

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570125

研究課題名 (和文) 自己免疫系による脊椎動物の個体形成の解析

研究課題名 (英文) Analysis of autoimmune responses involved in the vertebrate organogenesis

研究代表者

井筒 ゆみ (IZUTSU YUMI)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20301921

研究成果の概要 (和文) : アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を含む全ての脊椎動物の発生過程には、一度作った胎児型(幼生型)器官の一部を壊し、成体型へと組織の作り換えを行うリモデリングというプログラムがある。最も劇的な例は、両生類の変態過程において、幼生器官である尾の消失に見ることができる。我々はこれまでに、ツメガエル変態期に新たに出現する成体型の免疫系が、体を完成する際に不要となる尾の皮膚組織を「異物」として認識し、排除する。つまり、自己組織に対する免疫系の異物認識が、組織のリモデリング過程に関わっている、という独創的な仮説に至る結果を得た。免疫系は主に多様性に適応して発達してきた防御システムであるが、個体形成に直接関わるといふ観点からの研究は、近年申請者等により報告されてきたもの以外無い。申請者等は、最近、上記仮説を支持する成体免疫系から認識される抗原タンパク質の候補として *Ouro1* と *Ouro2* を単離同定した。本研究では、それらタンパク質の機能を明らかにするために、1), トランスジェニックツメガエルの F1 および F2, F3 を作製し、2), 尾の退縮には 2 つの *ouro* 遺伝子の共発現が必要であることを明らかとした。3), 変態期において *Ouro* タンパク質が細胞内で共発現をすることを免疫組織化学的に明らかにした。4), 有尾両生類から類似配列を単離し、変態期に限って発現することを明らかとした。これらの結果から、免疫系のターゲット候補から見いだされた *Ouro* タンパク質を介したシステムは、ツメガエルだけでなく他の脊椎動物の個体形成に広く関わっていると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : During ontogenesis, the vertebrates including *Xenopus* frogs show morphological changes from embryonic- (larval-) tissues into the adult counterparts. This process is called tissue remodeling. The most drastic tissue remodeling is seen in the tail regression during amphibian metamorphosis. We have previously proposed a model that the adult-type immune cells, which are newly differentiated during metamorphosis, recognize and remove own tail as non-self. In other words, we postulated that the acquired immune system contributes not only self-defense but also to remodeling processes in animal morphogenesis. This unique model isn't represented except for us. Recently, we isolated genes encoding the antigen proteins, *Ouro1* and *Ouro2*, as candidates being targets for adult immune T cells. In this study, to clarify function of these *ouro1* and *ouro2* genes, 1), we produced F1, F2 and F3 of *ouro*-transgenic tadpoles to analyze gain- and loss-of function. 2), Results indicated that expressions of both *Ouro1* and *Ouro2* proteins are required for the tadpole tail regression. 3), By immunohistochemical analyses, it was shown that *Ouro1* and *Ouro2* became co-expressed in the tail epidermal cells at metamorphic periods. 4), we identified *Ouro* ortholog from other amphibian (urodela). It was also expressed during metamorphosis of salamander. These results suggest that this

Ouro-mediated system may contribute to more general processes in vertebrate morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：発生生物学・免疫生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫生化学

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の個体形成過程には共通性がある。魚のような形をした胎児（幼生）型から四肢を持つ成体型へと変化する。その最も顕著な例は、本研究でモデル動物として用いたアフリカツメガエルを含む無尾両生類の変態現象に見られる。無尾両生類の変態過程では、オタマジャクシの幼生組織が全て消失し、成体組織が新たに分化し、カエルへと組織を再構成する。これは甲状腺ホルモンの作用によって、細胞自律的に進行するというのが定説となっている。特に、無尾両生類が水棲生活から陸上生活へ移り変わる際、幼生の尾部組織の退縮が起こるが、それはホルモンの直接作用によるアポトーシス（プログラムされた細胞死）であると説明されている (Schreiber & Brown, Proc. Natl Acad. Sci. U S A 2003; Das, et al., Dev. Biol. 2006)。しかし、申請者等は、純系 J 系統ツメガエル成体が同系統の尾部組織の皮膚を拒絶する (Izutsu & Yoshizato, J. Exp. Zool. 1993) という結果を始めとして、この拒絶には成体免疫 T 細胞が関与しているまでのツメガエル変態期に新たに出現する成体型免疫系が、成体を完成する時に不要となる尾の皮膚組織を要らないものとして認識し排除する。つまり、自己組織に対する異物認識が、尾部組織の退縮に関わっている、という独創的な仮説に至る結果を得た。

2. 研究の目的

申請者等が近年単離・同定した自己免疫のターゲットタンパク質の候補、Ouro1 と Ouro2、とそれに関わる免疫細胞の作用機序が明らかになれば、自らの遺伝子の発現を制御する発生プログラミングによって免

