

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2005～2008

課題番号：17570085

研究課題名 (和文) 原始的生体防御分子の多様性に基づく円口類の系統発生的位置づけに関する研究

研究課題名 (英文) Phylogenetic study on the cyclostomes, with special attention to the differentiation of primitive complement components.

研究代表者

藤井 保 (FUJII TAMOTSU)

県立広島大学・人間文化学部・教授

研究者番号：10181314

研究成果の概要：円口類ヌタウナギの生体防御に関わる分子群について調べ、補体系レクチン経路で働くと予想されるセリンプロテアーゼ MASP-1 と MASP-3 が存在すること、及びそれらの遺伝子構造がナメクジウオやヒトと同じであることを明らかにした。次に抗原認識分子として複数の候補分子を見出し、その何れもがホヤとヤツメウナギで見出された抗原認識分子の中間の性質を持つことを示唆する結果を得た。このことは、進化上ヤツメウナギよりも早い時期にヌタウナギが分岐したことを示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,500,000	0	1,500,000
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：円口類、メクラウナギ類、ヌタウナギ、補体レクチン経路、生体防御レクチン、マンノース結合レクチン関連セリンプロテアーゼ (MASP)

1. 研究開始当初の背景

メクラウナギ類の生体防御系に関する研究は、その系統分類学上の重要性にも拘わらず、PCR 法等による免疫学的認識分子 (Ig、TCR、MHC) の検索は何れも成功しておらず、Raison ら (シドニー工科大学) の補体様成分 (CLP) に関する研究が挙げられるにすぎなかった。CLP は当初 Ig として単離された

分子であったが、我々の解析により、原始的補体系において中心的役割を演ずる補体系第3成分 (HC3) の分解産物であることが示された。さらに我々は、その限定分解に関与すると予想されるセリンプロテアーゼ MASP-1 の同定に成功していた。MASP-1 はレクチン経路で働く酵素であり、哺乳類では MASP-1、MASP-2、MASP-3 の存在が知られて

いる。MASP の存在は原索動物ホヤにまで遡ることがわかっていたが、メクラウナギや哺乳類で見られる MASP とはタンパク質の構造的特徴がわずかに異なっていた。レクチン経路では、まず侵入異物（病原体等）の糖鎖認識が起こるが、これを担う分子は、哺乳類ではマンノース結合レクチン（MBL）である。MBL は、同じ円口類に分類されるヤツメウナギ類でも見つかっていたが、マボヤにおいては認識糖がグルコースであるグルコース結合レクチン（GBL）であることが明らかにされていた。このことから、原索動物マボヤから原始的な脊椎動物であるヤツメウナギへと進化する過程で生体防御レクチンがその機能を変化させたことが示唆されていた。

2. 研究の目的

円口類（無顎類）は最も原始的な脊椎動物と考えられており、現存種としてはヤツメウナギ類とメクラウナギ類が挙げられる。両グループは、解剖学的、生理学的、あるいは生態学的にかなり隔たっており、それぞれ別亜綱または別の綱に属する動物である可能性が指摘されている。しかし、両グループの類縁関係や分岐点、さらには有顎脊椎動物との関係については、未だ十分な情報が得られていない。上述したように生体防御機構は、原索動物から有顎脊椎動物へと進化する過程で大きく変化しており、その変化が原索動物から円口類が分岐したあたりで生じた可能性がある。そこで、知見が著しく少ないメクラウナギ類を研究材料にして、その生体防御に関わる分子群（補体成分等）の多様性や存在様式の解析を通じて、同動物群の系統発生的位置づけを試みた。

3. 研究の方法

(1) MASP-3 の探索

メクラウナギにも哺乳類で見つかった MASP-1 が存在していることを明らかにしてきた。ヒト及び原索動物頭索類ナメクジウオの MASP 遺伝子群の特徴として、MASP-1 の H 鎖と L 鎖をコードするエクソンの間に MASP-3 の L 鎖をコードするエクソンが存在していることが挙げられる。また、H 鎖については、MASP-1 及び MASP-3 遺伝子が共にそれを共有していることが示されていた。一方、同じ原索動物でありながら尾索類であるホヤでは、MASP-3 の L 鎖に相当する遺伝子は見つかっていなかった。これらの結果は、哺乳類で見られる MASP 遺伝子の構造が、原索動物が多様化する間に

確立してきたことを示唆しており、このことが正しければ、円口類メクラウナギでも哺乳類と同じ遺伝子構造になっていると予想される。そこで、このことを明らかにするために、メクラウナギ類ヌタウナギの MASP-1 遺伝子と MASP-3 遺伝子の配置関係について調べた。まず、ヒト及びヌタウナギ MASP-1 cDNA の塩基配列及びヒト MASP-1 遺伝子のエクソン配置情報からプライマーを設計し、ヌタウナギゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことで、ヌタウナギ MASP-3 の L 鎖をコードするエクソンの存在について調べた。次に、この遺伝子から mRNA が転写されていることを確認するために、肝臓から精製した mRNA を鋳型に RT-PCR を行った。

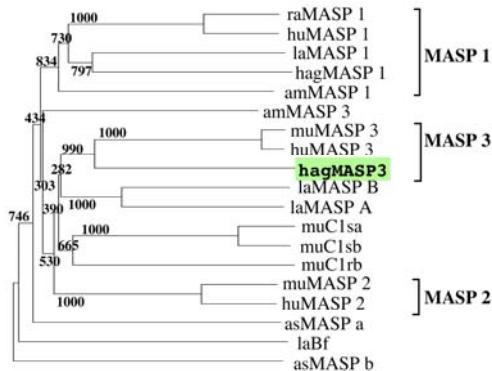
(2) 糖鎖認識レクチンの探索

ヌタウナギ MASP-1 と MASP-3 の存在が確認できたことから、メクラウナギにおいても生体防御に関わるレクチン経路の存在が示唆された。そこで、この経路において最初に侵入異物（病原体等）を認識する生体防御レクチンの探索を行った。同じ円口類であるヤツメウナギより高等な動物では、マンノースや N アセチルグルコサミン（GlcNAc）を認識するマンノース結合レクチン（MBL）が生体防御レクチンとして機能していること、及び原索動物であるホヤではグルコース（Glu）を認識するグルコース結合レクチン（GBL）が機能していることがわかっている。そこで、ヌタウナギ末梢血から血清を調整し、GlcNAc カラム、及びマルトース（Mal）カラムに結合する分子を精製した。次に、精製分子が分子構造的に MBL と GBL の何れに類似しているのかについて調べた。その際、既報の MBL にはコラーゲン様ドメインが存在すること、また、N 末端側のシステインに富む領域で多くの MBL が S-S 結合することにより数百 kDa にも及ぶ多量体を形成していることに注目した。一方 GBL には、コラーゲン様ドメインはなく、2 量体、4 量体、6 量体は形成するものの、MBL のような多量体は形成していない。そこで、精製した分子をコラーゲナーゼで処理し、また、S-S 結合での架橋について非還元条件下での電気泳動を行うことで、分子構造的特性が GBL と MBL のどちらに近いかわかった。

4. 研究成果

(1) ヌタウナギのゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、約 4,000 塩基対の DNA 断片を得た。塩基配列からアミノ酸配列を予測したところ、ヒト MASP-3 の L 鎖と 33.4% 相同な部分が存在していた。そこで、この部

分がメクラウナギの MASP-3 L 鎖をコードしている領域であると予想し、その 3' 末端側にアンチセンスプライマーを、MASP-1 cDNA の 5' 末端側にセンスプライマーを設計し、肝臓 mRNA を鋳型に RT-PCR を行った。その結果、約 2,500 塩基対の cDNA を得ることに成功した。塩基配列解析、及び系統樹作成 (図 1) により、この cDNA がメクラウナギ MASP-3 をコードしていることが明らかになった。このことから、メクラウナギにおいても、MASP-1 H 鎖と L 鎖をコードするエクソンの間に MASP-3 の L 鎖をコードするエクソンが存在していることが明らかになった。



hag:hagfish, hu:human, ra:rat, mu:murine, la:lamprey, as:ascidian, am:amphioxus

図 1: MASP L 鎖のアミノ酸配列をもとに作成した系統樹

この結果は、MASP-1 と MASP-3 の遺伝子構造が原索動物であるナメクジウオで確立したことを示すとともに、有顎脊椎動物で見られるレクチン経路の確立が進化過程上このあたりで起こったことを示唆するものである。

(2) ヤツメウナギの MBL 精製に用いられた方法に従い、ヌタウナギ血清を GlcNAc カラムに通すことにより、糖鎖認識分子をカラムに結合させた。その後、150mM GlcNAc で結合タンパク質を溶出したところ、4 種類のタンパク質 (31kDa、27kDa、26kDa、19kDa) を検出することができた (図 2、上段、+2ME)。これらタンパク質に糖鎖結合活性があることは、精製タンパク質を再度 GlcNAc カラムに通すことで確認した。ヤツメウナギやヒトで見られる MBL はコラーゲン様ドメインを含み、また、S-S 結合で多量体を形成することにより分子量が数百 kDa にも及ぶことが報告されている。そこでまず、これら 4 つのタンパク質をコラーゲンナーゼで処理したところ、分子量の変化は見られず、コラーゲン様ドメインの存在は確認できなかった。また、S-S 結合での架橋により多量体形成をしていないか非還元条件下での電気泳動により調べたところ、31kDa

