

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：12702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15053

研究課題名(和文) Saving the frog: Understanding how Japanese frogs are resistant to a deadly worldwide fungal disease through in silico and in vitro assays of MHC and related immune genes

研究課題名(英文) Saving the frog: Understanding how Japanese frogs are resistant to a deadly worldwide fungal disease through in silico and in vitro assays of MHC and related immune genes

研究代表者

QUINTIN LAU (LAU, QUINTIN)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・客員研究員

研究者番号：60794518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日本のカエルのMHCという免疫遺伝子に注目した。MHCは特定の抗原を認識するもので、適応免疫において重要な役割を果たしている。世界中のカエルにとって危険な「ツボカビ」という真菌症があるが、東アジアのカエルはツボカビに耐性がある。日本のカエル12種のcDNAライブラリをシーケンスし、特にMHC遺伝子配列について詳しく解析した。配列中のアミノ酸の特性等を考慮し対立遺伝子の物理化学特性を推定すると、すべての種で類似の特性を持つ対立遺伝子を共有していることが明らかになった。このことは、日本のカエルのMHC遺伝子の進化はツボカビのような共存する病原菌に対して形作られてきた可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カエルの免疫遺伝学及び宿主と病原体の進化をさらに深く理解することに貢献する。

さらに、本研究は保全遺伝学分野において、『致死性のツボカビから全世界のカエルを守る』という最終目的の達成にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：My research focused on an immune gene called major histocompatibility complex (MHC) in Japanese frogs. MHC receptors recognize specific antigens and are important for adaptive immunity. The deadly chytrid fungus is killing many frogs worldwide, but frogs in East Asia seem to be resistant.

I investigated MHC gene expression in tadpole skin in *Rana ornativentris* and *Xenopus* frogs, and found that MHC and immune genes have increased expression after the mid-tadpole stages. I also generated cDNA library from 12 Japanese frog species to understand more about their immune genes, especially MHC sequences. Using computational analyses, I found evidence that MHC alleles from the 12 species share some similar physicochemical properties, despite species divergence millions of years ago. This supports that MHC genes were shaped by evolution and possibly in response to a common pathogen like the chytrid fungus.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：MHC frogs immunogenetics

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MHC は特異的な抗原の受容体であり、獲得免疫に重要である。MHC にはクラス I とクラス II という機能的に異なる 2 つのクラスがある。MHC には、特異的なペプチドの結合に重要な「ペプチド結合領域」中に特異的な部位がある。MHC 遺伝子と特異的な病原体に対する抵抗性との関連があることが知られている(Sommer 2005)。

致死性のツボカビは、両棲類の皮膚を破壊し死に至らしめるだけでなく、集団サイズの縮小や多くのカエルの絶滅の原因となる(Pennisi 2009)。日本のカエルではツボカビ関連死や感染感受性に関する報告はほとんどないが、実験的にツボカビを感染させた韓国のカエルが抵抗性を示したという最近の報告がある(Fu and Waldman 2019)。ツボカビのゲノム研究から、このカビは東アジアとりわけ韓国に起源を持つことが示された (O' Hanlon et al. 2018)。ツボカビは東アジアに特有なため、この地域(日本を含めて)のカエルは病原性のカビと共進化をしこのカビに対して免疫的な抵抗性あるいは寛容性を獲得したのかもしれない。

MHC はカエルの免疫的ツボカビ抵抗性獲得に重要な役割を担ったかもしれない。例えば、韓国のカエルとツボカビ症から回復した感受性のあるオーストラリアのカエル個体との間に、MHC クラス II のペプチド結合領域のアミノ酸の性質が似ているという報告がある(Bataille et al. 2015)。

オタマジャクシでは、ツボカビとオタマジャクシの死亡との関連についてはほとんど知られていない。オタマジャクシの成長過程での免疫関連遺伝子の発現を調べることは、宿主と病原体の動態についてさらに理解を深める上で重要である。

2. 研究の目的

- a) モデル生物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) と非モデル生物のヤマアカガエル (*Rana ornativentris*) で、オタマジャクシでの MHC とその他の免疫関連遺伝子の発現を解析する。
- b) ツボカビのような疾病に対する抵抗性との関連のさらなる理解を深めるために様々な日本産カエルの免疫関連遺伝子について解析する。

3. 研究の方法

- a) 定量 PCR で、ヤマアカガエルのオタマジャクシ皮膚の MHC クラス I とクラス II の遺伝子の発現を解析した。さらに、次世代シーケンシングでヤマアカガエルとアフリカツメガエルのオタマジャクシからトランスクリプトームデータを作成した。このデータから MHC 遺伝子の発現や他の免疫遺伝子の differential expression を調べた。
- b) 11 種の日本産カエルの免疫関連遺伝子について調べるために、これらのカエルの脾臓から cDNA のライブラリーを作成した。このライブラリーの次世代シーケンシングから MHC クラス I とクラス II の配列を抽出し、さらにその配列を実験的に(PCR, クローニング, 配列解析)確認した。この日本産カエルの MHC の配列と世界各地のカエルの配列を用いて、系統樹解析と "スーパータイピング" と呼ばれる解析を行った。MHC のスーパータイピングとは、主成分分析法を利用して、ペプチド結合座位のアミノ酸の物理化学的性質により遺伝子のグルーピングを行う方法である。

4. 研究成果

a) qPCR からヤマアカガエルの MHC の遺伝子発現が発生中期から増加することを発見した (Fig 1)。トランスクリプトーム分析から、ヤマアカガエルとアフリカツメガエルのオタマジャクシの MHC や他の免疫遺伝子が発生中期から増加することを発見した。

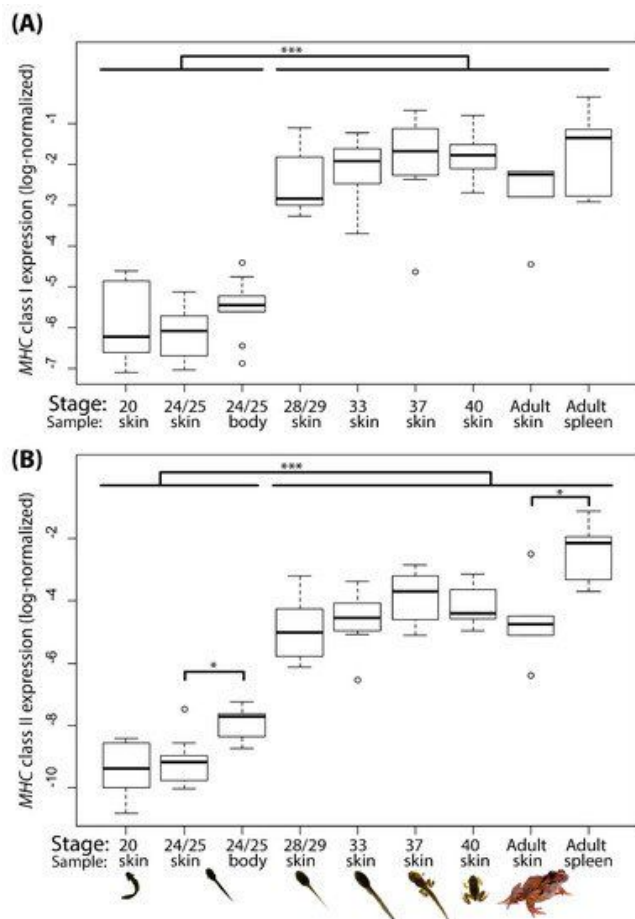


Fig 1. ヤマアカガエルのオタマジャクシの皮膚及び体とカエル(成体)の生体組織(皮膚及び脾臓)からの遺伝子の発現レベルの比較(A) MHC class I (B) MHC class II。

b) 日本のカエル11種のcDNAライブラリをシーケンスして、トランスクリプトームデータを作成した。これらのデータは、ツボカビに対する耐性獲得に重要な免疫関連遺伝子を同定する重要な資源となる。

配列中のアミノ酸の特性等を考慮し対立遺伝子の物理化学的特性を推定すると、すべての12種で類似の特性を持つMHC遺伝子を共有していることが明らかになった (Fig 2)。このことは、日本のカエルのMHC遺伝子はツボカビのような共存する病原菌に対して進化してきた可能性を示す。

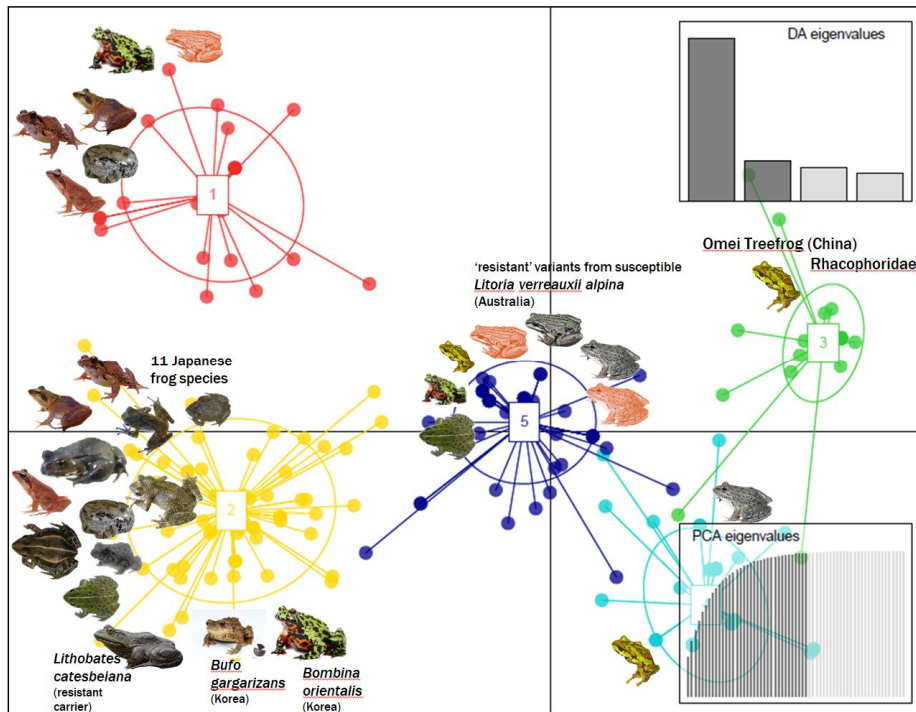


Fig. 2. 様々なカエルのMHCクラスII遺伝子のSupertyping解析結果。耐性がある日本、韓国及びアメリカのカエルが類似の性質を持つMHC class II遺伝子を共有していることが明らかになった（黄色いクラスター）

References

- Bataille, A. et al. Susceptibility of amphibians to chytridiomycosis is associated with MHC class II conformation. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 282, 20143127-20143127 (2015).
- Fu, M. & Waldman, B. Ancestral chytrid pathogen remains hypervirulent following its long coevolution with amphibian hosts. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. (2019).
- O'Hanlon, S. J. et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. Science 360, 621-627 (2018).
- Pennisi, E. Life and death play out on the skins of frogs. Sci. Mag. 326, 507-508 (2009).
- Sommer, S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front. Zool. 2, 16 (2005).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Quintin Lau, Takeshi Igawa, Tiffany A. Kosch and Yoko Satta	4. 巻 6
2. 論文標題 Selective constraint acting on TLR2 and TLR4 genes of Japanese Rana frogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e4842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.4842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 T. A. Kosch, C. N. S. Silva, L. A. Brannelly, A. A. Roberts, Q. Lau, G. Marantelli, L. Berger, L. F. Skerratt	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic potential for disease resistance in critically endangered amphibians decimated by chytridiomycosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Conservation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/acv.12459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 LAU, Q., IGAWA, T., MINEI, R., KOSCH, TA., AND SATTA, Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Transcriptome analyses of immune tissues from three Japanese frogs (genus Rana) reveals their utility in characterizing major histocompatibility complex class II.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-017-4404-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeshi Igawa, Teruhiko Takahara, Quintin Lau, Shohei Komaki	4. 巻 7
2. 論文標題 An Application of PCR-RFLP Species Identification Assay for Environmental DNA Detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.7597	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Quintin Lau, Takeshi Igawa, Shohei Komaki, Yoko Satta	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression Changes of MHC and Other Immune Genes in Frog Skin during Ontogeny	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani10010091	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 LAU, Quintin, IGAWA, Takeshi, KOSCH, Tiffany A. , and SATTa, Yoko
2. 発表標題 Understanding how Japanese frogs are resistant to a deadly worldwide fungal disease through in silico analyses of major histocompatibility complex (MHC)
3. 学会等名 SMBE 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	颯田 葉子 (Satta Yoko) (20222010)	総合研究大学院大学・生命共生体進化学専攻, 生命体科学専攻・教授	
研究協力者	井川 武 (Igawa Takeshi) (00507197)	広島大学・両生類研究センター・助教	
研究協力者	小巻 翔平 (Komaki Shohei) (90789629)	岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・特命助教 (31201)	