

# 無顎類抗原受容体 *VLR* 遺伝子の再編成の分子機構

## Somatic assembly of jawless-fish antigen receptor genes

(日本免疫学会推薦)

代表研究者 東京大学 名川文清 The University of Tokyo Fumikiyo Nagawa

Agnathans (jawless fish), which are the lowest class of vertebrates in existence, have novel antigen receptors, named variable lymphocyte receptors (VLRs). There are two kinds of VLR (VLRA and VLRB), both consisting leucine-rich repeat (LRR) modules. The *VLR* genes are assembled only in lymphocyte-like cells by replacing the intervening region of a germline *VLR* with LRR segments scattered upstream and downstream. Our group has recently reported that diverse *VLRs* are generated through the mechanism in which short homologies between certain LRRs are used as priming sites to insert them in a sequential manner. It is as yet unclear whether the two kinds of *VLR* are assembled in the same way and function likewise. We closely examined their assemblies by single-cell PCR with hagfish. Lymphocyte-like cells were sorted by size and approximately two thirds of cells were found to assemble either of the two *VLR* genes; but no cells were found to assemble both *VLRs*. Interestingly, the sequence analysis indicated that some of the VLR positive lymphocytes proliferated after the *VLR* assembly, suggesting that there may be clonal selection in jawless fish.

## 研究目的

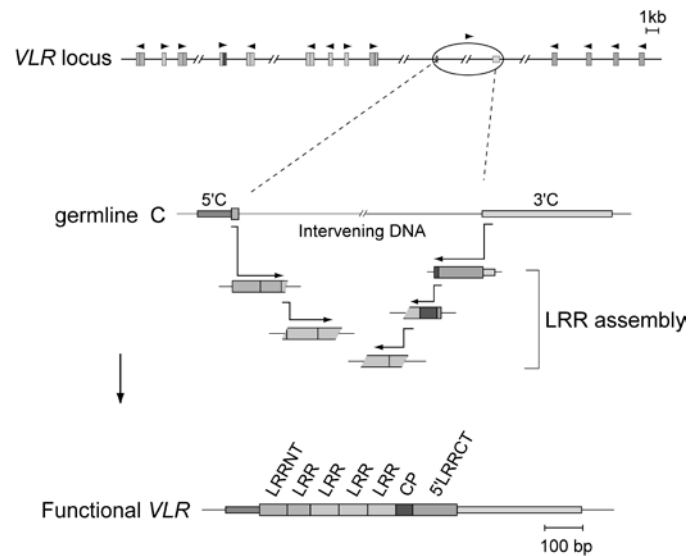
獲得免疫系は、外界から侵入してくる病原体を特異的に認識・排除するために脊椎動物が持つ高度なシステムであり、ゲノム再編成により多様化される抗原受容体が重要な役割を果たしている。軟骨魚類からヒトに至るまでの生物では、イムノグロブリン (Ig) 型の抗原受容体の遺伝子を V(D)J 組み換えにより再編成し、多様な抗原受容体を創り出している。一方、軟骨魚類より下等なヤツメウナギ等の無顎類では、Ig 型とは異なる抗原受容体 variable lymphocyte receptor (VLR) の遺伝子を、V(D)J 組み換えとは全く異なるゲノム再編成システムによって多様化している事が最近明らかとなってきた (Figure1)。私は、VLR 遺伝子再編成システムを解析することにより獲得免疫系の起源と進化について明らかにすることを目指している。

Ig 型抗原受容体遺伝子多様化に主要な役割を果たす V(D)J 組み換えは、動く遺伝因子であるトランスポゾンとの類似性が発見当初より指摘され、トランスポゾン由来ではないかと考えられてきた。実際、V(D)J 組み換えの過程で切り出された DNA が他の DNA に転移することが *in vitro* で示され、このモデルが実験的にも支持されてきている。V(D)J 組み換えはサメなどの軟骨魚類からヒトに至るまでの高等な動物でその存在が認められており、進化の過程で軟骨魚類が分岐するときに、原始抗原受容体にトランスポゾンが偶然に挿入されることにより、始まったと考えられている。原始抗原受容体遺伝子の中に挿入されたと考えられるトランスポゾンが一体どこから来たのかについては、現在のところ明らかではない。最近ウニのゲノムが解明された結果、V(D)J 組み換えに必須の recombination activating genes (RAG1 及び RAG2 遺伝子) に似た遺伝子が存在していることが明らかとなっている。しかし、これらの遺伝子の機能については現在のところ明らかではなく、トランスポゾンとの関係も明確ではない。