と 19kDa タンパク質、及び 27kDa と 26kDa タンパク質がそれぞれ 1 分子ずつ結合していることがわかったが、ヤツメウナギやヒトの MBL のような多量体形成は行っていない (図 2、上段、-2ME と下段)。

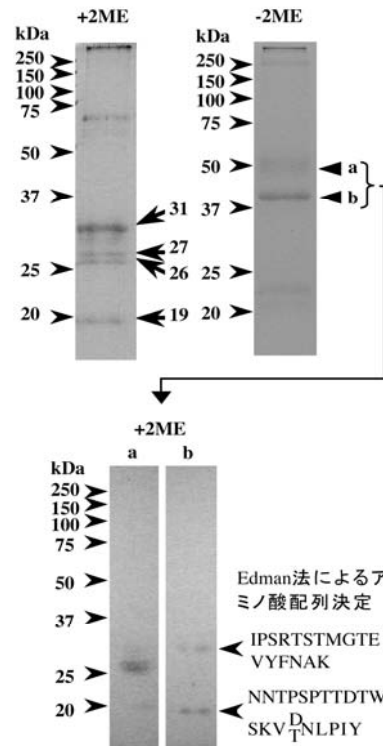


図 2: GlcNAc カラムを用いてメクラウナギ血清から精製された糖鎖結合タンパク質

MBL は C 型レクチンであることから、次に、150mM GlcNAc で溶出した後のカラムから 10mM EDTA で再度溶出したところ、コラーゲンナーゼで部分分解を受ける 25kDa と 73kDa の 2 つのタンパク質を見出した。この 2 つのタンパク質は 1 分子ずつ S-S 結合により架橋されていたが、多量体は形成していなかった。

ホヤの糖鎖結合レクチン (GBL) にはコラーゲン様ドメインはなく、2 量体、4 量体、6 量体は形成するものの、MBL のような多量体は形成しない。そこで、メクラウナギに GBL がないか、MaI カラムを用いて調べてみた。吸着後に 300mM の Glu で溶出したところ、GlcNAc カラムで検出された 31kDa、27kDa、26kDa、及び 19kDa タンパク質が溶出された。その後、10mM EDTA で溶出したところ、25kDa タンパク質が溶出してきた。このタンパク質の多量体形成について調べたところ、2 量体、及び 3 量体を形成していた。

このように、メクラウナギの血清に含まれる糖鎖結合タンパク質を複数同定することが

できた。しかし、この中でどれが生体防御レクチンとして機能しているのかについては特定に至っていない。ただ明確に言えることは、どのタンパク質も MBL のような多量体形成を行っていないということである。このことから、ホヤの GBL からヤツメウナギで見出される MBL へと生体防御レクチンが分子進化を遂げるのは、メクラウナギにおいてではないかと考えている。今後、検出したタンパク質のうちどれが生体防御レクチンとして機能しているのかを明らかにしていくために、タンパク質の構造解析を行う予定である。その一環として、今回明らかにした 19kDa と 31kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列を明らかにした (図 2、下段)。他のタンパク質についても同様の解析を行い、3' RACE 法、5' RACE 法等の方法を用いてまず mRNA の塩基配列を明らかにし、その情報からアミノ酸配列を予測していく予定である。これらの解析結果から生体防御レクチンを特定し、その後 GBL や MBL とタンパク質構造や性質を比較することにより、メクラウナギ類とヤツメウナギ類の類縁関係と進化上の分岐点について生体防御機構の観点から明らかにしていく。

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)

- ① Song, L., Takamune, K., Sugawara, Y. & Fujii, T. 2005. cDNA cloning of a mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) gene from Hagfish (*Eptatretus burgeri*). Zool. Sci., Vol. 22, 897-904. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 高宗和史、近藤昌和、稲川裕之、高橋幸則、菅原芳明、藤井保：円口類ヌタウナギ補体成分 MASP-3 遺伝子の同定。日本比較免疫学会第 18 回学術集会，2006 年 8 月 24 日 (広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 保 (FUJII TAMOTSU)

県立広島大学・人間文化学部・教授

研究者番号：10181314

(2) 研究分担者

菅原 芳明 (SUGAWARA YOSHIKI)

県立広島大学・人間文化学部・教授

研究者番号：30154462

(3) 研究協力者

高宗 和史 (TAKAMUNE KAZUFUMI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20206882