

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657086

研究課題名(和文) 特異的抗原を介した上皮器官形成に関する分子間相互作用の解析系の開発

研究課題名(英文) Analyses of the molecular interaction between epithelial organogenesis and immune system via specific antigens

研究代表者

井筒 ゆみ (IZUTSU, YUMI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20301921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、申請者らが発見した免疫系のターゲットであるオウロタンパク質を、動物の生体内で特異的に発現させ、細胞内での動的状態や機能を生きたまま解析できる系を開発することである。得られた結果から、獲得免疫の特異性を利用することによって、動物が体を維持・形成していることの機序を考察する。これまでに、以下の結果を得た。1)、免疫細胞が、オウロタンパク質を発現している細胞に短期間で集積するという動画撮影に成功した。2)、Ouroに対する特異的なポリクローナル抗血清を得た。3)、その抗血清を用いて、ツメガエルOuroが免疫系の標的となる際に生体内で特有の細胞内局在を示す可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We previously found a novel protein, named Ouro, as a candidate for immune antigens from amphibian. In this study, to clarify molecular mechanisms underlying the body plan of vertebrate animals, we focused on the functions of acquired immune system vs specific self-antigens, i.e., Ouro proteins. First, we examined immune cell response to the self-organ that expresses Ouro proteins. Using our transgenic *Xenopus* line, we found that immune T cells immediately migrated into Ouro expressing cells in the tadpole tail by using a live-cell-tracking. Second, we obtained polyclonal rat antisera against Ouro proteins. Third, using these antisera, we have tried the immunohistochemical analyses, and shown that a unique intracellular localization was seen when the Ouro proteins are recognized by immune cells.

研究分野：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：発生・分化 免疫学 蛋白質 発現制御 動物

1. 研究開始当初の背景

上皮は、全ての多細胞生物の器官構造上、必須の構造である。上皮は、基底部に存在する胚芽細胞から階層性を持って分化し、細胞外基質を含めて、三次元構造を形成する。そこでは種々の生体内分子や外来性分子が、結合あるいは分離することで相互作用し、機能していると考えられる。一方、上皮は、外界と生体内の境界（バリア）として機能しているのみならず、免疫器官としても重要な役割を担っている。しかしながら、これまでに、個々の分子間の相互作用やそれと直接関わる細胞・組織側との関わりを持つ生理的意義を、直接的に解析する有用な手段が乏しいのが現状であった。

そこで、申請者らは、器官形成の鍵となる分子に着目し、生体内でそれと相互作用する因子を生体内で解析することで、問題解決の糸口がつかめると考えた。そのために、これまでに以下のような結果を得ている。(1)免疫系の新規のターゲット抗原タンパク質であるオウロボロス、以下オウロタンパク質を、アフリカツメガエルより単離・同定した(Mukaigasa ... and Izutsu, 2009, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18309)。オウロボロス(Ouroboros)とは、ギリシャ語を語源としており、己の尾を食らう生き物の意味を持つ。幼生尾の消失に関わるという機能解析の結果から、申請者らが命名した。(2)オウロタンパク質を異所的かつ時期特異的に過剰発現させることが出来るトランスジェニックライン(F2~F4 世代)を既に数種維持している。(3)ツメガエル以外の脊椎動物から、オーソログを単離している。(4)ツメガエルの全ゲノム配列が明らかになっている。これらのことから、特異的なプロモーターを検索するなどしてオウロタンパク質を様々な組織に発現させることによって、発現組織を獲得免疫によって特異的に排除させることができる。つまり、獲得免

疫の特異性を利用することによって、細胞集団を、維持、形成、または破壊させるツメガエル実験モデルを作製することができると考えた。

2. 研究の目的

研究の主目的は、発現させたオウロタンパク質が、獲得免疫によって特異的に排除させられる、言いかえると、免疫が形態形成に働くという極めて独創性の高い仮説を検証することである。そのためには、生体内で免疫系のターゲット抗原タンパク質を組織特異的に発現させることで、細胞内での動的状態や機能を生きたまま解析できる系を開発する。それによって、オウロタンパク質をキー分子として着目し、皮膚と免疫細胞との相互作用が、器官形成に及ぼす分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

【1】複合型オウロタンパク質を認識するモノクローナル抗体の作製

興味深いことに、Ouroタンパク質は、硬骨魚類や有尾両生類といった他の動物種においても、Ouro1とOuro2の「1対」が存在する。しかも、免疫沈降実験により、ツメガエルのOuroタンパク質は互いに複合体を作っていることが示唆されている(論文投稿中)。従って、2つとも共発現させた場合を認識するモノクローナル抗体と、単独で発現させた場合だけを認識するものを選別することを計画した。得られた抗体によって、内在性タンパク質の局在や、その際、他のタンパク質との相互作用や、主要組織適合性複合体、MHC class II (Izutsu *et al.*, 2000, *Dev Biol* 221:365)に提示される経路を解析するために有用なツールとなり得る。

【2】ツメガエル生体内において異所的・異時的に細胞を除去・増幅させるモデル実験の確立と、相互作用する因子の検索

既に確立している野生型で作成したトランスジェニックツメガエルと、申請者らの研究室で系統維持されている完全なMHC分子が同一である近交系 J 系統と掛け合わせることによって、ハイブリッド個体を作成する。これにより、J 系統からの免疫細胞、しかも複数の個体からプールして一定量に調整した免疫細胞の移入が可能となる。それによって、様々な組織に発現させたOuroタンパク質をターゲットとして、特定の細胞あるいは細胞集団を、特定の時期に取り除くことを計画した。さらに免疫系を増強させるシグナル伝達因子などを外から加えるなどして、影響を見る。このような手順で、アポトーシスや成長をコントロールする分子の関わりを明らかにする。

4. 研究成果

これまでの研究成果をふまえ、本研究では以下の結果が得られた。

(1), まず、大腸菌に作らせたOuro1、Ouro2のリコンビナントタンパク質を精製し、それらタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製に着手した結果、陽性サンプルの中から、内在性の、即ちOuro1とコンプレックスを形成している時のOuro2を認識するクローンと、単独で発現させた状態のOuro2だけを認識するクローンが、別々に単離されてきた。しかし、これらクローンは途中で増殖を止めてしまい、十分な培養上清を回収することは出来なかった。今後、動物種を変えたりして再び試したい。その際の注意点や知見を得ることができたので、今後生かしたい。途中で、Ouroタンパク質それぞれに対する特異的なポリクローナル抗血清を得た。そこで、その抗血清を用いて、ツメガエルOuroが免疫系の標的となる際に生体内で特有の細胞内局在を示す可能性が示された。

(2), トランスジェニック動物を用いて、あらかじめ蛍光ラベルした免疫細胞が、オウロタンパク質を発現している細胞に短期間で集積するという動画撮影に成功した。本研究の主目的は、申請者が発見した免疫系のターゲットであるオウロタンパク質を、動物の生体内で特異的に発現させ、細胞内での動的状態や機能を生きたまま解析できる系を開発することである。今回得られた結果から、獲得免疫の特異性を利用することによって、動物が体を維持・形成していることの機序を考察することができた(投稿準備中)。

(3), 精製した Ouro リコンビナントタンパク質それぞれを単独、あるいは共に T 細胞の培養系に加え、T 細胞の反応を調べたところ、単独ではある程度の増殖反応を示すが、2つ同時に加えると、有意に強く反応が見られることが判った。この結果に関しては、いったん可溶化したリコンビナントタンパク質を使った場合だけでなく、直接組織に発現させた場合でも同様のことが見られるのか、今後も着目している予定である。

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 1 件)

(1). 井筒 ゆみ

「おたまじゃくしの尾の消失 免疫学的な観点から見る動物の体作り」化学と生物, 50 883-890 (2012). (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

(1). Mawaribuchi S., Izutsu Y., Fujitani K., Komiya T., Takamatsu N., Ito M.

「Dmrt1 controls germ cell fate in *Xenopus* developing gonads」

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月03日～2013年12月06日

神戸ポートアイランド、兵庫.

(2). 伊藤 道彦, 回淵 修治, 藤谷 和子, 武蔵 島 正人, 和田 美加子, 井筒 ゆみ, 高松 信彦

「ツメガエル性分化機構および脊椎動物雄化遺伝子Dmrt1の分子・機能進化」

第7回ツメガエル研究集会

2013年09月23日～2013年09月24日

秋吉台国際芸術村、山口.

(3). 井筒 ゆみ

「両生類の器官形成における細胞死に働く免疫系」(Immune system involved in the cell death during amphibian morphogenesis)

日本比較生理生化学会第35回大会

2013年07月13～2013年07月15日. イーグレひめじ, 兵庫. (招待講演).

(4). Maruyama E., Maeno M., Izutsu Y.

「Knockdown of ouro genes represses tadpole tail regression during *Xenopus* metamorphosis」

(オウロ遺伝子のノックダウンは変態期のツメガエル幼生の尾部退縮を抑制する)

第46回日本発生生物学会 (APDBN 共催)

2013年05月28日～2013年05月31日

くにびきメッセ、島根.

(5). Izutsu Y., Kikuta T., Kazama Y., Maeno M.

「Immune antigen proteins Ouro1 and Ouro2 for tadpole tail degeneration in *Xenopus* metamorphosis」

14th International *Xenopus* Conference (国際学会) 2012年09月09日～2012年09月13日. Giens peninsula, France. (招待講演).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
科学雑誌 Newton 別冊「生き物の超能力」2012年9月掲載 (pp30-31)。

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・准教授
研究者番号：20301921

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：