

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440201

研究課題名(和文) 主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子ペプチド積載機構の分子進化の解明

研究課題名(英文) Molecular evolution of the MHC peptide-loading system

研究代表者

橋本 敬一郎 (Hashimoto, Keiichiro)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：70192268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：古典的MHCクラスII分子は、有顎脊椎動物の獲得免疫系において、Tリンパ球への主として外来ペプチド抗原の提示という重要な機能を有していることが知られている。この古典的MHCクラスII分子へのペプチド抗原結合を細胞内で非常に効率的に行うシステムがDM分子を中心としたペプチド積載システムである。本研究では、分子進化上の要と考えられる動物種を用いて、このシステムに関わるクラスII遺伝子を単離し、詳細な解析を行った。本研究では最適な肉鱗類として肺魚を対象に選び、肺魚のMHCクラスII遺伝子の単離・解析を試みた。得られた肺魚MHCクラスII候補遺伝子の総合的な解析を進め、研究結果を総括した。

研究成果の概要(英文)：The classical MHC class II molecules play critical role in our acquired immune system, presenting antigenic peptide towards CD4-positive T lymphocytes. The nonclassical MHC class II molecule, HLA-DM in case of human, importantly assists the classical MHC class II molecule to bind appropriate antigenic peptide in its groove in the membrane-distal domains. However, the molecular evolution of this DM-system has not been clarified yet in the lower vertebrates including many bony fishes. We studied this DM system in the critical animals such as lungfishes to see if there is a typical DM system in this fish like those observed in human or mouse immune system. We summarized our results and discussed the molecular evolution of this peptide-loading system in the vertebrates.

研究分野：MHC

キーワード：MHC peptide-loading immune-system class II evolution fish antigen lungfish

1. 研究開始当初の背景

古典的MHCクラスII分子へのペプチド抗原の結合は、細胞内のMIICと呼ばれる特殊なコンパートメントで行われる。酸性の環境下で非古典的MHCクラスII分子であるDM分子（ヒトにおいてはHLA-DM）が古典的MHCクラスII分子と相互作用しながら、エンドソーム系で生成された、より高い結合力をもち外来ペプチドを選び結合させていくことが知られている。この非常に効率の良いペプチド積載システムにより、古典的MHCクラスII分子は高い結合力を持つペプチド抗原と結合し、細胞表面へ移動し、T細胞へと抗原提示を行うことになる。従って、我々の生体防御反応において、この外来ペプチド積載ステップは非常に重要な段階であるということになる。古典的MHCクラスII分子のペプチド積載システムの中核的分子であるDM分子は、その特徴を有する遺伝子が、哺乳類以外に、鳥類、爬虫類、さらには両生類から近年単離され、その存在が明らかにされて来た。しかしながら、魚類については、これまで多くのグループが様々な種類のゲノム及びESTデータベース等を用いて探索を行っても、DM遺伝子らしきものを見出すことはできなかった。ネガティブなデータである為、このDM分子によるペプチド積載システムの分子進化については、全く不透明であったと言える。一方で、このDM分子が関与するシステムの分子機構に関しても、mutagenesisの実験が行われ、DM分子及び古典的MHC分子のどの部分が反応に関与するのかは漠然と推測されて来たとは言え、本当に何が必要なのか、反応の実態はどういうものなのかに関して、長らく全く不明であった。2012年12月についに、古典的MHCクラスII分子とDM分子の複合体のX線結晶解析結果が発表され (Pos W et al. Cell 151, 1557 (2012))、実態が明らかになった。2分子の結合の鍵となるアミノ酸残基の存在

が明らかとなり、分子レベルでシステムの存在の有無を検証することが可能となった。我々は、この最も重要となるアミノ酸残基を調べ、真骨魚類ではこのDM分子を軸としたシステムが存在しないことを明確に示した。この研究成果は、BMC Evolutionary Biology に発表した (BMC Evol Biol 13:260 (2013))。

2. 研究の目的

古典的MHCクラスII分子は、有顎脊椎動物の獲得免疫系において、Tリンパ球への外来ペプチド抗原の提示という重要な機能を有している。この古典的MHCクラスII分子へのペプチド抗原結合を細胞内で非常に効率良く行うのが、非古典的MHCクラスII分子であるDM分子（ヒトではHLA-DM）を中心としたペプチド積載システムである。ごく最近我々はこのDM分子中心のメカニズムが脊椎動物の半数近くの種を占める真骨魚類では欠如していることを初めて明らかにし、四足動物系統で独自に進化したものと推測した (BMC Evol Biol 13:260 (2013))。本研究では、分子進化上の要と考えられる動物種、即ち肉鱗類である肺魚を用いて、このシステムに関わるクラスII遺伝子を単離して詳細な解析を行い、このペプチド積載システムの起源を探求しその分子進化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

肺魚におけるDMシステムの有無について、このペプチド積載システムに於いて相互作用する2者、即ち、古典的MHCクラスII分子及び非古典的MHCクラスII分子であるDM分子について、両方向からの検討を行なった。両者とも鎖分子が鍵となる事が判っている。

1. 肺魚の免疫関連組織よりcDNAを作成し、RACE法を用いてMHCクラスII遺伝子鎖遺伝子の単離解析を試みる。

2. 肺魚のMHCクラスII遺伝子鎖遺伝子

について、古典的特徴について様々な角度から検討を行い、古典的MHCクラスII鎖分子について、DMシステムにおける重要なアミノ酸残基に関する分析を行なう。

3. 肺魚の古典的MHCクラスII遺伝子の特徴よりDMシステムの可能性が考えられる場合、cDNAを基に非古典的MHCクラスII遺伝子の網羅的単離解析を行い、肺魚においてDM類似遺伝子の単離を試みる。

4. 研究成果

本研究では、分子進化上の要と考えられる動物種を用いて、このシステムに関わるクラスII遺伝子を単離し、詳細な解析を行う。シーラカンスと同じ肉鱗類の肺魚がより四足類に近い事が報告されており、本研究では最適な肉鱗類として肺魚を対象に選んだ。肺魚は大別して、オーストラリア、南アメリカそしてアフリカ産の数種が存在するが、本研究ではアフリカ産の肺魚を入手して実験に用いた。DMシステムにおいて重要な相互作用領域に関わる古典的MHCクラスII鎖とDMクラスII鎖の2者について、その両方向からキーとなるアミノ酸残基の保存性または遺伝子そのものの存在に関して詳細な検討を行なった。肺魚のMHCクラスII遺伝子の単離・解析を行った。肺魚の組織より得られたmRNAを基に、RACE法、RT-PCR法等によりMHCクラスII遺伝子の単離・解析を行った。得られた肺魚MHCクラスII遺伝子の総合的な解析を進めた。肺魚MHCクラスII遺伝子候補が得られ、その予想アミノ酸配列を他の多くのMHC分子との比較検討を行なった。また、本研究において分子進化上重要と考えられる動物種として加えた四足動物のサラマンダーからも、MHCクラスII遺伝子の単離・解析を試み、得られた遺伝子配列について他のMHC遺伝子群との比較解析を実施し、研究結果を総括した。本研究で得られた研究成果の中で、特に重要と考えられる成果に関して、科学雑誌での発表を予定している。ま

た、MHCクラスII遺伝子の分子進化の理解の為に、MHCクラスI遺伝子の分子群全体の把握と分子進化の理解が必要であるが、それらに関連した論文発表を行なった。

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2件)

- (1) Dijkstra JM, Yamaguchi T, Grimholt U.
Conservation of sequence motifs suggests that the nonclassical MHC class I lineages CD1/PROCR and UT were established before the emergence of tetrapod species.
Immunogenetics. 70: 459-476. (2018)
- (2) Hashimoto, K.
MR1 discovery
Immunogenetics 68, 491-498. (2016)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本敬一郎 (HASHIMOTO Keiichiro)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
教授
研究者番号：70192268

(2) 研究分担者

J.M.ダイクストラ (J. M. DIJKSTRA)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
講師
研究者番号：10387681

岡村和彦 (OKAMURA Kazuhiko)
藤田保健衛生大学・保健学研究科・
准教授
研究者番号：60132255

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

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし