

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570106

研究課題名(和文) クロイソカイメンにおける自己・非自己認識機能

研究課題名(英文) Self and non self recognition in a marine sponge, *Halichondria okadai*

研究代表者

齊藤 康典 (SAITO, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00196015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：クロイソカイメンの自己・非自己認識機能を調べた結果、同所的に生息するダイダイソカイメンの個体と接触すると、非自己と認識して拒絶することが明らかとなった。一方、同種個体間の認識においては、約10m四方の狭い範囲に生息する成熟個体間の接触で、ほとんどの組み合わせで拒絶反応を示し、癒合する組み合わせはほとんど無かった。一方、同一母親から生まれた幼生を固着変態させた幼体間での自己・非自己認識を調べると、固着変態直後から認識能を示し、さらに、拒絶反応の様式が成熟個体とは若干異なることが明らかとなった。拒絶反応の様式の詳しい記載や、個体間で拒絶が出現する頻度などから遺伝的な支配についてについて考察した。

研究成果の概要(英文)：The function of self and nonself recognition in a marine sponge *Halichondria okadai* was studied. An adult individual showed rejection against the individual of *Halichondria japonica*, when they came in contact with each other. The individual of *H. okadai* also recognized most of allogeneic ones as nonself. Furthermore, just after the metamorphosis of planktonic larvae from a mother individual into young individuals, they showed the ability of allorecognition among their siblings, that is, two young individuals fused with each other or rejected at their contact area. In *H. okadai*, the manner of xenorejection against individuals of *H. japonica* was different from that of allorecognition, and the manner of allorecognition of adult individuals was also different from the manner shown by young individuals. Then, to discuss the genetic control of allorecognition in *H. okadai*, we have examined the frequency of fusion and rejection among natural populations and among cultured siblings.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性/分類

キーワード：カイメン類 自己・非自己認識 遺伝的多様性 移植免疫 sponge *Halichondria okadai* allorecognition xenorecognition

## 1. 研究開始当初の背景

医療に於ける移植免疫治療で示される、我々の身体の中の移植組織に対する自己・非自己認識能は、何のために保持されているのか？人類が誕生してから500万年以上もの間、他個体から組織や器官を移植されることは無かったにもかかわらず、我々の身体は他個体の組織を非自己として区別し排除する。生物は進化の過程で、使うことの無い不必要な機能は無くしてきたと考えられている。それではこの機能は移植片の排除のためでなく、何のために保持されてきたのであろうか？そして、この機能は動物の進化の過程でいつ獲得され、どのように進化してきたのか？これらの疑問を解くために、この機能が多細胞動物において普遍的なものであるのか、そして、多細胞動物に於いてどのような生物学的意義があるのかを知る必要がある。

現在までに、脊索動物門の脊椎動物の自己・非自己認識については、移植免疫を支配する組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の存在が明らかであり、その機能についての研究も進んでいる。一方、無脊椎動物ではあまり研究が進んでいないのが現状である。比較的良く研究されているのは脊索動物門で脊椎を持たないホヤ類で、群体性のホヤでは成長端や被囊、血管内で自己・非自己認識を行うことが知られており、拒絶反応についてもよく調べられている。また、この現象を支配する癒合性遺伝子 (FuHC) の存在が明らかとなり、脊椎動物の MHC との関連性が示唆されたが、MHC と類似の DNA 配列は見つかっていない。その他、コケムシ、ミミズ、ヒモムシ、サンゴ、カイメン類などで、自己・非自己認識反応があるという報告があるが、自己・非自己認識反応の過程や遺伝的な支配についての詳細な報告は無い。しかしながら、多くの動物群で自己・非自己認識反応が認められたという事実は、この現象が動物界では普遍的な機能であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、多細胞動物で最も下等と考えられている海綿動物門のイソカイメン類を用いて、自己・非自己認識能の有無を調べ、そして、認識能が存在するならば、自己・非自己認識反応の過程を詳細に観察し、その反応過程を明らかにする。さらに、その自己・非自己認識反応の遺伝的支配について、掛け合わせ実験などから明らかにする。そして、これらのデータから、この機能の生物学的意義について考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

伊豆半島先端・下田市の下田湾及び鍋田湾の磯より採集したクロイソカイメン個体、及び、成熟雌個体より遊出した幼生から発生した幼若個体。そして、同じ場所で採集したダイダイイソカイメン個体。

### (2) 個体間の自己・非自己認識機能の調査

各個体から小片 (約7ミリ x 2ミリ x 5ミリ) を切り取り、同一個体からの2片、或いは、異個体からの2片をスライドガラス上で接触させ綿糸で固定する。この試料を流水中に4-5日おき、その間、接触部での反応を観察し、自己・非自己の区別が行われるか調べる。また、その反応過程を詳細に観察する。そして、非自己を識別できるならば、何が (細胞、液性因子など) 最初の非自己認識に関与するのかを調査する。

### (3) 幼若個体における自己・非自己認識機能の調査

成熟雌個体から遊出するパリンキメラ幼生を集め、固着変態を促す処理をして、スライドガラス上に付着変態させて幼若個体間での自己・非自己認識能の発現とその様式について観察する。

### (4) 室内飼育系の開発

クロイソカイメンをはじめイソカイメン類の生活史はほとんど分かっておらず、付着変態後から性成熟するまでの期間や寿命について調べるため、また、掛け合わせ実験など遺伝的な研究のために室内飼育系を開発する。

### (5) 解離細胞を用いた自己・非自己認識能の検定法の開発

カイメンの個体片を用いて、自己・非自己認識反応を調べるのは、材料の調製や結果が出るまでの時間がかかるので、より簡便で、一度に多くの実験が出来る検定法の開発を行う。カイメン2個体の細胞を解離し、一方をマーキングし細胞を混ぜ合わせ再集合させる。そしてマーキングされた細胞とそうで無い細胞が異なる細胞塊を作ることを確かめる。この検定法の開発のために、どのようなマーカー染料が最適かを調べる。

### (6) 自己・非自己認識機能の遺伝的支配の調査

自然界でどのような頻度で自己と見なす個体が存在するのか、兄弟間で自己或いは非自己と認識する頻度を調査し、遺伝子の関与があるかないかを調べる。また、室内飼育で性成熟した個体が得られたら、これらを用いて交配実験を行い、得られた幼若個体間での癒合と拒絶の割合から、遺伝子の関与の仕方について調査する。

## 4. 研究成果

(1) クロイソカイメンとダイダイイソカイメンの固体片 (約7ミリ x 2ミリ x 5ミリ) を成長端で接触させると目立った拒絶反応は観察されなかったが、切断面で接触させると接触する中膠 (無構造なゲル層) の癒合は起こらず中膠細胞が境界面に集合して、最終的にはフィラメント上の物質が境界部に分泌され拒絶反応は終了する。

一方、クロイソカイメンの同種の異個体間と同一個体間で2片を成長端同士、或いは、切断面同士で接触させると、成長端接触でも

切断面接触でも、同一個体間では常に癒合し一塊になり、異個体間では希に癒合する組み合わせがあるが、ほとんどの場合接触面で中膠の癒合と並行して拒絶反応が認められた。即ち、クロイソカイメンは同種個体間で自己と非自己の区別をすることが出来る。異個体に対する拒絶反応は、表皮層が最初に接触する成長端接触でも中膠が直接接触する切断面接触でも同様に発現したので、固体表面を被うピナコダームと呼ばれる表皮層は認識に参与していないことが明らかとなった。そして、2 固体片の接触面にミリポフィルターを挟むことで、拒絶反応のトリガーに液性因子が関与しているか調べたところ、ミリポフィルターを挟んだ部域では拒絶反応が現れなかったため、両個体の中膠細胞同士の接触が拒絶反応のトリガーになることが明らかとなった。つまり、ピナコダームは常に癒合し、中膠と呼ばれる内部組織中に分布する中膠細胞が相手個体の中膠細胞と接触することで自己・非自己を認識し、非自己と認識した場合は周囲に分布する他の中膠細胞を接触面に誘導する。初期に集合するのは黒色素を持つ細胞が多く、境界部に黒い線が引かれたようになる。その後、他のタイプの細胞が非常に多く集まり、境界部に繊維状の物質が分泌され2 個体間に異種間の場合より繊維密度の高い壁のような仕切りが形成され、2 個体間の相互作用は終了する。

