

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18587

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

研究課題名(英文) Evolution of dimorphic immunoproteasome subunit gene

研究代表者

塚本 健太郎 (Tsukamoto, Kentaro)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：00582818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫プロテアソームサブユニットPSMB8はプロテアーゼ活性を有し、MHCクラスI分子上に提示される抗原ペプチドの産生に関与する。軟骨魚類と条鰭類のPSMB8遺伝子にはアミノ酸配列で約20%もの違いが認められる二系統(A系統とF系統)が存在し、条鰭類では二型性を示す対立遺伝子として約4億年以上にわたり種をまたがって維持されている。研究代表者は二型が維持される要因を明らかにするため、二型間の切断特異性の比較を行った。A系統ではキモトリプシン様活性が亢進している一方、F系統では減弱していることが判明した。この結果からC末端のアミノ酸残基が異なるペプチドをMHCクラスI分子に供給することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PSMB8 is one of the proteasome beta subunits with protease activity responsible for generating MHC class I presenting-peptides. PSMB8 gene of cartilaginous and bony fish has two (A and F) lineages showing about 20% differences of amino acid residues. In bony fish, two lineages are presented as dimorphic alleles maintaining for about 400 million years among species. To clarify the biological factors maintaining the dimorphic alleles, cleavage specificities were compared between A and F alleles. Whereas immunoproteasome containing A lineage of PSMB8 increased chymotrypsin-like activity compared with constitutive proteasome, it having F lineage of PSMB8 decreased. this result implied that two lineages of PSMB8 supply the MHC class I presenting-peptides with various C-terminal residues.

研究分野：免疫進化生物学

キーワード：プロテアソーム プロテアーゼ 二型性 種を超えた多型

1. 研究開始当初の背景

遺伝的多型とは、単一遺伝子座において複数の対立遺伝子が存在することであり、基本的に同一種内で見られる現象である。しかし、遺伝的多型を積極的に維持する自然選択により長期間維持することで祖先種から子孫種へと受け継がれ、複数の生物種にまたがって存在する遺伝的多型が知られており、「種を超えた多型 (TSP, trans-species polymorphism)」と呼ばれる (Klein *et al.* 2007 *Annu Rev Genet*)。TSPは哺乳類の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、いずれもごく限られた系統的に近縁な種間のみで見られることから、持続期間は長くても数千万年だと考えられていた。

免疫プロテアソームサブユニット遺伝子 *PSMB8* は、免疫プロテアソームのプロテアーゼ活性を有するサブユニットをコードし、MHCクラスI分子上に提示される抗原ペプチドの産生に中心的な役割を果たしている。これまでに研究代表者は *PSMB8* 遺伝子には、軟骨魚類サメとゼブラフィッシュ等の一部の条鰭類に共有される起源の古い二系統 (A 系統と F 系統) が存在することを明らかにした (Tsukamoto *et al.* 2012 *Mol Biol Evol*)。この二系統は、約 20% ものアミノ酸残基の違いを示し、プロテアーゼ活性機能に関わるアミノ酸残基のうち、N 末端から 31 番目の残基だけに側鎖の小さいアラニン (A 系統) または側鎖の大きいフェニルアラニン (F 系統) という置換が見られ、ペプチド産生に関わる切断活性の違いをもたらすと考えられた。この二系統はサメではパラログとして、ゼブラフィッシュ、ニジマス、ポリプテルス等の条鰭魚では対立遺伝子として存在する事が判明し、進化過程で少なくとも一回パラログ、対立遺伝子間の移行が起こったことが示された (Tsukamoto *et al.* 2012 *Mol Biol Evol*, Fujito *et al.* 2012 *Immunogenetics*)。最も驚くべきことは、条鰭類の対立遺伝子の状態で存在する二系統の起源は約 4 億年以上前に遡り、今まで数千万年程度だと考えられていた TSP の持続期間を遥かに超えることが示唆された。またメダカ、両生類のツメガエル、及び爬虫類のワニやカメ等では一度 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対立遺伝子 (31 番目の残基はメダカでは Y、ツメガエルでは F) が獲得されたことが示された (Tsukamoto *et al.* 2005 *Immunogenetics*, Huang *et al.* 2013 *Immunogenetics*)。またメダカ属では近縁 6 種の野生個体を用いた大規模な多型解析により、再獲得された二型性の起源は 6000-7000 万年前に遡ることが示されている (Tsukamoto *et al.* 2009 *Mol Biol Evol*, Miura *et al.* 2010 *Proc Natl Acad Sci USA*)。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物において特有の進化を見せる *PSMB8* 遺伝子の二型性が維持される生物学的要因を明確にすることにより、遺伝子多型の新たな進化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

