

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12702

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22133007

研究課題名（和文）HLAと病原菌・ウイルスとの共進化

研究課題名（英文）Coevolution between HLA and bacteria or viruses

研究代表者

颯田 葉子（SATTA, Yoko）

総合研究大学院大学・先端科学研究科・教授

研究者番号：20222010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 39,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの主要組織適合性抗原遺伝子群(HLA)は病原菌に感染したことを感知するなど、免疫系で重要な役割を担う。このHLAは未知のウイルスや細菌に対応するため、ヒトのゲノムの中で最も多型的である。この多様性を形成し維持するメカニズムについて、以下の結果を得た。1) HLA6遺伝子座に働く自然選択の強度は高々3%程度である。2) HLA-DRB1遺伝子座対立遺伝子のペプチド結合領域でのアミノ酸進化速度が一定ではない、3) 対立遺伝子の中には他の霊長類で失われたことによりヒト特異的となった系統があることなどを明らかにした。その他に対立遺伝子間の遺伝的距離と結合するペプチドの種類数との関係を推定した。

研究成果の概要（英文）：Human major histocompatibility complex (human MHC, HLA) genes play an important role in the acquired immune system so as to recognize infection by bacteria and viruses and to activate the immune system in order to protect a body against the infection. Because HLA needs to recognize unpredictable pathogens, HLA genes are the most polymorphic loci among the human genome. We have examined mechanisms for the generation and the maintenance of HLA polymorphisms, and results were as follows: 1) Estimates of the strength of natural selection operating on the six HLA loci is at the most 3% 2) Amino acid substitution rate at the peptide binding region (PBR) among HLA-DRB1 allelic lineages is not uniform, 3) Human-specific DRB1 allelic lineages, which diverged 28 myr ago, resulted from the loss of the allelic lineages in other primates. Furthermore, the relationship between genetic distances between HLA-DRB1 alleles and the extent of repertoires of its binding peptides were elucidated .

研究分野：分子進化学、集団遺伝学、進化生理学

キーワード：自然選択 免疫機構 進化速度 ペプチド 病原菌 ペプチド結合領域

1. 研究開始当初の背景

現在のヒト主要組織適合性抗原 (HLA) 遺伝子群での多様性は過去数百万年あるいはそれ以上にわたりアフリカという環境の中でヒトが出会った細菌やウイルス等のパソジェンとの共進化の結果出来上がってきた。その一方で、現生人類の集団は、アフリカから全世界へ生息環境を拡大させていった。その過程で、アフリカでは出会うことのない地域特異的なウイルスや細菌に遭遇してきた。環境中の未知のパソジェンに対応するため HLA はヒトゲノムのなかで、最も多型的な遺伝子座である。

また、HLA の多様性の維持機構として二つの異なる対立遺伝子を持つヘテロ接合体の適応度 (生存力や、次世代を残す力) に関して、ふたつの異なる仮説がある。ヘテロ接合体が結合できるペプチドのレパトリーの広さが、PBR の配列の異なる程度に依存しているとする Divergent Allele Advantage モデル (DAA モデル) とヘテロ接合体の適応度は等しく、よって、結合できるペプチドのレパトリーの広さにも基本的に差がないとする、対称超優性モデル (SOD) がある。

2. 研究の目的

HLA に関して、長い時間をかけて作り上げられてきた多様性と、アフリカを出て世界拡散の過程で短期間に適応する必要があった世界各地域の特性という、異なる進化的な力のもとで、どのようにして現在の HLA の多様性が形成されてきたかを HLA のハプロタイプという観点から特に民族特異的なハプロタイプに着目し、その歴史を明らかにするとともに、ハプロタイプの多様性について、その維持機構を集団レベルと分子レベルの両面から明らかにすることを目的とした。そのために、まず、ハプロタイプを形成する各遺伝子座の特性を明らかにすることと、各遺伝子座に働く自然選択の様式について、コンピュータシミュレーションおよび、結合ペプチドの種類という観点から、上記の二つの仮説を区別することを試みた。

3. 研究の方法

(1) データベースからほぼ完全長の HLA の対立遺伝子の塩基配列を取得する。HLA のペプチド結合領域 (PBR) に蓄積するアミノ酸を変えるような置換 (非同義置換) の数を推定し、それを元に、1994 年に開発された方法 (参考文献) を用いて、自然選択の強度を推定した。また、

各対立遺伝子の頻度を推定するため、世界各民族集団での頻度データを収集した。

(2) 自然選択の働いていないと想定される、PBR 以外の領域での塩基置換を用いて、対立遺伝子間の分岐時間を反映させた系統樹を描く。次に、最節約法を用いて、PBR で起きた非同義置換の起きた系統樹上の枝を推定する。さらに、同義置換率を用いてその非同義置換率を標準化して、統計検定を行い、対立遺伝子系統間の PBR での非同義置換速度の大小を比較した。

(3) HLA 各対立遺伝子産物が結合できるペプチドの種類数と対立遺伝子間の PBR でのアミノ酸置換数の関連を調べるために次のような方法を用いた。HLA-DRB1 の各対立遺伝子産物が結合できるペプチドは、NetMHCIIpan-3.0 を用いて推定した。用いたパソジェンは、*Mycobacterium tuberculosis*、*Plasmodium falciparum*、*Bordetella pertussis*、*Helicobacter pylori* などヒトに対する病原性等を示す 54 種類を用いた。また、ペプチドは、各パソジェン由来の 1~2 種類の表面タンパク質あるいは、エピトープの存在がすでに知られているタンパク質を用いて行った。ペプチドとの結合を調べる際には、生体中での抗原産生の際のカテプシン酵素での切断を模すために、疎水性のアミノ酸残基での切断を行うようなプログラムを作成した。そのプログラムを用いて、タンパク質を仮想的に切断した結果、15~24 残基からのなる 268 種類のペプチドを得た。また、73 の HLA 対立遺伝子は、すべての対立遺伝子の組み合わせ 2628 について、PBR のアミノ酸の違いがどの程度あるかを推定した。各対立遺伝子が結合できるペプチドを推測したのち、2628 通りの組み合わせについて、対立遺伝子間で共通に結合できるペプチド (JOINT)

と、対立遺伝子のペアでカバーできる結合ペプチド (UNION) を推定して、それぞれを PBR のアミノ酸置換数に対してプロットした。また、ペプチドが由来したパソジェンに対しても同様の解析を行った。

4. 研究成果

以下の 5 つの研究を中心に行った。(1) から (3) および (5) についてはその結果を国際誌に発表した。また (4) については現在国際誌に投稿中である。

(1) HLA 各遺伝子座の自然選択強度の再推定 (発表論文)

これまで HLA 遺伝子座にかかる自然選択強度は 1990 年代の前半、研究代表者のグループが当時入手可能であった各遺伝子座 30 余りの対立遺伝子の塩基配列を元に推定したものがあつた ()。これに対して、2000 年以降爆発的に増えた対立遺伝子の塩基配列のデータを用いて、HLA 各遺伝子座の自然選択強度の再推定を行い、これまでの推定値にサンプル数の増大などが影響をどのように与えたかを明らかにした。その結果、サンプル数の増大はほとんど推定値に影響を与えていないことが明らかになった。(表 1) これは、2000 年以降に明らかになった対立遺伝子の多くが、頻度の低い稀少対立遺伝子であり、1990 年代に用いられた配列の派生型であること、また、自然選択の強度の推定には理論が示すように、稀少対立遺伝子は影響を与えないことを示した。

表 1 HLA 各遺伝子座の自然選択強度(%)の再推定

HLA 遺伝子座							
A	B	C	DRB 1	DQB 1	DPB 1	DQA 1	DPA 1
2.3	4.4	0.5	1.9	0.2	0.5	0.03	0.03
1.5	4.2	0.3	1.9	0.9	0.07	0.3	-

上段の数字は本研究課題の遂行により得られた結果、下段は、1994 年の推定値(参考文献)。

(2) HLA-DRB1 でのペプチド結合領域 (PBR) 非同義置換の蓄積のパターン (発表論文)