(2) 7月から9月にかけて、クロイソカイメンは性成熟し、雌個体は中膠内に多数の胚を持つ。胚はパリンキメラ幼生となり母親個体から泳ぎ出てくる。通常だと、幼生は2-4日遊泳後、それぞれ独自に付着変態を始める。これでは実験しづらいので、できるだけ早く、且つ、同時に付着変態させる方法の発見を試み、以下の方法を見つけた。それは、泳ぎ出した幼生を集め、低調海水中に8時間ほど入れておき、その後正常海水中に戻すという方法である。この処理を行うと、多くの幼生が遊泳を止めて変態を始めることが明らかになったからである。

この方法を用いて、変態を始めた幼生2 個体を2-3ミリ離してスライドグラス上に置き、そこで変態をさせ、幼若個体間の自己・非自己認識反応の調査を行った。変態後すぐに2つの幼若個体は周縁部で接触するので、接触部域でどのような反応を示すかを観察した。その結果、変態直後の2 個体間でも明瞭な拒絶反応を示す個体があることが示され、変態直後の幼若個体が、既に自己・非自己認識能を保持している可能性が示唆された。幼若個体の拒絶反応は、成熟個体の拒絶反応と類似したのもあったが、異なる様式が目立った。成熟個体のように接触直後に中膠細胞が境界部に集合して2 個体間に繊維質の壁を作るケースはあまり多くなく、一旦、パラピオシスやキメラ状態になり、その後、パラピオシスでは2 個体が分離したり、境界部で中膠細胞が集合して拒絶反応を示したり、或いは

両個体が共に組織崩壊し死滅した。また、キメラとなった場合は、そのまま1 個体として成長する場合と、組織崩壊して死滅する場合があった。いずれにしても、拒絶反応は接触後1 週間以内に現れることが分かった。

(3) 解離細胞を用いた、自己・非自己認識反応検定システムの開発は、生細胞を染める色素と生細胞の核に特異的に取り込まれる蛍光色素の二つのタイプの色素を用い、一方の個体の細胞をマーキングして調査する方法を試した。結果は、2 個体からの細胞がそれぞれ別々に凝集する様子が見えるが、生細胞を染める色素の場合は、染色された細胞から拡散した色素で、染色していない個体の細胞が染まることで、不明瞭になっており、色素の拡散を阻止することが課題となっている。一方、核に取り込まれる蛍光色素(SYTO9 など)では、再集合中に色素が溶出して染色していない細胞を染めることが比較的少ないことが分かった。そこで、今後は核に取り込まれる蛍光色素を用いた検定法を開発することとした。そのために、これらの色素を使用するための最適な色素濃度と再集合時の最適細胞密度などの検討を行っている。

(4) 室内飼育での飼育系の構築では、性成熟個体を得ることを目標とした。しかし、パリンキメラ幼生から1 年半ほどでスライドグラスほどの大きさの個体に育てることができるようになり、そしてその後2 年以上室内で飼育しているが、性成熟した個体は未だ得られていない。従って、自己・非自己認識能をコントロールする遺伝子について、掛け合わせ実験からの解析は進んでいない。イソカイメン類は生活史が明らかでなく、付着変態後の寿命や、性成熟までの期間が不明なため、飼育システムが完全でないのか、性成熟するまでの時間がまだ足りないのかが、現段階では不明である。また、幼若個体の湾内の生け簀や屋外水槽での飼育実験では、成長する前に死滅するケースが多くうまくいっていないため、室内飼育系にフィードバックするデータは得られていない。今後も、室内飼育を続けると共に、性成熟に必要な飼育条件を見つけていくことを目標としたい。

(5) 室内飼育系の開発がまだ完成しておらず、掛け合わせ実験などから、自己・非自己認識能の発現に参与する遺伝子の詳細な解析は出来ていない。しかしながら、同一母親個体から得られた兄弟の幼若個体間での癒合性を調べた結果、6-8 割の確立で癒合する結果を得ており、イタボヤ類の即時的な自己・非自己認識反応の群体特異性と類似した結果となり、イタボヤ類のFuHC と類似の遺伝子の存在が示唆された。

一方、約10メートル四方の生育場所を下田湾と鍋田湾の海岸線で数カ所選び、その中に棲むクロイソカイメン個体の集団を用い、集団内、及び、集団間での2 個体の組み合わせで癒合するかしないか(癒合性)を調べた結果、同一生育場所内で生育する個体間での

癒合する組み合わせは非常に少なく、また、異なる生育場所の集団の個体間では癒合する組み合わせは見つからなかった。狭いニッチの中なら、兄弟関係の固体もある程度生育していると考えていたが、自己と見なして癒合する組み合わせが異常に少ないのは、まだ我々が知らない生態学的な要因が存在するかも知れないと考えている。

(6) カイメン類に於ける自己・非自己認識反応については、その存在が、イソカイメン類以外の尋常カイメン類や、石灰カイメン類の数種に於いて報告はあったが、その反応についての詳しい観察や、遺伝的な解析は全くなされていなかった。また、幼若固体に於ける自己・非自己認識能についても全く報告が無かった。本研究では、遺伝的な解析が目指すところまで到達できなかったが、日本の磯で普通に見かけるイソカイメン類に自己・非自己認識能があり、その機能は変態直後の幼若個体にも認められることを明らかにした。また、自己・非自己認識には2個体の中膠細胞が直接接することが必要であることも明らかとなり、細胞に因る異個体認識は脊椎動物の移植免疫と通じるところが認められる。

(7) イソカイメン類は、でこぼこの磯の岩の上を生息域にしているため、成長過程で自己の成長端同士が接触したり、となりにいる同種異個体の成長端と接触したり、或いは異種の個体(ダイダイイソカイメン等)と接触することが、比較的普通に起こりうると思われる。従って、自己と接触した場合は速やかに癒合して成長方向を別の方へ向ける必要があり、異個体に対してはニッチの競合がありその結果拒絶する必要がある。それ故、このような自己・非自己認識能を保持しているという説がある。一方、カイメン類には血管系が存在しないので、少なくとも同種異個体間では拒絶せずキメラとなって共に成長しても問題無いのではないかと考えられる。私としては、後者の考えのように同種異個体と癒合しても病理的な害があるとは思えないので、異個体の組織を排除するのは別の理由が存在すると考えている。つまり、生物には、Individuality(個性)の維持という基本的な性質があり、体内の遺伝的に異質なものを排除しようとする機能を保持しているからと考えている。そして、全ての生物にこの機能は残っていて、ある種では基本的な機能だけを保持し、脊椎動物等では病原体からの生体防御などに応用して発達させたのではないかと考えている。

#### 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)

Saito, Y. (2013)

Self and nonself recognition in a marine sponge, *Halichondria japonica*

(Demospongiae)

Zool. Sci., 30: 651-657. (査読有り)

[学会発表](計 1件)

齊藤康典 (2012/09/13)

クロイソカイメンの自己・非自己認識

日本動物学会・第83回大会

大阪大学豊中キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~hassei/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

齊藤 康典 (SAITO, Yasunori)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00196015