

平成24年 5月 6日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890009

研究課題名（和文）自然免疫系における「記憶」のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Trans-generational “memory” in *Drosophila* innate immunity

研究代表者

古橋 寛史 (FURUHASHI HIROFUMI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60545432

研究成果の概要（和文）：

自然免疫系における「記憶」現象を検証する為に、ショウジョウバエモデルを用いて、複数世代にわたって病原性細菌感染実験を行った。網羅的遺伝子発現解析の結果、複数世代感染を繰り返した個体群と感染歴の無い対照群では、次世代以降での感染刺激に応答した遺伝子発現パターンに違いが観られた。今回の結果から、自然免疫系のみを有する生物種においても、特定の環境ストレスを何らかの機構により世代を超えて「記憶」している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To examine the existence of “trans-generational memory” in innate immunity, we used *Drosophila melanogaster* as a model system and did generational infection experiments. Gene expression profiling analyses revealed that some innate immunity-related gene expression patterns in response to a bacteria infection is significantly different between test group that has been infected at previous generations and the control group not infected previously. The results suggest the possibility that organism which only has innate immunity can “memorize” environmental stress, and that the “memory” can be maintained across generations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：自然免疫、遺伝子発現制御、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

従来、非特異的生体防御システムとして捉えられていた自然免疫系は、獲得免疫系とは

異なり、「適応能」を持たないと考えられてきた。しかし、最近の研究により、獲得免疫系を持たないショウジョウバエなどの生物

においても、感染刺激に対する特異的な「適応」がみられ、一度目の感染刺激を「記憶」することで、二度目に致死量の刺激を与えても死を免れていると考えられる観察結果が得られている (*PLoS Pathog.*, 3, e26, 2007)。また、哺乳動物細胞においても、自然免疫系を司るマクロファージや樹状細胞において、炎症誘起に関与する遺伝子群が、エピジェネティックな「記憶」によって抑制されうるといふ知見が得られている (*Nature*, 447, 972-978, 2007, *Blood*, 111, 1797-1804, 2008)。エピジェネティクスとは、遺伝子の塩基配列、あるいはその変化に依らない遺伝現象である。具体的には、1) DNA やヒストンなどのクロマチン (染色体) 上での化学修飾を介した転写レベルでの制御と、それらの修飾状態の細胞分裂を通じた維持、2) 非コード RNA などの制御分子による mRNA の安定性や翻訳レベルでの制御と、それらの制御分子の細胞分裂を介した娘細胞への伝播などより達成されると考えられている。しかし、自然免疫系における「記憶」については、現象の発見がようやく端緒についたばかりであり、そのメカニズムは明らかにされていない。また、この「記憶」がどの程度維持されるのか？ 世代を超えて生じうるものなのか？ など、新たな疑問も湧いてくる。

1800 年代初頭にラマルクが提唱した「用不用説」以来、遺伝学の歴史の中で「環境適応に有利な『獲得形質』が遺伝しうるのか？」という問いについて度々議論されてきた。しかし、動物において、その証拠と共に根底にある分子基盤を示した例は未だ皆無であると思われる。ショウジョウバエ自然免疫系を一つのモデルとして、この長年の謎にエピジェネティクスの観点から迫りたいと考えている

2. 研究の目的

自然免疫系における「記憶」機構の解明は、生物が元来有する生体防御能を利用した医薬・農水産業／病虫害対策への応用と生態系保全の両立を可能にする新たな知識創出に繋がると考えられる。本研究では、獲得免疫は有さず、比較的シンプル且つよく保存された自然免疫系のみを持つショウジョウバエをモデル生物として解析を進めることで、自然免疫系における「記憶」の実態に迫り、生体防御戦略上、進化的に保存されていると予想される分子基盤の迅速な発見と理解を目指している。

3. 研究の方法

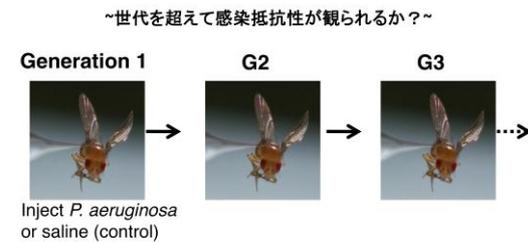
Genetic background の影響を最小限に減らすため、研究室において”wild type”として用いられている OregonR 系統の雌雄一対か

