

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570271

研究課題名(和文) ヒト特異的な発現・機能の変化を示すシアル酸受容体 Siglec-11 の進化

研究課題名(英文) Evolution of Siglec-11 in primates

研究代表者

早川 敏之 (HAYAKAWA, TOSHIYUKI)

九州大学・基幹教育院・准教授

研究者番号：80418681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：シアル酸は、細胞表面の糖鎖の末端に位置する酸性単糖である。このシアル酸を認識する受容体の1つであるSiglec-11は、ヒトでのみ脳ミクログリアで発現している。Siglec-11の進化を精査したところ、Siglec-11と別のシアル酸受容体Siglec-16は、約100万年前に脳ミクログリアに出現したペア型受容体であり、これらSiglecは、脳細胞上に豊富に見られるポリシアル酸の構成成分を認識していることがわかった。Siglec-11/Siglec-16ペア型受容体の出現は、ヒト系統において新たな脳細胞間の相互作用を生み出し、ヒトの進化後期における脳進化に関わったとみられる。

研究成果の概要(英文)：Sialic acids are a family of nine-carbon sugars that are found at the terminal end of glycan chains on cell surface. Siglec-11 is a sialic-acid receptor that gained expression on brain microglia uniquely in the human lineage, and shows a neuroprotective function in brain immunity. It seems that Siglec-11 contributed to brain evolution in the human lineage.

Evolutionary analysis of Siglec-11 revealed that Siglec-11 functions as paired receptors with Siglec-16 on human brain microglia. Both Siglec-11 and Siglec-16 recognize oligo-sialic acids, which are enriched in the brain. A mutation that conferred the brain expression of Siglec-11 occurred about one million years ago. It is therefore possible to consider that Siglec-11/Siglec-16 paired receptors contributed to the gain of human-specific cell-cell communication in the brain in the later stage of human evolution.

研究分野：分子進化学・人類進化学

科研費の分科・細目：進化生物学・分子進化

キーワード：ヒトの進化 ヒト化 シアル酸 受容体 遺伝子変換

### 1. 研究開始当初の背景

シアル酸を認識する受容体である Siglec は、霊長類において 17 種見いだされており、そのほとんどが免疫系細胞に発現している。そして、ほとんどの Siglec は細胞内領域に抑制性もしくは活性化シグナルモチーフをもち、免疫系細胞での細胞内シグナル伝達分子として働いている。

Siglec-11 は、細胞内領域に抑制性シグナルモチーフをもつ抑制性受容体である。ヒトにおいてマクロファージと脳ミクログリアで発現しているが、研究代表者らは脳ミクログリアでの発現がヒト特異的なものであることを見いだした。一方で、Siglec-11 はシグナル伝達経路の調節分子である Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 と相互作用すること、SHP-1 は脳ミクログリアの維持に必須の調節分子であること、Siglec-11 は神経保護機能をもつこと、が明らかにされている。これらの知見は、Siglec-11 のヒト特異的な脳ミクログリアでの発現獲得は、ミクログリアの数や機能に影響を与え、脳ミクログリアの関わるヒト特有の脳機能の獲得に関与していることを示唆している。また研究代表者らは、Siglec-11 遺伝子は隣接する Siglec-16 遺伝子による遺伝子変換を受けていることを見出しており、遺伝子変換が遺伝子発現に関わる遺伝子上流領域を含む領域でおこっていること、Siglec-16 遺伝子も脳ミクログリアで発現していることから、Siglec-16 遺伝子による遺伝子変換が、Siglec-11 のヒト特異的な脳発現の獲得の原因と考えられる。

このようなことから、Siglec-11 はヒト系統で特殊化しており、ヒトの脳の進化に関わっている可能性がある。

### 2. 研究の目的

Siglec-11、および Siglec-11 と進化的に関係が深いとみられる Siglec-16 を対象に、それらシアル酸受容体の進化を霊長類系統にて精査し、Siglec-11 のヒト特異的な脳ミクログリア発現の獲得の進化的な背景と、そのヒト進化での役割を解明する。

### 3. 研究の方法

霊長類各種での Siglec-11 と Siglec-16 のゲノム配列の決定と配列解析、および得られたゲノム配列情報をもとにした組換えタンパクの作製によるシアル酸認識能の解析からなる。

#### (1) 霊長類サンプル

ヒト、類人猿、旧世界ザル、新世界ザル、原猿のサンプルを用いる。ヒト、類人猿、旧世界猿、新世界猿、原猿は霊長類の主要系統であり、サンプルはヒトおよび類人猿については、すべての属を網羅し、旧世界ザルにつ

いては全 2 亜科 (オナガザル亜科とコロブス亜科)、新世界ザルについては全 4 科 (オマキザル科、ヨザル科、クモザル科、サキ科) を、それぞれ網羅している。また原猿については、全 4 下目 (キツネザル下目、ロリス下目、アイアイ下目、メガネザル下目) を網羅している。以上のことから、本研究のサンプルを用いることで、霊長類での各遺伝子の進化を精査することができる。

サンプルは、ゲノム DNA もしくは血液として入手するが、血液サンプルについては、DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen 社) にてゲノム DNA として抽出する。

#### (2) DNA 配列の決定

ゲノム DNA を鋳型に、各遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR にて各遺伝子断片を得る。プライマーは、対象とする霊長類種、もしくはその近縁種のゲノムプロジェクトからの配列情報を用いて設計する。ヒトはヒトゲノム、類人猿は、チンパンジー (*Pan troglodytes*)、ゴリラ (*Gorilla gorilla*)、オランウータン (*Pongo pygmaeus*)、テナガザル (*Nomascus leucogenys*) の各ゲノム、旧世界ザルは、アカゲザル (*Macaca mulatta*) ゲノム、新世界ザルは、マーモセット (*Callithrix jacchus*) ゲノム、原猿は、キツネザル (*Microcebus murinus*)、ガラゴ (*Otolemur garnettii*)、メガネザル (*Tarsius syrichta*) の、以上各ゲノムの配列を用いる。配列情報は、NCBI (Trace Archive を含む; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) より得る。

PCR 産物の DNA 配列は、ABI3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems 社) にて決定する。

#### (3) 配列解析

分子進化的・集団遺伝学的解析は、解析用ソフトウェア (MEGA、Gene Tree、DnaSP 等) を用いて行う。

#### (4) Siglec 組換えタンパクの作製

シアル酸認識能の解析に用いるため、Siglec のシアル酸認識に関わる細胞外領域とヒト免疫グロブリン G の Fc 領域 (hIgG Fc) との融合タンパクを作製する。シアル酸認識に直接関与する第 1・第 2 免疫グロブリン様ドメインをコードするエクソンを含むゲノム領域を、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により得る。得られた PCR 断片を発現ベクター上の hIgG Fc コード領域上流に組み込み、作製した発現コンストラクトを 293T 細胞または CHO 細胞に導入し、その後培養上清に分泌される組換えタンパク (Siglec-Fc) を Protein A 固相化担体を用いて精製する。

#### (5) シアル酸認識能の解析

Siglec-Fc を、Protein A でコートしたブ

レートに加え固定、その後ビオチン化したシアル酸糖鎖プローブを加え、Siglec-Fc と結合させる。続いて、ストレプトアビジン結合アルカリ性フォスファターゼを加えて、ビオチン化シアル酸糖鎖プローブとストレプトアビジン結合アルカリ性フォスファターゼを結合させる。これにより、Siglec-Fc とシアル酸糖鎖プローブとの結合を、アルカリ性フォスファターゼの酵素反応による発色として検出する。

#### 4. 研究成果

Siglec-11 は、抑制性のシアル酸受容体であり、隣接する Siglec-16 遺伝子との遺伝子変換にてヒト特異的に脳ミクログリアでの発現を獲得している。そこで、Siglec-11 および Siglec-16 の進化を配列と機能の両面から調べた。ヒト系統での解析から、ヒトにおいて Siglec-16 遺伝子には不活性化アレルが存在しており、その出現は約 300 万年前にまで遡ること、Siglec-16 遺伝子の不活性化アレルによって Siglec-11 遺伝子は遺伝子変換していること、その遺伝子変換の時期から、ヒト Siglec-11 の脳ミクログリア発現の獲得は、約 100 万年前におこったこと、がわかった(図 1)。また、ヒトの脳にて Siglec-11 のリガンドの存在が確認され、ヒト Siglec-11 の脳ミクログリアでの発現獲得は、ヒト脳機能において意味のあるものと考えられる。さらにヒト以外の霊長類も加えた解析から、ヒト、類人猿(チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、テナガザル)、旧世界猿(ヒヒ)の系統で、Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子との間での遺伝子変換が確認されるとともに、少なくともヒト、チンパンジー、ゴリラの系統では Siglec-11 と Siglec-16 のシアル酸認識特異性が、遺伝子変換によってよく似ていることが分かった(図 2 と 3)。Siglec-11 と同様 Siglec-16 も脳ミクログリアで発現しているが、Siglec-11 は抑制性の受容体であるのに対して、Siglec-16 は活性化受容体と正反対の役割をもっている。このように、発現とシアル酸認識特異性は同じであるのに対して、シグナル伝達での役割が正反対であることは、Siglec-11 と Siglec-16 が、細胞機能の微調整に働くペア型受容体であることを示している。このため、約 100 万年前におこった Siglec-11 のヒト特異的な脳ミクログリア発現の獲得は、ヒト進化後期におけるヒト特異的な脳内ペア型受容体の出現を意味している。

シアル酸認識能の解析から、Siglec-11 および Siglec-16 は脳で豊富なポリシアル酸の構成成分を認識することが示され(図 3)、脳内リガンドはポリシアル酸と考えられる。そして、脳内においてポリシアル酸の大半は脳細胞上の NCAM に付加されているため、ヒト特異的な脳ミクログリアでの

Siglec-11/Siglec-16 ペア型受容体の獲得は、ポリシアル酸を介したヒト特異的な脳細胞間の相互作用を生み出したとみられる。ポリシアル酸の異常やミクログリアは統合失調症に関わっていることから、Siglec-11/Siglec-16 ペア型受容体の出現によって獲得された脳細胞間の相互作用は、ヒトの脳の高次精神機能の進化に関わっている可能性がある。

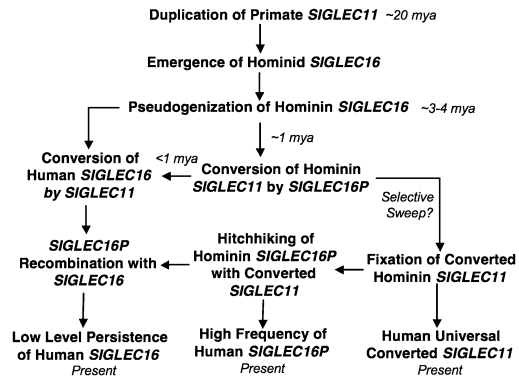


図 1. Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子の進化シナリオ. Siglec-16 遺伝子の不活性化アレルは、SIGLEC16P で示す。ヒトの系統で、Siglec-16 遺伝子の不活性化アレルによる Siglec-11 遺伝子の遺伝子変換 (Siglec-11 遺伝子の脳発現獲得の原因) につづいて、Siglec-11 遺伝子による Siglec-16 遺伝子の遺伝子変換も生じている

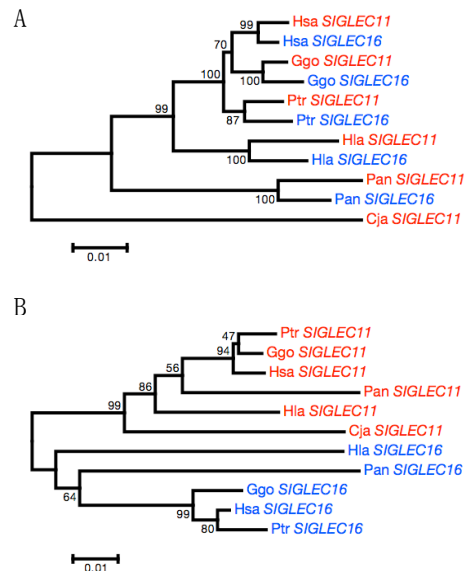


図 2. Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子の系統関係. (A) Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子の間で各霊長類種に共通して相同性の高い領域における系統関係、(B) Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子の間で各霊長類種に共通して相同性の低い領域における系統関係。Hsa はヒト、Ptr はチンパンジー、Ggo はゴリラ、Hla は、テナガザル、

Pan はヒヒ、Cja はマーモセットを示す。各霊長類系統において、Siglec-11 遺伝子と Siglec-16 遺伝子の間で相同性が高い領域では、遺伝子変換がおこなわれていることがわかる。

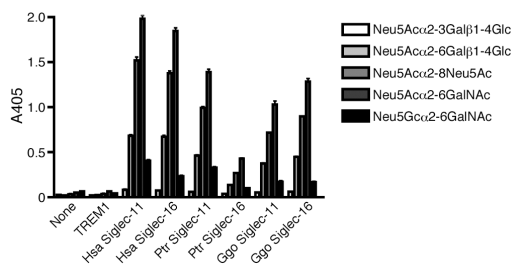


図3. Siglec-11 と Siglec-16 のシアル酸糖鎖プローブへの結合. Hsa はヒト、Ptr はチンパンジー、Ggo はゴリラを示す。Siglec-11 と Siglec-16 との間で、シアル酸糖鎖プローブに対する認識特異性が似ている。

## 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)

- ① Xiaoxia Wang、Nivedita Mitra、Pedro Cruz、Liwen Deng、NISC Comparative Sequencing Program、Nissi Varki、安形高志、Eric D. Green、Jim Mullikin、早川敏之、Ajit Varki、Evolution of Siglec-11 and Siglec-16 Genes in Hominins、2012、Molecular Biology and Evolution、29 (8)、pp. 2073-2086、査読有  
DOI: 10.1093/molbev/mss077

[学会発表] (計5件)

- ① 早川敏之、シアル酸受容体 Siglec-11/Siglec-16 と遺伝子変換、日本進化学会第14回大会、2012年8月21日、東京都
- ② 早川敏之、ヒト系統におけるシアル酸受容体 Siglec-11 の進化、第28回日本霊長類学会大会、2012年7月8日、愛知県
- ③ 早川敏之、ヒト系統におけるシアル酸受容体 Siglec-11 の進化、日本進化学会第13回大会、2011年7月31日、京都府

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 敏之 (HAYAKAWA, Toshiyuki)  
九州大学・基幹教育院・准教授  
研究者番号：80418681

### (2) 研究分担者

安形 高志 (ANGATA, Takashi)  
独立行政法人理化学研究所・システム糖鎖

生物学研究グループ・チームリーダー

研究者番号：40371017

### (3) 連携研究者

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

平井 啓久 (HIRAI, Hirohisa)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：10128308