

氏 名 高 橋 朋 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第788号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ウマにおけるナチュラルキラーレセプター遺伝子群の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 助 教 授 嶋 田 葉 子
教 授 笠 原 正 典
助 教 授 柳 川 右 千 夫
助 教 授 前 仲 勝 実 (九州大学)

論文内容の要旨

NK (natural killer) 細胞は、古典的 MHC (major histocompatibility complex) クラス I 分子と相互作用して NK 細胞の機能を調整するレセプター群を発現している。ヒトをはじめとする霊長類の NK レセプターは KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) として知られている。KIR は I 型膜貫通タンパク質で、細胞外領域に 2 つまたは 3 つの Ig (immunoglobulin) 様ドメインがある。また、KIR の細胞内領域には ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) がある。ITIM は、チロシンフォスファターゼを介したリン酸化により、NK 細胞の抑制性シグナルを誘導する役割を果たす。KIR 遺伝子は LRC (leukocyte receptor complex) と称される 1 メガ塩基対の遺伝領域に存在する。これに対して、齧歯類の NK レセプターである LY49 は、II 型膜貫通タンパク質で、C タイプレクチン様ドメインを持っている。LY49 遺伝子は NKC (natural killer complex) と称される遺伝領域でコードされている。

霊長類と齧歯類で構造的に全く違った形のレセプターが用いられているということは、NK レセプターの進化もそれぞれに異なっていることを示している。当初ヒトでは LY49 がないものと考えられていた。しかし、その後の研究で、ヒトの遺伝子上には 1 コピーだけ LY49 遺伝子 (LY49L) があることがわかった。ヒト LY49L 遺伝子がコードするタンパク質は、C タイプレクチン様ドメインが欠けており、NK レセプターとして機能していないものと考えられる。これとは逆に、齧歯類も 1 つか 2 つの KIR 様遺伝子を持っている。しかし、配列に異常があり、正常には機能していないものと考えられる。そこで、霊長類と齧歯類の祖先では、LY49 と KIR の両方のレセプター遺伝子が存在したことが推測される。最近の研究で、ウシには ITIM のある 1 コピーの LY49 遺伝子と、複数の KIR 遺伝子があることが示された。また、他の哺乳類ではネコ、イヌ、ブタにおいて ITIM を持った 1 コピーの LY49 遺伝子と、サザンブロット解析の結果から複数の KIR 遺伝子が存在することが示された。以上の結果からは、哺乳類の大部分の種においては KIR が NK レセプターであることが示唆される。そこで、NK レセプター遺伝子に関しては齧歯類だけが、例外なのだろうかという疑問が持ち上がった。

我々の研究室では、哺乳類の複数の種を対象にして RT-PCR (reverse transcription-PCR) を用いた予備実験を行っていた。その結果、ウマで複数の LY49 遺伝子が転写されているということが分かった。それが、本研究で、ウマにおける NK レセプター遺伝子の詳細な解析を行う動機になった。

本研究の結果、齧歯類以外の哺乳類で初めて、ウマで複数の LY49 cDNA 配列が同定された。2 個体のウマから合計 16 個の異なった LY49 配列を単離することができた。各々のウマから LY49A、LY49B、LY49C、LY49D、LY49E、LY49F の配列を得ることができ、やはりウマには複数の LY49 配列があることが分かった。LY49A、LY49B の中には、アミノ酸配列に翻訳すると C タイプレクチン様ドメインに欠落があり、NK レセプターとしての機能を果たせないと推測されるようなレセプター遺伝子もあった。しかし、それ以外の LY49 については、NK レセプターとして機能しうるものであ

った。LY49A、LY49B、LY49D、LY49E と LY49F は細胞内領域に ITIM モチーフがあり抑制化型としての機能を、LY49C は膜貫通領域に陽電荷性アミノ酸残基のアルギニンを有して活性化型としての機能を果たすことが可能なレセプターだった。

以上の結果より、ウマにおいては LY49 が NK レセプターとしての機能を果たしていると考えられる。これに対して、ウマの KIR プローブを用いたサザンブロット解析でも複数のバンドが検出されていた。ウマが機能的な *KIR* 遺伝子も持っているかどうかを検証するために、ウマ脾臓より作成されたライブラリーを用い、*KIR* 遺伝子族の cDNA クローニングを行った。そして、少なくとも 6 種の異なった cDNA クローン配列を得た。アリル様の 2 つは KIR3DL をコードしたが、ITIM モチーフに変異があった。4 種は KIR・ILT ハイブリッド型であったが、全てのクローンにはストップコドンやフレームシフト変異があり、さらに D2 ドメインの大部分が欠けていて、NK レセプターとして機能しうるものは 1 つもなかった。従ってこの結果は、ウマでも NK レセプターとして LY49 を用いているということの裏付けにもなった。また、サザンブロット解析の結果からだけでは、KIR と LY49 のどちらかが使われているかを推測することが不可能であるということも分かった。

