

論文の内容の要旨

論文題目 Evolution of the dimorphism of the immunoproteasome subunit beta type 8 (*PSMB8*) gene in reptiles

(爬虫類における免疫プロテアソームサブユニット*PSMB8*遺伝子の二型性の進化)

氏名 黄 慶輝

免疫プロテアソームは、主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス I 分子によって提示されるペプチドを生成するマルチサブユニットのプロテアーゼである。プロテアーゼ活性を持つサブユニットの一つをコードする *PSMB8* 遺伝子は顎口類に固有で、条鰭類、両生類の多くの種で二型性を示すことが知られている。二型は切断特異性を決定すると考えられる 31 番目の残基が、比較的小さな疎水性側鎖をもつアラニン(A)又はバリン(V)である A 型と、芳香族の大きな側鎖をもつフェニルアラニン(F)又はチロシン(Y)である F 型からなっている。分子系統解析の結果は、*PSMB8* は二つの系統、一部の条鰭類とサメの F 型のみからなる F 系統とその他全てを含む A 系統、に分かれることを示した。この結果は古くから存在した二系統のうち、F 系統が上位条鰭類(メダカ)、及び四足類(ゼノバス、イモリ)において失われ、その後 F 型のアシルが A 系統内で再形成されたことを示唆しており、A 系統内での F 型の再形成は何度も独立に起きているように見える。これまで、爬虫類の *PSMB8* 遺伝子の配列はアノールトカゲ A 型(C31)が知られていたに過ぎないので、本研究では爬虫類の主要 3 目における二型性の有無を検討し、その進化過程を推測した。

台湾のワニ牧場で購入した爬虫綱ワニ目のメガネカイマン(以後、カイマン)とイリエワニ、東京都東京大学三四郎池で採集した爬虫綱カメ目のアカミミガメと福岡県のスッポン牧場で購入したスッポン、及び東京都谷中霊園で採集した爬虫綱有鱗目のニホンヤモリ(以後、ヤモリ)を用いた。まず脾臓及び肝臓等組織からtotal RNAを抽出し、他の動物の *PSMB8* 遺伝子の配列をもとに、31番目のアミノ酸をはさむ位置に作成した縮退プライマーを用いて、RT-PCRを行った。5'及び3'RACE法により *PSMB8* 遺伝子の全長配列を決定し、MEGA5を用いて系統解析を行った。その結果、五種類の爬虫類全てにおいて *PSMB8* 遺伝子の二型性が認められた。種内の二型間の塩基配列を比較したところ、カイマン

(86.9%)、イリエワニ (92.2%)、アカミミガメ (90.8%)、スッポン (90.0%)、ヤモリ (98.2%) となり、両生類のゼノパス (81.5%)、イモリ (92.1%)と同様高いidentityが認められた。系統解析(Fig.1)の結果、これらの配列は全てA系統に属することが明らかとなった。この結果はF型が四足類の中で少なくとも五回独立に再形成されたことを示唆し、*PSMB8*遺伝子の二型性は非常に強い平衡選択を受けていることが示された。

先行研究により、*PSMB8* 遺伝子の二型は、周辺ゲノム領域の解読からアリルであることが示されている。43 野生個体のヤモリ、4 養殖個体のカイマン、及び5 人工環境個体のアカミミガメを用いて、genomic DNA を抽出、intron の増幅断片長多型(Amplified fragment length polymorphism, AFLP) を利用した genotyping を行った。Genotyping の結果は、ヤモリ (A/A:A/F:F/F=12:20:11)、カイマン (A/A:A/F:F/F=1:2:1)、アカミミガメ (A/A:A/F:F/F= 1:3:1)。野生個体を用いたヤモリでの *PSMB8* 遺伝子の二型のアリル頻度は A:F= 0.51:0.49 であり、カイマン、アカミミガメからも少数個体から両型が検出された事実は、両型の頻度をほぼ等しく保つ非常に強い平衡選択の存在を示唆した。