ら生まれた個体群を準備した。これを一つの line として、複数の独立した line で実験を行った。

緑膿菌、あるいはコントロールとして生理食塩水をマイクロインジェクションによりショウジョウバエ成虫体内に微量注入した。各個体群から得られた次世代でも同様の感染実験を行い、これを複数世代繰り返すことで緑膿菌に対する耐性度が変化するか、生存率などを指標に検証した (Fig. 1)。

Fig. 1

Generational analysis of *P. aeruginosa* (緑膿菌) infection

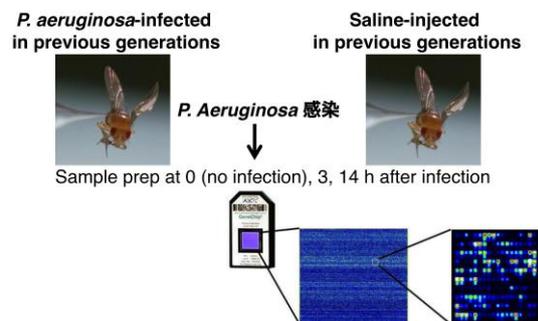


また、以前の世代で感染歴のある個体群と、生理食塩水をインジェクションし続けた対照群のそれぞれについて、非感染時および感染後一定時間経過した個体から RNA を精製し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現状況を網羅的に解析した (Fig. 2)。

Fig. 2

Expression profiling analysis

P. aeruginosa-infected line vs Saline-injected control



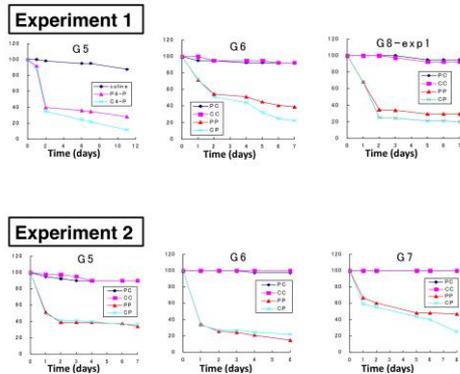
これにより、以前の感染歴が感染刺激に応答した遺伝子発現パターンに影響するかどうか検証した。さらに、発現パターンの変化が見られた遺伝子群の一部について、定量的 PCR (qPCR) 法を用いて異なる独立したサンプルでも同様の結果が得られるか検証した

4. 研究成果

ショウジョウバエに対して高い病原性を示すことが知られている緑膿菌を用い、感染から一定時間経過後の生存率を指標に、適応が見られるか評価した。この結果、複数世代にわたる緑膿菌感染を行った個体群では、以

前の世代で感染歴の無い対照群に比べて、若干ながら生存率が上昇する傾向が観察された (Fig. 3)。

Fig. 3

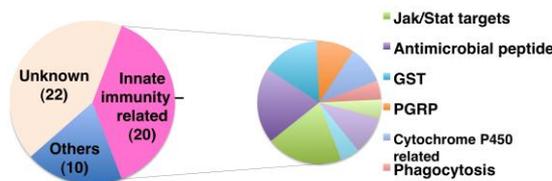


複数世代にわたって感染刺激を与えた個体群 (PP) と、生理食塩水を注射した対照群 (CP) の間で、感染抵抗性に統計的有為差が観られるケースもあり非常に興味深い。ただし、この差は独立した複数の実験で毎世代安定して観察されるものではなかった。PC: 以前の世代で感染刺激を与えた個体群に生理食塩水を注射したコントロール。CC: 以前の世代で生理食塩水を注射した対照群に当該世代でも生理食塩水を注射したコントロール。

しかし、この変化は世代間で安定して見られるものではなく、生存率に差が認められないことも度々観察された。生存率のみを指標にした今回の実験系では、感染条件等により「適応／記憶」現象を見出し難い可能性があると考え、次に、micro array を用いた発現プロファイリング解析を行い、分子レベル (遺伝子発現レベル) での変化について検証した (Fig. 2)。この結果、複数世代にわたる感染刺激を行った個体群と、以前の世代で感染歴の無い対照群では、感染刺激にตอบสนองした遺伝子発現パターンに違いが見られ、前者において *Attacin*, *Cecropin*, *Turandot*, *PGRP-SC* などの自然免疫に関する機能カテゴリーに属する遺伝子群の発現誘導が緩慢、あるいは遅れる傾向が伺えた (Fig. 4)。

Fig. 4

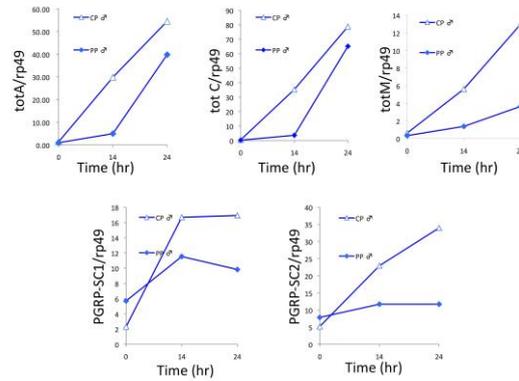
複数世代にわたり緑膿菌を感染させた個体群で発現が減少していた遺伝子群



また、この遺伝子発現パターンの変化は、qRT-PCR を用いた解析により、異なる世代、

および独立した実験系統間で同様の変化が見られ、再現性が得られることを確認した (Fig. 5)。

Fig. 5



独立したlineを用いた実験でも同様の発現パターンの変化が観られるか、RT-qPCRにより検証した。発現プロファイリング解析結果と同様、以前の世代で感染歴のある個体群 (PP: ◆) では、生理食塩水を注射した対照群 (CP: △) に比べて、感染刺激にตอบสนองした発現誘導が緩慢、あるいは遅れる傾向が観られた。

<結論>

これまで、自然免疫は獲得免疫とは異なり適応能を持たないと考えられてきたが、最近の研究により、獲得免疫系を持たないショウジョウバエなどの生物においても、感染刺激に対する特異的な適応が見られる現象が報告されている。しかし、自然免疫における『適応反応』については、現象がようやく発見されたばかりで、そのメカニズムの詳細は解明されていない。そこで本研究では、自然免疫系における「適応／記憶」が世代を超えて観察されるか検証するために、ショウジョウバエをモデル生物に複数世代にわたる病原性細菌感染実験を行った。

その結果、感染から一定時間経過後の生存率を指標に、適応が見られるか評価した実験において、複数世代にわたる緑膿菌感染を行った個体群では、以前の世代で感染歴の無い対照群に比べて、若干ながら生存率が上昇することが観察された。しかし、この変化は世代間で安定して見られるものではなく、一般的な統計解析では有意差が見え辛かった。しかし、このような生存率の微動について、集団遺伝学的な解析／シミュレーションなどにより、子孫の繁栄維持に寄与しうる可能性について検証できるかもしれない。

次に、micro array を用いた遺伝子プロファイリング解析の結果、複数世

代にわたる感染刺激を行った個体群と感染歴の無い対照群では、感染刺激に応答した遺伝子発現パターンに違いが見られ、*Attacin*、*Cecropin*、*Turandot*、*PGRP-SC*などの自然免疫に関連する遺伝子群の応答が緩慢あるいは遅れる様子が伺えた。また、この遺伝子発現パターンの変化は、qRT-PCRを用いた解析により、独立した実験系統を用いた実験でも同様の変化が見られ、さらに、世代間で再現性がえられることも確認された。

今回見出した「適応/記憶」現象に関わると考えられる遺伝子群の発現を制御することが知られている因子、シグナルカスケードなどを念頭においたさらなる解析により、自然免疫における「適応/記憶」現象のメカニズムに迫ることが出来るかもしれない。また、エピジェネティクスの観点から、今回見出した遺伝子群、あるいはその上流因子をコードする領域での染色体上の修飾状態を調査することも考えている。さらに、今回は緑膿菌を感染源に用いたが、他の菌種やウイルスなどでも同様の現象が観察されるか、検証する必要があると考えられる。

今回の結果から、自然免疫系のみを有する生物種においても、特定の感染刺激/環境ストレスを何らかの機構により「記憶」することで、「適応」へと繋がりを有する可能性が考えられる。今後、注意深く設計された実験による検証例が蓄積され、これらの分子機構を明らかにしていくことで、生物が元来有する生体防御機能を利用した医薬・農水産業/病虫害対策への応用と、生態系保全の両立を可能にする新たな知識創出に繋がることが期待される。

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)

[学会発表] (計3件)

古橋寛史：自然免疫系における「適応/記憶」機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7-10日、神戸

古橋寛史：The epigenetics of germ-line immortality. 第17回配偶子制御セミナー、2010年9月16日、岡崎

古橋寛史：Trans-generational epigenetic regulation in *C. elegans* primordial germ cells. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting、2010年8月5-9日、アルバカーキ (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古橋 寛史 (FURUHASHI HIROFUMI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60545432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし