

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21657063

研究課題名（和文） 変態を経て変化する棘皮動物ヒトデの自然免疫系の分子実体を探る

研究課題名（英文） Exploring molecular entities of innate immune system that changes through metamorphosis in starfish

研究代表者

古川 亮平（FURUKAWA RYOHEI）

慶應義塾大学・文学部・助教

研究者番号：90458951

研究成果の概要（和文）：

無脊椎動物において、個体発生の視点から幼生、成体の自然免疫系を比較解析する研究はなされていない。本研究において、イトマキヒトデの免疫細胞の同種異個体認識能力は、幼生から成体への変態後に獲得されることを明らかにした。幼生及び成体の免疫細胞で発現する遺伝子を比較解析したところ、免疫関連遺伝子の大部分が両細胞種で共通である一方で、これら共通遺伝子の中に認識システムの変化を示唆する遺伝子が存在することを発見した。

研究成果の概要（英文）：

In invertebrate, a comparative analysis of larval and adult innate immune system, from a perspective of ontology, has not been made. We revealed that the allorecognition capability of immune cells is acquired after metamorphosis in the immune system of the starfish, *Asterina pectinifera*. Although a global analysis comparing genes expression in the larval and the adult immune cells showed that the majority of immune-related gene is common to both cell types, a certain type of gene that suggests the alteration of immune recognition system was present in these common genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	0	800,000
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	240,000	3,340,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：棘皮動物、ヒトデ、自然免疫、認識メカニズム、個体発生、変態、間充織細胞、体腔細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫の重要性が見直され、無脊

椎動物における自然免疫系に関する研究は盛んになってきているが、個体発生の視点か

ら幼生、成体の自然免疫系を比較解析する研究はなされていない。

イトマキヒトデ幼生の免疫細胞である間充織細胞は、貪食作用の際に哺乳類のマクロファージと非常に良く似た細胞行動を示しながら、同種細胞を特異的に認識し、認識できないものを全て異物と見なす認識メカニズム (missing-species 認識) によって生体防御を行っている (Furukawa *et. al.*, 2009)。棘皮動物は系統進化的に脊椎動物に繋がる後口動物の基部に位置しているため、これらの結果は免疫系の進化を考える上で非常に有用な知見である。一方、ヒトデ成体では、同種異系組織の移植拒絶反応が報告されている (Karp and Hildemann, 1976)。この事実は、幼生における種特異性認識による免疫系が、成体に変態することにより、同種異個体認識による免疫系 (missing-self 認識) へと変化している可能性が示唆される。現在のところ、自然免疫系において、個体発生過程で自己非自己認識メカニズムそのものがこれほど変化することを示す研究は存在しない。

2. 研究の目的

本助成では、棘皮動物イトマキヒトデの免疫系において、個体発生過程における自己非自己認識メカニズムの変化を明らかにするために、幼生及び成体の免疫系を比較解析する。

まず、これまでイトマキヒトデにおいて報告がない成体での同種移植系を確立し、成体の免疫細胞である体腔細胞が同種異個体認識能力を携えていることを明らかにする。次に、幼生と成体の免疫細胞でそれぞれ特異的に発現する免疫関連分子を比較解析し、両者の免疫系を特徴付ける因子を探索する。さらに、両者に共通の免疫関連分子の機能解析を行い、幼生と成体の免疫系の共通性を調べる。

これらの研究をもとに、免疫系が個体発生過程で「個性」をどのように確立していくかを解析するための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 成体における同種移植系の確立及び同種異個体細胞に対する免疫応答の解析

人工海水で 30 µg/ml に希釈した細胞ラベル化試薬、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) を個体 A の体腔に 1 ml 注射し、8 時間のインキュベーションにより体腔細胞を蛍光ラベルする。その後、個体 A の体腔液 1 ml からラベルした体腔細胞を回収、洗浄し、1 ml の人工海水で再懸濁して個体 B の体腔に注射する。対照実験として、個体 C から体腔

液を 1 ml 抜き、再度個体 C に注射する (自家移植)。その後、経時的に個体 A、個体 C から体腔液を抜き、体腔細胞を蛍光顕微鏡下で観察する。

(2) 幼生又は成体で特異的に発現する免疫関連分子の比較解析

幼生及び成体の免疫系を比較解析するため、Suppression Subtractive Hybridization 法 (SSH 法) によって幼生の間充織細胞又は成体の体腔細胞でそれぞれ特異的に発現する遺伝子を網羅的に調べる。サンプルとする間充織細胞は、培養下に単離した多数個体由来の間充織細胞集団であり、同種認識による免疫抑制が生じている。一方、成体の体腔細胞は、3-(1) で確立した体腔細胞移植系を用いて、同種異個体認識反応を惹起した個体から経時的 (移植後 0、1、3、6、12、24 時間) に得た体腔細胞をサンプルとする。

(3) 幼生と成体で共に発現する免疫関連遺伝子の機能比較

幼生の間充織細胞及び成体の体腔細胞で共に発現している免疫関連遺伝子として、Scavenger Receptor Cysteine-Rich domain (SRCR ドメイン) を有するタンパク質ファミリーに属する *ApSRCR1* に着目する。SRCR タンパク質は、代表的なパターン認識分子群として知られており、幅広い動物種において免疫系の様々な局面で機能していると考えられている。まず、*ApSRCR1* に対するポリクローナル抗体を用いて、間充織細胞及び体腔細胞における詳細な発現解析を行う。さらに、Morpholino Anti-sense Oligonucleotide (MO) あるいはポリクローナル抗体を用いて機能阻害を行い、注射したバクテリアに対する免疫応答を観察することにより、幼生及び成体の免疫系における *ApSRCR1* の機能の相違を解析する。

4. 研究成果

(1) 成体における同種移植系の確立及び同種異個体細胞に対する免疫応答の解析

CFSE ラベルした個体 A の体腔細胞を個体 B に注射した 12 時間後、個体 B の体腔液中には凝集塊を形成した体腔細胞が多数観察された。さらに、個体 A に由来する蛍光シグナルは、その凝集塊中のみ観察され、遊離細胞では全く検出されなかった。この事実は、注射した個体 A の体腔細胞は、全て個体 B の体腔細胞によって取り込まれていることを意味しており、成体の体腔細胞が同種異個体細胞を識別できることが明らかとなった。一方、自家移植を行った個体 C では、体腔細胞による凝集塊形成は全く認められなかった。

この移植系を用いて、体腔細胞による同種

異個体細胞に対する免疫応答を経時的に観察したところ、移植1時間後において凝集塊形成が開始されていた。さらに移植3時間後、移植前と比較してレシピエントの体腔細胞数は倍増し、凝集塊形成が促進された。凝集塊のサイズは移植8時間後にピークを迎え、その後減少していった。自家移植の場合は、いずれに時間においても、凝集塊形成及び体腔細胞数の増加は認められなかった。

Karp & Hildemann (1976)が行った表皮移植系では移植拒絶に数ヶ月を要したが、本研究により短時間で解析可能な移植系を確立することができた。さらに、無脊椎動物において初めて、幼生から成体へ変態する過程で自己非自己認識システムが変化していることを示すことができた。

(2) 幼生又は成体で特異的に発現する遺伝子の比較解析

SSH法によって得られた遺伝子断片に関して、間充織細胞特異的に検出された288クローン、体腔細胞特異的な384クローンをシークエンスしたところ、体腔細胞で特異的に発現している免疫関連遺伝子として数種の抗菌ペプチドやレクチンを同定した。間充織細胞では数種のmetalloproteinaseを同定した。しかしながら、各細胞腫で特異的に発現する免疫関連遺伝子は予想に反して非常に少なく、サイトカインやパターン認識分子の大部分が間充織細胞及び体腔細胞で共通に発現していると考えられる。また、両細胞種において同定された遺伝子には、機能未知遺伝子が多く含まれていた。今後、両細胞種の自己非自己認識の差を生み出す遺伝子がこれら機能未知遺伝子の中に存在するか、詳細に解析していく必要がある。

