

ウニ発生過程における免疫応答バイオマーカーの探索

A survey of immune-relevant biomarkers during sea urchin development.

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)

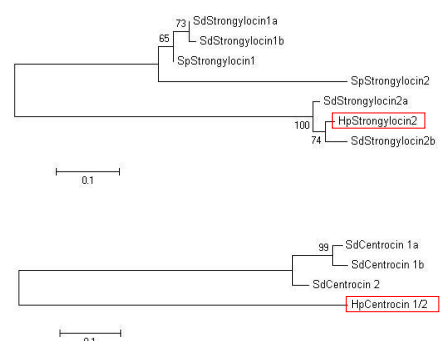
1 研究の概要

食作用とは、細胞が異物を排除するために内部へ取り込むことであり、ほとんどの動物で見られる自然免疫の最も原始的な姿と考えられている。この機構は棘皮動物（ウニ・ヒトデ）の幼生を用いた研究から初めて発見された。近年ウニのゲノムが解読され、ウニは非常に多くの病原体認識受容体を保有していることが明らかになった。これらの受容体が何を認識し、どのような応答を行うのかは、非常に興味深い。しかし、ウニの免疫系の研究はこれまでほとんど行われず、分子レベルで免疫系を解明しようにも、棘皮動物の免疫応答の指標となるバイオマーカーが存在しない状況である。

一般的に貪食した細胞内では、異物を殺菌するために、活性酸素・抗菌ペプチド・消化酵素・窒素酸化物などが産出される。ウニの幼生は透明であり、*in vivo* で食作用を観察できる利点はあるものの、これらの分子を可視化することにより、食作用とその後起こる殺菌を効果的に観察できれば、異物特異的な応答を識別することができる。本研究ではウニ発生過程において、（1）殺菌物質産出を促す酵素活性（NADPH オキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ）に人工的な基質を加え、色素沈着や蛍光の局在変化（2）抗菌ペプチドをコードする遺伝子を同定し、*in situ hybridization* による遺伝子発現パターンの変化を調べる。これらから、免疫応答バイオマーカーを同定し、ウニ発生過程における免疫機構解明の基盤を作ることを目的とする。

2 結果と考察

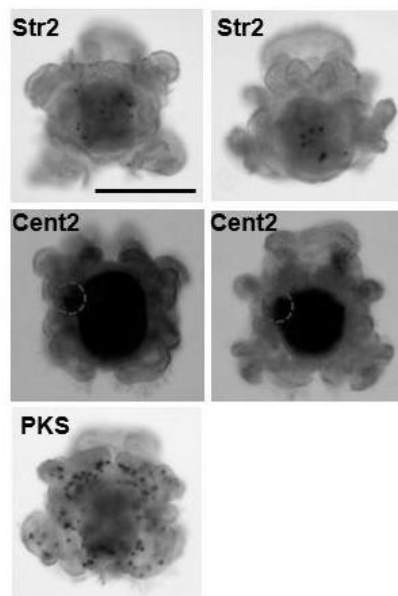
今回、（2）の抗菌ペプチドをコードする遺伝子の同定と遺伝子発現パターンについて報告する。抗菌ペプチドは広範囲な抗菌作用を有する数十個程度のアミノ酸からなる短いペプチドで、さまざまな動物から発見されている。ウニにおいては、*S. droebachiensis* からこれまでに Strongylocin1, 2 と Centrocin1, 2 の計 4 種の抗菌ペプチドをコードする遺伝子が発見されているが、これらのアミノ酸配列と相同な遺伝子ファミリーは、他の動物では発見されていない。またこれらの 4 種の遺伝子の発現は、成体の体腔細胞にみられることが報告されているが、発生過程における発現パターンの報告はない。そこで、バフンウニの体腔細胞 cDNA から Strongylocin 相同遺伝子、Centrocin 相同遺伝子のクローニングを行った。クローニングした遺伝子断片は、Strongylocin2 と相同な遺伝子と Centrocin1/2 と相同な遺伝子であることがわかり、それぞれ HpStrongylocin2, HpCentrocin1/2 と



命名した。(右図)

HpStrongylocin2, HpCentrocicin1/2 の時間的空間的発現を調べるために、EST とマイクロアレイのデータベース上を検索した。しかし初期発生においては、これらの遺伝子発現は確認できなかった。

そこで、クローニングした遺伝子断片を元に、DIG ラベルした RNA アンチセンスプローブをそれぞれ作成し、Whole mount in situ hybridization を行った。データベースの結果同様、HpStrongylocin2, HpCentrocicin1/2 とともに原腸胚と初期 4 腕プルテウス幼生期では、発現は確認できなかった。HpStrongylocin2 は、6 腕プルテウス幼生期に発現が開始し、そのパターンは胃や腸の周縁部にランダムで現れた。PKS は色素細胞特異的に発現する遺伝子であるが、この発現パターンとは異なることから、HpStrongylocin2 は、胞胚腔細胞で発現していることが示唆される。HpCentrocicin1/2 も、6 腕プルテウス幼生に発現が見られ、そのパターンは胃や腸で強く発現していた。また体腔、石管、水管系付近での発現も確認された。このように、2 つの遺伝子は異なる発現パターンを示すことが分かった。異なるパターンを示すことは、異なる遺伝子制御が存在することが示唆される。次に、6 腕プルテウス幼生に LPS を感染させた。感染から 6 時間後に 2 つの遺伝子発現がともに上昇することが RT-PCR により明らかになった。



今回、HpStrongylocin2, HpCentrocicin1/2 とともに、後期プルテウス幼生において免疫応答のバイオマーカーとなりうることが明らかになった。ウニの原腸胚において、原腸先端から放出される二次間充織細胞がすぐに異物を貪食する能力を持つことが明らかになっている。このことは、原腸胚期と後期プルテウス幼生期では異なる殺菌作用があることを示唆している。今後、特に初期発生における免疫応答のバイオマーカーの探索を続け、発生が進むにつれてどのように免疫機構が成熟するのかを解明したいと考えている。多くの免疫応答バイオマーカーの同定がウニの免疫機構の解明を導いてくれるであろう。

なお、本研究は、平成 23 年に提出された橋本拓磨の卒業論文の一部を再構成したものである。

3 発表状況

貪食細胞の一部はウニプルテウス幼生の骨に沿って移動する. 日比野 拓, 中大輔.

第22回日本比較免疫学会学術集会(2010年8月2日)

4 外部資金

若手研究(B) 平成 22 度～平成 23 度

自然免疫における祖先型TIRドメインをもつシグナル分子の機能と分子進化の解析