獲得免疫系は、サメより下等な脊椎動物であるヤツメウナギなどの無顎類からその存在が知られていた。しかしながら無顎類は獲得免疫系は持つものの、V(D)J 組み換えによって多様化される Ig タイプの抗原受容体は持たず、一体どのようにして多様な病原体を認識しているのかについては謎であった。ところが最近、無顎類において、ヒトなどに見られる抗原受容体とは全く異なるタイプの抗原受容体 VLR が報告された。VLR は、複数の leucine-rich repeat (LRR) を含み、それぞれの分子は LRR の数とその配列において極めて大きな多様性を示す。VLR のもつ LRR の数は少ないものの、その細胞外領域の基本的な構造は、自然免疫系でパターン認識にかかわる TLR (Toll-like receptor) の細胞外ドメインに類似している。VLR 遺伝子はリンパ細胞において、V(D)J 組み換えとは異なるゲノム再編成機構により多様性を創出している。再編成前の定常領域には LRR は認められず、周辺に多数

存在する germline LRR 遺伝子セグメントからいくつかのセグメントが選ばれ持ち寄られることにより機能型遺伝子が創出される (Figure1)。我々は、この遺伝子再編成の分子機構を解析し、"copy choice"あるいは"template switching"と呼ばれる遺伝子再編成機構が関与していることを最近報告した (*Nature Immunology* 2007)。copy choice とは、複製の際に DNA polymerase が短い繰り返し配列の間で基質を switch する現象であり、これにより様々な DNA の再編成が起こることが知られている。

無顎類には現在 2 種類の抗原受容体 ( $VLR_A$  及び  $VLR_B$ ) が存在することが知られている。しかしながら、これらの遺伝子が同じ細胞で同時に再編成されるのか、あるいは相互排他的に再編成されるのか、また、ヒトやマウスの系で見られるように、1つの細胞で1種類の抗原受容体が mono-allelic に発現するようになっているのかなど、遺伝子再編成の制御については不明の点が多い。本研究課題では、 $VLR$  遺伝子の再編成がいかにかに制御されているのかについて検討した。



**Figure1.** Organization and assembly of the  $VLR$  gene. Four types of germline LRR segments, LRRNT-LRR, LRR(s), CP, and 5'-LRRCT are indicated. Arrowheads indicate the direction of translation of the gene segment. Arrows indicate the direction of DNA synthesis in  $VLR$  gene assembly.

## 研究経過

*VLR* 遺伝子再編成がどのように制御されているのかについて調べるため、ヌタウナギの *VLR* 遺伝子 (*VLR<sub>A</sub>* 及び *VLR<sub>B</sub>*) の再編成を single-cell PCR を用いて解析した。再編成前のヌタウナギの *VLR* 遺伝子は 5' 及び 3' 定常領域とその間に存在する介在配列からなっており、リンパ球の分化の過程で、周辺に多数存在する germline LRR 遺伝子セグメントからいくつかのセグメントが選ばれて持ち寄られ、介在配列と置き換わることにより機能型遺伝子が創出される。ヌタウナギでは、介在配列が短く、*VLR<sub>A</sub>* 及び *VLR<sub>B</sub>* どちらの遺伝子も再編成すると長くなるので、アガロース電気泳動により判定することができる。選別した多数の細胞を single cell PCR で解析したところ、約 3 分の 1 の細胞が *VLR<sub>A</sub>* を、別の約 3 分の 1 の細胞が *VLR<sub>B</sub>* を再編成していた。しかしながら両方を同時に再編成したものは見出せなかった。この結果は、*VLR<sub>A</sub>* と *VLR<sub>B</sub>* の再編成は相互排他的であることを示している。

また、遺伝子再編成において allele がどのように使われているのかについて、定常領域遺伝子座に見られる single nucleotide polymorphisms (SNPs) を利用して調べたところ、ほとんどの場合でどちらか一方の allele だけが完全に再編成を受けた機能型遺伝子になっていた。したがって、*VLR<sub>A</sub>* と *VLR<sub>B</sub>* の再編成は基本的には mono-allelic に起こっていると考えられる。しかしながら、まれに (数%) 両方ともに再編成が見られた。これら再編成した双方の allele が機能的に発現しているどうかについては現在のところ不明であり、今後更に解析する必要がある。

上記の single cell PCR によって得られた *VLR* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、全く同じ可変領域の配列を持つものが *VLR<sub>A</sub>* で十数例見つかった。遺伝子再編成によって全く同じ可変領域が出来る確率は極めて低いので、これらは遺伝子再編後に増殖したものと考えられる。

## 考察

*VLR* 遺伝子再編成がどのように制御されているのかについては不明の点が多く残っている。我々は、今回ヌタウナギの *VLR* 遺伝子の再編成を、2 つの異なる遺伝子 (*VLR<sub>A</sub>* と *VLR<sub>B</sub>*)、更にそれぞれの allele を区別し、single-cell PCR を用いて解析した。この様に 1 つのリンパ細胞において 4 つの *VLR* allele (*VLR<sub>A</sub>* の paternal と maternal、及び *VLR<sub>B</sub>* の paternal と maternal) を同時に解析することにより、2 つの *VLR* 遺伝子 (*VLR<sub>A</sub>* と *VLR<sub>B</sub>*) がヌタウナギのリンパ細胞において相互排他的にかつ mono-allelic に再編成していることを明らかにすることができた。この結果は、無顎類の免疫系において、少なくとも 2 種類のリンパ球 (*VLR<sub>A</sub>* を発現するものと *VLR<sub>B</sub>* を発現するもの) が存在することを示しており、その機能的棲み分けが

今後の問題として注目される。また、 $VLR_A$  遺伝子に関しては、可変領域が同じ配列であるものを複数同定した。この結果は、無顎類においても、リンパ細胞が抗原受容体遺伝子を再編成により完成させた後、クローナルに増殖するシステムが存在する事を示唆する。以上これらの結果は、single-cell PCR を用いて解析することにより初めて得ることが可能になり、 $VLR$  遺伝子再編成も V(D)J 組み換えと同様に極めて巧妙に制御されている事を示す重要な結果である。無顎類の  $VLR$  システムと有顎類の  $Ig$  システムはそれぞれ全く構造の異なる抗原受容体を用いているのに拘わらず、本研究でも明らかになったように、共通点を多く持っている。これら2つのシステムの比較は、獲得免疫系の起源とその進化についての謎を解くための大きな手がかりになると期待される。今後も引き続き、ヌタウナギやヤツメウナギを用いて  $VLR$  遺伝子再編成システムの解析を進めていきたい。

#### 研究発表

##### 口頭発表

1. 名川文清 ; 「無顎類における抗原受容体遺伝子再編成の分子機構」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会ワークショップ (横浜、2007)
2. 高場啓之、岸下奈津子、西住裕文、坂野仁、名川文清 ; 「無顎類抗原受容体遺伝子の再編成機構」第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 口頭発表 (横浜、2007)

##### 誌上発表

1. Nishihara T, Nagawa F, Imai T and Sakano H; “RAG -7mer interaction in the synaptic complex is a crucial checkpoint for the 12/23 recombination rule.” *J Biol Chem.* **283**: 4877-4885 (2008).
2. 名川文清 ; 「無顎類抗原レセプター  $VLR$  の多様性獲得機序」*臨床免疫・アレルギー科* **49**: 217-224 (2008).