

論文の内容の要旨

論文題目

Evolution of the complement genes in the Arthropoda (節足動物における補体遺伝子の進化)

氏名 関口 玲生

序論

哺乳類の補体系は 30 種以上のタンパク質で構成された反応系で、自然免疫の主要部分として異物の認識と排除を担っている。補体系の中心成分である C3 は限定分解によって様々な生理活性を示すが、最も重要なのは、分子内のチオエステル結合が活性化に伴い開裂し、異物と共有結合を形成することで標識化し、貪食作用を促進するオプソニン活性であると考えられている。分子内チオエステル結合やその他の分子構造を C3 と共有しているタンパク質には、補体成分 C4、C5、プロテアーゼインヒビターである α 2-マクログロブリン (A2M)、GPI アンカー結合型膜タンパク質の CD109、CD109 とオーソログスの関係にあり昆虫において自然免疫を担うことが明らかになっている inset TEP (iTTEP) などがあり、thioester-containing protein (TEP) ファミリーを形成している。先行研究により、刺胞動物イソギンチャクのゲノム中に補体遺伝子 Mannose binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP), factor B (FB), C3 および A2M, CD109 遺伝子が存在することから、真正後生動物の共通祖先では、これら 3 つの成分からなる原始補体系が存在していたこと、TEP 遺伝子の出現と機能分化が完了していたことが考えられる。しかしながら、MASP, FB, C3 遺伝子と TEP 遺伝子はヒトを含むほぼ全ての後口動物にそろって存在しているのに対して、センチュウやショウジョウバエで解読されたゲノム中にはこれらのうち iTTEP/CD109 遺伝子しか存在していない。そこで私は、節足動物に注目し、修士課程においてアダンソンハエトリグモ (*Hasarius adansoni*) を解析し、C3, A2M, iTTEP 遺伝子が存在することを明らかにした。このように、補体系遺伝子と TEP ファミリー遺伝子は節足動物内で複雑な進化を遂げていることが示唆されたため、本研究ではこれらの遺伝子の情報がない主要な綱に属する動物種 (図 1) について網羅的な解析手法を用いて節足動物における補体系および TEP 遺伝子の進化過程の全容解明を目指した。

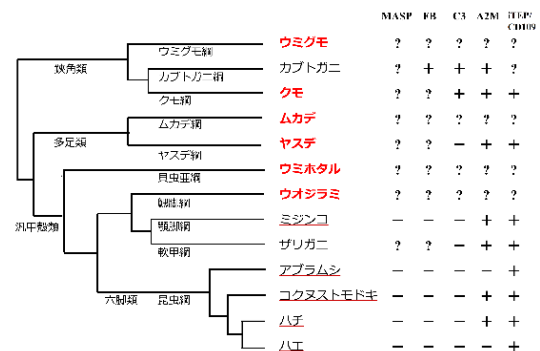


図 1 節足動物の系統関係と補体、TEP 遺伝子の分布
赤字は本研究で解析した種、赤字はゲノム情報が存在する動物種を示す。

第一部 縮退プライマーを用いた RT-PCR による TEP 遺伝子のクローニング

TEP ファミリーに属するタンパク質は C3, A2M, iTTEP/CD109 サブファミリーに分類され、8 つのマクログロブリン(MG)ドメイン、CUB ドメインおよびチオエステルドメイン (TED) を持つ。TEP 遺伝子のアミノ酸配列をアラインすることで、動物種と TEP の種類に関わらず非常に