PBR での非同義置換の蓄積を同義置換に対してプロットすると、予想に反して一定の速度で蓄積していないことが明らかになった (図 1)。その原因を詳しく調べてみると、非同義置換率が早い系統と遅い系統が存在することがわかった。非同義置換率は自然選択の強度と相関するので、この結果は HLA-DRB1 の系統間で、自然選択の強度が異なる可能性を示している。この違いは、HLA-DRB1 の対立遺伝子系統それぞれの対応する細菌やウイルスの違いを反映している可能性が示唆された。

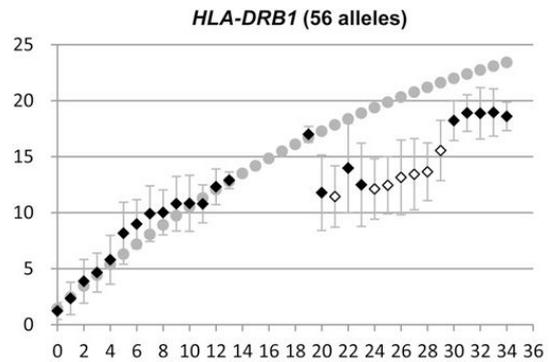


図 1 PBR での非同義置換の蓄積の様子。横軸は対立遺伝子間の分岐時間。縦軸は、PBR での非同義置換の蓄積数。グレーの丸は理論的な期待値。白抜きダイヤモンドは期待値との差が統計的に有意であったもの。

(3) ヒト特異的な HLA-DRB1 対立遺伝子系統とその由来 (発表論文)

HLA-DRB1 と他の霊長類の DRB1 対立遺伝子の系統関係を見てみると、HLA-DRB1 はヒトにだけ存在する対立遺伝子のグループ (A グループ) と他の霊長類の DRB1 と垂直伝達多型 (trans-specific polymorphism) を示すグループ (B グループ) の二つに大別されることが明らかになった (図 2)。しかしヒト特異的な対立遺伝子の分岐年代は 2800 万年前にさかのぼることから、A グループの遺伝子もかつては他の霊長類にも存在していたことが推測され、これらの対立遺伝子が他の霊長類では失われたことにより、ヒト特異的になったことが示唆された。またこの A グループには上記の早い非同義置換率を示す系統が多く、B グループには、遅い非同義置換率を示す系統が多く含まれることもわかった。

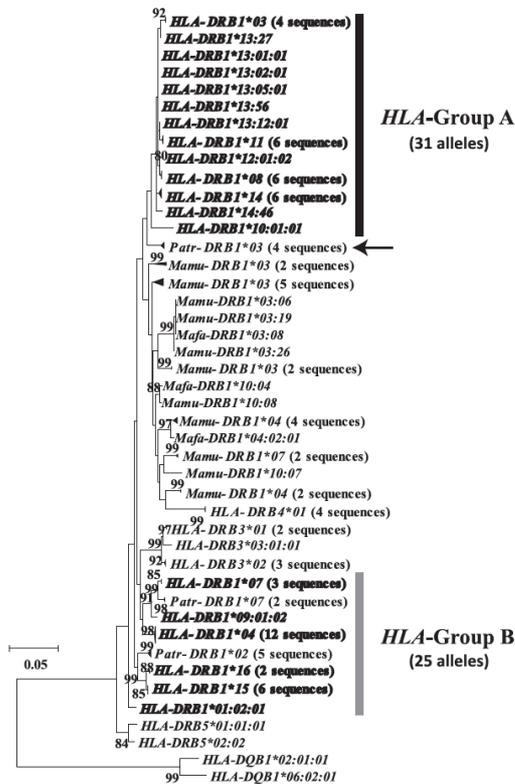


図2 HLA-DRB と他の霊長類の DRB 遺伝子の系統樹 (最尤法)。HLA-DRB1 はヒト特異的なグループ A と他の霊長類との垂直伝達多型を示すグループ B に大別される。外群は HLA-DQB1 の配列を用いた。矢印は A グループに最も近縁であるチンパンジー DRB1*03 の系統を指している。

(4) HLA の対立遺伝子の多様性を維持する自然選択の機構として HLA のヘテロ接合体が結合できるペプチドのレパトリーの広さが、PBR の配列の異なる程度に依存しているとする Divergent Allele Advantage モデル (DAA モデル) とヘテロ接合体の適応度は等しく、よって、結合できるペプチドのレパトリーの広さにも基本的に差がないとする、対称超優性モデル (SOD) を区別するための、コンピューターシミュレーションを行った。観察されている HLA 多型の程度と DAA モデルで予測される結果は相反する点が多いことを示した。また、54 種のウイルス等のパゾジェンのタンパク質に由来する 268 種類のペプチドについて、実際の HLA-DRB1 の対立遺伝子に結合できるペプチドの種類、さらに認識できるウイルスの数と PBR に蓄積する非同義置換の数を比較したところ、上記の A グループ、B グループの間では、置換数と結合ペプチドの数との関係に違いがあることが明らかとなった。

DIVERGENT ALLELE ADVANTAGE (DAA)

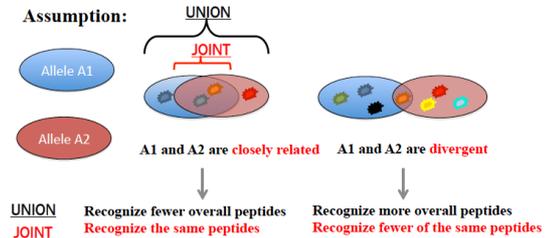
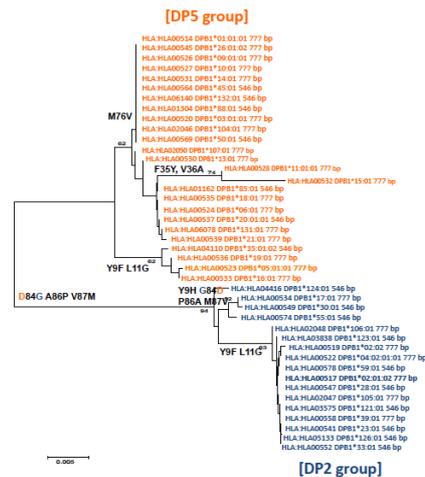


図3 DAA モデル

(5) DP5 の立体構造とアミノ酸置換 (発表論文)

DP5 とスギ花粉に由来するペプチド (Criji1) の結合に関する結晶構造解析が共同研究で行われた。この結晶構造解析の結果から DP5 の構造を特徴付けるアミノ酸がいくつか同定された。共同研究では、それらの特徴的なアミノ酸が進化的に見て DP5 が分化する過程のどのような場面で起きているかを明らかにする研究を担当した。DPB1 と DPA1 それぞれの対立遺伝子のほぼ完全長の塩基配列をデータベースから取得し、PBR 以外の領域を用いて系統樹を描き、その樹上に最節約法で、アミノ酸置換の起きたと思われる時期を推定していくという方法を用いた。その結果、DPB1、DPA1 とともに、最初の 2 分岐の直後に DP5 を特徴付けるアミノ酸置換が起きている事がわかった (図4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

YASUKOCHI YOSHIKI and YOKO SATTA, Current perspectives on the intensity of natural selection of MHC loci. 査読有 Immunogenetics 65:479-83.2013, doi:10.1007/s00251-013-0693-x.

