

学位論文題名

Variable lymphocyte receptor の遺伝学的解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

抗原レセプターである B cell receptor (BCR) と T cell receptor (TCR) は遺伝子の再構成によって多様な抗原結合領域を形成し、進入してきた抗原を直接、あるいは主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) を介して抗原特異的に認識する。しかし、*TCR/BCR/MHC* は有顎脊椎動物でのみ同定され、無顎脊椎動物 (メクラウナギ類・ヤツメウナギ類) や無脊椎動物では同定されていない。近年、*TCR/BCR* と同様に、遺伝子の再構成によって多様性を創出する新規抗原レセプター variable lymphocyte receptor (*VLR*) がヤツメウナギ類で発見された。*VLR* は leucine-rich repeat (LRR) から構成される glycosyl phosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質であり、細胞ごとに LRR の配列と数に多様性が生じる。さらに、LRR の N 末端と C 末端側に存在する N 末端 LRR ドメイン (LRRNT) および C 末端 LRR ドメイン (LRRCT) も多様性に寄与する。これまでに *VLRA* および *VLRB* が同定されている。血清中に抗原特異的 *VLRB* が分泌されることから、*VLRB* は抗体として機能している。本研究では、*VLR* の遺伝学的基盤を明らかにする目的で、①既知の *VLR* とは異なる新規 *VLR* 遺伝子の同定、②メクラウナギ類 *VLR* 遺伝子の染色体マッピング、③ *VLR* と類似したドメイン構造を有するナメクジウオ類 LRR 含有遺伝子 (LRR-containing gene: *LCG*) の同定をおこなった。

【材料と方法】

①ウミヤツメ由来 expressed sequence tag のデータベースを構築し、既知の *VLR* を用いて相同性検索をおこなった。得られた *VLR* 様遺伝子 (*VLR-like*) の完全長 cDNA 配列を決定し、各種配列解析をおこなった。また、組織分布と発現量、および免疫刺激に対する応答性を調べるため、RT-および Real-time PCR をおこなった。また、GPI アンカー型タンパク質か否かを調べるため、*VLR-like* を強制発現させた培養細胞を用いて GPI のアンカー部位を切断する phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) 処理し、フローサイトメトリーにて解析した。②メクラウナギ類 *VLRA* および *VLRB* をコードする bacterial artificial chromosome (BAC) DNA を用いた fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析をおこない、染色体上の位置を同定した。③既知の *VLR* を用いて相同性検索をおこなった。

【結果】

①同定された *VLR-like* のドメイン構造および再構成前の *germline VLR* 構造 (*gVLR*) を含むゲノム構造を既知の *VLR* と比較したところ、*VLR-like* のそれら構造は既知の *VLR* と基本的に一致していた。しかし、*gVLRA* と *gVLRB* では LRRNT と LRRCT の一部または完全な欠失が見られるのに対し、*gVLR-like* では完全な LRRNT および LRRCT が存在していた。単一遺伝子座から LRR の配列と数を異にする多様な転写産物が得られたことから、

VLR-like は遺伝子の再構成をおこなうことが示唆された。よって、*VLR-like* を *VLRC* と命名した。*VLRC* では *gVLRC* 由来の *LRRNT* と *LRRCT* を含む転写産物が発現される。また、*LRRCT* でも遺伝子の再構成が生じるものの、その多様性は低いことが示唆された。PI-PLC 処理実験から、*VLRC* は GPI アンカー型タンパク質であることが示された。立体構造の予測をおこなったところ、*VLRC* の *LRRCT* には *VLRA* および *VLRB* が有する多様性に富む突出構造が存在しなかったことから、他の *VLR* と異なる立体構造を持つことが予測された。*VLRC* の組織発現分布を調べたところ、末梢血白血球で最も発現が高かった。しかし、その発現量は *VLRB* の発現量と比較して 60~100 倍程度低く、免疫刺激による発現亢進も見られなかった。②FISH 解析の結果から、*VLRA* および *VLRB* は同一染色体上に離れて存在していることが示された。③探索の結果、約 400 個の *LCG* を同定した。多くの *LCG* は膜貫通領域を持ち、レセプターとして機能していることが示唆された。レセプター型 *LCG* は *VLR* と同様に *LRR* 関連ドメイン (*LRR*, *LRRNT*, *LRRCT*) のみからなる *LRR* 型と、*LRR* 関連ドメインと Ig 様ドメインを含む *LRR/Ig* 型に大別された。また、これらの遺伝子群の *LRR* の数や配列は遺伝子によって異なっていた。

【考察】

①本研究で同定された *VLRC* は完全な *LRRNT* と *LRRCT* を有していることから、最も原始的な構造を維持する *VLR* であることが示唆された。また、*LRRNT* が多様性に寄与せず、*LRRCT* の多様性も低いことから、*VLRC* では *LRR* が主たる多様性を創出することが示唆された。*VLRC* は *VLRB* と同様に GPI アンカー型タンパク質であり、かつ C 末端には多量体形成に重要な複数のシステイン残基を持つことから、*VLRC* は膜表面に発現するレセプター型以外に、分泌型として放出される可能性がある。*VLRB* の発現を誘導する免疫刺激でも *VLRC* の発現が誘導されず、正常状態での発現量も低いことから、*VLRB* とは異なる機能を有することが示唆された。*VLRC* の *LRRCT* には可変性に富む突出構造が存在せず、その配列の多様性が低いことから *VLRB* とは異なる抗原結合様式をとり、*VLRB* とは異なる抗原を認識する可能性がある。また、②染色体進化の過程で *VLRA* と *VLRB* が離れたことは、組換えや遺伝子変換を抑制し、両遺伝子の機能的分化を促進した可能性がある。③現在、ユニゲノムやナメクジウオゲノムでは、*toll-like receptor* などのパターン認識レセプター (*PRR*) が著しく増加していることから、*LCG* は *PRR* として機能している可能性がある。

