

論文審査の結果の要旨

氏名 関口 玲生

本論文は二部からなり、第一部では縮退プライマーを用いた RT-PCR とクローニングにより、補体系の中心成分である C3 及び C3 と共にチオエステル含有タンパクファミリーに属する TEP 遺伝子の節足動物からの同定と系統解析、第二部では RNA-seq 法による節足動物の補体遺伝子の網羅的解析と補体系の進化過程の解明について述べられている。

哺乳類補体系は 30 種以上のタンパク質で構成された生体防御機構で、自然免疫において中心的な役割を果たしている。近年の研究により、哺乳類で確認されている補体遺伝子のうち、C3、FB (B 因子)、MASP (MBL associated serine protease) が刺胞動物イソギンチャクにも存在することが明らかになっており、真正後生動物の共通祖先には少なくとも 3 成分からなる原始補体系が存在していたと考えられる。これら 3 補体遺伝子はこれまでに解析されたほとんどすべての後口動物で保存されていたが、早期に解読されたショウジョウバエ、センチュウのゲノム中には存在せず、前口動物ではこれらの補体遺伝子の喪失が生じた事が示唆されていた。本論文では前口動物中、最大の門である節足動物門に着目した補体系遺伝子の網羅的解析と、その結果から推定された節足動物における補体系の進化過程について述べている。

第一部では、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、サメジラミを解析種として、RT-PCR とクローニングによって C3 を含む TEP 遺伝子の同定を行った。TEP 遺伝子を増幅する PCR は、既知 TEP 遺伝子のアミノ酸配列を基に作製した縮退プライマーを用いて行い、BLAST 検索によって各節足動物の TEP 遺伝子の種類を同定した。各 TEP 遺伝子は RACE-PCR によって全コーディング領域の決定を試みた。その結果、解析に用いた 5 種全てからヒト C3 と同様の構造的長を持つ C3 遺伝子が同定された。TEP アミノ酸配列を用いた BLAST 検索および系統解析から、シマウミグモとアオズムカデの C3 は節足動

物型であったのに対してウオジラミ種の C3 は硬骨魚類 C3 と高い同一性を示すことが明らかになり、ウオジラミが宿主である魚類から C3 遺伝子を水平伝播で獲得した可能性が示唆された。論文提出者の修士課程の研究結果と併せると、C3 遺伝子は節足動物内において、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において少なくとも二回独立に喪失したことが明らかになった。一方で、C3 と同じ TEP ファミリーに属する A2M 遺伝子は節足動物全体でよく保存されていることが明らかになった。第一部の解析結果は、節足動物内で進化的に重要な綱における TEP 遺伝子の進化を明らかにしたものとして高く評価できる。

第二部では、節足動物の補体系の進化を明らかにするために、RNA-seq による補体遺伝子の網羅的な解析を行った。シマウミグモ、アダンソンハエトリ、アオズムカデ、マクラギヤスデ、オビヤスデ、ウミホタル、フグウオジラミ、アイゴウオジラミを解析種に選択し補体遺伝子の探索を行った。補体成分特有のドメイン構造を指標に、ヒト補体成分の内、特徴的なドメイン構造を示す C1q、MBL、C1r/C1s、MASP、FB/C2、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。その結果、シマウミグモ、アダンソンハエトリ、アオズムカデから C3 と FB 遺伝子が同定され、節足動物内でこの 2 つの補体遺伝子はセットとして存在することが明らかになった。一方でそれ以外の補体成分はどの種からも同定できなかった。これまでにゲノム解析が行なわれた前口動物は何れも C3 遺伝子を欠損していたため、本研究は C3 を保持する前口動物における補体遺伝子の初めての網羅的な解析となる。

また、RNA-seq のデータを用いた TEP 遺伝子の再解析の結果、第一部で同定されなかった発現量の低い TEP 遺伝子も新たに得られた。その結果、節足動物内において A2M と iTEP/CD109 遺伝子は保存されており、TEP 遺伝子の中で C3 遺伝子だけが特異的に喪失が生じていることが明らかになった。第二部の結果から、節足動物は共通祖先の段階で既に MASP 遺伝子を喪失し、C3 と FB から成る、哺乳類の第二経路に似た補体活性化経路を持っていたと考察している。その後 C3 と FB 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ことが明らかになった。RNA-seq のデータを用いて補体系以外の自然免疫関連遺伝子である TLR (Toll-like receptor) 等を探索した所、節足動物内における喪失は認められなかった。従って節足動物内における複数回の喪失は補体系に固有の現象である事が強く示唆され、これらの結果は前口動物における自然免疫の進化過程の解明に大きく貢献したと評価できる。

なお、本論文は、野中勝との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。