その結果、遺伝子再編成が一方から開始する従来のunilateralモデルではなく、両側から開始するbilateralモデルが妥当であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文):The jawless vertebrates (lampreys and hagfish), the most phylogenetically distant vertebrates from mammals, possess an alternative form of adaptive immune system that is mediated by antigen receptors called variable lymphocyte receptors (VLRs). A functional VLR gene, which consists almost entirely of several leucine-rich repeats (LLRs), is generated by the assembly of variable germline LRR gene segments that encode LRRs. Stepwise assembly of the gene segments occurs by replacement of the intervening non-coding DNA between the 5' and 3' constant regions by a process involving "copy choice". Here, we have cloned and analyzed many partially assembled hagfish VLR genes. We found that they contained partially assembled structures at the 5' and 3' ends. These results suggest that a model where the assembly starts at both the 5' and 3' ends, and proceeds up to the middle LRRs, and the two ends are joined using a short homology between the LRR sequences.

研究分野:免疫学

キーワード:獲得免疫系 無顎類 抗原受容体 VLR 遺伝子再編成 進化

1. 研究開始当初の背景

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る。軟骨魚類からヒトに至るまでの生物では、多様なイムグロブリン(Ig) 型の抗原受容体遺伝子 (>10¹⁴ 種類) を V(D)J 組み換えにより創出しているが(図1左) この組み換えは、原始抗原受容体遺伝子にトランスポゾンが偶然に挿入されることによって開始されたと考えられている。

一方、軟骨魚類より下等な脊椎動物であるヤツメウナギやヌタウナギなどの無顎類は、LRR からなる抗原受容体 VLR を持っている。現在のところ、ヤツメウナギやヌタウナギには VLR が3種類(VLRA、VLRB、VLRC)見出されており、ヤツメウナギでは VLRA または VLRC を発現する細胞は哺乳類の T 細胞に、一方 VLRB を発現する細胞は B 細胞に相当すると考えられている。

VLR 遺伝子も、遺伝子再編成により極めて大きな多様性 (~ 10¹⁴ 種類) を創出しているが、この遺伝子再編成の仕組みは、V(D)J 組み換えとは極めて異なったものである(図1右)。再編成前の定常領域遺伝子座に LRR は存在せず、周辺にある数百個の LRR 遺伝子セグメントから数個を選んで定常領域遺伝子座にコピーすることにより機能型遺伝子を創出している。

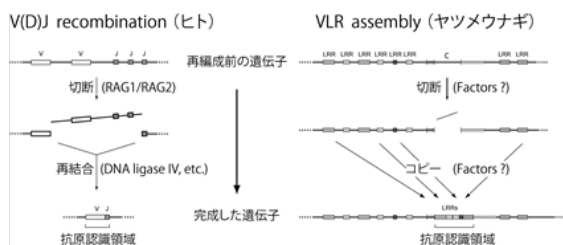


図1 抗原受容体遺伝子の再編成

申請者らは、この遺伝子再編成をヤツメウナギ(*Lethenteron japonicum*)を用いて詳細に解析し、“copy choice” と呼ばれる遺伝子

再編成機構が関与していることを報告した(Nagawa et al. *Nature Immunology*, 8:206-213, 2007)。“copy choice” とは複製の際に DNA polymerase が短い繰り返し配列の間で基質を switch する現象であり、“template switching” とも呼ばれている(図2)。

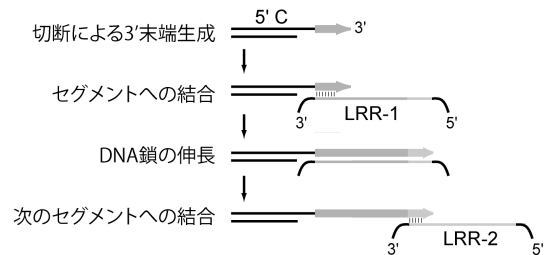


図2 VLR 遺伝子の再編成：“copy choice” モデル

5'側における LRR セグメントの取り込みを示す。VLR 遺伝子再編成は、まず、定常領域(5' C)の末端で DNA が切断されることで開始される。切断により生じた3'末端が周辺に存在する LRR セグメントの1つと相同性を介して対合し、コピーを開始する。1つのセグメントのコピーが終わると、短いホモロジーを利用して次のセグメントにジャンプしコピーを続ける。同様の反応が3'側でも起こり、必要なセグメントのコピーが全て終了した後、左右(5'と3')の末端が結合され、VLR 遺伝子が完成する (Nagawa et al. *Nature Immunology*, 8:206-213, 2007; Kishishita and Nagawa. *Bioessays*, 36:244-50, 2014)。

申請者らはまた、ヌタウナギから 1000 個を超える single cell を単離し、PCR により解析した結果、基本的に1つのリンパ細胞あたり1つの allele だけが機能型 VLR 遺伝子として再編成されていること、さらに、機能型遺伝子が作られると他の allele の再編成を抑える「フィードバック制御」が存在することを報告した(Kishishita et al. *EMBO reports*, 11:126-132, 2010) この結果は、VLR 遺伝子再編成も、V(D)J 組み換えと同様、

精緻な調節を受けていることを示している。

VLR 遺伝子再編成は、今まで知られている遺伝子再編成とは極めて異なった特徴を有しており、この様な遺伝子再編成は無顎類以外には知られておらず、一体どのような機構により VLR 遺伝子の再編成が起きているかは極めて興味深い問題となっている。

2. 研究の目的

本研究課題では、獲得免疫系における自己識別およびその制御機構を、脊椎動物のうち最も下等な無顎類において解析し、免疫系における自己識別をその起源と進化の観点から解明することを目指す。ヤツメウナギやヌタウナギなどの無顎類は、イムノグロブリン型の抗原受容体ではなく leucine rich repeat (LRR) からなる variable lymphocyte receptor (VLR) を抗原受容体として利用している。本研究課題では、VLR 遺伝子再編成システムについて詳細に解析し、自己識別の起源と進化について明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ヌタウナギの germline LRR セグメントの解析

ヤツメウナギ (*Petromyzon marinus*) のゲノム配列は最近報告されたが、ヌタウナギのゲノム配列は現在のところ分かっていない。まず、ヌタウナギに関して、germline LRR の配列を、多数得ることを試みた。sequence capture 法を用いてヌタウナギ (*E. burgeri*) の VLRB・VLRC の germline LRR セグメントの配列を濃縮し、次世代シーケンサーで解析した。

(2) 部分再編成体の同定と解析

germline LRR 可変領域セグメントの取り込みの仕組みを明らかにするため、部分再編成体を同定し解析した。リンパ細胞の中に

は、VLR 遺伝子の再編成が途中まで進行した部分再編成体がまれに検出される。これらの大半は、LRR セグメントをいくつか取り込んだものである (Nagawa et.al., 2007 *Nature Immunology*)。本研究では、ヌタウナギから、このような部分再編成体を VLRC 遺伝子に関して多数得ることにより、それぞれの遺伝子に関して、遺伝子再編成の過程を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

本研究課題では、現在のところ不明の点の多い VLR 抗原受容体遺伝子系について、遺伝子再編成システムを解析し、免疫系における自己識別をその起源と進化の観点から解明することを目的とした。ヤツメウナギに関しては、*P. marinus* ゲノムの配列が明らかにされているが、ヌタウナギに関しては、数種の germline LRR セグメントの配列しか明らかになっていない。本研究では、次世代シーケンサー解析により得られた多数の germline LRR セグメントの配列を用いて、VLR 遺伝子再編成のプロセスを解析した。また、本研究では、ヌタウナギから、VLRC 遺伝子の部分再編成体を多数得た。これら部分編成体には、定常領域の両側から再編成を開始したが、完成前に再編成を中止したと考えられる部分再編成体が複数見いだされた。これらの結果は、VLR 遺伝子再編成が定常領域の両側から開始する bilateral モデルと一致する。これまで、遺伝子再編成が一方からのみ開始し、最後まで進行する unilateral モデルが一般に受け入れられてきたが、われわれの結果は、VLR 遺伝子再編成が定常領域の両側から開始し、最後に両末端が結合して遺伝子再編成が完成する bilateral モデルが妥当なモデルであることを示している。

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1件)

Kishishita N, Nagawa F. Evolution of adaptive immunity: implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Bioessays* 36:244-50 (2014) 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. *11th International Congress of Biology of Fish.* 2014年8月3日~7日「Edinburgh (the United Kingdom)」

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本分子生物学会 2014年11月25日~27日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本免疫学会 2014年12月10日~12日「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本免疫学会 2013年12月3日~7日「幕張メッセ(千葉県・千葉市)」

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本分子生物学会 2013年12月10日~13日「神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

名川文清 (NAGAWA, Fumikiyo)
東京大学・大学院理学系研究科・講師
研究者番号: 10241233

(2)研究分担者

高橋宜聖 (TAKAHASHI, Yoshimasa)
国立感染症研究所・免疫部・室長
研究者番号: 60311403

(3)研究協力者

大島健志朗 (OSHIMA, Kenshuro)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授
研究者番号: 40537411