YASUKOCHI YOSHIKI and YOKO SATTA, Nonsynonymous Substitution Rate Heterogeneity in the Peptide-Binding Region Among Different HLA-DRB1 Lineages in Humans. 査読有 G3-Genes Genomes Genetics, 7: 1217-1226, 2014, doi: 10.1534/g3.114.011726 (Early online)

YASUKOCHI YOSHIKI and YOKO SATTA, A human-specific allelic group of the *MHC DRB1* gene in primates. 査読有, Journal of Physiological Anthropology 33:14-22,2014, <http://www.jphysiolanthropol.com/content/33/1/14>

KUSANO SEISUKE, MUTSUOKO KUKIMOTO-NIINO, YOKO SATTA, NOBORU OHSAWA, TOMOMI UCHIKUBO-KAMO, MOTOAKI WAKIYAMA, MARIKO IKEDA, TAKAHO TERADA, KEN YAMAMOTO, YASUHARU NISHIMURA, MIKAKO SHIROUZU, TAKEHIKO SASAZUKI and SHIGEYUKI YOKOYAMA, Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5. 査読有, J. Mol. Biol 426:3016-3027,2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.06.020>

颯田 葉子, HLA の分子進化が語るもの、査読無、血液フロンティア 「特集 HLA Revisited」, 23 巻、1111-1116, 2013

〔学会発表〕(計 15 件)

SATTA YOKO, Human Evolution Revealed from Molecular Evolution of Genes for Immunity. 分子生物学会(招待講演), 2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

颯田 葉子, PBR の機能と HLA の進化、第 20 回日本組織適合性学会大会(招待講演)、2011 年 8 月 29 日、ツインメッセ静岡 北館(静岡県・静岡市)

YASUKOCHI YOSHIKI. and YOKO SATTA, PBR, peptides, and functional divergence in MHC, Society for Molecular Biology and Evolution 2011 (招待講演)、2011 年 7 月 28 日、京都大学(京都府・京都市)

安河内 彦輝、颯田 葉子, HLA-DRB1 スーパータイプにおけるペプチド結合領域の進化経路、第 40 回日本免疫学会、2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

安河内 彦輝、颯田 葉子, HLA-DRB1 スーパータイプのペプチド結合領域における進化モード、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 22 日、京都大学(京都府・京都市)

YASUKOCHI YOSHIKI, YOKO SATTA, Selection intensity and evolutionary process on the peptide binding region in the HLA genes, Society for Molecular Biology and Evolution 2011, 2011 年 7 月 28 日、京都大学(京都)

安河内 彦輝、颯田 葉子, HLA-DRB1 分子の進化過程における抗原ペプチド認識レパトリー多様化の制約、日本進化学会第 14 回大会、2012 年 8 月 21 日~8 月 24 日、首都大学東京(東京都・八王子市)

安河内 彦輝、颯田 葉子, HLA-DRB1 遺伝子座の二つの系統グループにおける分子進化、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24 日~9 月 26 日、九州大学(福岡県・福岡市)

颯田 葉子, HLA 多型維持の機構についての再考、日本進化学会第 15 回大会、2013 年 8 月 28 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

颯田 葉子, MHC 多型維持とヘテロ接合体の適応度について、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 19 日、慶應大学(神奈川県・横浜市)

颯田 葉子, MHC 遺伝子の進化速度、進化様式、そして多型維持の機構、第 29 回京都賞ワークショップ(招待講演)2013 年 11 月 12 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

安河内 彦輝、颯田 葉子, 最新の塩基配列データを用いた HLA 遺伝子座における自然選択圧の強度の推定、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 19 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

SATTA YOKO, Symmetry or Asymmetry in maintaining extraordinary MHC polymorphisms?、Society for Molecular Biology and Evolution 2013、Chicago (USA)

YASUKOCHI YOSHIKI, YOKO SATTA, The human specific HLA-DRB1 allelic lineages maintained by balancing selection. Society for Molecular Biology and Evolution 2013、Chicago (USA)

LAU QUINTIN, YOSHIKI YASUKOCHI, YOKO SATTA, Further investigation of HLA and pathogens 日本遺伝学会第87回大会、2014年9月17日～9月19日、長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

颯田 葉子 (SATTA Yoko)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授

研究者番号：20222010

(4) 研究協力者

安河内 彦輝 (YASUKOCHI Yoshiki)

LAU Quintin

藤戸 尚子 (FUJITO Naoko)