疫系が動き、正常の器官形成に働くという新しい器官形成メカニズムを証明することが可能となる。従って、本研究では、上記モデルの検証を目的とし、以下の3つのサブテーマの解析を行う。それによって、変態を行うツメガエルをモデル実験動物として用い、他のモデル動物に先駆けて証明することを目的とする。さらには、他の脊椎動物での類似遺伝子の検索及び解析を行い、上記提唱したモデルの一般化を目指す。

3. 研究の方法

【1】F1、F2世代トランスジェニックツメガエルを用いた自己免疫のターゲット遺伝子ouroの機能解析

核移植法により遺伝子導入（トランスジェニック）ツメガエルを作製し、F1およびF2、F3を作製する。一般的に、ツメガエルの性成熟には約2年の期間を要し、さらに、導入された遺伝子が次世代に必ずしも遺伝する訳ではない。しかし、我々の研究室において未だに難しいがより早く継代する技術が確立している。得られたトランスジェニックラインを用いて、各発生段階における詳細な発現と機能解析、尾だけでなく各組織における機能も調べる。

【2】なぜ抗原タンパク質は自己免疫にとって2つ必要なのか？

F0 世代を用いた結果によると、ouro1 と ouro2 遺伝子は2つ同時に過剰発現させないと、早まった尾部崩壊を起こさない。抗

原としてなぜ2つ必要なのか、タンパク質-タンパク質の相互作用があるのか、特定の局在を示すのかについて免疫組織化学的に調べる。

【3】自己免疫系は他の動物の形態形成にもかかわるのか？

尾が変態によって縮まない有尾両生類ではどのような働きをするのか。類似配列を得て発現を調べ、機能や進化的保存性を考察する。

4. 研究成果

まず、Ouro1 と Ouro2 の2つのタンパク質をコードする遺伝子の機能を明らかにするために、熱ショックにより ouro 遺伝子を過剰発現させることができるよう作製したトランスジェニックツメガエルを用いて、変態期のまだ尾が縮む前の幼生に、ouro1 と ouro2 を両方強制発現させた。蛍光顕微鏡で生きたまま観察することで、尾がT細胞の逡巡を伴って本来壊れない時期に壊れることを明らかにした。次に、このツメガエルを成体にし、F1 および F2 を作製した。遺伝子の発現の度合いが強いもの、表現系が得られたもの同士を交配させることによって得られた個体に同様の処理をすると、本来壊れない段階の尾の崩壊する割合は劇的に高まった(雑誌論文#4, 5 参照のこと)。また崩壊の度合いは、幼生の発生段階、即ち、成体型のT細胞の分化程度と共に増加した(投稿準備中)。尾以外の組織においても、組織の細胞死がT細胞の存在の有無に依存して誘導されることが明らかとなった(投稿準備中)。

大腸菌につくらせた Ouro1 と Ouro2 のリコンビナントタンパク質を抗原としてポリクローナル抗体を作製した。これによって、内在性の両タンパク質の細胞内局在を調べると、変態期に特有の共局在をすることが解った。これはセルラインを用いて単独で発現させたときには見られない(投稿準備中)。

有尾両生類であるサンショウウオからオーソログを単離した。ouro 遺伝子の発現パ

ターンを RT-PCR によって調べると、変態期に尾でも背中でも一過的に増加することが解った。これに関しては今後も着目していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ①. Yoshimoto S, Ikeda N, Izutsu Y, Shiba T, Takamatsu N, & Ito M. Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W* in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: Implications of a ZZ/ZW-type sex determining system. ***Development*, 137: 2519-2526 (2010).**
- ②. Kurauchi N, Izutsu Y, & Maéno M. Involvement of Neptune in induction of the hatching gland and neural crest in the *Xenopus* embryo. ***Differentiation*, 79 (4-5): 251-259 (2010).**
- ③. Saito Y, Takahashi Y, Izutsu Y, & Maéno M. Identification and expression of ventrally associated leucine-zipper (VAL) in *Xenopus* embryo. ***Int. J. Dev. Biol.*, 54 (1): 203-208 (2010).**
- ④. Mukaigasa K, Hanasaki A, Maéno M, Fujii H, Hayashida S, Itoh M, Kobayashi M, Tochinai S, Hatta M, Iwabuchi K, Taira M, Onoé K, & Izutsu Y. The keratin-related Ouroboros proteins function as immune antigens mediating tail regression in *Xenopus* metamorphosis. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 106: 18309-18314 (2009).**
- ⑤. Izutsu Y. The immune system is involved in *Xenopus* metamorphosis. ***Front. Biosci.*, 14: 141-149 (2009).**
- ⑥. Saito Y, Gotoh M, Ujiie Y, Izutsu Y, & Maéno M. Involvement of AP-2rep in morphogenesis of the axial mesoderm in *Xenopus* embryo. ***Cell. Tissue. Res.*, 335(2): 357-369 (2009).**

⑦. Shibata T, Takahashi Y, Tasaki J, Saito Y, Izutsu Y, & Maéno M.
A role of D domain-related proteins in differentiation and migration of embryonic cells in *Xenopus laevis*.
Mech. Dev., 125(3-4): 284-298 (2008).

