

(高木 明子) 論文内容の要旨

主 論 文

Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms
in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques.
(アカゲザルとニホンザルにおける Toll 様受容体 2 の多様性獲得進化)

(共著者名)

山崎 朗子 前川 知之 柴田 宏樹
平山 謙二 木村 彰方 平井 啓久 安波 道郎

(Immunogenetics • In press 2011年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：平山謙二教授)

緒 言；

アカゲザル(*Macaca mulatta*)は旧世界ザルに属し、様々な医学生物学研究に、ヒトに近いモデルとして広く利用されている。またその近縁種であるニホンザル(*Macaca fuscata*)も近年、生物資源として注目されている。アカゲザルは南アジアから中国にかけて生息し、ヒトと同様に、種々の熱帯感染症が淘汰圧となってゲノムの進化に影響してきたと想定される。一方同じマカク属のニホンザルはもっとも高緯度に生息するサルとして知られ、アカゲザルとは全く異なる自然環境に適応したと推測される。

Toll 様受容体 2 (TLR2) は、グラム陽性菌細胞壁リポペプチド等のパターン認識受容体である。ヒトではこの遺伝子に見られる多型と、いくつかの感染症や炎症性疾患への感受性との関連が既に報告されていることから、マカク属においても様々な感染因子が淘汰圧となり TLR2 の分子進化に影響を与えていることが想定される。

本研究では、アカゲザルとニホンザルについて TLR2 翻訳領域の多型を比較分析した。その結果アカゲザルではニホンザルに比較してアミノ酸置換がより多い傾向にあり、多様性獲得の方向に進化していることが示唆された。発現ベクターを用いたレポーターアッセイでは明らかな機能の違いは見られなかったが、ホモロジーモデリングを行うことにより、アミノ酸置換はリガンドとの親和性に影響していると考えられた。

対象と方法；

アカゲザル(インドシナ原産)21 匹とニホンザル 35 匹のゲノム DNA から、TLR2 翻訳領域を含む DNA 断片を PCR にて単離し、塩基配列を明らかにした。

分子進化解析については、見いだした多型について NJ 法を用いて系統樹作成を行い、系統樹に基づいて非同義・同義置換の変異率を計算することで、正、負の選択圧の存在を推定した。さらに最尤法に基づいて進化パターンの検証(正の選択圧部位の探索)を行った。また既に報告されているヒトの TLR1-TLR2 立体構造を基にホモロジーモデリングを行い、アミノ酸置換による立体構造への影響とリガンドとの相互作用への効果を評価した。

機能解析は、HEK293 細胞に TLR2 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを NF- κ B ルシフェラーゼレポーターと共に導入して一過性発現させ、TLR2 アゴニストである Pam2CSK4 10ng/ml、又は Pam3CSK4 100ng/ml で刺激後 6 時間培養し、ルシフェラーゼ活性により NF- κ B の活性化を評価した。

結 果；

アカゲザル種内に 6 個の非同義と 3 個の同義置換多型を、ニホンザル種内に 3 個の非同義と 5 個の同義置換多型を同定した。非同義置換率と同義置換率の比較(dN-dS)から、ニホンザルでは負の淘汰(Ztest:P=0.0435)が働き、一方アカゲザルでは、リガンド結合・二量体形成部位より細胞膜に近い細胞外領域において、正の自然選択が働いている可能性 (P=0.0362) が示唆された。最尤法を用いた評価でも同様の結果が得られた。

コドン 326 番は、アカゲザルでは全て Asn (AAT) に対し、ニホンザルでは全て Tyr (TAT) であり、このコドンは、TLR2 を含む複合体のリガンド結合・二量体形成部に位置していた。このアミノ酸置換が受容体機能に及ぼす影響をレポーターアッセイで調べてみたが、有意差は認めなかった。タンパク質立体構造解析では、326 番コドンが祖先型と考えられるニホンザルの Tyr からアカゲザルの Asn に変化することによって、リガンドと受容体の結合親和力が若干低下し、さらに二つ目の変異が加わることにより(Thr405Ile,又は Thr416Ala)、親和力が回復することが示唆された。

考 察；

アカゲザルとニホンザルでの TLR2 翻訳領域における分子進化を分析し、この 2 種間での非同義・同義置換の頻度と分布の違い、及び分子構造解析から、TLR2 遺伝子は複合体の安定性やリガンドの親和性を種の生息環境に適応するように変化させながら進化してきたものと考えられた。