

## もう一つの獲得免疫系：Variable lymphocyte receptors

我々脊椎動物、厳密には有顎類の免疫系が体細胞での遺伝子組み換えによって多様性を獲得することはよく知られた事実である。免疫系が生み出す多様性は  $10^{14}$  のオーダーに及ぶ。これほど優れた多様性創出メカニズムは他には考えられないほどであった。しかし、同じ脊椎動物に属し、我々有顎類の姉妹群である無顎類は全く異なる機構ながら、同じくらいの多様性を生み出す機構を持っていることが近年わかってきた。無顎類は大きくヤツメウナギの仲間とヌタウナギ及びメクラウナギの仲間に分けられる。無顎類からは、有顎類の獲得免疫系の構成要素である免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig)、T 細胞受容体 (T-cell receptor: TCR)、組換え遺伝子 RAG1/2、主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex: MHC) などの遺伝子は全く見つかっていない。にもかかわらず、生理学的研究からは無顎類にも獲得免疫があることが示されていた。では、この無顎類の獲得免疫の作用因子は何なのか？2004 年、Pancer らはヤツメウナギから抗原によって活性化されたリンパ球を分離し、mRNA の配列を大量に決定することでこの疑問に迫った (Pancer et al. 2004)。

活性化したリンパ球は通常のリンパ球に比べて2倍程度の大きさがあり、フローサイトメーターで分離することが可能である。サブトラクション法によって活性化したリンパ球で発現が大きく増加している遺伝子を調べたところ、調べたクローンの内、2割以上がロイシンリッチリピート (LRR) を持つ遺伝子であった。増加した遺伝子は互いに似てはいるがそれぞれ異なる配列を持っており、なんと239種類に分けることができた。Pancer らはこの遺伝子を variable lymphocyte receptors (VLR: 可変性リンパ球受容体) と命名した。VLR は200から300アミノ酸程度の蛋白質であり、N 末からシグナルペプチド、N 末の LRR (LRRNT) の後に配列のそれぞれ異なる LRR (LRRV) が不特定の数だけ続き、更に C 末の LRR (LRRCT) の後には、スレオニンかプロリンに富んだ柄 (stalk) に相当する領域があり、GPI (グリコシルフォスファチジルイノシトール) アンカー、そして疎水性の C 末端 (tail) で終わっていた。数の異なる LRR の内、最も N 末側と最も C 末側は中央部と少し異なっており、それぞれ LRR1、LRRVe と呼ばれている。数の異なる LRR と LRRCT の間には13アミノ酸 (Connecting peptide, CP) が挟まっている。すなわち、構造を N 末から並べると、 $SP-LRRNT-LRR1-LRRV \times n-LRRVe-CP-LRRCT-stalk-GPI-tail$  となる。VLR は GPI アンカーによって細胞膜に結合している。それぞれの VLR の配列の違いは、LRRNT から LRRCT までの LRR の数の違いと、配列の違いに起因している。

VLR は各リンパ球で一種類だけしか発現していない。C 末領域をプローブに

用いたサザンハイブリダイゼーションにより、VLR はゲノム上に1コピーしかないことが示された。リンパ球のゲノムから PCR によって VLR 遺伝子の配列を決定すると、mRNA で見られたのと同様の多様性が認められた。すなわち、それぞれのリンパ球は配列の異なる VLR 遺伝子を持っており、これが発現することで VLR の多様性が生み出されている。興味深いことに、生殖細胞系列の VLR 遺伝子 (gVLR) はリンパ球の VLR とはかなり異なった構造を持っていた。gVLR は4つのエクソンから構成され、1番目のエクソンには5'UTRの前半部、2番目には5'UTRの後半とシグナルペプチド及びLRRNTの5'側、3番目にはLRRCTの5'側、4番目にはLRRCTの3'側以降がコードされていた。LRRNTの3'側とLRR1、LRRV、LRRVeはコードされていない。更に、適切なスプライシング配列が見つかったのは1番目と2番目のエクソンの間だけで、他は本当にイントロンであるのかも疑わしい。このgVLRの周辺には多数のLRRV、それよりも数は少ないが、LRRNTやLRRCT、LRR1が散らばっている。

これらの事実は、VLR が有顎類の獲得免疫系のように体細胞遺伝子組み換えによって多様性を生み出していることを示唆している。おそらく生殖細胞系列のVLR遺伝子は正常な蛋白質を作り出すことはできず、リンパ球の成熟過程での繋ぎ換えによってLRRNTの3'側とLRR1、LRRV、LRRVeが、LRRNTの5'側とLRRCTの3'側との間に挿入されることによって機能を持ったVLR蛋白質が作られるようになるのだろう。この際、少しずつ配列の異なるLRRVのどれが挿入されるかによって多様性が生み出されると考えられる。

2005年には、Pancerらは他のヤツメウナギやヌタウナギにもVLRが存在していることを発見した (Pancer et al. 2005)。構造もほとんど同じであり、大きく異なることといえば、ヌタウナギの仲間ではVLRがゲノム上に2種類 (VLR-A、VLR-B) コードされていることだけである。

Scienceに掲載されたAlderらの論文は4つの異なる解析の寄せ集めの印象が強い (Alder et al. 2005)。(1)まず、彼らはVLRがどれほどの多様性を生み出すことができるかを検討した。残念ながらヤツメウナギもヌタウナギもゲノム上にコードされているLRRVの数はわかっていない。そこで、リンパ球からmRNAとゲノムを抽出、クローニング、配列決定し、LRRVの組み合わせを調べた。隣り合うLRRVの組み合わせでは一つも共通するものは無かったが、LRRNTとLRR1、CPとLRRCTとではいくつか同じ組み合わせが認められた。しかしほとんどの場合異なる配列が組み合わせられており、組み合わせはランダムであると言ってよい。既知のLRRVの出現頻度からゲノム上にコードされたLRRVの種類を計算すると、ヤツメウナギで1500、ヌタウナギのVLR-Aでは2400程度と推定された (ただしNagawaらの論文(Nagawa et al. 2006)に基づくこの数はかなり少なくなる)。ここからランダムにLRRVを選ぶことにより $10^{14}$

から  $10^{17}$  の多様性が生み出される計算になる。

(2) 繋ぎ換え途中の転写産物やゲノムをクローニングすれば、繋ぎ換えの機構を推測することが可能となる。そこで、cDNA とゲノムを鋳型にして、エクソンとエクソンの間の、最終産物ではなくなってしまう領域にプライマーを設計して PCR し、クローニングした。5'末端からは LRRNT に LRR1、LRRV が順番に付け加えられ、並列的に 3'末端から CP、LRRVe、そして LRRV が順番に付け加えられていることが繋ぎ換え途中の配列から予想された。また、繋ぎ換え途中の産物では、最後の LRRV は途中で終わっている場合が多い。ここから、新しく LRRV が付け加わるときには末端の LRRV の断片と入れ替わるようにして組み込まれる機構が想定できる。

(3) VLR が正の淘汰圧を受けているかどうかを、同義非同義置換率を用いて推定したところ、予測立体構造の蛋白表面のくぼんだ位置に正の淘汰圧を受けている部位があることが示された。多くの LRR を持つ蛋白質ではこのくぼんだ位置にリガンドが結合することが知られているため、様々なリガンドに対応できるようにそれぞれの LRR が異なるリガンドを認識するよう淘汰圧がかかったと考えられる。

(4) VLR が本当に獲得免疫と関係するのかどうかは実験されていなかった。そこでヤツメウナギに炭疽菌の孢子を注射し、細胞性及び液性免疫を解析した。すると、VLR を持つ細胞の中でも大型のリンパ球の割合が劇的に増大した。血液中の VLR の濃度も上昇し、増えた VLR が炭疽菌特異的な認識をすることも ELISA によって確かめられた。すなわち、炭疽菌を固定したウェルにヤツメウナギの血液を加え、洗浄した後、付着した VLR を抗 VLR 抗体で定量したところ、コントロールの枯草菌を固定した場合に比べて顕著に結合量が多かった。これは血液中に炭疽菌を認識する VLR が増加したためと考えられる。

Nagawa らの論文では、VLR のリンパ球での繋ぎ換え機構について更に詳細に解析を進め、これが copy choice と呼ばれる機構によることを示している (Nagawa et al. 2006)。彼らは、リンパ球での VLR の繋ぎ換え中間体や最終産物において、5'C と LRRNT や 5'LRRCT と 3'C など、断片の結合した境界の配列を決定し、それを生殖細胞の配列と比較したところ、境界には 10 から 30 塩基ほどの短い相同領域があることを発見した。この相同領域は互いによく似ているが、由来する 2 種類の断片のどちらか一方と 100% 一致し、もう一方とは mismatch を含んでいた。Nagawa らは VLR の DNA 繋ぎ換えの機構について、相同組み換え (homologous recombination)、遺伝子変換 (gene conversion)、コピー選択 (copy choice) の 3 種類を想定し、いずれが正しいかを検討している。相同組み換えは互いに良く似た DNA 配列同士が繋ぎ変えられる現象である。相同組み換えによってこの断片同士がつなぎ合わされているならば、逆向きに繋ぎ変えられた

DNA が同時に存在するはずであるが、そのような DNA は PCR では増幅することが出来なかった。また、相同組み換えでは、短い相同領域が常に元になった DNA の片方と 100%一致するという現象を説明することができない。これは、遺伝子変換やコピー選択によって繋ぎ換えが起こっている可能性を強く示唆している。遺伝子変換やコピー選択では、DNA 複製あるいは DNA 修復の際に、合成される DNA 鎖の 3' 末端付近が本来の鋳型から離れて似た配列とミスマッチを含みつつ塩基対形成し、合成を再開する。このため、相同領域では 2 種類の鋳型の内、元々鋳型となっていた DNA の配列と常に一致する。彼らは議論の中で、通常の遺伝子変換は (1) コード領域全長にわたって配列の相同性がある場合に起こること、(2) 一つながりの DNA 配列が鋳型として利用されること、の 2 点が VLR の場合と一致しないことから、コピー選択の可能性が高いとしている。また、コピー選択は非常に短い相同配列でも起こることが VLR の場合と一致するとする。しかし、遺伝子変換とコピー選択の機構上の違いは明確ではなく、VLR の繋ぎ換えが厳密に制御されたものであると考えられる以上、このどちらが正しいという議論は意味を持たないかもしれない。ここでは、繋ぎ換えの機構の名称をコピー選択としておく。

同じ VLR の繋ぎ換えでも中央部、LRR の繰り返し領域では末端近くとは状況が異なる。LRR 同士は配列の制約上、相同性が高いため、LRR の内部のどの位置でもコピー選択が起こりうる。実際に、配列の完全に一致する短い DNA 領域は LRR の末端に限らず、内部でも見られる。また、繋ぎ換え中間体の末端の LRR は途中で途切れている場合が多い。これらの事実は、LRR 同士のコピー選択では、決まった位置で鋳型が交換されるわけではなく、内部の何処でも交換されていることを示唆している。これにより LRR の内部がモザイクになることができるため、新しく作り出すことができる VLR の種類も増大する。

また、Nagawa らは VLR が一つのリンパ球では片方の対立遺伝子しか繋ぎ換えされておらず、5' 側からあるいは 3' 側からのいずれか一方からだけ繋ぎ換えが起こっていることも明らかにしている。

以上のように無顎類の獲得免疫系の多様性は、VLR 中の LRR の配列多様性によって生み出されている。その機構はまだ明らかではないが、有顎類の VDJ 組み換えとは全く異なっていることはわかってきた。VDJ 組み換えの起源についても現在様々な新事実が蓄積してきているが、これには、VLR の起源も大きく関係している。獲得免疫の研究からはまだまだ目が離せない。

Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD.

Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey.

Nature. 2004 Jul 8;430(6996):174-80.

Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT, Kasahara M, Cooper MD.

Variable lymphocyte receptors in hagfish.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 28;102(26):9224-9. Epub 2005 Jun 17.

Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z.

Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate.

Science. 2005 Dec 23;310(5756):1970-3.

Nagawa F, Kishishita N, Shimizu K, Hirose S, Miyoshi M, Nezu J, Nishimura T, Nishizumi H, Takahashi Y, Hashimoto S, Takeuchi M, Miyajima A, Takemori T, Otsuka AJ, Sakano H.

Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice.

Nat Immunol. 2007 Feb;8(2):206-13.

2006/01/06

加筆修正 2007/02/19

小島 健司 著

禁 無断複写転載