よく保存されている配列を TED 内に見出すことができた。この配列を基に作成した縮退プライマーを用いた RT-PCR によって得られる約 200 b p の部分配列をクローニングすることで TEP 遺伝子を網羅的に得ることを計画し、TEP 遺伝子の情報がないウミグモ綱シマウミグモ (*Ammothea* sp.)、ムカデ綱アオズムカデ (*Scolopendra subspinipes*)、顎脚綱フグウオジラミ (*Pseudocaligus fugu*)、アイゴウオジラミ (*Caligus* sp.)、サメジラミ (*Pandaridae* gen. et sp.) が持つ TEP 遺伝子の解析を行った。これにより、シマウミグモ、アオズムカデ、フグウオジラミからそれぞれ 4 種、アイゴウオジラミ、サメジラミからそれぞれ 2 種の TEP 部分配列が得られた。各 TEP 部分配列に BLAST による相同性検索を行った結果から、シマウミグモの各 TEP 遺伝子を C3, A2M-1, A2M-2, A2M-3, アオズムカデの各 TEP 遺伝子を C3, A2M, iTEP/CD109-1, iTEP/CD109-2, フグウオジラミの各 TEP を C3, A2M-1, A2M-2, A2M-3, アイゴウオジラミの各 TEP を C3, A2M, サメジラミの各 TEP 遺伝子を C3, A2M とした。続いて、全ての TEP について 5',3'RACE-PCR を行い、シマウミグモ A2M-3, アオズムカデ iTEP/CD109-1, アイゴウオジラミ C3, サメジラミ C3 を除く TEP の cDNA 配列の全長を決定した。ドメイン検索や他動物の TEP アミノ酸配列とのアラインにより、シマウミグモ C3, アオズムカデ C3, フグウオジラミ C3, サメジラミ C3 にはヒト C3 と同様に β - α 切断部位、アナフィラトキシンドメイン、C345C ドメインが確認できた。また、シマウミグモ A2M-1, A2M-2, アオズムカデ A2M, アイゴウオジラミ A2M, サメジラミ A2M は A2M に特徴的なベイト領域を持つことがわかった。一方で、フグウオジラミ A2M-1, A2M-2 はベイト領域が認められず、またアミノ酸配列を用いた相同性検索により N 末端側は A2M、C 末端側は iTEP/CD109 とそれぞれ 30% 程度の同一性を示した。フグウオジラミ A2M-1, -2 は例外として、これまでに判明している節足動物の TEP は亜門や綱が異なる他の節足動物 TEP とアミノ酸配列で 30~40% 程度の同一性を示した。ところが、魚を宿主とした寄生生物であるフグウオジラミ、アイゴウオジラミ、サメジラミから同定した C3 遺伝子は節足動物の TEP とは 25~30% の同一性を示したのに対して、魚類の C3 とは約 70% の同一性を示した。魚類 C3 と同一性の高いウミグモ綱種の C3 遺伝子がゲノム中に存在しているかを明らかにするために、フグウオジラミにおいて genomic-PCR を試みた結果、イントロンを含む C3 遺伝子の部分配列を増幅することができた。このことから、ウミグモ綱は C3 遺伝子を宿主である魚類から水平伝播により獲得した可能性が示唆された。

第二部 RNA-seq による補体成分の網羅的解析と節足動物の補体系の進化

節足動物の持つ補体成分遺伝子の探索を行うために RNA-seq による網羅的解析を試みた。Illumina HiSeq2000 によるシーケンスデータをアセンブルして得られたコンティグに対する BLAST 検索を行うことで解析を行った。修士課程および本研究第一部において縮退プライマーを用いた TEP 遺伝子の解析を行ったアダソンハエトリ、マクラギヤスデ (*Niponia nodulosa*)、シマウミグモ、アオズムカデ、フグウオジラミ、アイゴウオジラミに加えて、オビヤスデ (*Epanerchodus* sp.)、ウミホタル (*Vargula* sp.) を解析種とし、TEP 遺伝子の解析も同時に行った。まず TEP 遺伝子の解析結果について述べる。ヒトおよび節足動物 TEP のアミノ酸配列をクエリーとした BLAST 検索の結果および修士課程、本研究第一部で同定した全ての TEP を表 1 に示す。これら TEP のうち、第一部において系統関係が不明であったフグウオジラミ A2M-1, -2 と、部分配列しか得られていない アイゴウオジラミ C3, ウミホタル A2M-1, A2M-2,

iTEP/CD109 を除いて作製した TEP 遺伝子の系統樹が図 2 である。この系統樹から、節足動物の TEP の多くはアイソタイプが種ごとにクラスターを形成しており、それらが各種の系統における遺伝子重複で生じたことが示唆される。一方で、アオズムカデ、マクラギヤステ、オビヤステの iTEP/CD109 は二つのクレイドに分かれており少なくとも二つの系統がこれらの iTEP/CD109 に存在すると考えられる。