真核生物の 20S プロテアソームは 14 種類のサブユニット各ふたつずつ計 28 個のサブユニットからなり、細胞内タンパク分解を担う巨大なタンパク質分解酵素複合体である。酵素活性を持つのは *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7* と呼ばれる 3 種のサブユニットであるが、免疫反応が惹起されインターフェロン γ (IFN- γ) が分泌されると *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMB10* の新たなサブユニットが誘導され、これらがそれぞれ *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7* と置換することにより免疫プロテアソームが形成される。免疫プロテアソームによって切り出されたペプチド断片は MHC クラス I 分子との結合に、より適していると考えられている。各サブユニットは単体では酵素活性を示さないため、免疫プロテアソームを使って *PSMB8* の活性測定を行う必要がある。A 系統ではキモトリプシン様活性が、F 系統ではエラスターゼ様活性を示すことが予測立体構造から推定されているので、実際にこのような切断特異性が見られるかどうかを検証した。

準備段階として *PSMB8* 遺伝子が F 系統または A 系統のホモ個体をそれぞれ飼育し、それらから繊維芽細胞様の培養細胞株を既に確立している。また、ゼブラフィッシュの IFN- γ 遺伝子が大腸菌に発現させ精製を

行い、組換えタンパク質を得ている。前述の2種の培養細胞(F系統ホモとA系統ホモ)で組換えIFN- γ の効果を調べたところ、添加前には殆ど検出されなかったPSMB8遺伝子の発現がIFN- γ 添加によって強く誘導されていることを確認している。従って、これらの培養細胞を使って、IFN- γ の添加前後で切断特異性を比較することにより、PSMB8の二型間の切断特異性の違いを検出できると考えられる。具体的な方法として、増殖期の培養細胞をIFN- γ 処理したものと、しないものから72時間後にホモジェネートを調整し、グルコース密度勾配遠心により免疫プロテアソーム分画を精製し、合成ペプチド基質を用いて切断特異性を比較した。

条鰭類のポリプテルス、コイ目、サケ目では、*PSMB8* 遺伝子の二型性が約4億年に渡りTSPとして維持されてきたことが示唆されたことから、遺伝的多型を積極的に維持する自然選択(平衡選択:超優性選択や頻度依存選択)がはたらいっていると予測された。しかし、数多くの種の分岐を経ても一度もなくならず、系統的に遠縁な種間で数億年も二型が保持され続ける機構としては説得力に欠ける。そこで、雌が自分とは異なる*PSMB8* 系統を持つ雄を配偶者として積極的に選んでおり、その結果として二型が必ず子孫種に受け継がれていると仮説を立てた。ここでは、そのような現象が見られるのかを検証したい。まず予備的な実験として、どちらか一方の系統をホモで持つ雌、雌と同じ系統をホモで持つ雄、雌と異なる系統をホモで持つ雄を1匹ずつ用いて交配実験を行う。生まれた稚魚のゲノムDNAを抽出し、ゲノムPCRにより*PSMB8* 系統のタイピングを行い、どちらの雄が選ばれたのかを調べる。同様な交配実験を同一条件または条件を変えて数回行い、雌が異なる*PSMB8* 系統を持つ雄を選択的に選んでいるのかを検証した。

4. 研究成果

組換えIFN- γ を添加したゼブラフィッシュ培養細胞からグリセロール密度勾配遠心によりプロテアソームを精製する系を確立した。PSMB8, PSMB9, PSMB10それぞれに対する抗血清を作製し、ウエスタンブロット

を行った結果、PSMB8, PSMB9, PSMB10が取り込まれた免疫プロテアソームの形成誘導が可能で精製できることを確認した。また、組換えIFN- γ を添加しないゼブラフィッシュ培養細胞からは、PSMB5, PSMB6, PSMB7が取り込まれた構成型のプロテアソームだけがグリセロール密度勾配遠心により精製される。PSMB8の二型間の機能的な違いを検証するために、上記のアッセイ系を用い多種の合成ペプチド基質に対する切断特異性の比較を行った。その結果、A系統のPSMB8を含む免疫プロテアソームは構成型のプロテアソームに比べてキモトリプシン様活性が亢進している一方、F系統のPSMB8を含む免疫プロテアソームでは構成型のプロテアソームに比べてキモトリプシン様活性が減弱していた。このことから、二系統間の切断特異性の違いにより、C末端のアミノ酸残基が異なるペプチド断片がMHCクラスI分子へ供給されることで様々な病原体に対する抵抗性を保証していることが示唆された。

また、PSMB8の他にプロテアーゼ活性を有する免疫プロテアソームサブユニットとしてPSMB9とPSMB10が存在する。硬骨魚類ではさらにPSMB9-likeとPSMB10-likeが存在し、アミノ酸配列からプロテアーゼ活性を有することが示唆されている。実際に免疫プロテアソームにサブユニットとして取り込まれているのかを明確にするため、PSMB9-likeとPSMB10-likeそれぞれに対する抗血清を作製した。その結果、ウエスタンブロットによりPSMB9-likeとPSMB10-likeの発現がIFN- γ により誘導され、ゼブラフィッシュ培養細胞から精製した免疫プロテアソームにPSMB9-likeとPSMB10-likeが組み込まれサブユニットとして機能していることが明らかとなり、硬骨魚類のプロテアソームは他の脊椎動物のものに比べて多様化していることが示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

塚本 健太郎 (Tsukamoto Kentaro)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：00582818