

ウニ幼生における貪食作用に関わる細胞の同定

Characterization of immunity-related cells in the sea urchin larva.

プロジェクト代表者：日比野 拓 (埼玉大学教育学部・准教授)

Taku Hibino (Associate Professor, Faculty of Education, Saitama University)

1 研究の概要

棘皮動物ムラサキウニの全ゲノムが解読され、ヒトゲノム中に10種類ある *Toll-like receptor* (TLR) 遺伝子が、ウニのゲノム内には222種類と膨大な数のTLR遺伝子の存在が明らかになった。このTLR遺伝子以外にも、病原菌の構成成分を認識する自然免疫受容体の遺伝子数が、脊椎動物よりも約10倍も多く存在していることが明らかになり、ウニは脊椎動物とは異なる自然免疫のメカニズムを持っていることが示唆されている (Hibino et al. 2006)。ウニを含む棘皮動物は、後口動物の系統において根元に位置づけられている。そのため、後口動物の祖先からヒトへとつながる進化の中で、どのように複雑な免疫システムが獲得されたのかを理解する上で、ウニの免疫系の解明が鍵を握っていると言える。ゆえに、引き続きウニゲノムの解析を行うことも必要であるが、それに加えてウニの免疫応答の詳細な観察と記載を行い、免疫研究の土台を築くことが必要である。

本研究では、ウニのプルテウス幼生へ病原体や蛍光ビーズを人工的に感染させ、貪食細胞や相互作用する細胞を同定することを試みた。またウニ幼生において、どの細胞が免疫に関与するかを分子生物学的側面から調べるため、ウニ特有の免疫関連遺伝子 *185/333* や脊椎動物で免疫系のみで機能する転写因子 *PU.1* をクローニングしこれをプローブとして、Whole mount *in situ* hybridization を行い、空間的な発現パターンを調べた。

2 結果と考察

ウニのプルテウス幼生に、GFPでラベルした大腸菌をマイクロインジェクション法によって幼生体内へ注入し、蛍光顕微鏡で大腸菌を追跡し貪食作用を調べた。インジェクション後30分～1時間後に、体腔内で仮足を伸ばしている体腔細胞(Blastocoelar cell)が、細菌を貪食することを観察した(図1)。このとき貪食された細菌のGFPの蛍光強度が著しく減少していることを発見したことから、貪食された直後に細菌は殺菌され、細菌の原形質が外へと流出したことが示唆された。

図1

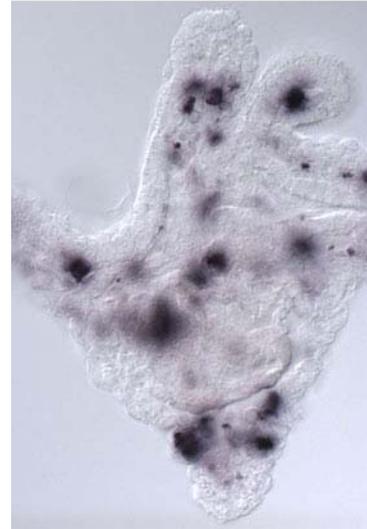


しかし、いつからウニの胚や幼生の体腔内で、貪食と殺菌が開始されるか未だに確証が得られていないため、効率的なマイクロインジェクション法を改良し、細かく発生ステージを区切って実験を行い観察できるように、現在試行錯誤しているところである。

一般的なウニは、間接発生様式をもち、1ヶ月から2ヶ月間をプルテウス幼生として浮遊生活し、その後変態し着底生活へと移る。一方、ヨツアナカシパンは、直接発生様式をもち、3日で変態し成体となる。このような直接発生様式にも貪食細胞が存在するのか、あるいは発生様式の違いが貪食細胞の分化や貪食効率はどうのような違いをもたらすのかという疑問を明らかにするために、現在ヨツアナカシパンを用いたインジェクション実験も行っている。

ウニ特有の免疫関連遺伝子 *185/333* は、ウニ成体の体腔内の貪食細胞でのみ発現し、免疫刺激により発現上昇が報告されている。転写因子 *PU.1* は、脊椎動物では免疫系のみで機能するもの、ウニでの発現や機能はまったくわかっていない。この二つの遺伝子に着目し、cDNA をクローニングしこれをプローブとして、Whole mount *in situ* hybridization 法で発現部位を調べた。*185/333* は、原腸後期に原腸先端から生じる二次間充織細胞の1つか2つの細胞で発現がはじまり、その後ウニプルテウス幼生の体全体に散らばる体腔細胞に発現が見られた(図2)。発現は体腔細胞だけでなく、細胞から伸びる仮足や仮足につながった小胞でも発現が見られた。このことから、体腔細胞のネットワークが *185/333* を輸送していることが示唆された。同じバッチのプルテウス幼生 50 個体の発現パターンを調べたが、約半分の幼生で発現がまったく見られず、残り半分の幼生では、図2のように体全体に広がるという、all-or-nothing の発現パターンが見られた。*PU.1* に関しては発現が弱いため発現パターンはいまだ明らかになってはいないが、腸の周りのいくつかの細胞で発現しているようである。

図2



ウニ幼生の間充織細胞は、骨片形成細胞、体腔細胞、色素細胞に分けられるが、今回の結果では、体腔細胞でしか免疫関与が見られなかった。一方、ヒトデ幼生の間充織細胞は1種類のみで、すべて貪食作用を行うようである。ウニの間充織細胞を細胞レベルであるいは分子レベルでより詳しく免疫関与を調べることで、ウニとヒトデの免疫細胞の違いだけでなく、ウニの膨大な数の自然免疫における病原体認識受容体がどのように機能しているのか、あるいはウニからヒトへの免疫システムの進化はどのようにおこったのかを解明していきたい。

3 発表状況

ウニの左右非対称性からみる後口動物の体軸の進化. 日比野 拓. 細胞工学. Vol.27, No. 6, 548-52. (2008)

ウニ幼生に感染する細菌の特定と免疫関連遺伝子の発現解析. 日比野 拓, Jonathan Rast. 第20回日本比較免疫学会(2008年8月27日)東京医科歯科大学

ウニゲノムからみる免疫機構の進化. 日比野 拓. 第324回Zoological Conference. (2008年10月8日)東京大学

4 外部資金

若手研究(スタートアップ) 平成20年度～平成21年度

棘皮動物ゲノムにおけるToll-like receptor多重遺伝子族の分子進化

5 参考文献

The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, Buckley KM, Brockton V, Nair SV, Berney K, Fugmann SD, Anderson MK, Pancer Z, Cameron RA, Smith LC, Rast JP. *Dev. Biol.* Vol.300, 349-65. (2006).