続いて C3 以外の補体成分についての探索を行った。哺乳類の補体成分の多くは反応特異性を生み出す固有のドメイン構造を有していることから、これらドメイン構造を指標に補体成分の探索ができることが知られている。そこでヒトの補体成分の内、特徴的なドメイン構造を示す C1q、MBL、C1r/C1s、MASP、FB/C2、factor I (FI)、C6/C7/C8/C9 のアミノ酸配列をクエリーとして BLAST 検索を行った結果、FB 遺伝子がシマウミグモとアオズムカデからそれぞれ 2 種、アダンソンハエトリから 3 種同定できたが、それ以外の補体成分はどの種からも同定できなかった。これらの FB は short consensus repeat(SCR)ドメイン、von Willebrand factor (vWF)ドメイン、セリンプロテアーゼ様ドメインを有しており、哺乳類 FB と共通のドメイン構造であったが、アダンソンハエトリ FB-3 とアオズムカデ FB-2 のセリンプロテアーゼ様ドメインは活性中心である Ser にあたるアミノ酸残基がそれぞれ Val、Asp に置換しており、この 2 つの FB はプロテアーゼとしての活性はないと考えられる。これらの FB 遺伝子と他動物の FB 遺伝子のアミノ酸配列を用いて作製した系統樹を図 3 に示す。節足動物 FB は二つのクレイドに分かれた。先に述べたアダンソンハエトリ FB-3 とアオズムカデ FB-2 はともにクレイド 2 に含まれており、節足動物の共通祖先の段階で既に二系統の FB 遺伝子が存在したことが示唆された。

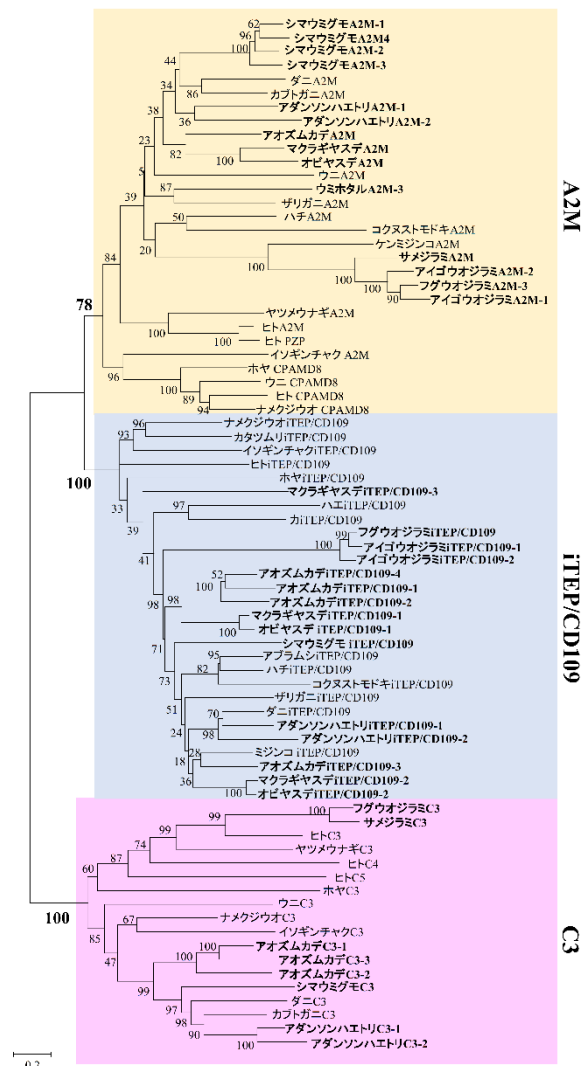


図 2 TEP 遺伝子の系統関係 (714aa, ML 法)
太字は本研究で解析した遺伝子を示す。

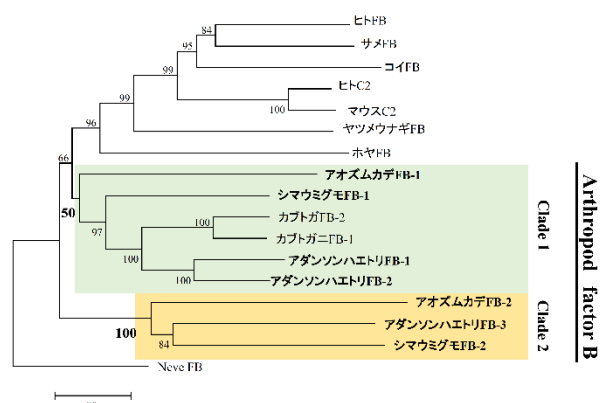


図 3 FB 遺伝子の系統関係 (510aa, NJ 法)
太字は本研究で解析した遺伝子を示す。

先に述べたアダンソンハエトリ FB-3 とアオズムカデ FB-2 はともにクレイド 2 に含まれており、節足動物の共通祖先の段階で既に二系統の FB 遺伝子が存在したことが示唆された。

結論

図 4 に節足動物門の系統関係と TEP 遺伝子 (A2M、iTEP/CD109) と補体遺伝子 (C3, FB, MASP) の分布を示す。節足動物ではこれまでカブトガニを除く鋏角類と多足類の TEP 遺伝子、補体遺伝子の情報がなかったが、本研究によって節足動物全体のこれらの遺伝子の進化を明らかにすることができた。1) 節足動物は共通祖先の段階で既に MASP 遺伝子を喪失し、FB と C3 となる補体系を持っていたと思われる。この補体系は哺乳類の第二経路に似た機構で C3 を活性化させ異物を標識化し、食細胞による貪食を促進することで自然免疫として働いていると思われる。その後節足動物の進化過程で、FB と C3 遺伝子はムカデ綱が分岐した後の多足類内と、汎甲殻類の共通祖先で二回独立に、同時に喪失が起きたと考えられる。2) A2M と iTEP/CD109 は C3 と同じく TEP ファミリーに属しているながら、C3 遺伝子とは異なり節足動物内でよく保持されていることが示された。iTEP/CD109 はショウジョウバエやハマダラカにおいて自然免疫に関わっていることが報告されており、本研究の結果と併せて節足動物全体で重要な働きをしていることが強く示唆された。3) 寄生物であるウオジラミ種は宿主である魚類から C3 遺伝子を水平伝播により獲得した可能性が示唆された。

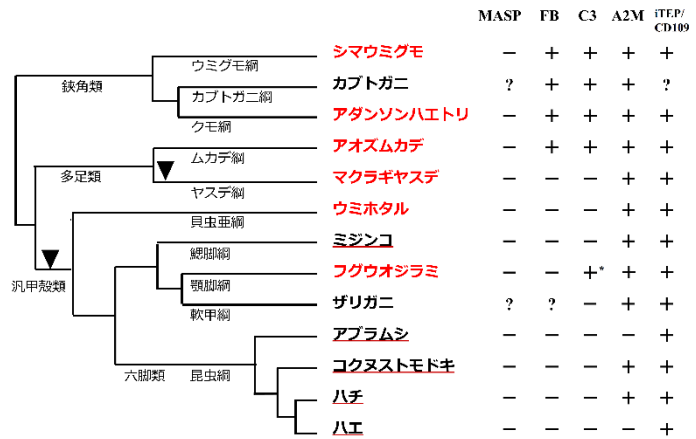


図 4 節足動物の系統関係と補体成分 MASP, FB, C3 と TEP 遺伝子 A2M, iTEP/CD109 の進化。赤字は本研究で解析した動物種、下線はゲノム情報が存在する動物種、黒三角は同時に C3 と FB 遺伝子の喪失が起きたと考えられる位置をそれぞれ示す。*は水平伝播により獲得した可能性のある遺伝子を示す。

