

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670233

研究課題名(和文) 無顎類における腸内細菌叢と獲得免疫系

研究課題名(英文) Adaptive immune system and intestinal flora in jawless vertebrates

研究代表者

名川 文清 (Nagawa, Fumikiyo)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10241233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢が免疫系の構築や機能に重要な役割を果たすことが近年明らかになってきたが、その進化的起源については現在のところ不明である。獲得免疫系を有する最も下等な生物はヤツメウナギなどの無顎類であり、無顎類における腸内細菌叢と獲得免疫系の関連を解明することは重要であると考えられる。無顎類はイムノグロブリン型の抗原受容体ではなくLRRからなるVLR(VLRA、VLRB、VLRC)を抗原受容体として利用している。本研究では、ヤツメウナギを孵化後無菌で1カ月飼育し、無菌状態がVLR遺伝子へ及ぼす影響を検討することを目指した。しかし、孵化後1か月ではVLR+リンパ細胞が検出できず、結論は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Intestinal bacterial flora plays an important role in the adaptive immune system. The jawless vertebrates (lampreys and hagfish), the most phylogenetically distant vertebrates from mammals, possess an alternative form of adaptive immune system that is mediated by antigen receptors called VLRs (VLRA, VLRB and VLRC). To understand the relationship between intestinal flora and the adaptive immune system in jawless vertebrates, we tried to analyze VLR gene diversities in lamprey grown aseptically up to the stage 30, however, no mature VLR gene could be detected.

研究分野：分子生物学

キーワード：無顎類 獲得免疫系 腸内細菌叢 抗原受容体 VLR

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内細菌叢が免疫系の構築や機能に重要な役割を果たすことが近年明らかになってきている。例えば、感染防御や自己免疫疾患に関連する T 細胞である Th17 の分化誘導に、セグメント細菌 (SFB) が関与していること、また、制御性 T 細胞の誘導にクロストリジウム属の細菌が関与していることなどが明らかになってきている。腸内細菌叢と免疫系がどのような分子機構により相互作用しているのかは現在極めて興味深い問題となっている。

獲得免疫系を有する最も下等な生物は、脊椎動物のうち最も下等なヤツメウナギやヌタウナギなどの無顎類である。無顎類は、イムノグロブリン型の抗原受容体ではなく leucine rich repeat (LRR) からなる variable lymphocyte receptor (VLR) を抗原受容体として利用しており、V(D)J 組換えとは異なる遺伝子再編成により多様な抗原受容体 ($\sim 10^{14}$ 種類) を創り出している。現在のところ、無顎類には 3 種類の VLR (VLRA、VLRB、VLRC) があり、VLRA/VLRC を発現する細胞は哺乳類などの $\alpha\beta T/\gamma\delta T$ 細胞に、VLRB を発現する細胞は B 細胞に相当すると考えられている。研究代表者らは、VLR 遺伝子の再編成のしくみについて解析すると共に、無顎類におけるリンパ細胞の分化についても解析してきた。

抗原受容体 VLR 遺伝子の多様化機構として “copy choice” モデルを提唱した研究代表者らの論文は、国内外で広く受け入れられ、重要な論文として紹介されている (Litman GW et al.: *Curr. Opin. Immunol.* **19**:526-534, 2007; Amemiya CT et al.: *Curr. Opin. Immunol.* **19**:535-541, 2007; Boehm T et al.: *Ann. Rev. Immunol.* **30**:203-220, 2012)。また、VLR 遺伝子再編成のフィードバック制御を明らかにした研究代表者らの論文も重要な論文として紹介されている (Hsu: *Curr Opin Immunol.* **23**: 156, 2011)。

2. 研究の目的

本研究課題では、脊椎動物のうち最も下等な

無顎類において、腸内細菌と獲得免疫系との関係を、免疫系の起源と進化の観点から解明することを目指した。

ヒトの腸内には約 100 兆個の細菌が常在菌として生息している。この常在菌叢はヒトの健康と密接に関連していることが、近年次々に明らかになってきている。腸内細菌叢の乱れが、潰瘍性大腸炎などの消化器系疾患や自己免疫疾患、また糖尿病などにも関与していることが示されている。また、無菌マウスの解析から、腸内細菌叢が免疫系の構築や機能に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。腸内細菌叢と免疫系がどのような分子機構により相互作用しているのかは、現在、極めて興味深い問題となっている。

ヒトの腸内細菌叢が免疫系の構築や機能に重要な役割を果たすことが近年明らかになってきたが、その進化的起源については現在のところ不明である。ヤツメウナギやヌタウナギなどの無顎類は獲得免疫系を有する最も下等な生物であり、イムノグロブリン型の抗原受容体ではなく LRR からなる VLR を抗原受容体として用いる原始的な獲得免疫系を有している。本研究課題では、無菌の個体を作成・解析し、腸内細菌叢と獲得免疫系との関係を明らかにすることを目的とした。

本研究の結果、ヤツメウナギおよびヌタウナギの腸内細菌叢がリンパ細胞の分化や機能に及ぼす影響が明らかになり、腸内細菌と獲得免疫系との関係が、免疫系の起源と進化の観点から解明されることを期待した。

3. 研究の方法

腸内細菌叢の研究は、細菌叢に含まれる細菌のゲノム全体を解読するメタゲノム解析が可能になったことで大きく進展した。ヒトの常在細菌叢は主に 4 つの門 (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) に属している。常在菌層が進化の過程でどのように選択され、現在見られるようなヒトとの関係を確立してきたのかは興味深い問題である。本研究では、腸内細菌叢と個体との関係を進化の観点から理解するため、脊椎動物

で最も下等なヤツメウナギなどの無顎類における腸内細菌叢と獲得免疫系との関係を明らかにすることを目指した。

無顎類には3種類のVLR (VLRA、VLRB、VLRC)があるが、抗原受容体の構造は全く異なるものの、リンパ細胞の分化や機能に関しては、無顎類とほ乳類とでかなり似ていることが明らかになりつつある。造血器官は腸内に隆起した typhlosole と呼ばれる組織であり、獲得免疫系の起源において、腸との関係は密接であったと思われる。従って、腸内細菌叢と無顎類の獲得免疫系の関連を明らかにすることは重要であると考えられる。

本研究では無菌のヤツメウナギを作出し、免疫系の組織やリンパ細胞の分化・機能に及ぼす影響を解析することをめざした。ヤツメウナギに関しては、人工授精を行うことが可能であり、無菌の個体を作成することを試み、無菌の個体において、免疫系の組織やリンパ細胞の分化・機能がどのような影響を受けるかを解析することを目指した。

具体的には以下のように無菌のヤツメウナギを作出した。雌から取り出した卵に、雄から取り出した精子を *in vitro* で受精させた後、無菌的に培養し、孵化させ、孵化後も、無菌的にシャーレで飼育した。

VLR 遺伝子に関しては、PCR により解析した。成熟リンパ細胞では、遺伝子再編成が起こり、PCR により増幅される DNA の長さが変化するので、電気泳動により検出可能となる。成熟 VLR 遺伝子の割合が低い場合には、grmline 型の VLR 遺伝子断片を除去した後、PCR を再度行うことで、成熟 VLR 遺伝子を検出することが可能になる。

4. 研究成果

カワヤツメ生体の雌から取り出した卵に、雄から取り出した精子を *in vitro* で受精させた後、無菌的に培養し、孵化させた。孵化後、無菌的にシャーレの中で飼育した。

孵化後 (ステージ ~ 24)、シャーレに抗生物質のカクテルを添加し、飼育をつづけた。発生のステージが 24、26、28、30 の時点で、個体から DNA を抽出した。同時に、対照と

して、抗生物質のカクテルを添加せずに飼育をつづけた個体からも同様に DNA を抽出した。なお、ステージ 30 においては、幼生の形態がほぼできあがっており、造血器官も存在すると期待される。

これら各ステージの DNA を基質として、VLRA、VLRB、VLRC、各遺伝子を PCR により増幅した。用いた primer のセットはすべて germline VLR 遺伝子を効率よく増幅することができた。したがって、PCR による検出法には問題がないことが確認された。次に、再編成した成熟 VLR 遺伝子を検出するため、1 回目の PCR 産物から grmlineVLR 遺伝子断片を除去した後、2 回目の PCR を行った。しかし、無菌で飼育したかどうかにかかわらず、再編成した成熟 VLR 遺伝子を検出することはできなかった。

ステージ 30 の時点において再編成した成熟 VLR 遺伝子を検出されなかったことは、このステージにおいては、予想に反して、成熟リンパ球がまだほとんどできていないことを示唆している。人工受精後シャーレ中ではステージ 30 までしか飼育できないので、今回の方法では、無菌状態がリンパ細胞の分化に及ぼす役割について調べることはできない。

発生の初期ではなく、もう少し成長した幼生の段階で、解析することが今後の課題である。

< 引用文献 >

Kishishita N and Nagawa F. Evolution of adaptive immunity: Implication of a third lymphocyte lineage in lampreys. *BioEssays* **36**: 244-250 (2014)

Nagawa F., et al. Antigen receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nature Immunology* **8**: 206-213 (2007).

Kishishita N, Matsuno T, Takahashi Y, Takaba H, Nishizumi H, Nagawa F. Regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. *EMBO Rep.* **11**:126-132 (2010)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本分子生物学会第38回年会 2015年12月1日~4日神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in jawless vertebrates. 日本免疫学会第44回年会・学術総会 2015年11月18日~20日札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本免疫学会第43回年会・学術総会 2014年12月10日~12日国立京都国際会館(京都府・京都市)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 日本分子生物学会第37回年会 2014年11月25日~27日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Nagawa F. Antigen receptor gene assembly in hagfish. 11th International Congress of Biology of Fish. 2014年8月3日~7日 Edinburgh(the United Kingdom)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

名川 文清(NAGAWA, Fumikiyo)

東京大学・大学院理学系研究科・講師

研究者番号: 10241233

(2)研究分担者

高橋 宜聖(TAKAHASHI, Yoshimasa)

国立感染症研究所・免疫部・室長

研究者番号: 60311403

大島 健志朗(Oshima, Kenshiro)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 40537411