

[別紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ふ し

申請者氏名 付 希

本論文研究は、魚類における免疫グロブリン遺伝子の構造を詳細に解析し、免疫グロブリン遺伝子の進化や発現機構に関する基礎的なデータを得るとともに、養殖における感染防御や魚類抗体の医学などへの活用などを将来的な目的として計画された。

トラフグ (*Takifugu rubripes*) は脊椎動物の中でも最小のゲノム (約400Mb) を持っていることから、脊椎動物のモデル生物としてゲノム解析が早くから進められてきており、精度の高いゲノムシーケンスデータが公開されている。さらにトラフグは我が国における重要な水産魚種であり、養殖が盛んで育種も進められている。これらのことからトラフグは基礎、応用の両面から注目されており、所属専攻や所属研究室においてもトラフグゲノム配列の高精度化が推進されている。

本論文は(1)免疫グロブリン重鎖遺伝子の構造、(2)免疫グロブリン軽鎖遺伝子の構造、(3)次世代シーケンサーを用いた免疫グロブリン重鎖遺伝子の発現解析、(4)結論の4部から構成されており、免疫グロブリン遺伝子のゲノム構造、遺伝子のレパートリー、各遺伝子セグメントの構成、発現頻度、超可変領域の構造の解析結果が詳細に示され、論じられている。

まず(1)免疫グロブリン重鎖遺伝子の構造では、公開されているトラフグゲノムデータベース(assembly v5, January 2010)とともに、所属研究室で雌性発生ダブルハプロイド個体をゲノム解析材料として用いた高精度ゲノムアセンブルデータに基づいて、免疫グロブリン重鎖遺伝子(IGH)の網羅的探索を行っている。それらの過程で所属研究室のシーケンスデータを用いて、公開データに存在する多くのギャップを埋めるとともに、ギャップのPCR増幅とシーケンシングを行って、残っていたギャップの多くを閉じた。所属研究室で構築したスキヤホールドを基に新たに37個の遺伝子を見出した。これらも含めて見出したV遺伝子の系統関係を調べることにより、新たに3種類のV遺伝子ファミリー(IGHV3, IGVH4, IGVH5)が存在することを示した。最終的に48種類のV遺伝子、7種類のD遺伝子、6種類のJ遺伝子

を見出した。それらに加えてIgM、IgT、IgDのクラスに対応するC μ 、C τ 、C δ の構造も明らかにした。C δ については、過去の報告と大きく異なる点があり、それらが個体差なのか、エラーなのかなども含めてその構造を明らかにするにはさらなる検討が必要であることが分かった。

(2)免疫グロブリン軽鎖遺伝子(IGL)の構造の章では3つの染色体と、染色体帰属のついていない38個のスキマホールドから76個のIGL遺伝子を見出した。これらの中でV遺伝子、およびC遺伝子は3つのグループに分類した(L1、L2、L3)。そしてL1、L2遺伝子座の完成度を高めた。特にL2遺伝子座については21個のスキマホールドから22個のIGLV、8個のIGLJ、11個のIGLC遺伝子を見出した。L1、L2遺伝子座では多くのV遺伝子がJ遺伝子、C遺伝子と転写の方向が逆にコードされていることが分かった。

(3)次世代シーケンサーを用いた免疫グロブリン重鎖遺伝子の発現解析の章では次世代シーケンサーであるIlluminaのMiseqを用いて片側301bpの両エンドシーケンスを行い、超可変領域で抗原との結合の特異性の主要決定領域であるCDR-H3の構造、VDJの組み合わせや、各クラス(IgM、IgT)とVDJとの組み合わせの傾向、個体差を調べた。解析した3個体から各々約600万リード、のべ1800万リードが得られた。両エンドからのリードのオーバーラップ部分を結合した結果、各個体から約100万のコンセンサス配列が得られた。それぞれのコンセンサス配列の一つ一つは、1分子のIGH発現mRNAに相当する。これらのデータを解析した結果、V遺伝子、J遺伝子の使用頻度やその組み合わせが明らかになり、IgMとIgTでは異なるV遺伝子を使う傾向があることが分かった。またVDJの使用頻度の傾向は個体間で類似していることが分かった。

CDR-H3については、同じフレームを抽出し比較できるように自らPerlスクリプトを作製しての解析に活用した。その結果、CDR-H3は個体間で差異が大きく、共通する配列はほとんど存在しないことが分かった。

(4)結論では以上の(1)~(3)の内容が要約されている。

以上の研究成果はゲノム解析のモデル生物であるトラフグにおいて、一般的に正確な解析が難しい「多重遺伝子族」の一つである免疫グロブリン遺伝子の構造を詳細に解析し、従来、未同定であった多くの遺伝子を発見した。さらに3個体、各100万分子にもおよぶIGH発現分子の塩基配列を決定して、IGH遺伝子の各部位の遺伝子頻度やその組み合わせの傾向、個体差を明らかにした。これらの成果は学術上、応用上資するところが極めて大きく、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文としてふさわしいものと認めた。