ウマ *ILT11* と *LILRA* の同定は、霊長類と齧歯類以外の哺乳類にも *ILT* 遺伝子が存在するという確固たる証拠になった。ウマにおいて脾臓で最も多く発現されていたのは、*ILT11A*、*ILT11B* である。それらは 2 つの Ig 様ドメインがあるタイプで、ヒトの *ILT11* に類似していた。これらの cDNA にはスプライシングバリエントがあり、アミノ酸配列に翻訳して配列の比較を行うと、膜近位の Ig 様ドメインのみで構成される新しいタイプのウマで特有 *ILT* もあることが分かった。*LILRA* は 4 つの Ig 様ドメインがあるウマ *ILT* 遺伝子であるが、ヒトやマウスにはないような独特のドメイン構成を持っていた。以上の結果から、*ILT* 遺伝子族はそれぞれの種によって、構造も発現のパターンも異なるということが分かった。

本研究ではさらに、LRC 領域に遺伝子があり 2 つの Ig 様ドメインを持つ活性化型レセプターの *FcαR* や *NKp46* 分子をコードする cDNA も単離することができた。その結果、ウマでは *FCAR* や *NKp46* 遺伝子は保存されているのに *KIR* や *ILT* 遺伝子族についてはヒトやマウスとは異なっていることが分かった。また、本研究により *FcαR* とドメイン構成の似た *ILT* 様レセプターをコードするウマ cDNA クローンも単離された。

現段階では、齧歯類以外の哺乳類においてはウマのみが、LY49 を古典的 MHC クラス I 分子のレセプターとして用いていることが強く示唆される動物である。しかし、これから他の哺乳類においての研究が進むにつれて、この状況も変化していくであろう。

論文審査結果の要旨

ナチュラルキラー（NK）細胞の表面には、主要組織適合遺伝子複合クラス I 分子を認識するレセプター（NK レセプター）が発現されている。これらのレセプターは、抑制性、あるいは活性化シグナルを NK 細胞内に伝達することにより、NK 細胞の細胞障害活性を調節している。しかし、ヒトとマウスの NK レセプター分子は、構造的な類似性を示さない。すなわち、ヒトの NK レセプター分子である KIR(killer immunoglobulin-like-receptor)は免疫グロブリン用の分子であり、マウスの NK レセプターである LY49 は C 型レクチン養分氏である。本博士論文は、ヒトとマウス以外の哺乳類がどちらのタイプの分子を NK レセプターとして使用するのかという問題に答えることを主要な目的とした研究であり、ウマに焦点を当てて、NK レセプター遺伝子群の詳細な cDNA クローニングを行ったものである。その結果、ウマには複数の機能的な *LY49* 遺伝子が存在するが、NK レセプターとして機能しうる KIR 遺伝子は存在しない可能性が極めて高いことを示した。この結果に基づき、ウマでは C 型レクチン様分子である *LY49* が NK レセプターとして使われている可能性が強く示唆された。げっ歯類以外の哺乳類 KIR が NK レセプターとして使われているというのがこれまでの通説であったが、本研究はこの通説とは異なる結論を示しており、哺乳類における NK レセプター遺伝子の進化に関して、新たな知見を提供するものである。

本論文では、さらに、多数のウマ NK レセプター関連遺伝子群の塩基配列が報告されている。また、*in situ hybridization* 法ならびに *radiation hybrid* パネルを用いてこれらの遺伝子群の染色体上の位置を決定した共同研究も報告されている。これらのデータとヒト、マウスの騒動領域との比較やこれら遺伝子群の系統樹解析をもとに、この遺伝子群の位置する領域（白血球レセプター遺伝子複合体領域）が、各種生物で独自のダイナミズムで進化している可能性を示唆した。

以上に述べたことから、本論文の内容は博士（理学）に十分値するものであると判断した。なお、本博士論文の主要部分は、申請者を筆頭著者として、免疫学分野における国際学術誌である *European Journal of Immunology* に掲載が確定している。また、公開の論文発表会では、研究内容がわかりやすくまとめられ、質疑応答も適切なものであった。審査委員による口頭試問においても審査委員の質問やコメントに対して真摯な受け答えをし、3 年間に多くのことを学んだことをうかがわせた。また、筆頭著者とした論文が国際誌に受理されていること、本論文の英語要旨も的確に書かれていることから語学力についても問題ないと判断された。以上の点から申請者は学位授与に相応しいと判断した。