Teleost LTβR and its ligand：Evolutionary perspective on LT/LTβR system

メタデータ	言語: English
	出版者:
	公開日: 2019-06-18
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 前田, 知己
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/226

博士論文要約

Teleost LTβR and its ligand: Evolutionary perspective on LT/LTβR system

（魚類リンホトキシンβ受容体：LT/LTβR システムの起源についての進化的考察）

前田　知己

緒言

免疫応答の場である二次リンパ組織はどのように進化してきたのか？二次リンパ組織は免疫応答を担当する細胞が集合し、非自己である病原体に対して効率よく応答を起こせるように高度に制御されている。免疫応答の要となる二次リンパ組織は、脊椎動物において魚類から哺乳類にまで広く保存されており、その構造は徐々に複雑化、高度化していく。この複雑化、高度化はどのような分子基盤に基づき進化してきたのだろうか。

サイトカインの１つであるリンホトキシン（Lymphotoxin; LT）とその受容体（Lymphotoxin beta receptor; LTβR）は、それぞれ Tumor necrosis factor (TNF) superfamily および TNF receptor superfamily に属するタンパク質で、免疫応答の制御や二次リンパ組織の構造形成に不可欠な分子である。これらの遺伝子を欠損したマウスでは、二次リンパ組織の構造異常と免疫応答の低下が観察されるため、LT/LTβR システムが二次リンパ組織の構造の複雑化、高度化に関与している可能性が高いと考えられる。このように重要な LT/LTβR システムであるが、これらの遺伝子の存在は肉鰭類や両生類で近年になって初めて報告された。それゆえ、本システムは肉鰭類以前に生じたと予想されるが、真骨魚類では LTβR および LT の報告はなく、リガンドと受容体の結合など機能的な解析は哺乳類以外に報告がない。そこで、本研究では、二次リンパ組織形成の分子機構の進化の過程を明らかにすることを目指し、真骨魚類における LTβR および LT の機能的同定を行った。

第１章　魚類 LTβR および LT 遺伝子の探索

LTβR および LT は、特徴的なドメイン構造を持ち、それぞれ遺伝子クラスターを形成する。そこで、ドメイン構造と種間でシンテニーが保存された遺伝子クラスターを指標として、ゲノムデータベースを利用して魚類の LTβR 遺伝子および LT 遺伝子を探索した。

LTβR 遺伝子は、トラフグをはじめ、調べた魚類全てに保存されていた。また、肉鰭類および両生類でも LTβR 遺伝子が保存されていた。しかし、爬虫類と鳥類のゲノムでは遺伝子クラスターが保存されておらず、LTβR 遺伝子の存在は確認できなかった。

哺乳類の LT 遺伝子はα鎖遺伝子とβ鎖遺伝子の 2 種類が遺伝子クラスター内で近接して存在する。ところが、真骨魚類の LT 候補遺伝子は保存された遺伝子クラスター内に TNF-New（TNFN）と呼ばれる 1 種類だけが存在していた。一方、肉鰭類および両生類ではα鎖遺伝子とβ鎖遺伝子の両遺伝子が保存されていたが、爬虫類と鳥類のゲノムデータベース上ではどちらも確認できなかった。また、哺乳類の LTβR のもう一つのリガンドである LIGHT 遺伝子についてもデータベースを探索した結果、鳥類を除いて、今回調べたすべての脊椎動物群で LIGHT 遺伝子を見つけることができた。それゆえ、LTβR 遺伝子は硬骨魚類から哺乳類まで保存されているのに対して、LT の候補遺伝子は真骨魚類にも存在するが、その数は肉鰭類や哺乳類とは異なり 1 種類しかなく、LT/LTβR システムが真骨魚類と哺乳類では異なる可能性が示された。

第 2 章　魚類 LTβR 受容体に結合するリガンドの同定

第 1 章で報告した真骨魚類の LTβR と LT の候補である TNFN が、実際にリガンドと受容体の関係であるかを調べるために、トラフグを材料に結合実験を行った。結合実験に先立ち、それぞれの組換えタンパク質を作製した。トラフグ LTβR の組換えタンパク質は、LTβR の細胞外領域に Fc タグを付加した可溶化タンパク質として昆虫細胞を用いて作製した（以後 LTβR-Fc と呼ぶ）。トラフグの LT 候補である TNFN は哺乳類細胞で発現させ、培養液中の可溶型タンパク質はウエスタンブロット法で、細胞膜上の膜型タンパク質はフローサイトメトリで解析した。その結果、トラフグの TNFN は単独で膜上で発現した。この発現様式は、哺乳類の LT がα鎖とβ鎖の複合体として膜上に発現することとは異なる。

トラフグの TNFN を発現した細胞とトラフグの LTβR-Fc を混合し、フローサイトメトリによりこれらの結合の有無を解析した。その結果、TNFN と LTβR-Fc の結合を確認することはできなかった。一方で、哺乳類において LTβR のもう一つのリガンドである LIGHT の組換えタンパク質を TNFN と同様に作製し、結合実験を行ったところ、トラフグの LIGHT とトラフグの LTβR-Fc の結合が観察された。これらの結果から、真骨魚類の LTβR のリガンドは、TNFN ではなく、LIGHT であることが示された。さらに、TNFN には真骨魚類独自の受容体が存在することが推測された。

第 3 章　魚類 LTβR の細胞内伝達因子の同定

哺乳類の LTβR は、細胞内の TNF receptor associated factor (TRAF)を介してシグナルを伝達する。LTβR に結合する TRAF は、主に TRAF2 と TRAF3 であり、それぞれ一般的な炎症応答と二次リンパ組織形成に関与している。そこで、真骨魚類 LTβR の細胞内に結合する TRAF を明らかにするため、トラフグ LTβR の全長配列およびトラフグ TRAF2 もしくは TRAF3 を哺乳類細胞で共発現させ、免疫沈降を用いてこれらの結合を調べた。その結果、TRAF2 との結合は見られたが、TRAF3 の結合はほとんど見られなかった。また、ヒトの LTβR はトラフグ TRAF2 および TRAF3 ともに結合が確認された。それゆえ、真骨魚類の LTβR のシグナル伝達には二次リンパ組織形成に重要な TRAF3 ではなく、炎症応答を制御する TRAF2 が関与することが示唆された。

真骨魚類の LTβR と TRAF2 が結合する領域を明らかにするために、まず LTβR のアライメント解析を行ったところ、条鰭類の LTβR では哺乳類と共通の TRAF 結合ドメインは確認できなかったが、条鰭類の LTβR に特異的な機能未知の領域が見つかった。そこで、この領域を欠損したトラフグ LTβR の変異組換えタンパク質を作製し結合実験を行った。その結果、欠損変異体では TRAF2 との結合を検出できなかった。それゆえ、条鰭類 LTβR 特異的に保存された領域が TRAF2 との結合ドメインであることが示された。また、トラフグの TRAF3 がヒトの LTβR に結合したことから、真骨魚類の TRAF3 はすでに哺乳類型の LTβR への潜在的な結合能を有すると考えられ、肉鰭類以降の LTβR における TRAF3 結合ドメインの獲得が LTβR の機能的進化において重要であることが示唆された。

第 4 章　魚類 LTβR および LIGHT の発現解析

真骨魚類 LTβR の機能を推測するため、定量 PCR による遺伝子発現解析を行った。トラフグの臓器別に LTβR と LIGHT の発現を調べた結果、哺乳類同様、様々な組織で LTβR 遺伝子と LIGHT 遺伝子が検出され、これら遺伝子の組織発現パターンは類似していた。しかし、LIGHT では、白血球においても高い発現レベルが検出された。それゆえ、白血球に発現した LIGHT が様々な組織に発現する LTβR に結合しシグナルを伝達する機構が示唆された。

真骨魚類の LTβR および LIGHT を発現する細胞を特定するために、白血球を分離し、定量 PCR により発現解析を行った。その結果、LTβR は哺乳類では発現が見られないリンパ球にシグナルが検出された。一方、LIGHT は哺乳類同様、リンパ球をはじめ様々な細胞でシグナル検出された。それゆえ、真骨魚類の LIGHT を介した LTβR の機能は哺乳類とは異なることが示唆された。

結論

本研究では、二次リンパ組織形成の分子機構において重要な LT/LTβR システムの起源を考察するために、真骨魚類 LTβR および LT の機能的同定を行った。その結果、哺乳類以外の脊椎動物で初めて LTβR を機能的に同定し、（1）真骨魚類にも LTβR が存在し、そのリガンドは LIGHT であり、LT の候補と考えられてきた TNFN ではないこと、（2）真骨魚類の LTβR は今回の実験条件では TRAF2 と結合し TRAF3 とはほとんど結合しないこと、（3）真骨魚類の LTβR の発現が哺乳類とは異なることを明らかにした。これらの結果から、LTβR 遺伝子は少なくとも条鰭類と肉鰭類の共通祖先で生じ、その最初のリガンドが LIGHT である可能性が示された。その後、肉鰭類以降での LT の獲得、LTβR の TRAF3 結合ドメインの獲得、発現パターンの変化により、哺乳類のもつ LT/LTβR システムが形成されたと考えられる。真骨魚類と LTβR 欠損マウスの二次リンパ組織の構造の類似性から、真骨魚類から哺乳類の間に生じた LT/LTβR システムのこうした進化が二次リンパ組織の複雑化、高度化において重要なイベントであったと推測される。

本論文の関連論文

DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700900

Originally published in *The Journal of Immunology*. Tomoki Maeda, Hiroaki Suetake, Tomoyuki Odaka, and Toshiaki Miyadai. 2018. Original Ligand for LTβR Is LIGHT: Insight into Evolution of the LT/LTβR System. *J. Immunol.* Vol. 201(1): 202-214.
Copyright © 2018 The American Association of Immunologists, Inc.