	Length of deduced amino acids	B-a cleavage site	ANA domain	Bait region	Thioester site	Catalytic histidin	C345C domain		Length of deduced Amino acids	B-a cleavage site	Bait region	Thioester site	Catalytic histidin	GPI anchor signal sequence
シマウミグモ	C3 1725	RPKR	+	-	GCGEQ	H	+	フグウオジラミ	A2M-1 1536	-	-	GCGEQ	H	-
アダソンハエトリ	C3-1 1738	RRKR	+	-	GCGEQ	H	+	A2M-2 1341	-	-	GCGEQ	II	-	
	C3-2 1695	RWKR	+	-	GCGEQ	E	+	A2M-3 1717	-	+	GCGEQ	S	-	
アオズムカデ	C3-1 1749	RRKR	+	-	GCGEQ	H	+	アイゴウオジラミ	A2M-1 1735	-	+	GCGEQ	S	-
	*C3-2 1755	RKKR	+	-	ACGEQ	G	+	*A2M-2 1701	-	+	GCGEQ	S	-	
	*C3-3 1631	RMKR	+	-	GCGEQ	S	-	サメジラミ	A2M 1704	-	-	GCGEQ	S	-
フグウオジラミ	C3 1655	RKKR	+	-	GCGEQ	H	+	シマウミグモ	*iTEP/CD109 1465	RRGR	-	GCGEQ	N	+
アイゴウオジラミ	C3 67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	アダソンハエトリ	iTEP/CD109-1 1440	RKKR	-	GCGEQ	H	+
サメジラミ	C3 1608	RKKR	+	-	GCGEQ	II	+	*iTEP/CD109-2 1456	RRRR	-	GCGEQ	H	+	
シマウミグモ	A2M-1 1527	RSKR	-	+	GCGEQ	II	-	アオズムカデ	iTEP/CD109-1 1447	-	-	GCGEQ	H	-
	A2M-2 1614	RKKR	-	+	GCGEQ	H	-	iTEP/CD109-2 1423	-	-	GCGEQ	Y	-	
	A2M-3 1552	-	-	+	GCGEQ	H	-	*iTEP/CD109-3 1437	-	-	GCGEQ	N	+	
	*A2M-4 1496	RPSR	-	+	GCGEQ	II	-	*iTEP/CD109-4 1430	-	-	GCGEQ	II	-	
アダソンハエトリ	A2M-1 1717	RMPR	-	+	GCGEQ	N	-	マクラギヤステ	iTEP/CD109-1 1437	RKKR	-	GCGEQ	S	-
	*A2M-2 1520	-	-	+	GCGEQ	D	-	iTEP/CD109-2 1457	-	-	GCGEQ	II	+	
アオズムカデ	A2M 1625	-	-	+	GCGEQ	H	-	iTEP/CD109-3 1427	-	-	GCGEQ	D	-	
マクラギヤステ	A2M 1452	-	-	+	GCGEQ	H	-	オビヤステ	iTEP/CD109-1 1430	RKKR	-	GCGEQ	N	-
オビヤステ	A2M 1473	-	-	+	GCGEQ	H	-	iTEP/CD109-2 1465	-	-	GCGEQ	H	+	
ウミホタル	A2M-1 853	-	-	+	GCGEQ	S	-	ウミホタル	iTEP/CD109 323	n.d.	-	n.d.	n.d.	+
	A2M-2 638	n.d.	n.d.	n.d.	GCGEQ	N	n.d.	フグウオジラミ	*iTEP/CD109 1535	-	-	GCGEQ	F	+
	A2M-3 1542	-	-	+	GCGEQ	H	-	アイゴウオジラミ	*iTEP/CD109-1 1539	-	-	GCGEQ	F	+
								*iTEP/CD109-2 1429	-	-	GCGEQ	F	+	

表 1 RT-PCR および RNA-seq により同定した節足動物の TEP 遺伝子が有する特徴的なドメイン、モチーフ、アミノ酸残基。*は RNA-seq でのみ同定された TEP 遺伝子を示す。