系統解析の結果(Fig.1)は、F 系統のアリルが失われたのち、四足類の中で、残った A 系統のアリルに起きた突然変異によって少なくとも五回独立に F 型が再生されたようにみえる。しかしながら、二型が存在しない期間を想定することは、非常に強い平衡選択の存在と矛盾する。そこで、F 系統の喪失と見られる事象は実は 31 番目の残基近傍のみを除いた A と F 両系統のアリル間での配列の homogenization であり、全体としては A 系統の配列に統一されたものの二型性は存在し続けたのではないかと考えた。この場合は、系統間の homogenization 後、極めて配列の類似した二型間では homogenization が続行し、何らかのきっかけにより homogenization が止まり、二型の配列が分岐しはじめた時点が Fig.1 の分岐点となる。爬虫類の *PSMB8* 遺伝子配列から homogenization の痕跡を探索するために、exon ごとの遺伝子配列比較、系統解析(Fig.2)を行ったところ、ヤモリを除く各種では exon 6 の二型間の類似度が他の exon に比べて著しく低く、爬虫類の共通祖先にはかなり配列の異なる二型が存在したことが示唆された。その後、カメ、ワニの系統で独立に exon 6 を除く部分での homogenization が起き、また、ヤモリでは遺伝子全体に homogenization が起きたと考えられる。爬虫類の *PSMB8* の二型は、F 型を消失したことはなく、homogenization を繰り返しながら存在しつづけたものと思われる。爬虫類の *PSMB8* 遺伝子の二型は、強い平衡選択と繰り返す homogenization の結果生じ、維持されてきた。

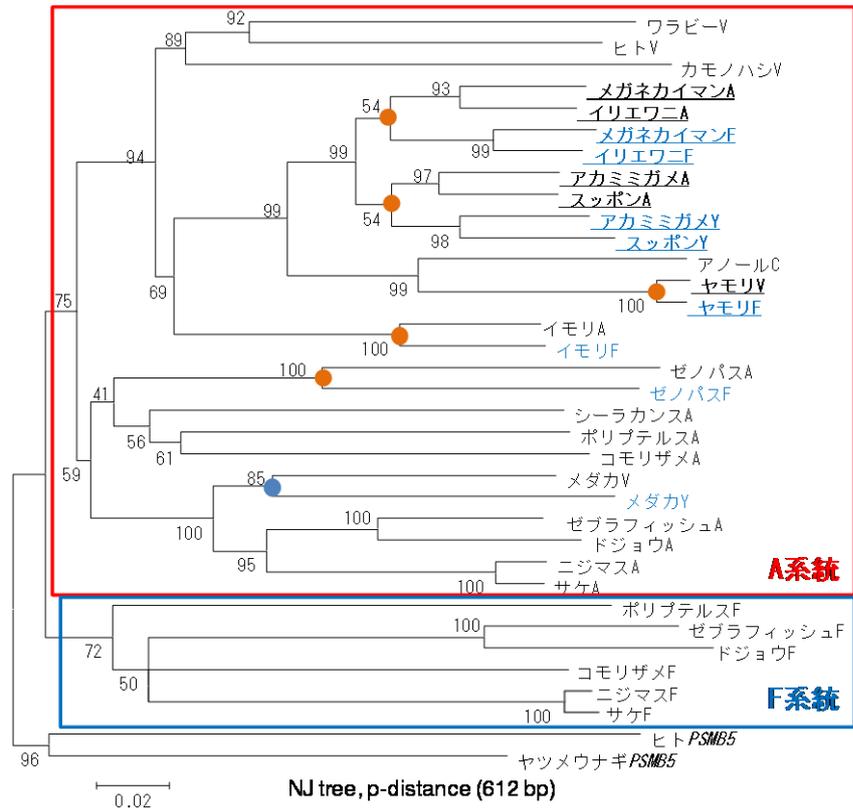


Fig. 1 *PSMB8* 遺伝子の系統樹。本研究で単離した遺伝子を下線で示した。A系統内で生じたF型は青い文字で示した。

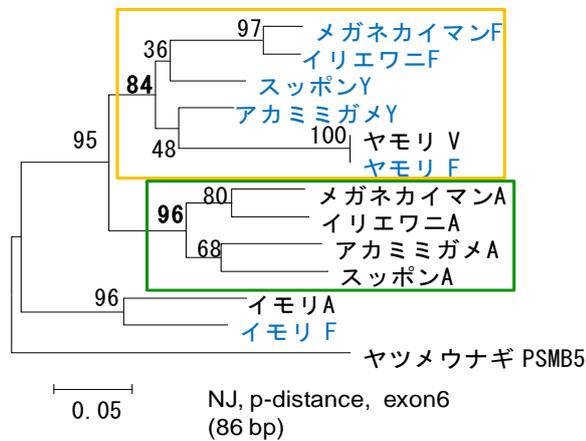


Fig. 2 exon6 のみを用いた四足類の *PSMB8* 遺伝子の系統樹。遺伝子全体の系統樹の結果と異なり、ヤモリ以外の爬虫類は二つのグループに分かれた。