[学会発表] (計 12 件)

(1). Katsuki Mukaigasa, Mitsugu Maéno, Masanori Taira, Kazunori Onoé, Yumi Izutsu
「Role of ouro genes in tail degeneration during *Xenopus* metamorphosis」
日本発生物学会第 40 回大会 **2007 年** 5 月 28-30 日(福岡).

(2). Yumi Izutsu, Mitsugu Maéno, Masanori Taira, Kazunori Onoé
「Requirement of keratin-related protein Ouroboros as immune antigens for metamorphic tail regression in *Xenopus*」
12th International *Xenopus* Conference **2008**, Sep, 8-12, Leiwen, Germany.

(3). Akira Hanasaki, Mitsugu Maéno, Yumi Izutsu
「Knockdown of ouro genes in tail regression in transgenic *Xenopus* tadpoles」
(ノックダウン法によるツメガエル幼生尾部抗原遺伝子オウロボロスの機能解析)
日本発生物学会第 42 回大会 **2009 年** 5 月 28-31 日 (新潟) (ベストポスター賞受賞)

(4). Shin-ichiro Hayashida, Mitsugu Maéno, Yumi Izutsu
「Role of ouro1 and ouro2 genes in tail degeneration during *Xenopus* metamorphosis」
(ツメガエル幼生尾部退縮に働く抗原遺伝子オウロボロス)
日本発生物学会大 42 回大会 **2009 年** 5 月 28-31 日 (新潟)

(5). 五十嵐一博、前野貢、井筒ゆみ
「ツメガエル尾部退縮における免疫系の関与」(Immune system involved in *Xenopus* tail regression during metamorphosis)
日本動物学会第 80 回大会 **2009 年** 9 月 17-20 日(静岡)

(6). 井筒ゆみ
「オタマジャクシの尻尾の消失に関わる免疫系とマクロファージ」
第 50 回日本リンパ網内系学会総会 **2010 年** 6 月 18-19 日(新潟朱鷺メッセ)
シンポジウム講演 (招待講演)

(7). Tomomi Oshima, Tomohiro Kikuta, Mitsugu Maéno, Yumi Izutsu
「A possible reason why both ouro1 and ouro2 genes are required for tail regression during tadpole metamorphosis」(おたまじゃくしの変態時の尾部退縮になぜオウロ 1 とオウロ 2 両方の遺伝子が必要なのか)
第 43 回日本発生物学会 **2010 年** 6 月 20-23 日 (京都国際会館, 京都)

(8). Yumi Izutsu, Tomomi Oshima, Shin-ichiro Hayashida, Akira Hanasaki, Mitsugu Maéno
「A role of the immune system in the tadpole tail degeneration during *Xenopus* metamorphosis」
13th International *Xenopus* Conference **2010**, Sep, 12-16, Lake Louise, Alberta, Canada. (招待講演).

(9). Akira Hanasaki, Mitsugu Maéno, Yumi Izutsu
「Knockdown of ouro genes inhibit tadpole tail regression during *Xenopus* metamorphosis」
13th International *Xenopus* Conference **2010**, Sep, 12-16, Lake Louise, Alberta, Canada.

(10). Tomomi Oshima, Mitsugu Maéno, Yumi Izutsu
「A possible reason why both ouro1 and ouro2 genes are required for tail regression during *Xenopus* metamorphosis」
13th International *Xenopus* Conference **2010**, Sep, 12-16, Lake Louise, Alberta, Canada.

(11). 菊田智広, 大嶋友美, 前野貢, 井筒ゆみ
「ツメガエル細胞株 A6 における尾部抗原タンパク Oouro の細胞内局在の変化」(Changes of intracellular localizations of the tail antigen protein Oouro in cultured *Xenopus* A6 cells.)
日本動物学会第 81 回大会 **2010 年** 9 月 23-25

日(東京大学教養棟, 東京)

(12). 井筒ゆみ

「The role of the immune system in the tail tissue degeneration during amphibian metamorphosis (両生類の変態過程における尾の退縮に関わる免疫システム)」
第33回日本分子生物学会 第83回日本生化学会大会合同大会 **2010**年12月7-10日(神戸ポートアイランド) (招待講演)

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ(申請者らが作製)

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/biologyindex/izutsu/welcome.html>

新潟大学ホームページ(研究トピックスとして研究内容が掲載されている)

http://www.niigata-u.ac.jp/research/10_research_010/ouroboros.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井筒 ゆみ (IZUTSU YUMI)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：20301921

(2) 研究分担者

伊藤 道彦 (ITO MICHHIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：90240994

(3) 連携研究者

()

研究者番号：