【結論】

本研究と最近の研究報告を合わせると、生物はその進化の過程で二種類の生体防御戦略を獲得したことが示唆される。すなわち、第一の戦略は遺伝子重複によって *PRR* の数と種類を増加させることで進入してくる抗原に対抗する戦略である。第二の戦略は少数の遺伝子が多様性を創出する機構を獲得し、進入してくる抗原に対抗する戦略である。また、*VLR* は抗体が認識しにくい糖鎖を認識することから、抗体に替わる実験試薬や診断試薬、治療薬として使用できる可能性がある。したがって、*VLR* 研究は生物学と医学をつなぐトランスレーショナル・リサーチとなり得る。

学位論文審査の要旨

主査	教授	有賀	正
副査	教授	小野江	和則
副査	教授	笠原	正典
副査	教授	畠山	鎮次
副査	准教授	岩淵	和也

学位論文題名

Variable lymphocyte receptor の遺伝学的解析

学位申請者笠松純の学位論文審査は、平成 21 年 2 月 4 日午後 1 時から 2 時まで医学研究科長室において行われた。

《学位論文の内容要約》

Variable lymphocyte receptor (VLR) は無顎脊椎動物 (ヤツメウナギ類とメクラウナギ類) に固有の抗原レセプター分子であり、T 細胞レセプターや B 細胞レセプターと同様に遺伝子の再構成によって多様性を獲得する。現在までに *VLRA* および *VLRB* の 2 遺伝子が同定されている。抗原特異的な *VLRB* が血清中に分泌され、かつ主要な凝集反応因子であることから、VLR は抗体として機能していることが明らかとなっている。申請者は、①新規 *VLR* 遺伝子の単離・同定、②メクラウナギ *VLR* 遺伝子の染色体マッピング、③ナメクジウオ *VLR* 様遺伝子の同定について、それぞれ得られた研究成果を発表した。①では相同性検索によって同定した新規 *VLR* 遺伝子、*VLRC* の遺伝学的解析と発現解析からその機能について議論した。次いで、②では同一染色体上に 2 つの *VLR* 遺伝子が連鎖していることから、染色体進化に伴う VLR の機能分化について議論した。次いで、③では VLR のドメイン構造と類似した多数の遺伝子群をナメクジウオゲノムから同定し、その機能について推察した。最後に申請者の研究成果および近年報告されている研究結果を総合的に概観することにより生物の抗原認識戦略の多様性について言及し、VLR 研究の医学への応用について論じた。

《質疑応答の内容》

有賀正教授から、生体内における VLR の半減期および補体因子との関連性についての質問があった。申請者は VLR の半減期については未だ不明であるが、免疫後の抗血清を用いることで補体価が上がるという過去の研究を引用し、VLR と補体因子の相互作用が存在する可能性があるかと回答した。次いで小野江和則教授より、申請者が同定した新規 *VLR* 遺伝子、*VLRC* の遺伝子発現が非常に低いことから、*VLRC* がヒトイムノグロブリン (Ig) D のように特殊な機能を有している可能性が指摘された。加えて、無顎脊椎動物がもつリンパ球の種類について質問があった。申請者は前者の質問に対しては、抗 *VLRC* 抗体を用いたウェスタンブロット解析から *VLRC* をタンパク質として検出していることを述べ、*VLRC* が特殊な免疫機能を有している可能性があるかと回答した。また後者の質問に対しては、*VLRA* および *VLRB* はそれぞれ異なる細胞集団で発現されていることから、少なくとも機能的に分化した 2 種類のリンパ球が存在すると考えられると回答した。次いで畠山鎮次教授から VLR の多量体

化機構について質問があった。申請者は培養細胞系で VLR が多量体構造を形成すること、および C 末端側のシステイン残基が分泌型 VLR で保存されているという過去の研究を引用し、VLR の多量体化はヒト Ig のように他のタンパク質因子 (J 鎖) を必要とせず、C 末端のシステイン残基によるジスルフィド結合によって生じる可能性を指摘した。次いで岩淵和也准教授からリンパ球は単一の VLR 分子を発現しているのか否か、また機能的に胸腺に相当する器官が無顎脊椎動物に存在するのか否かについて質問があった。申請者は前者の質問に対して、過去の研究から対立遺伝子排除が報告されていることを述べ、無顎脊椎動物のリンパ球はヒトの T 細胞や B 細胞と同様に単一の VLR 分子を発現していると考えられていると回答した。また後者の質問に対して、無顎脊椎動物では胸腺に相当する器官が発見されていないと回答した。さらに、無顎脊椎動物の腸管縦隆起では幼生期にはリンパ球の分裂が盛んに認められるが、同隆起は成体になると退縮することから胸腺と類似した免疫学的・発生学的特徴を示すことについて述べ、無顎脊椎動物では腸管縦隆起が胸腺として機能している可能性があるという回答した。最後に、指導教員である笠原正典教授から、本研究の歴史的背景と今後の研究の展望について質問があったが、申請者は具体例を交え、適切に回答した。

《学位論文に対する審査員の評価》

この論文内容は、Immunogenetics 誌や Genome Research 誌等に掲載され、国際的に高く評価されている。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。