

氏 名 鈴木 隆志

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 820 号

学位授与の日付 平成 16 年 9 月 30 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 無顎魚類における免疫関連遺伝子の解析

論文審査委員 主 査 助教授 堀田 葉子  
助教授 田辺 秀之  
教授 野中 勝（東京大学）

## 論文内容の要旨

適応免疫系は、自己—非自己を抗原特異的に識別し、体内に侵入した病原微生物を排除するように進化してきた。抗原の提示および認識は、major histocompatibility complex (MHC) 分子と、rearranging antigen receptor である T-cell receptor (TCR) および Immunoglobulin/B-cell receptor (Ig/BCR) により媒介される。従って、MHC、TCR および Ig/BCR は、適応免疫系の成立には必須の構成要素であるといえる。全ての有顎脊椎動物は、系統進化学的に最も下位の軟骨魚類を含めて、非常に発達した基本的には同様の適応免疫系を備えている。対照的にヌタウナギおよびヤツメウナギに代表される無顎魚類では、適応免疫系の成立に必須な構成要素を同定しようとする試みは、現在まで全て不成功に終わっている。これらの事実は、無顎魚類が適応免疫系の起源を探るうえで重要な系統進化学的な位置を占めていることを示唆している。それゆえ本研究では、適応免疫系の起源を探ることを目的に、無顎魚類の一種であるヌタウナギ *Eptatretus burgeri* を対象として以下の 3 つの実験を行った。1) ヌタウナギ末梢血白血球 cDNA library を用いた transcriptome 解析。2) ヌタウナギ由来 Ig superfamily (IgSF) 遺伝子群の同定および特性調査。3) ヌタウナギ bacterial artificial chromosome (BAC) library の構築、である。

最初のパートでは、ヌタウナギ末梢血白血球より作成した cDNA library 由来の 15,360 clone について、5'-および 3'-tag 配列の決定を行った。5'-tag 配列の相似性に基づいた cluster 化により得られた 5,036 cluster について BLASTX 解析を試みた結果、3,962 cluster で既知遺伝子との相同性が確認された。これらの遺伝子には、MHC、TCR および Ig/BCR は含まれていなかったものの、免疫系に関与すると予測される 78 遺伝子が同定された。これらの遺伝子から、有顎脊椎動物では免疫担当細胞であるリンパ球の分化および機能調節に関与する GATA3 および Bruton's tyrosine kinase (Btk) との相同性が確認された 2 つの cDNA clone を対象に、より詳細な解析を行った。アミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果、ヌタウナギ由来 GATA3-like 分子は、有顎脊椎動物の GATA2 および GATA3 から等距離に位置することが示された。同様に Btk-like 分子を用いた解析からも、この分子は、

真正の Btk というよりむしろ同じ Tec tyrosine kinase family に含まれる Bmx と Btk とが重複する前の特徴を有していることが示された。以上の結果は、適応免疫系が、有顎脊椎動物に限定された機能であるというこれまでの説を強く支持するものと考えられる。一方、無顎魚類からは初めて V-C2 type の domain 構造を持つ IgSF 遺伝子が同定された。予測アミノ酸配列を用いた解析から、本遺伝子は、cytoplasmic tail に immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を持つ新規遺伝子である事が明らかと成った。

続いて、IgSF 遺伝子をコードする cDNA clone 群の同定を行った結果、計 14 cluster が、IgSF 遺伝子に属すると予測された。これらの内、rearranging antigen receptor の V domain との相同性が確認された遺伝子を、ヌタウナギ特異的 IgSF 遺伝子として詳細な解析を行った。本遺伝子特異的 probe を用いてヌタウナギ cDNA library の screening を行った結果、同じ遺伝子族に含まれる 11 本の cDNA 配列が得られた。これら cDNA 配列を用いた解析からは、この遺伝子が multigene family を形成していることが確認された。アミノ酸配列を用いた解析からは、activation form および inhibitory form により構成される膜型糖タンパク質 receptor であり、paired receptor としての特徴を備えていることが確認された。これらの特徴から、本遺伝子族を APAR (Agnathan Paired receptors resembling Antigen Receptors) と命名した。two-step real-time PCR の結果、APAR は、白血球において顕著に発現していることが確認された。APAR の V domain は、非常に保存性が高く、典型的な Joining (J) region を有する。さらに APAR は、現在までに報告されている限り、有顎脊椎動物より下位の生物から報告されたものとしては、TCR/Ig-like V domain を持つ事が確認された初めての遺伝子である。genome 上での APAR V domain の構造は、V region および J region が同一 exon 上にコードされていることから、有顎脊椎動物の rearranging antigen receptor に見られるような recombination signal sequence が挿入されておらず、祖先型 antigen receptor が持っていたと想定される V domain の構造的特徴を備えている。それゆえ、APAR 遺伝子族は、TCR および Ig/BCR の共通祖先が持っていたと予測される V domain と、同じ起源から生じた可能性が示唆される。

最後に、ヌタウナギを対象として bacterial artificial chromosome (BAC) library の構築

を行った。本 library は、およそ 100 kb の平均 insert size を持つ 93,978 clone により構成され、約 3 倍の genome coverage と等しい total DNA size を持つ。また、同時に作成した BAC DNA three-dimensional pool は、PCR による迅速な library screening を可能とする。本研究により構築されたヌタウナギ BAC library は、無顎魚類を対象に作成されたものとしては、世界初の large-insert genomic library である。

まとめとして、本研究により、ヌタウナギから多くの免疫関連遺伝子が同定された。特に APAR 遺伝子族は、antigen receptor の起源を探る手掛かりをもたらすと考えられる。また、本研究で構築された BAC library は、提供可能な重要なリソースであり、ヌタウナギをはじめ無顎魚類の genome 解析を推し進める上では、原動力になるものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

ヒトからサメに至る全ての有顎脊椎動物は、主要組織適合遺伝子複合体、リンパ球抗原レセプター（T、B細胞レセプター）を持っており、そのため莫大な数の抗原を個別に認識し、非自己を排除することができる。これに対し、顎を持たない脊椎動物（無顎類）から、主要組織適合遺伝子複合体、リンパ球抗原レセプター遺伝子を同定しようとする試みはこれまでのところ、ことごとく失敗に終わっている。したがって、ヌタウナギとヤツメウナギによって代表される無顎類は、免疫系の進化を理解する上で重要な系統発生上の位置を占めている。本学位論文は、ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* に焦点を当てて、無顎類の免疫系の解析を行ったものであり、大別すると、1) 白血球 cDNA ライブラリーの構築とそのトランスクリプトーム解析、2) リンパ球抗原レセプターの祖先分子の探索、3) 大規模なゲノム解析のための bacterial artificial chromosome(BAC)ライブラリーの構築の3部からなる。

まず、「白血球 cDNA ライブラリーの構築とそのトランスクリプトーム解析」においては、約 12,000 クローンの expressed sequence tag 会席の結果が詳細に報告されており、1) 多数の新規免疫遺伝子が同定されたが、主要組織適合遺伝子複合体、リンパ球抗原レセプター（T、B細胞レセプター）をコードする cDNA クローンは同定されなかったこと、2) ヌタウナギでは免疫系の細胞の分化に関与する GATA3、BTK 分子の祖先系と推定される GATA3 様分子、BTK 様分子が存在すること、3) GATA、BTK 分子の解析結果は、無顎類と有顎脊椎動物の中間段階でゲノム重複が起きたとする仮説に合致すること、などの結論を得ている。

次いで、「リンパ球抗原レセプターの祖先分子の探索」の章では、agnathan paired receptors resembling antigen receptors (APAR) と名づけられた新規遺伝子群が発見されたことが報告されている。1) APAR の V ドメインは、これまでには有顎脊椎動物以外の生物で同定されたどの V ドメインよりも、T、B細胞レセプターの V ドメインと類似した構造を持っており、さらには典型的な J (joining) 領域を有すること、2) APAR は白血球で発現される多重遺伝子族であり、活性型と抑制型の2型から成る paired Ig-like receptor であること、などの点が明らかにされている。これらのデータは、APAR が抗原レセプターの祖先と近縁であることを強く示唆するものであり、抗原レセプターの進化を理解する上で重要な新知見を提供するものと考えられる。

「ヌタウナギ BAC ライブラリーの作製」の章では、平均インサート長 100kb、ゲノム被覆度約 3 倍のライブラリーが構築されたことが、報告されている。本 BAC ライブラリーはヌタウナギから構築された最初にして唯一の large insert ライブラリーであり、無顎類ゲノムを解析するための貴重なリソースとして、今後、国内外の研究者によって利用されることが期待されている。

獲得免疫系の進化過程の解明において重要な役割を果たす無顎類ヌタウナギの免疫系関連遺伝子について詳細に検討するため、末梢血球細胞由来の mRNA から cDNA ライブラリーを構築し、1 万余に及ぶ EST 配列のカタログ化を行った。脊椎動物の獲得免疫系で細胞分化に関与する分子の祖先系と推測される遺伝子を同定したこと、またこの中で獲得免疫系の進化過程を解明する上で重要な T細胞受容体様の構造を持つ遺伝子 (APAR) を同定した。さらに、ゲノム配列決定のリソースと

なる BAC ライブラリーの構築・整備を行い、それを用いて APAR のゲノム構造を明らかにした。

以上に述べたように、本学位論文には多数の重要な新知見が盛り込まれており、本論文は博士（理学）に十分値するものであると判断した。なお、「白血球 cDNA ライブラリーの構築とそのトランスクリプトーム解析」に関連する部分は、申請者を筆頭著者として、Genes & Genetic System に掲載が確定している。

公開講演会では、上記の結果についてその意義も含めた明確な報告が行われた。無顎類の免疫系関連遺伝子について詳細に検討し、特に APAR 遺伝子について、mRNA、ゲノム DNA の両側面からその存在を明らかにした点はオリジナリティーの高い研究と評価された。公開講演会での質疑においては、獲得免疫系の進化過程に関する最新の情報や、構築したリソースの応用・今後の展開、さらに獲得免疫系の進化過程に関する見解等についての質問に明確な対応を行い、質疑応答は充実したものであった。また、口頭試問では、審査員の質問やコメントに的確かつ思慮深い対応をし、在籍中に多くのことを学んだことを示した。語学力に関しても、申請者を筆頭著者とした論文が国際誌に複数受理されている点、また本論文の英語用紙が的確に書かれている点から、問題はないと判断された。

以上の観点から、申請者は総合研究大学院大学先導科学研究科の課程博士としての要件を満たしており、学位授与に相応しいと判断した。