間充織細胞は、免疫系のみならず、上皮細胞の増殖制御など発生過程においても重要な役割を担っていることが示唆されているが、体腔細胞においては免疫系以外に関与しているという報告はない。しかし、間充織細胞では、重複して同定された遺伝子が非常に多く、約30%のクローンが11種類の遺伝子にアノテーションされたのに対し、体腔細胞では約15%のクローンが10種類の遺伝子に重複してアノテーションされた。この事実、発現遺伝子のバリエーションは、間充織細胞より体腔細胞の方が高いことを推測させる。これらの発現遺伝子のバリエーションの差が、個体発生における両免疫細胞の機能分化にどのような影響を及ぼすのか、非常に興味深い。

一方、SSH法の結果から、体腔細胞においてNotch-Deltaシグナルカスケードに関与すると考えられる遺伝子が比較的多くヒットした。体腔細胞の同種異個体移植系において、レシピエントの体腔細胞数が移植後速やか

に増加したことから、体腔細胞では認識システムの下流にNotch-Delta系が存在し、体腔細胞の供給を制御していることが示唆された。

(3) 幼生と成体で共に発現する免疫関連遺伝子の機能比較

ApSRCR1 遺伝子は、SRCRドメインがタンデムに9個連なった膜型タンパク質をコードしていた。*ApSRCR1* タンパク質の細胞外領域の一部に対するポリクローナル抗体を作製し発現解析を行った結果、*ApSRCR1* タンパク質は、幼生の間充織細胞及び成体の体腔細胞内の何らかの小胞膜で特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、両細胞種を材料としたウエスタンブロットの結果、間充織細胞、体腔細胞において共に、*ApSRCR1* に対する糖鎖修飾が認められた。一方興味深いことに、体腔細胞で検出された*ApSRCR1* タンパク質は、間充織細胞よりもサイズが大きく、両細胞種において*ApSRCR1* タンパク質に対する糖鎖修飾の程度が異なることが示唆された。また、タンパク質の発現量も、体腔細胞の方が非常に多かった。

幼生における機能阻害の結果、*ApSRCR1* タンパク質は細胞外に分泌され、バクテリアに対する貪食作用を促進していることが示唆された。さらに、成体の体腔細胞及び体腔液を用いた解析から、*ApSRCR1* は細胞外に分泌され、バクテリアに結合することにより貪食作用を促進していることが確かめられた。これらの結果から、*ApSRCR1* タンパク質は、幼生及び成体の免疫細胞において共にバクテリアに対するオプソニンとして機能していることが明らかになった。一方、バクテリアの貪食に対する機能阻害効果は間充織細胞で60%程度、体腔細胞では100%と明確な差が認められた。これらの事実は、*ApSRCR1* タンパク質は、幼生、成体において共にバクテリアに対するオプソニンとして機能する非自己認識関連分子である一方で、幼生、成体の免疫系における*ApSRCR1* の重要性には差があることを示している。

本研究により、幼生と成体の免疫系における自己非自己認識システムの差が、変態の前後での発現遺伝子の劇的な変化ではなく共通遺伝子の翻訳後修飾や作用能の変化に裏打ちされている可能性が示唆され、免疫系の個体発生において新たな生命現象の発見につながる発展性が期待される。

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1件)

① Furukawa R, Matsumoto M, Kaneko H. *ApSRCR1* protein serves as an opsonin to different extents in the two distinct immune systems of the larvae and adults of the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev Comp Immunol*. 査読有. 36(1), 51-61, 2012, DOI: 10.1016/j.dci.2011.06.005

〔学会発表〕(計3件)

① 古川 亮平, 松本 緑, 金子 洋之. ヒトデ *ApSRCR1* タンパク質はオプソニンとして機能する. 日本比較免疫学会第23回学術集会. 2011年8月21日. 神奈川.

② 古川 亮平, 金子 洋之, 松本 緑. 変態を経てアロ認識へと変化するヒトデの異物認識様式. 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第1回領域会議. 2010年7月14日. 愛知.

③ 古川 亮平, 玉木 香菜, 船橋 宏美, 金子 洋之. ヒトデ幼生の免疫システム: その概要と変態を経て変化する「自己」について. 第50回日本リンパ網内系学会総会(シンポジウム「系統発生からみたマクロファージの発生と分化」). 2010年6月18日. 新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 亮平 (FURUKAWA RYOHEI)

慶應義塾大学・文学部・助教

研究者番号: 90458951

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし