

**PROCEEDINGS**  
**22nd JAPANESE ASSOCIATION FOR**  
**DEVELOPMENTAL & COMPARATIVE IMMUNOLOGY**

Fukuoka Japan

August 2 to 4, 2010

---

**日本比較免疫学会**  
**第22回 学術集会講演要旨**

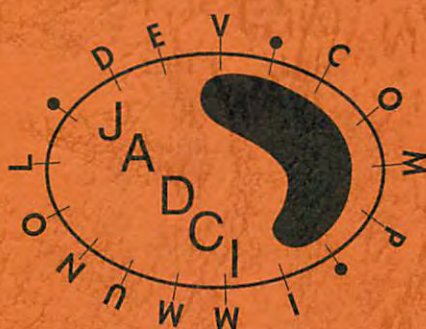
---

会期：2010年8月2日（月）～4日（水）

会場：九州大学西新プラザ大会議室

学術集会会長：川畑 俊一郎（九州大学大学院理学研究院）

学術集会事務局長：中尾 実樹（九州大学大学院農学研究院）



日本比較免疫学会

— 2010 —

## Contents

	ページ
目次	1
(Contents)	
日本比較免疫学会学術集会日程	2
(Meeting Schedule of JADCI)	
参加者へのご案内	3
(Information for Participants)	
役員名簿	5
(Officers of JADCI)	
講演プログラム (和文)	6
(Programme in Japanese)	
講演要旨 (Abstract)	
・一般講演 Session A	11
Session B	15
Session C	19
Session D	32
・古田賞受賞者講演	37
・特別講演	39
・シンポジウム	41
学会会則	47
(Constitution & Bylaws of JADCI)	
英文役員名簿・会則等	49
(Officers, Constitution & Bylaws of JADCI)	
協賛企業・団体	52
(Contributors)	

# 日本比較免疫学会 第22回 学術集会

(2010年度)

会期：2010年8月2日(月)～4日(水)  
 場所：九州大学西新プラザ  
 学術集会会長：川畑俊一郎(九州大学大学院理学研究院)

## 学術集会日程表

	時間	プログラム 内容
第1日目 (2日)	12:00～	受付
	13:10～	開会の辞
	13:15～	一般講演 (15 演題)
第2日目 (3日)	9:15～	一般講演 (10 演題)
	13:30～	総会・学会賞表彰式
	14:45～	古田賞受賞講演「魚類(トラフグ)の生体防御機構に関する研究 —トラフグゲノム解説の魚類免疫学へのインパクト— 末武 弘章(福井県立大学海洋生物資源学部) 鈴木 譲(東京大学大学院農学生命科学水産実験場)
	15:30～	特別講演 「マダニの原虫媒介に血液消化酵素が果たす役割」 藤崎幸蔵(鹿児島大学農学部先端獣医科学講座)
	16:45～	記念写真撮影
	18:30～	懇親会
第3日目 (4日)	9:00～	シンポジウム 「免疫の応答と制御の比較生物学」 1) 内因性リガンドに対する病原体センサー応答の制御機構 三宅健介(東京大学医科学研究所感染遺伝学分野) 2) マウス免疫応答におけるヘルパーT細胞の役割と分化制御。 吉村昭彦(慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室) 3) ショウジョウバエの免疫応答と制御 倉田祥一郎(東北大学大学院薬学研究科) 4) 病原体媒介蚊の免疫学 嘉藤洋陸(帯広畜産大学原虫病研究センター) 5) 昆虫サイトカインによる細胞性自然免疫活性調節機構 早川洋一(佐賀大学農学部応用生物科学科) 6) キチン受容体の認識を介した植物免疫応答 賀来華江・渋谷直人(明治大学農学部生命科学科)
		総合討論
	12:30～	閉会の辞

## 参加者へのご案内

学術集会会場：九州大学西新プラザ（福岡市早良区西新 2-16-23）

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 九州大学大学院農学研究院  
水族生化学研究室 中尾実樹 TEL:092-642-2894, FAX:092-642-2897  
E-mail:[mikimnakao@kyudai.jp](mailto:mikimnakao@kyudai.jp)

受付：会場にて、8月2日（月）昼の12時00分より開始致します。ネームプレートを用意致しますので着用して下さい。なお、ネームプレートは学術集会終了後に必ずご返却願います。  
学会への入会手続き、年会費の納入受付も併せて行います。

参加費：学会参加費：5,000円（会員、非会員）、3,000円（学生）  
懇親会参加費：4,000円

【懇親会場のIPホテル福岡（福岡市博多区中洲5-2-18）は地下鉄「中洲川端」駅から徒歩1分です。（<http://www.iphotel.co.jp/>）皆様、奮ってご参加ください。】

発表要領：PC用液晶プロジェクターにより投影して行います（Power Point 2003/WindowsXP）。OHP、スライドは使用できません。USBメモリー対応のパソコンを用意しますので、Power Point ファイルを事前に当方のパソコンにコピーするか、ご持参のメディアを接続して投影していただくこととなります。試写用のパソコンを会場受付にご用意いたしますので、動作の確認は事前に行ってください。ご自分のパソコンの接続をご希望の場合は前もってその旨ご連絡ください。

宿泊案内：会場付近（福岡市早良区西新地区）にはホテルはありませんが、福岡市営地下鉄沿線（天神、中洲川端、博多駅周辺）には多数のホテルがございます。懇親会場であるIPホテル福岡が、本学術集会関係者向けに特別割引料金の宿泊プランを用意しております。詳しくは、IPホテルの担当：伊藤さんへお問い合わせ下さい。（092-262-2009）

### 会場へのアクセス

交通のご案内：（九州大学西新プラザ 公式ページ）

<http://www.kyushu-u.ac.jp/university/institution-use/nishijin/infomap.htm>

西新プラザへは、福岡市営地下鉄空港線（最寄り駅は「西新」）が便利です。

1) 福岡市営地下鉄の主要駅から西新駅までの所要時間と料金

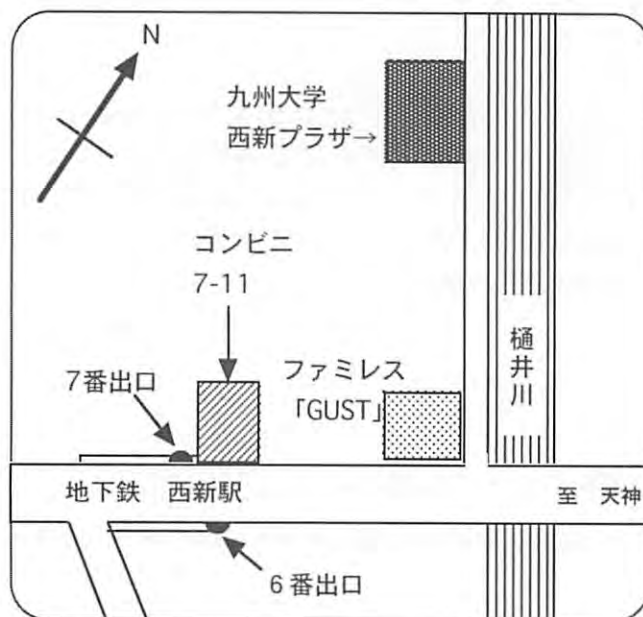
福岡空港から 20分 (290円)      JR博多駅から 15分 (250円)

中洲川端から 10分 (250円)      天神から 7分 (250円)

\* 福岡市営地下鉄ホームページ <http://subway.city.fukuoka.jp/index.html>



2) 西新駅から九州大学西新プラザへのアクセス



地下鉄西新駅7番出口を出て樋井川方面へ。新今川橋の手前、ファミレス「Gust」の角を左折し、樋井川沿いに下る。(約10分)

日本比較免疫学会・役員名簿  
(2010年度)

会 長	吉田 彪	臨床パストラルケア 教育研修センター
副 会 長	川畑 俊一郎	九州大学
庶 務・会 計 【補助役員】	中尾 実樹	九州大学
	柚本 智軌	九州大学
学術集会担当	中村 弘明	東京歯科大学
	橋本 香保子	千葉工業大学
会 計 監 査	和合 治久	埼玉医科大学
	中西 照幸	日本大学
広報担当	飯島 亮介	帝京大学
	広瀬 裕一	琉球大学

学会事務局：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1  
九州大学大学院農学研究院  
水族生化学研究室内  
TEL:092-642-2894  
FAX:092-642-2897  
E-mail: jadci2office@gmail.com

# 第22回学術集会プログラム

第1日目 8月2日(月)

## 【一般演題】

開会挨拶 13:10~13:15

### Session A 環形動物・棘皮動物・軟体動物の生体防御

座長：矢野 環(東北大)・後藤 彰(東北大)

- A 1 13:15~ 自由電子レーザー照射による生命化学反応の探索  
○宍倉 文夫<sup>1</sup>, 早川 建<sup>2</sup>, 中尾 圭佐<sup>2</sup>, 野上 杏子<sup>2</sup>, 稲垣 学<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>日本大学・医学部・化学教室, <sup>2</sup>日本大学・量子科学研究所・LEBRA)
- A 2 13:30~ イトマキヒトデ幼生の恒常性維持システムにおけるマクロファージ遊走  
阻止因子の役割  
○玉木 香菜<sup>1</sup>, 古川 亮平<sup>2</sup>, 松本 緑<sup>1</sup>, 金子 洋之<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>慶応義塾大学大学院・基礎理工学専攻, <sup>2</sup>慶応義塾大学・自然科学研究教育センター)
- A 3 13:45~ 食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(埼玉大学・教育学部)
- A 4 14:00~ 鰓に細菌を共生させるシンカイヒバリガイ類の血液細胞の比較形態学的  
研究  
○多米 晃裕<sup>1</sup>, 吉田 尊雄<sup>2</sup>, 大石 和恵<sup>2</sup>, 植松 勝之<sup>1</sup>, 小山 純弘<sup>2</sup>, 丸山 正<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>(株)マリン・ワーク・ジャパン, <sup>2</sup>海洋研究開発機構)

### Session B 節足動物の生体防御

座長：宍倉 文夫(日大)・佐々木 年則(国立感染研)

- B 1 14:15~ *Drosophila*トランスグルタミナーゼの基質群の機能解明  
○柴田 俊生<sup>1</sup>, 宮地 隆太<sup>1</sup>, 木場 健吾<sup>1</sup>, 有木 茂<sup>1</sup>, 新澤 直明<sup>2</sup>, 嘉糠 洋陸<sup>2</sup>,  
小柴 琢己<sup>1</sup>, 川畑 俊一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大・院・システム生命, <sup>2</sup>帯広畜産大・原虫病研究センター・原虫進化生物学研究分野)
- B 2 14:30~ カプトガニ体液凝固因子 Factor G の $\beta$ -1, 3-D-グルカン認識モジュールと  
土壌細菌 *Cellvibrio mixtus* の糖鎖認識モジュールとの構造類似性  
○植田 祐生<sup>1</sup>, 大和田 修平<sup>1</sup>, 阿部 義人<sup>2</sup>, 柴田 俊生<sup>1</sup>, 飯島 学<sup>1</sup>, 吉光 由希子<sup>1</sup>  
小柴 琢己<sup>1,4</sup>, 中田 宗宏<sup>3</sup>, 植田 正<sup>2</sup>, 川畑 俊一郎<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・システム生命, <sup>2</sup>九大院・薬, <sup>3</sup>東海大・応用生化学, <sup>4</sup>九大院・理)
- B 3 14:45~ ショウジョウバエPGRP-LEの細胞内リステリア菌認識によるオートファジー  
誘導機構解析  
○矢野 環, 若林 康介, 倉田 祥一郎(東北大・院・薬)

- B 4 15:00～ **Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by PGRP-LE and JAK-STAT pathway**  
○Akira Goto<sup>1</sup>, Tamaki Yano<sup>2</sup>, Jun Terashima<sup>2</sup>, Shinzo Iwasita<sup>2</sup>, Yoshiteru Oshima<sup>2</sup>, Shoichiro Kurata<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

休憩 15:15～15:45

## Session C 魚類の生体防御(1)

座長：柚本 智軌（九大）・近藤 昌和（水産大学校）

- C 1 15:45～ **ヒラメ IPS-1 遺伝子のクローニングおよび抗ウイルス活性**  
○引間 順一<sup>1</sup>, 大谷 真紀<sup>1</sup>, Rhoda M Cerbo<sup>1</sup>, 近藤 秀裕<sup>2</sup>, 廣野 育生<sup>2</sup>, Tae-Sung Jung<sup>1</sup>, 青木 宙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>国立慶尚大学校・Aquatic Biotechnology Center, <sup>2</sup>東京海洋大学・ゲノム科学講座)
- C 2 16:00～ **ヒラメにおけるLGP2を介したI型IFN経路の活性化**  
○大谷 真紀<sup>1</sup>, 引間 順一<sup>1</sup>, 近藤 秀裕<sup>2</sup>, 廣野 育生<sup>2</sup>, Tae-Sung Jung<sup>1</sup>, 青木 宙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>国立慶尚大学校・Aquatic Biotechnology Center, <sup>2</sup>東京海洋大学・ゲノム科学講座)
- C 3 16:15～ **Molecular characterization and expression analysis of nuclear oligomerization domain protein, NOD1 in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus***  
○Seong bin Park<sup>1</sup>, Jun-ichi Hikima<sup>1</sup>, Maki Otani<sup>1</sup>, Seong won Noh<sup>1</sup>, Ho bin Jang<sup>1</sup>, In seok Cha<sup>1</sup>, Hidehiro Kondo<sup>2</sup>, Ikuo Hirono<sup>2</sup>, Tae sung Jung<sup>1</sup> and Takahashi Aoki<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup> College of Veterinary medicine, Gyeongsang National University, South Korea, <sup>2</sup>Lab. of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology)
- C 4 16:30～ **ヒラメ Toll-like receptor 3, 7, 8 遺伝子のクローニングならびに発現解析**  
○黄 晟敦, 近藤 秀裕, 廣野 育生, 青木 宙（東京海洋大・ゲノム科学）

座長：末武 弘章（福井県立大）・大谷 真紀（国立慶尚大学校）

- C 5 16:45～ **Characterization of zymosan-binding proteins in the Nile tilapia serum**  
○Soha Gomaa Ramadan Abdel-salam Okba, Tomonori Somamoto, Miki Nakao  
(Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University)
- C 6 17:00～ **魚類における膜型補体制御因子の同定**  
○辻倉 正和, 柚本 智軌, 鶴木 陽子, 中尾 実樹  
(九州大学大学院・農学研究院)
- C 7 17:15～ **円口類ヌタウナギにおける補体系活性化因子の同定**  
○山口 智和<sup>1</sup>, 高宗 和史<sup>1</sup>, 近藤 昌和<sup>2</sup>, 高橋 幸則<sup>2</sup>, 鶴木(加藤)陽子<sup>3</sup>, 中尾 実樹<sup>4</sup>, 藤井 保<sup>5</sup> (<sup>1</sup>熊本大・院・自然科学, <sup>2</sup>水産大学校・生物生産, <sup>3</sup>九大・院・農・研究教育支援センター, <sup>4</sup>九大・院・農・生命機能科学, <sup>5</sup>県立広島大・人間文化)



## 第2日目 8月3日(火)

### Session C 魚類の生体防御(2)

座長：丸山 正 (海洋研究開発機構)・中村弘明 (東歯大)・引間 順一 (国立慶尚大学校)

- C 8 9:15～ ウイルス感染で誘導されたギンブナ細胞傷害 T 細胞と単球の細胞傷害活性  
○ 柚本 智軌<sup>1</sup>, 中西 照幸<sup>2</sup>, 中尾 実樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九州大学大学院・農学研究院, <sup>2</sup>日本大学・生物資源科学部)
- C 9 9:30～ スポットドガーの顆粒球  
○ 近藤 昌和, 安本 信哉, 高橋 幸則 (水産大学校・生物生産学科)
- C10 9:45～ 皮膚に発現する二つのトラフグケモカイン  
○ 田内 博久<sup>1</sup>, 末武 弘章<sup>2</sup>, 菊池 潔<sup>1</sup>, 鈴木 譲<sup>1</sup>, 宮台 俊明<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学・水産実験所, <sup>2</sup>福井県立大学・海洋生物資源学部)
- C11 10:00～ コイ末梢血白血球の培養における B リンパ球の増殖  
○ 仁井田 祥光, 片倉 文彦, 山口 卓哉, 森友 忠昭, 中西 照幸  
(日本大学・生物資源科学部・獣医学科・魚病学研究室)
- C12 10:15～ ギンブナにおける CD4, CD8 陽性 T 細胞サブセットの組織分布  
○ 小川 詩乃, 戸田 秀明, 柴崎 康宏, 森友 忠昭, 中西 照幸  
(日本大学・生物資源科学部・獣医学科・魚病学研究室)
- C13 10:30～ トラフグの TNF 受容体スーパーファミリー遺伝子の cDNA クローニング  
○ 末武 弘章<sup>1</sup>, 菊池 潔<sup>2</sup>, 鈴木 譲<sup>2</sup>, 宮台 俊明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井県立大学・海洋生物資源, <sup>2</sup>東京大学・附属水産実験所)

### Session D 哺乳類の生体防御

座長：橋本 香保子 (千葉工大)・中尾 実樹 (九大)

- D1 10:45～ 北西太平洋に棲息するミンククジラの精巣組織におけるブルセラ菌感染と炎症に関する研究  
○ 阿部 瑛理香<sup>1,2</sup>, 大石 和恵<sup>1</sup>, 斎藤 雅史<sup>1,2</sup>, 坂東 武治<sup>3</sup>, 藤瀬 良弘<sup>3</sup>, 丸山 正<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究プログラム、  
<sup>2</sup>東京海洋大学大学院・海洋科学研究科、<sup>3</sup>財団法人日本鯨類研究所)
- D2 11:00～ 脾臓摘出マウスへの窒素含有ビスホスホネート投与により誘導された肝臓内赤血球造血について  
○ 大塚 裕忠<sup>1</sup>, 中村 雅典<sup>1</sup> (<sup>1</sup>昭和大学・口腔解剖学教室)
- D 3 11:15～ 乳酸はウマ多形核白血球の活性酸素産生を調節する  
○ 越後谷 裕介<sup>1</sup>, 森田 祥平<sup>1</sup>, 伊藤 琢也<sup>1</sup>, 酒井 健夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日本大学動物医科学研究センター・獣医衛生学研究室)
- D 4 11:30～ クッパー細胞の活性制御における脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) の関与  
○ 澤田 知夫, 清平 美和, 宮崎 啓史, 徳田 信子, 安達 泰弘, 大和田 祐二  
(山口大・院・医学系研究科・器官解剖学)

昼食 11:45～

総会・表彰式 13:30～14:45

古田賞受賞講演（座長：吉田 彪）

FP：14:45～『魚類（トラフグ）の生体防御機構に関する研究  
—トラフグゲノム解読の魚類免疫学へのインパクト—』

末武 弘章（福井県立大・海洋生物資源）  
鈴木 譲（東大・院・農学生命科学・水産実験場）

休憩 15:15～15:30

特別講演（座長：川畑 俊一郎）

SL：15:30～『マダニの原虫媒介に血液消化酵素が果たす役割』  
藤崎幸蔵（鹿児島大・農・先端獣医科学）

16:45～ 写真撮影

18:30～ 懇親会（IPホテル福岡：福岡市博多区中洲 5-2-18）

第3日目 8月4日(水)

シンポジウム『免疫の応答と制御の比較生物学』 司会：川畑俊一郎  
倉田祥一郎

S1 9:00～ 内因性リガンドに対する病原体センサー応答の制御機構  
三宅健介(東大・医科研・感染遺伝学)

S2 9:30～ マウス免疫応答におけるヘルパーT細胞の役割と分化制御  
吉村昭彦(慶應大・医・微生物学免疫学)

S3 10:00～ ショウジョウバエの免疫応答と制御 倉田祥一郎(東北大・院・薬学)

休憩 10:30～10:45

S4 10:45～ 病原体媒介蚊の免疫ロジー 嘉糠洋陸(帯広畜産大・原虫病研究センター)

S5 11:15～ 昆虫サイトカインによる細胞性自然免疫活性調節機構  
早川洋一(佐賀大・農・応用生物学)

S6 11:45～ キチン受容体の認識を介した植物免疫応答  
賀来華江・渋谷直人(明治大・農・生命科学)

総合討論：12:15～(12:30終了予定)

閉会の辞：12:30

一般演題 : A1 ~ A3  
                  B1 ~ B3  
                  C1 ~ C13  
                  D1 ~ D4

## 自由電子レーザー照射による生命化学反応の探索

宋倉 文夫<sup>1</sup>, 早川 建<sup>2</sup>, 中尾 圭佐<sup>2</sup>, 野上 杏子<sup>2</sup>, 稲垣 学<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日本大学・医学部・化学教室, <sup>2</sup>日本大学・量子科学研究所・LEBRA

### Investigation on bio-chemical reactions by Free Electron Laser irradiation

Fumio Shishikura<sup>1</sup>, Ken Hayakawa<sup>2</sup>, Keisuke Nakao<sup>2</sup>, Kyoko Nogami<sup>2</sup>, and Manabu Inagaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemistry, Nihon University School of Medicine, <sup>2</sup>Laboratory for Electron Beam Research and Application (LEBRA), Institute of Quantum Science Nihon University

#### 【目的】

日本大学では、可視領域から近赤外線領域をカバー (350 nm~6 μm) する自由電子レーザー (Free Electron Laser: FEL) の発振に成功し、現在、生命・医科学分野への利用研究が進められている (1)。

光が作用する化学反応は生命科学のさまざまな分野で探査され、その成果は近未来の新しい科学と新規科学技術の創出に期待されている。光化学反応を解析するために、波長の揃った (コヒーレント性に優れた) レーザーは、優れた光プローブ (探り針) である (2)。一方、化学物質は近・中赤外線領域の光を構造依存的に吸収し、波数 (単位: cm<sup>-1</sup>) で表すことができる。化学物質のこの固有の特性は光照射による生命化学反応を捕捉する手段として極めて有力である。

私たちは、微小なクローン生物に近赤外線領域のレーザーを照射し、生物への光線の影響を探った。その結果、近赤外線領域の FEL 照射により、微小生物は致命的なダメージを受けた。この物理化学反応は、プラズマ誘起アブレーション (plasma induced ablation) と見做され、レーザーの波長・照射エネルギー量等を適切にコントロールすることにより、細胞レベル、組織レベル、器官レベル、個体レベルでの興味深い生命化学反応を探査できると期待される。

#### 【材料と方法】

**材料**: 微小なクローン環形動物: ミドリアブラミミズ (*Aerosoma bengalense*) とヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus japonensis*)。淡水性のミドリアブラミミズは培養液中で、土壌性のヤマトヒメミミズは寒天培地で飼育した。両種ともにクローン化した。

**FEL**: 日本大学量子科学研究所・電子線利用研究施設の波長可変(350 nm~6 μm)FELを使用。近赤外線領域の波長 (1 μm, 2 μm, 3 μm, 4 μm, 5 μm) を光線として使用。とくに 2.94 μm

(水の吸収帯の一つ) を多用した。

**照射エネルギー量**: 当施設の FEL は 10 mJ / 30 mm (直径: φ) のパルス (2 パルス・秒<sup>-1</sup>) 光である。CaF<sub>2</sub> レンズを使用して、(A) φ = 約 0.1 mm, (B) φ = 約 3 mm, (C) φ = 約 6 mm に集光した。

**照射方法と顕微観察**: 光路にあたるステージ上に材料を 1~2 個体、培養液中または 1% CMC(CarboxyMethyl Cellulose)を含む培養液中 (2 μL) に置き、集光した FEL を照射した。また、フィルターで光量を調節した。顕微下、照射時の試料の動態をビデオで記録した。なお、*Enchytraeus* は、培養液中で長期間飼育可能なため、照射実験中の水環境からの影響は少ない。

#### 【結果】

集光した近赤外線 (1 μm~5 μm) を微小な生物に照射すると plasma induced ablation が起こり、損傷が激しかった。しかし、両種ではその反応の強弱に違いが生じた。波長 2.94 μm について結果を纏め、報告する: (A) φ = 約 0.1 mm 照射では、両種共に plasma induced ablation が起こった。(B) φ = 約 3 mm 照射では両種に損傷の違いが生じた。*Enchytraeus* の皮膚は、*Aerosoma* のそれより脆弱と考えられた。(C) φ = 約 6 mm 照射では、両種共に plasma induced ablation が起こらなかった。

#### 【結論】

近赤外線領域の FEL 照射実験により、微小生物に plasma induced ablation が起きた。波長・エネルギー量をコントロールし、光生物化学反応を探査できると期待できる。

#### 【参考文献】

1. 宋倉文夫, 早川建 (2008) 自由電子レーザー: 生命・医科学研究への新しい応用. 日大医雑誌 67, 357-358.
2. Shishikura F, et al. (2009) Visible FEL irradiation experiments on carbonmonoxy hemoglobin. Proc. FEL 2009, 561-564.

# イトマキヒトデ幼生の恒常性維持システムにおける マクロファージ遊走阻止因子の役割

玉木 香菜<sup>1</sup>, 古川 亮平<sup>2</sup>, 松本 緑<sup>1</sup>, 金子 洋之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>慶応義塾大学大学院 基礎理工学専攻, <sup>2</sup>慶応義塾大学 自然科学研究教育センター

## Homeostatic roles of macrophage migration inhibitory factors in starfish larva

Kana Tamaki<sup>1</sup>, Ryohei Furukawa<sup>2</sup>, Midori Matsumoto<sup>1</sup>, Hiroyuki Kaneko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Fundamental Science and Technology, Keio University

<sup>2</sup>Research and Education Center for Natural Sciences, Keio University

### 【目的】

炎症性サイトカインであるマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration Inhibitory Factor; MIF) は、免疫性疾患やガンなど、様々なヒトの疾患に関与していると考えられている。MIF が関与する疾患の多様さは、MIF が個体の恒常性維持システムの根幹を担う分子である可能性を推測させる。本研究では、棘皮動物イトマキヒトデの幼生を材料に、系統進化的視点から、恒常性維持システムにおける MIF の生理機能の実態を個体レベルで解明することを目的とした。

### 【材料と方法】

イトマキヒトデ胚培養間充織細胞の cDNA ライブラリーから、哺乳類 MIF に相同な遺伝子 *ApMIF-1*、*ApMIF-2* を単離した。*ApMIF-1*、*ApMIF-2* 両遺伝子にコードされるタンパク質及び他の動物種の MIF のアミノ酸配列をもとに、MIF の分子進化系統樹を作製した。RT-PCR により、孵化後の特徴的な発生段階において、両遺伝子の発現解析を行った。続いて、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MIF1-MASO, MIF2-MASO) を用いて両タンパク質の翻訳阻害を行い、ノックダウン個体の表現型を解析した。

### 【結果】

分子進化系統解析の結果、*ApMIF-1*、*ApMIF-2*

両タンパク質の祖先型が分子進化の初期に分岐している事がわかった。この事実は、*ApMIF-1*、*ApMIF-2* タンパク質間で機能差が存在する事を示唆する。実際、両タンパク質は、哺乳類 MIF と同様の二次構造を保存しているが、哺乳類 MIF において、アポトーシスに対する抑制能を有するとされる機能部位の保存率には差があった。

RT-PCR 及びプロテオミクス解析データの結果から、両タンパク質がピピンナリア幼生までの発生過程を通して発現していることが推測された。MIF1-MASO、MIF2-MASO を用いた両タンパク質の翻訳阻害幼生では、共に構成細胞数とリンクしたサイズの減少が観察された。構成細胞数の減少率には、MIF1-MASO 個体、MIF2-MASO 個体間で有意差が認められた。また、生理的条件下において、一部のノックダウン個体では、胞胚腔に陥落した上皮細胞のプレブ形成やそれを食食する間充織細胞に断片化が生じていた。これらの形態的特徴は、ノックダウン個体においてアポトーシスが亢進されている可能性を示唆する。

### 【結論】

*ApMIF-1*、*ApMIF-2* タンパク質は、細胞周期制御とアポトーシスの抑制によってヒトデ幼生の恒常性維持に関与する。両タンパク質が機能すると予測される具体的なシグナルカスケードを挙げ、両者の共通点及び相違点を考察する。

## 食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  
埼玉大学教育学部

**A subset of phagocytes migrates along with a larval skeleton of sea urchin.**

Taku Hibino, Daisuke Naka  
Faculty of Education, Saitama University

### 【目的】

イリヤ・メチニコフは、ヒトデ幼生に異物を注入すると、アメーバー状の間充織細胞が 1) 異物に向かって移動し、2) 異物を取り込み、3) 多核の凝集塊を形成することを発見した (Metchinikoff 1891)。

ヒトデの幼生同様ウニの幼生においても、原腸先端から放出された間充織細胞が、食食作用を行うことが知られている。しかし、2) の異物の取り込みに関しては電子顕微鏡での観察は行われているものの、1) 異物に向かう移動や、3) 多核の凝集塊の形成に関する報告は乏しい。またウニの幼生は、間充織細胞の一部が骨片を形成し、内部骨格をもったプルテウス幼生になる点でヒトデの幼生とは大きく異なる。このような形態的な差異が、食食作用にもたらす影響はあるのか、ウニ幼生における食食作用の詳細な観察を行った。

### 【材料と方法】

バフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus* を受精させ、8腕プルテウス幼生になるまで約 18℃で飼育した。8腕プルテウス幼生の左右どちらかの前繊毛帯直下の体腔に、マイクロインジェクション法を用いて 0.2 μm 径の蛍光ビーズを顕微注入し、1-5 日後の蛍光ビーズの所在を追跡した。

### 【結果】

プルテウス幼生の体内へ顕微注入された蛍光ビーズは、注入直後は分散していたものの、体腔細胞が凝集するのとともに、蛍光ビーズも凝集される様子

が観察された。凝集体の周辺では、アメーバー状の体腔細胞が曲がりくねりながら凝集体に向かって移動する様子が観察された。これらの食食作用の過程は、ヒトデ幼生で観察されたものとほぼ同じであった。

ウニ 8腕プルテウス幼生において、蛍光ビーズを食食した細胞の一部は、凝集塊に向かわずに骨に沿って直線的な移動をするという、他の食食細胞とはまったく異なる挙動を示した。これは、腕の先端へと向かう一方向の移動であり、蛍光ビーズ注入箇所に近い腕の骨上での移動は観察されたものの (92 %、n = 50)、正中線に対して反対側に位置する腕の骨上ではこのような移動は観察されなかった (0 %、N = 50)。

骨の上を直線的に移動する食食細胞はどこまで移動するのか、注入後 5 日目まで蛍光ビーズの所在を観察すると、骨の上を滑りつづけ、腕 (骨) の先端に蛍光ビーズの一部が集められることが分かった。

### 【結論】

ウニ幼生では骨に沿って食食細胞が移動するという、ヒトデ幼生の食食作用とは異なる特性があることが明らかになった。これまでウニ発生過程における骨格形成に関する研究は盛んに行われてきたが、骨の機能に関する情報は乏しかった。今回の結果は、ウニ幼生の骨が食食細胞の移動・異物の排除に関与することを示唆している。

## 鰐に細菌を共生させるシンカイヒバリガイ類の血液細胞の比較形態学的研究

多米 晃裕<sup>1</sup>、吉田 尊雄<sup>2</sup>、大石 和恵<sup>2</sup>、植松 勝之<sup>1</sup>、小山 純弘<sup>2</sup>、丸山 正<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (株) マリン・ワーク・ジャパン, <sup>2</sup> 海洋研究開発機構

Comparative morphology of hemocytes in a deep-sea symbiotic clams, *Bathymodiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons*

Akihiro Tame<sup>1</sup>, Takao Yoshida<sup>2</sup>, Kazue Oishi<sup>2</sup>, Katsuyuki Uematsu<sup>1</sup>, Sumihiro Koyama<sup>2</sup>, Tadashi Maruyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Marine Works Japan LTD, <sup>2</sup> JAMSTEC

### 【目的】

二枚貝は血液細胞が関わる生体防御機構により外来微生物の感染を防御すると考えられる。他方、深海の化学合成生態系に生息する共生二枚貝は、鰐細胞内にメタン酸化細菌や硫酸化細菌を共生させているが、それに対する生体防御反応がどうなっているかは良く分かっていない。本研究では、共生二枚貝の血液細胞による生体防御機構を調べるため、メタン酸化細菌を共生させる2種のシンカイヒバリガイ類の血液細胞の種類と性質を明確にすることを目的として、光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察を行った。

### 【材料と方法】

シンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイから血液を採取し、Percollを用いた密度勾配遠心分離法により血球細胞を密度と大きさで分画した。血液細胞は顆粒の有無と好酸性や好塩基性などの染色性についてはメイグリュワルド・ギムザ (MGG) 染色による光学顕微鏡観察を行い、血液細胞の微細形態は電子顕微鏡により観察をした。また、血液細胞の食食能を調べるため、血液細胞に蛍光標識大腸菌 (BioParticles Alexa488, *E. coli*) を加えて暗室下4℃で2時間反応させ、蛍光顕微鏡により観察した。さらに、血液細胞の糖鎖結合性を調べるため、N-アセチルグルコサミン及びN-アセチルノイラミン酸と親和性を持つ蛍光標識コムギ胚芽レクチン (FITC-labeled WGA Lectins) を血液細胞に添加し、暗室下4℃で15分間インキュベート後、蛍光顕微鏡により観察した。

### 【結果】

2種のシンカイヒバリガイ類では両者ともに、3種類の血液細胞を有することが判明した。これらの血液細胞を形態的特徴から、無顆粒で細胞質が好塩基性に染まる無顆粒細胞 (Agranular cell)、小型顆粒を有し好塩基性に染まる少顆粒細胞 (Hyaline cell)、大型顆粒を有し好酸性に染まる顆粒細胞 (Granular cell) に分類した。電子顕微鏡観察では、顆粒細胞には電子密度の高い大型のライソソーム様顆粒が見られ、少顆粒細胞には電子密度が低い小型の顆粒が見られたが、無顆粒細胞ではそのような顆粒は見られなかった。血液細胞の食食能は、顆粒細胞は高く、少顆粒細胞では低いながら食食能が見られた。しかし、無顆粒細胞には食食反応は見られなかった。蛍光標識コムギ胚芽レクチンの糖鎖結合性観察では、無顆粒細胞は蛍光染色されなかったが、少顆粒細胞は弱く、顆粒細胞は強く染色された。

### 【結論】

メタン酸化細菌を有する2種のシンカイヒバリガイ類では、共に3種類の血液細胞を有しており、血液細胞の種類や形態的特徴、さらに食食能やレクチン結合性は、お互いに大変類似していることが明らかになった。また、コムギ胚芽レクチン蛍光染色の結果において、3種類の血液細胞で細胞表面の糖鎖が質的、あるいは量的に異なった結果が得られた。これら共生二枚貝が有する血液細胞が、共生細菌に対してはどのような認識をし、影響を与えるか、さらに、非共生二枚貝とはどのような相同性または相違性があるか、今後明確にしていく必要がある。



## *Drosophila* トランスグルタミナーゼの基質群の機能解明

柴田俊生<sup>1</sup>、宮地隆太<sup>1</sup>、木場健吾<sup>1</sup>、有木茂<sup>1</sup>、新澤直明<sup>2</sup>、嘉糠洋陸<sup>2</sup>、小柴琢己<sup>1</sup>、川畑俊一郎<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>九大・院・システム生命、<sup>2</sup>帯広畜産大・原虫病研究センター・原虫進化生物学研究分野

### Functional analysis of substrates for transglutaminase in *Drosophila*.

Toshio Shibata<sup>1</sup>, Ryuta Miyaji<sup>1</sup>, Koba Kengo<sup>1</sup>, Shigeru Arikawa<sup>1</sup>, Naoaki Shinzawa<sup>2</sup>, Hiroataka Kanuka<sup>2</sup>, Takumi Koshiba<sup>1</sup>, Shun-ichiro Kawabata<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, <sup>2</sup>National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

#### 【目的】

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質間にイソペプチド結合を形成させる酵素で、哺乳類においては皮膚形成や体液凝固などの生理機能を果たしている。一方、無脊椎動物における TGase の機能はほとんど不明であった。そこで、私たちは *Drosophila* を用いて TGase の機能解明を進めてきた。これまでに、全身で TGase を RNAi すると羽化率や羽化後の生存日数が著しく低下すること、さらに、成虫では翅の水疱形成や腹部の模様の消失といった表現型が現れることなどが判明している。今回は、このような外皮形成に影響をおよぼす TGase の基質と推定されるタンパク質群の機能解析を行った。

#### 【材料と方法】

GAL4/UAS システムにより TGase を RNAi した個体の翅を回収し、タンパク質を抽出後、SDS-PAGE により分離した後、質量分析を行った。同定したタンパク質を GAL4/UAS システムを用いて全身や組織特異的に RNAi して、その表現型を観察した。さらに、これらのタンパク質の大腸菌による組み換え体の作製を行った。この組み換え体を用いて、TGase の合成基質であるピオチンアミドペンチルアミンの TGase 依存的な取り込みを調べるとともに、各種多糖への結合性を解析した。

#### 【結果】

外皮形成における TGase の機能を調べるために GAL4/UAS システムによる RNAi を行った。その結果、成虫では翅の水疱形成や、腹部の模様の消失といった異常な表現型が現れた。

外皮形成に関与する TGase の基質を同定する目的で、TGase を RNAi した個体の翅からタンパク質を抽出して、全タンパク質について質量分析による同定を行った。各タンパク質を全身および翅特異的に RNAi したところ、4 種類のタンパク質について翅や腹部に異常が現れた。このうち Cpr97Eb と Clect26 について、大腸菌を用いた組換え体の作製を行った。この組換え体を、TGase 存在下で TGase の合成基質と反応させたところ、どちらのタンパク質についても TGase 依存的に合成基質の取り込みが確認された。また、両タンパク質は昆虫外皮の主成分であるキチンと特異的に結合することも分かった。

#### 【結論】

*Drosophila* の TGase は、発生や外皮の形成に重要な役割を果たしていることが判明した。また、外皮形成に必要なキチン結合性のタンパク質が TGase の基質として同定された。

## カプトガニ体液凝固因子 Factor G の $\beta$ -1,3-D-グルカン認識モジュールと 土壌細菌 *Cellvibrio mixtus* の糖鎖認識モジュールとの構造類似性

植田 祐生<sup>1</sup>、大和田 修平<sup>1</sup>、阿部 義人<sup>2</sup>、柴田 俊生<sup>1</sup>、飯島 学<sup>1</sup>、吉光 由希子<sup>1</sup>  
小柴 琢己<sup>1,4</sup>、中田 宗宏<sup>3</sup>、植田 正<sup>2</sup>、川畑 俊一郎<sup>1,4</sup>  
<sup>1</sup>九大院・システム生命 <sup>2</sup>九大院・薬 <sup>3</sup>東海大・応用生化学 <sup>4</sup>九大院・理

### Factor G utilizes a carbohydrate-binding cleft that is conserved between horseshoe crab and bacteria for the recognition of $\beta$ -glucans

Ueda Yuki, Ohwada Shuhei, Abe Yoshito, Shibata Toshio, Iijima Manabu, Yoshimitsu Yukiko  
Koshiba Takumi, Nakata Munehiro, Ueda Tadashi, Shun-ichiro Kawabata

<sup>1</sup>Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, <sup>3</sup>Department of Applied Biochemistry, Tokai University  
<sup>4</sup>Faculty of Sciences, Kyushu University

#### 【目的】

自然免疫系で働くタンパク質は、感染微生物の細胞壁に含まれる特有の分子パターンを認識することで、自己-非自己を区別し、速やかに異物の排除をおこなっている。カプトガニ Factor Gは、真菌の表層成分である $\beta$ -1,3-D-グルカン (BDG) によって活性化し、体液凝固を開始するセリンプロテアーゼ前駆体である。Factor Gは、ふたつのサブユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) によって構成され、 $\alpha$ サブユニットのC末端のキシラナーゼZ様モジュールの二回繰り返し(Z1、Z2)がBDGの認識部位であることが判明している。また、Z1およびZ2は、土壌細菌*Cellvibrio mixtus*由来のエンドグルカナーゼ5Aのセルロース結合モジュール (CmCBM6) と相同性がある。今回、Factor GによるBDG認識機構を詳細に解明するため、NMRを用いてZ2のリガンド結合部位を解析した。

#### 【材料と方法】

カプトガニFactor GのZ1、Z2モジュールの組み

換えタンパク質を調製し、不溶性のBDGであるカードラン、可溶性のBDGであるラミナリン、およびラミナリオリゴ糖に対する親和性を詳細に調べた。さらに、NMRを用いてラミナリペンタオースとの相互作用を解析した。

#### 【結果と結論】

Factor GのキシラナーゼZ様モジュールは、繰り返し構造をとることで、その単独モジュールと比較して、カードランに対して高い親和性を獲得していることが明らかとなった。また、CmCBM6には、2種のリガンド結合部位 (Cleft AとCleft B) が存在するが、Z2はCleft Bに相当する部位で、ラミナリペンタオースを認識していた。したがって、BDG認識に必須の構造様式は、細菌とカプトガニ間で保存されていることが判明した。一方、ショウジョウバエやカイコのBDG結合タンパク質 (GNBP3/ $\beta$  GRP) と構造比較をおこなったところ、タンパク質のフォールドは類似していたが、詳細なBDG認識機構は相互に異なっていた。

## ショウジョウバエ PGRP-LE の細胞内リステリア菌認識 によるオートファジー誘導機構解析

矢野 環, 若林 康介, 倉田 祥一朗  
東北大・院・薬

Molecular mechanism of the induction of autophagy *via* recognition of *Listeria* by *Drosophila* PGRP-LE

Tamaki Yano, Kosuke Wakabayashi and Shoichiro Kurata<sup>1</sup>  
Grad. School Pharm. Sci., Tohoku Univ.

### 【目的】

自然免疫は哺乳類を含むほぼすべての多細胞生物が有する生体防御機構である。ショウジョウバエでは、Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)ファミリー因子が侵入した病原体を認識し、自然免疫応答を誘導する。PGRPファミリーに属するPGRP-LEは細菌細胞壁のペプチドグリカン（PGC）を認識し、抗菌ペプチド産生を誘導する<sup>[1]</sup>。PGRP-LEは体液中と、免疫細胞である体液細胞内の両方においてペプチドグリカン（PGC）を認識するという、他のPGRPにない特徴を持つ<sup>[1]</sup>。我々は、PGRP-LEが細胞内寄生細菌であるリステリア菌を体液細胞内で認識し、オートファジーを認識依存的に、新規のシグナル伝達経路を介して誘導することによって菌を取り囲んで消化し、その増殖を抑制することを明らかにしてきた<sup>[2]</sup>。

リステリア菌やサルモネラ菌といった細胞内寄生細菌は、ほ乳類細胞内でユビキチンと共局在することが見いだされている。また、ほ乳類で同定されているp62/SQSTM1は、ポリユビキチン化したタンパク質の凝集体形成の制御に機能するが、近年、細胞内に侵入した細胞内寄生細菌に局在し、オートファゴソーム形成に働いていることが示された。そこで、病原体認識分子依存的なオートファジー誘導が細菌に共局在するユビキチンとp62を介することにより、p62がリステリア菌感染に対する抵抗性に機能しているかを解析した。

### 【材料と方法】

p62のショウジョウバエホモログであるref(2)P変異体とその体液細胞を用いて、ref(2)Pがリス

テリア菌感染に対する抵抗性に*in vivo*で機能しているか、また、体液細胞内におけるリステリア菌増殖抑制に機能しているかを検討した。また、ref(2)Pタンパク質が細胞内に感染したリステリア菌、リステリア菌細胞壁成分を認識することにより、菌周囲に局在するPGRP-LE、ユビキチンと共局在するかを検討した。

### 【結果】

ref(2)P変異体はリステリア菌感染に感受性であり、その体液細胞はリステリア菌の細胞内増殖抑制能が低下していた。また、ref(2)Pタンパク質は、細胞内に侵入したリステリア菌の周囲に局在するPGRP-LE、さらにユビキチンと共局在し、オートファゴソーム膜上に局在する因子LC3とも局在を共にした。ref(2)Pタンパク質のリステリア菌周囲への局在、ユビキチンの集積はPGRP-LE依存的であった。

### 【結論】

PGRP-LEによるリステリア菌認識依存的に誘導されるオートファジーは、ユビキチンとLC3の両方と結合するアダプター因子ref(2)Pを介している可能性を示した。これは、無脊椎動物であるショウジョウバエからほ乳類に至るまで、細胞内寄生細菌に対する抵抗反応としてのオートファジー誘導が、種を越えて保存された類似の機構によることを示唆している。

### 【参考文献】

1. Kaneko, T. *et al. Nature Immunol.* 7, 715-723 (2006)
2. Yano, T. *et al. Nature Immunol.* 9, 908-916 (2008)

## Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by PGRP-LE and JAK-STAT pathway

Akira Goto<sup>1</sup>, Tamaki Yano<sup>2</sup>, Jun Terashima<sup>2</sup>, Shinzo Iwasita<sup>2</sup>, Yoshiteru Oshima<sup>2</sup>, Shoichiro Kurata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

### 【Introduction】

Intracellular bacteria cause serious infectious diseases such as tuberculosis, shigellosis, and listeriosis. In spite of well-recognized innate immune signaling, the Toll and Imd pathway, which are mainly involved in defenses against extracellular pathogens, it is still elusive how hosts deal with the attacks of intracellular pathogens. We previously demonstrated that *Drosophila* peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE functions as an important host pattern recognition receptor against intracellular bacteria such as *Listeria monocytogenes* [1]. To further identify novel PGRP-LE dependent host defense factors, we performed strategic DNA microarray, extracted candidate genes and finally identified novel antimicrobial like peptide Listericin. [2].

\*\*\*\*\*

### 【Materials & Methods】

Strategic DNA microarray analysis was performed using different *L. monocytogenes* infection combination either in the absence or presence of PGRP-LE [2]. By comparing with all data, we extracted candidate genes whose induction is both dependent on the presence of PGRP-LE and by the wild-type *L. monocytogenes* infection and finally identified uncharacterized gene *CG9080* (referred to here as Listericin). Then, we assessed the function of Listericin by overexpression and RNAi studies, biochemical analysis and colony formation unit (CFU) assay both *in vivo* and *in vitro* studies.

\*\*\*\*\*

### 【Results】

Functional RNAi and overexpression studies demonstrated that the induction of Listericin is cooperatively regulated by PGRP-LE and the JAK-STAT pathway. An *in vitro* cell culture assay showed that Listericin is secreted as processed forms and suppresses growth of not only *L. monocytogenes* but also Gram-negative bacteria. Further more, *in vivo* Listericin overexpressed flies rendered resistance against *L. monocytogenes* infection.

\*\*\*\*\*

### 【Conclusion】

We first reported novel antimicrobial-like peptide Listericin whose induction is regulated by both PGRP-LE and JAK-STAT pathway. The CFU assay and *in vivo* survival experiments further reinforced the function of Listericin as antimicrobial peptide.

\*\*\*\*\*

### 【References】

1. Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, Takada H, Goldman W, Fukase K, Silverman N, Yoshimori T, Kurata S (2008) Nat Immunol, 9:908-916
2. Goto A, Yano T, Terashima J, Iwashita S, Oshima Y, Kurata S (2010) J. Biol. Chem. In press

## ヒラメ IPS-1 遺伝子のクローニングおよび抗ウイルス活性

引間 順一<sup>1</sup>、大谷 真紀<sup>1</sup>、Rhoda M Cerbo<sup>1</sup>、近藤 秀裕<sup>2</sup>、廣野 育生<sup>2</sup>、  
Tae-Sung Jung<sup>1</sup>、青木 宙<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立慶尚大学校・Aquatic Biotechnology Center、<sup>2</sup>東京海洋大学・ゲノム科学講座

Molecular cloning and antiviral activity of IPS-1 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jun-ichi Hikima<sup>1</sup>, Maki Ohtani<sup>1</sup>, Rhoda M Cerbo<sup>1</sup>, Hidehiro Kondo<sup>2</sup>, Ikuo Hirono<sup>2</sup>,  
Tae-Sung Jung<sup>1</sup>, Takashi Aoki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Aquatic Biotechnology Center, Gyeongsang National University,

<sup>2</sup>Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

【目的】ホ乳類において、病原体関連分子パターン (PAMPs) の認識機構として、Toll 様受容体 (TLRs) を初めとする多くのパターン認識受容体 (PPRs) による免疫システム活性化機構が知られている<sup>1)</sup>。しかし、魚類においては TLRs による認識機構以外の知見は乏しい。そこで、我々は魚類における PPRs、特に RLRs [retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors] ファミリー分子によるウイルス核酸認識機構に着目し、その中でも、もっとも重要な役割を担っている分子の 1 つである IPS-1 [Interferon (IFN)- $\beta$  promoter stimulator-1, 別名 MAVS, VISA あるいは Cardif] 遺伝子のクローニングを試み、さらに、その抗ウイルス活性を調べた。

【材料と方法】GenBank の登録情報をもとに縮重プライマーを設計し、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の腎臓から作製した cDNA を鋳型としてヒラメ IPS-1 の部分配列を得た。この配列をもとに遺伝子特異的プライマーを用いた RACE 法を行い、全長配列を決定した。また、ヒラメ BAC クローン (70-12N) を鋳型にしてヒラメ IPS-1 遺伝子の全長を決定した。ヒラメ各組織における遺伝子発現、さらに PolyI:C や VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) 刺激した腎臓白血球における遺伝子発現について調べた。また、HINAE (Hirame natural embryonic) 細胞を用いて、IPS-1 を過剰発現させた系での VHSV あるいは HIRRV (Hirame rhabdovirus) に対する抗ウイルス活性を観察した。さらに、その時に I 型 IFN 誘導遺伝子 (Mx, ISG15, IRF3) の発現量の変化をリアルタイム PCR 法で確認した。

【結果】ヒラメ IPS-1 遺伝子は全長 5,262 bp で、2,235 bp のコード領域を含んでおり、コードして

いるアミノ酸配列は 641 残基と推定された。N 末端に存在する CARD および Proline-rich ドメインは良く保存されていた。また、ヒラメ IPS-1 遺伝子の構造は 5 つのエキソンから成り立っていたが、ヒト IPS-1 遺伝子より少なかった。各組織における IPS-1 遺伝子の発現は多くの組織で確認されたが、特に腎臓、脾臓および心臓での発現が顕著であった。Poly I:C や VHSV で刺激した腎臓白血球では IPS-1 遺伝子の発現量はほとんど変化せず、ホ乳類の特徴と類似していた。IPS-1 を過剰発現させた系での VHSV あるいは HIRRV に対する抗ウイルス活性を細胞変性効果 (CPE) の観察およびウイルス力価の測定によって検討したところ、共に IPS-1 の過剰発現によって十分にウイルスの増殖が抑えられた。さらに、Mx、ISG15 および IRF3 遺伝子の発現量はヒラメ IPS-1 の過剰発現によって、VHSV 感染 24 時間後に著しく増加した。

【考察】本研究でクローニングしたヒラメ IPS-1 遺伝子によってコードされている分子は、様々な特徴の類似性からホ乳類の IPS-1 と同様の働きをしていることが推察された。今回の実験に用いた 2 種類のラブドウイルス (一本鎖 RNA ウイルス) に対する抗ウイルス活性試験の結果により、ヒラメ IPS-1 は I 型 IFN 関連遺伝子の発現誘導を通して、これらのウイルス感染防御に対し、重要な役割を担っていることが示唆された。

## 【参考文献】

1. Akira S., Uematsu S., and Takeuchi O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell, 124: 783-801.

## ヒラメにおける LGP2 を介した I 型 IFN 経路の活性化

大谷 真紀<sup>1</sup>、引間 順一<sup>1</sup>、近藤 秀裕<sup>2</sup>、廣野 育生<sup>2</sup>、Tae-Sung Jung<sup>1</sup>、青木 宙<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>国立慶尚大学校・Aquatic Biotechnology Center, <sup>2</sup>東京海洋大学・ゲノム科学講座

### LGP2-mediated activation of type I IFN pathway in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

Maki Ohtani<sup>1</sup>, Jun-ichi Hikima<sup>1</sup>, Hidehiro Kondo<sup>2</sup>, Ikuo Hirono<sup>2</sup>, Tae-Sung Jung<sup>1</sup>, Takashi Aoki<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Aquatic Biotechnology Center, Gyeongsang National University,  
<sup>2</sup>Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

【目的】自然免疫は生体内に侵入したウイルスや細菌に特異的なタンパク質、脂質、核酸などの病原体成分 (pathogen associated molecular pattern: PAMPs) を速やかに認識し、感染に対する最初の免疫応答を誘導する。近年の研究により、ウイルス感染後、細胞質内のウイルス核酸センサー (pattern recognition receptors: PRRs) がウイルス由来の核酸を特異的に認識し、I 型インターフェロン (IFN-I) の産生を誘導することが明らかになった<sup>[1]</sup>。PRRs の一つで RIG-I 様受容体 (retinoic acid inducible-gene I like receptor: RLR) ファミリーに属する LGP2 について、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) より cDNA を同定し、一本鎖 RNA (single-strand RNA: ssRNA) ウイルスであるウイルス性出血性敗血症ウイルス (VHSV) 感染後の腎臓において LGP2 遺伝子の発現が著しく増加することを既に報告した。本研究では、LGP の過剰発現によって誘導される抗ウイルス活性のより詳細な分析を IFN-I、IFN 誘導遺伝子 (IFN-I, Mx, ISG15 および ISG56) や RLR (MDA5 および IPS-1) の発現定量解析を中心に行った。

【材料・方法】完全長のヒラメ LGP2 および C 末端側の制御ドメイン (regulatory domain: RD) を欠損した LGP2 $\Delta$ RD をコードする発現ベクターを構築した。これらをヒラメ胚由来細胞株 (HINAE) に遺伝子導入し、48 時間後に VHSV (10<sup>4</sup> PFU/ml) を感染させた。VHSV 感染から 3 日後に 4% パラホルムアルデヒドで HINAE 細胞を固定後、クリスタルバイオレットで HINAE 細胞を染色し、細胞変性効果 (CPE) を可視化した。発現定量解析にはウイルス感染から 24 時間後の HINAE 細胞を回収し、cDNA を合成してリア

ルタイム PCR 用の鋳型とした。また、発現ベクターと共に Poly I:C (合成 dsRNA) を細胞質内に導入し、48 時間後に細胞を回収した。

【結果】LGP2 の過剰発現により、VHSV 感染後の CPE 発現およびウイルス力価が抑制され、さらに IFN-I (14 倍), Mx (42 倍), ISG15 (24 倍) および IRF-3 遺伝子 (12 倍) の発現量は優位に増加した。興味深いことに、LGP2 $\Delta$ RD を過剰発現した HINAE 細胞では VHSV 感染後の CPE 発現は抑制されず、IFN-I や IFN 誘導遺伝子の発現増加も見られなかった。

一方、Poly I:C を HINAE 細胞に導入すると、コントロールにおいても IFN-I を除くその他の遺伝子の発現が誘導されたが、これらの誘導は LGP2 の過剰発現によりさらに 3~5 倍程度増加した。

【結論】LGP2 の過剰発現により、VHSV の増殖が抑制された。また、VHSV や Poly I:C の存在下において IFN-I や IFN 誘導遺伝子の発現が強く誘導された。これらの結果は、ヒラメ LGP2 はウイルス核酸を認識して IFN-I や IFN 誘導遺伝子の発現を誘導していることを示唆している。現在、二本鎖 RNA (double-strand RNA: dsRNA) ウイルスである伝染性腭臓壊死症ウイルス (IPNV) を用いて同様の実験を進めている。

#### 【参考文献】

1. Akira S., Uematsu S., and Takeuchi O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell, 124: 783-801.

**Molecular characterization and expression analysis of nuclear oligomerization domain protein, NOD1 in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus***

Seong bin Park<sup>1</sup>, Jun-ichi Hikima<sup>1</sup>, Maki Otani<sup>1</sup>, Seong won Noh<sup>1</sup>, Ho bin Jang<sup>1</sup>, In seok Cha<sup>1</sup>, Hidehiro Kondo<sup>2</sup>, Ikuo Hirono<sup>2</sup>, Tae sung Jung<sup>1</sup> and Takahashi Aoki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary medicine, Gyeongsang National University, South Korea, <sup>2</sup> Lab. of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

**【Introduction】**

Invading pathogens are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) distributed in extracellular, membrane and cytoplasmic compartments. In mammals, three major classes of PRRs have been identified: Toll like receptors (TLRs), nuclear oligomerization domain protein (NOD)-like receptors (NLRs) and retinoid acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors (RLRs). TLRs are the most characterized membrane-associated PRRs. NLRs are recently identified cytoplasmic PRRs involved in recognition of intracellular pathogens in early host defense. However, NOD1 function in teleost fish is poorly understood. Here we present the molecular cloning and characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NOD1 gene and the gene expression was examined in bacterial and viral infected fish.

**【Materials and Methods】**

NOD1 cDNA was cloned from the spleen and kidney of Japanese flounder. The full-length of NOD1 gene was also determined by direct-sequencing using BAC clone screened from flounder BAC library. Tissue distribution of NOD1 mRNAs was analyzed by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). The expression levels of flounder NOD1 gene in the flounder kidney infected with *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda* and Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) was measured by quantitative real-time PCR (Q-PCR). To understand the mechanism of NOD1 gene induction by *E. tarda* infection, the kidney in flounder immunized with formalin-killed cells (FKC) and outer membrane vesicles (OMVs), which are naturally released from *E. tarda*, were also examined for Q-PCR analyses. The values of the gene expression

were relative to the expression of EF-1 $\alpha$  gene.

**【Results】**

The Japanese flounder NOD1 (poNOD1) cDNA contains 3753bp. The complete open reading frame of poNOD1 was 2,820 bp, encoding a 940-amino acid polypeptide. The poNOD1 possesses three conserved domains: carboxyl terminal leucine rich repeat (LRR) domains, a central NOD domain and amino terminal CARD domain. The poNOD1 gene consisted of 11 exons with 10 intervening introns, spanning 7,591bp of genomic sequence using screened BAC clone. RT-PCR analysis showed poNOD1 was ubiquitously expressed in the flounder tissues. The expression of poNOD1 gene was significantly induced in the infected kidney with all pathogens including *S. iniae*, *E. tarda* and VHSV. However, OMV and FKC of *E. tarda* couldn't induce the expression of NOD1 gene.

**【Discussion】**

Expression of NOD1 gene was significantly elevated after viral and bacterial infection, suggesting that NOD1 plays an important role in fish innate immune response to viral and bacterial infections. Since the expression of NOD1 gene was induced by alive *E. tarda* but not by OMV and FKC of *E. tarda*, which seem not to invade into the cytoplasm, the induction of NOD1 mRNA is probably involved in the immune response to intercellular infection with *E. tarda*.

**【References】**

1. S.E. Girardin, R. Tournebise, M. Mavris, A.L. Page, X. Li and G.R. Stark (2001) *EMBO Rep* 2: 736–742
2. D.J. Philpott, S. Yamaoka, A. Israel and P.J. Sansonetti (2000) *J Immunol* 165: 903–914

## ヒラメ Toll-like receptor 3, 7, 8 遺伝子の クローニングならびに発現解析

黄晟敦, 近藤 秀裕, 廣野 育生, 青木 宙  
東京海洋大学・ゲノム科学講座

**Molecular cloning and gene expression study on the Toll-like receptor 3, 7 and 8 in Japanese flounder,  
*Paralichthys olivaceus*.**

Seong Don Hwang, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki  
Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

### [Objective]

Toll-like receptors (TLRs) regulate immune response by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in the first line of defense against pathogen. Mammalian TLR3 recognizes viral dsRNA and TLR7 and TLR8 sense viral ssRNA genome. TLR signals from these TLRs result in inflammatory cytokine and type I interferon production. Hence, TLR3, TLR7 and TLR8 play central roles in the immune response during viral infection. However, the systemic reaction of teleost fish TLR3, TLR7 and TLR8 during viral infection has not been fully understood. In order to understand these viral recognition TLRs in teleost, we cloned TLR 3, TLR7 and TLR8 from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and investigated its expression profile following viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection.

### [Methods]

Degenerate PCR, expressed sequence tags (ESTs) annotation and primer walking PCR were conducted to clone TLR3, TLR7 and TLR8 cDNAs of Japanese flounder. The exon/intron structures of their genes were determined by screening the Japanese flounder BAC library. Furthermore, after VHSV infection, the gene expression of Japanese flounder TLR3, TLR7 and TLR8 in immune-related organs were also investigated.

### [Results]

The coding region of Japanese flounder TLR3,

TLR7 and TLR8 cDNAs were 2,799 bp, 3,159 bp and 3,078 bp, encoding 932, 1,052 and 1,025 amino acid residues, respectively. The structure of these TLRs consisted of LRR, transmembrane and TIR domains. The ORF of TLR3, TLR7 and TLR8 genes consisted of 4, 2 and 1 exon, respectively. VHSV experimental exposure led to low induction of TLR3 and TLR8 in the examined organs. On the other hand, TLR7 was highly induced in almost all organs with the highest induction of TLR7 observed in kidney and spleen at 5 days post-infection.

### [Conclusion]

Our results showed that TLR3, TLR7 and TLR8 are present in Japanese flounder and expression of their genes is regulated differently in the tissues against viral infection. It may be important for the modulation of systemic immune responses.



## Characterization of zymosan-binding proteins in the Nile tilapia serum

Soha Gomaa Ramadan Abdel-salam Okba, Tomonori Somamoto and Miki Nakao  
Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental  
Science, Kyushu University

### 【Introduction】

One of the striking features of fish complement system is that it contains multiple isoforms of several complement proteins, such as C3, where the function of this diversity in complement proteins is considered to expand their innate immune recognition capacity and response. However, this complement diversity has been proven only in a limited number of teleost species such as trout, carp, zebrafish and medaka fish, and less studied for evolutionarily newer teleost groups such as Perciformes. Tilapia (*Oreochromis niloticus*), belonging to this order, is one of the most important species in aquaculture, but still poorly analyzed for their innate immunity. Therefore, the present study aimed at elucidating structural and functional diversity of tilapia complement component C3.

In addition to cDNA cloning of two distinct C3 isotypes, we have attempted C3 identification at the protein level by analyzing the myosin-binding proteins (ZBP) of tilapia serum, since ZBP have been shown to contain activated forms of C3 as major constituents in other species such as carp and mammals. Here we report the presence of two distinct C3 isoforms and constituents of ZBP in tilapia.

### 【Materials and Methods】

Tilapia C3-encoding cDNAs were amplified using primers corresponding to conserved amino acid sequence segments, and subcloned into pGEM-T, and sequenced.

For preparation of ZBP, tilapia serum was incubated with 5 mg/ml zymosan for 1 h at 25°C. Proteins bound to zymosan were eluted with 1 M hydrazine for 1 h at 25°C, concentrated by precipitation with 15% trichloroacetic acid, and

analysed by SDS-PAGE on 8% gels.

### 【Results】

Sequencing of PCR products showed two major isoforms, designated C3-H and C3-Q, that differs at catalytic site for cleavage and binding reaction of C3.

SDS-PAGE analysis of ZBPs eluted with hydrazine gave three bands corresponding to polypeptides of iC3b form of C3, suggesting that tilapia C3 can bind to zymosan as an active form.

In addition to the iC3b-like polypeptides, tilapia ZBP gave a major band of 240 kDa polypeptide, designated ZBP-240. Since carp and trout ZBP do not contain any protein band of such high molecular mass, ZBP-240 is considered to be a novel protein with zymosan-binding ability.

ZBP-240 was purified from tilapia serum by PEG precipitation and chromatographic separation on Q-Sepharose HP, Superdex 200, and hydroxylapatite. On the Superdex 200 column, ZBP-240 migrated as a ~400 kDa protein, suggesting that it is present as a dimer in serum. Detailed structural and functional analyses of ZBP-240 are now in progress.

### 【Discussion】

In mammals and carp, ZBP mainly contain iC3b form of activated C3. It should be noted that unlike other species tested to date, ZBP-240 was the major component of ZBP, suggesting that ZBP-240 may play a significant role in recognition and elimination of yeast and possibly fungi.

## 魚類における膜型補体制御因子の同定

辻倉 正和、柚本 智軌、鶴木 陽子、中尾 実樹

九州大学大学院農学研究院

### Identification of membrane-bound regulators of complement activation in fish.

Masakazu Tsujikura, Tomonori Somamoto, Yoko Kato-Unoki, Miki Nakao

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,

Kyushu University

#### 【目的】

Regulator of complement activation (RCA) ファミリーは、補体制御タンパク質および補体レセプターを含んでいる。RCA タンパク質には分泌型と膜結合型があり、膜結合型制御因子は自己細胞を補体による攻撃から守るために重要である。系統発生的には、RCA タンパク質は円口類や硬骨魚類からも同定されており、その起原が非常に古いと示唆される。これまでに factor H 様の可溶性分子が硬骨魚類の barred sand bass とヒラメ、さらに円口類ヤツメウナギで見つかっている。しかし、魚類では自己細胞を保護する上で重要な膜結合型の RCA タンパク質は未だ同定されていない。本研究ではゼブラフィッシュとコイから膜結合型の RCA タンパク質を同定することを試みた。

#### 【材料と方法】

ゼブラフィッシュのゲノムデータベースから、BLAST 検索などによって膜結合型の新規 RCA タンパク質の配列を予測し、Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) と名付けた。これを基にプライマーを設計し、RACE PCR により全塩基配列を決定した。さらにこれをクエリ配列とした BLAST 検索によって、コイ Tecrem の部分 EST 配列を得て、RACE PCR によりこの全塩基配列を決定した。

また、pcDNA 3.1 vector を用い、6XHis tag 付きコイ Tecrem を発現する CHO 細胞を樹立した。こ

の Tecrem 発現株を標的として用い、コイ補体による細胞傷害試験を行い、コイ Tecrem の補体抑制活性を評価した。

#### 【結果】

ゼブラフィッシュからは、5 個の SCR ドメイン、膜貫通領域および細胞質領域を含む Tecrem タンパク質 (404 アミノ酸残基) をコードする cDNA、(2248 bp) がクローニングされた。一方、コイ Tecrem (362 残基) は、4 つの SCR ドメイン、Thr/Pro-rich 領域、膜貫通領域および細胞質領域から構成されていた。Tecrem の発現組織を RT-PCR を用いて解析した結果、供試したすべての臓器で mRNA が検出され、Tecrem が補体制御因子であることが示唆された。

さらに CHO 細胞を用いた細胞障害阻害試験では Tecrem 発現株に対する細胞障害が有意に減少し、Tecrem がコイ補体を制御することが示された。

#### 【結論】

下等脊椎動物からは初めて膜結合型の RCA ファミリーに属する補体制御因子 Tecrem をクローニングした。rTecrem 発現 CHO 細胞を用いたコイ血清細胞障害阻害試験の結果から、Tecrem がコイ補体による細胞障害活性を阻害することが示唆された。

## 円口類ヌタウナギにおける補体系活性化因子の同定

山口 智和<sup>1</sup>, 高宗 和史<sup>1</sup>, 近藤 昌和<sup>2</sup>, 高橋 幸則<sup>2</sup>, 鶴木(加藤) 陽子<sup>3</sup>, 中尾 実樹<sup>4</sup>, 藤井 保<sup>5</sup>

<sup>1</sup>熊本大学・大学院自然科学研究科, <sup>2</sup>水産大学校・生物生産学科,

<sup>3</sup>九州大学・農学研究院研究教育支援センター, <sup>4</sup>九州大学・農学研究院生命機能科学部門,

<sup>5</sup>県立広島大学・人間文化学部

### Identification of complement factor involved in the activation of complement system in hagfish, *Eptatretus burgeri*.

Tomokazu Yamaguchi<sup>1</sup>, Kazufumi Takamune<sup>1</sup>, Masakazu Kondo<sup>2</sup>, Yukinori Takahashi<sup>2</sup>, Yoko Kato-Unoki<sup>3</sup>,

Miki Nakao<sup>4</sup>, Tamotsu Fujii<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, <sup>2</sup>Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, <sup>3</sup>Faculty of Agriculture, Kyushu University, <sup>4</sup>Department of Bioscience and

Biotechnology, Kyushu University, <sup>5</sup>Department of Health Sciences, Hiroshima Prefectural University

#### 【目的】

最も原始的な脊椎動物の一つである円口類のヌタウナギでは、原始的な自然免疫が生体防御の中心的な役割を果たしているのではないかと考えられている。特に、補体系レクチン経路に関与するタンパク質が数種見つかったことから同経路が免疫の重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。そこで本研究では、ヌタウナギにおけるレクチン経路の全容を明らかにするため、経路活性化の起点となる糖鎖認識分子の探索を行った。

#### 【材料と方法】

ヌタウナギの血清を分離し、それをN-アセチルグルコサミンを担体としたアフィニティークラムに通すことで、血清中の糖鎖認識分子の単離を試みた。その後、N-アセチルグルコサミンを含むバッファー、及びEDTAを同カラムに順次通すことでカラムに結合している糖鎖認識分子の溶出を行った。溶出された分画中に含まれるタンパク質の解析は、SDS-PAGE、Edman法によるN末端アミノ酸配列解析、RACE法により行い当該タンパク質の実体を明らかにした。

#### 【結果】

EDTA分画中に存在するタンパク質において、既存の糖鎖認識レクチンに見られるような多量体形成、コラーゲン様ドメインの存在が示された。そこでN末端アミノ酸配列を決定し、RACE法を用いて当該タンパク質をコードするcDNA全長の塩基配列を明らかにした。BLASTP解析による相同性検索と系統樹による系統解析の結果、同タンパク質は他種で発見されているClqと相同性を示した。また、系統解析により、このヌタウナギClqがヤツメウナギのClqよりも進化的に起源が古いことが示唆された。

#### 【結論】

N-アセチルグルコサミンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにてヌタウナギClqタンパク質が同定された。獲得免疫を有する高等脊椎動物で主に抗体認識に働くClqがヌタウナギでは糖鎖認識分子として働くことが示唆され、両者における当該分子の作用機序の違いは免疫進化を考える上で非常に興味深い現象といえる。今後は、同タンパク質の機能解析を行うことでヌタウナギにおけるレクチン経路の全容解明を目指す。

## ウイルス感染で誘導されたギンブナ細胞傷害 T 細胞と単球の細胞傷害活性

杣本 智軌<sup>1</sup>、中西 照幸<sup>2</sup>、中尾 実樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院・農学研究院, <sup>2</sup>日本大学・生物資源科学部

## Cell-mediated cytotoxicity of CTL and monocyte from virus-infected ginbuna crucian carp

Tomonori Somamoto<sup>1</sup>, Teruyuki Nakanishi<sup>2</sup>, Miki Nakao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University,

<sup>2</sup> Department of Veterinary Medicine, Nihon University

## 【目的】

哺乳類のウイルス感染防御システムにおいて、細胞傷害性 T 細胞(CTL)が担う細胞性免疫は重要な役割を担っている。これまでに我々はクローンギンブナを用いることにより、魚類のウイルス感染防御システムにおける細胞性免疫の重要性を提唱してきた。本研究では、ウイルス感作によって誘導されるエフェクター細胞が CTL だけなのか、あるいは、それ以外のエフェクター細胞が関与しているかを検討した。

## 【材料と方法】

S3n 系統のクローンギンブナに、致死量以下( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/50g 魚体重) の crucian carp haematopoietic necrosis virus (CHNV)を3週間間隔で2回腹腔内接種し、最終免疫から8日後に末梢血白血球を分離した。CTLは、比重分離およびギンブナ CD8 $\alpha$  に対する mAb(2C3)を用いた磁気ビーズ分離法にて単離した。また、エフェクター細胞をプラスチック付着性を利用し、付着性細胞群(単球画分)と非付着性細胞群に分画した。S3n 系統と同系である CFS 細胞に CHNV を感染させた標的細胞と各エフェクター細胞とを混合培養し、LDH 遊離法によって細胞傷害活性を測定した。

エフェクター細胞の傷害機序を検討するため、EGTA(パーフォリン/グランザイム経路の阻害)、NaN<sub>3</sub> (MPO 阻害)、L-alanine, L-serine, glycine (HOCl のスカベンジャー)を傷害活性阻害剤とし

て用いた。

## 【結果】

未感作のエフェクター細胞は CHNV 感染細胞を殆ど傷害しないが、CHNV で感作することにより、33-59%の感染細胞を傷害した。単離した CTL が感染細胞を傷害すること、また CTL を除去したエフェクター細胞群の活性が、除去していない細胞群の活性と比べ約 1/2 に低下することから、誘導された傷害活性の担当細胞に CTL が含まれることが確認された。しかしながら、CTL を除去したエフェクター細胞群も有意に感染細胞を傷害することから、CTL 以外にもエフェクター細胞が存在することが示唆された。次にその傷害活性が単球によるという仮説のもと、付着・非付着性細胞の傷害活性を測定したところ、付着性細胞群(単球画分)は、非付着性細胞群よりも高い傷害活性を示した。また、MPO 阻害剤や HOCl スカベンジャーにより、その活性が有意に抑制されることから、単球は HOCl を産生してウイルス感染細胞を殺傷していることが示唆された。以上の結果から、ウイルス感染で誘導される主なエフェクター細胞には、CTL だけではなく活性化された単球も含まれることが示された。ウイルス感染時のみ傷害活性が誘導されることから、単球はウイルス感染によるなんらかの刺激により活性化され、感染細胞に対する傷害能を獲得すると考えられる。

## スポットドガーの顆粒球

近藤 昌和, 安本 信哉, 高橋 幸則  
水産大学校・生物生産学科

### Granulocytes of spotted gar

Masakazu Kondo, Shinya Yasumoto, Yukinori Takahashi  
Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University

#### 【目的】

演者らはこれまでに、各種魚類の好中球顆粒の種類数および染色性について調べ、その多様性について明らかにしてきた。魚類を含む脊椎動物の原始の系統とされているヌタウナギでは、好中球に好塩基性顆粒 ( $\gamma$  顆粒) のみが観察される。また、四肢動物が含まれる肉鰭綱のアフリカハイギョの一種 (*Protopterus annectens*) の好中球には、種々の染色性 (酸好性、塩基好性、異調アズール好性) を示す 1 種類の顆粒 (多染性顆粒) が存在することが明らかとなった。一方、真骨魚類とともに条鰭綱に含まれ、条鰭綱の中で最も祖先的と考えられている腕鰭亜綱に属する *Polypterus endlicheri* では、好酸性顆粒 ( $\alpha$  顆粒) と  $\gamma$  顆粒が認められている。また、真骨魚類は好中球顆粒の種類数の違いから 3 群 (I ~ III 群) に大別され、I 群には真骨魚類の中で、祖先種が最も早期に出現したアジアアロワナなどが含まれることから、I 群の好中球は、真骨魚類好中球の原型であると推察されている。I 群の好中球には、 $\alpha$  顆粒、難染性顆粒 ( $\beta$  顆粒) および  $\gamma$  顆粒の 3 種類の顆粒が認められているが、 $\beta$  顆粒は他の群の好中球にも観察され、ペルオキシダーゼ (PO) 活性が検出されている。しかし、ヌタウナギ、アフリカハイギョおよび *P. endlicheri* では PO は検出されていない。本研究では、条鰭綱のうち、腕鰭亜綱よりも新しく、真骨魚類 (ハレコストム区真骨亜区) とともに新鰭亜区に含まれるが、真骨魚類よりも古くに出現した鱗骨区ガー目のスポットドガー *Lepisosteus oculatus* の好中球顆粒の形態学的特徴を調べ、魚類好中球顆粒の系統進化について考察する。

#### 【材料と方法】

熱帯魚店で購入したスポットドガーを実験に供した。尾部血管から採血し、血液塗沫標本を作製して各種染色を施した。また、Zymosan A に対する食食の有無を調べた。

#### 【結果】

スポットドガーの血液中には、4 種類の顆粒球 (A 型好中球、B 型好中球、大型好酸球、小型好酸球) が観察され、このうち、2 種類の好中球には食食能が認められた。両好中球ともに、 $\beta$  顆粒を有していたが、A 型には  $\gamma$  顆粒も、B 型には  $\alpha$  顆粒も観察された。しかし、PO は、B 型の  $\beta$  顆粒にのみ検出された。大型の好酸性顆粒を有する大型好酸球にも PO が検出されたが、好酸性顆粒は PO 陰性であり、PO は小型の陽性顆粒として認められた。また、大型好酸球の好酸性顆粒は、ヘマトキシリン染色によって、青染された。

#### 【結論】

スポットドガーの血液中には、PO 陰性の  $\beta$  顆粒と  $\gamma$  顆粒を有する A 型好中球と、PO 陽性の  $\beta$  顆粒と  $\alpha$  顆粒を有する B 型好中球が存在した。両好中球の特徴は、真骨魚類 I 群の好中球の特徴 ( $\alpha$  顆粒、PO 陽性の  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒を有する) を二分したものと推察されるが、スポットドガー好中球と、真骨魚類 I 群の好中球のどちらが原始的なのかは、スポットドガーと姉妹群を形成するチョウザメ類と、この群と姉妹群を形成するアミア類の情報が必要であり、現在、検討中である。

## 皮膚に発現する二つのトラフグケモカイン

田内博久<sup>1</sup>, 末武弘章<sup>2</sup>, 菊池潔<sup>1</sup>, 鈴木譲<sup>1</sup>, 宮台俊明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大学・水産実験所, <sup>2</sup>福井県立大学・海洋生物資源学部

### Two chemokines in fugu skin

Hirohisa Tauchi<sup>1</sup>, Hiroaki Suetake<sup>2</sup>, Kiyoshi Kikuchi<sup>1</sup>, Yuzuru Suzuki<sup>1</sup>, Toshiaki Miyadai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fisheries Lab. The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural Univ.

#### 【目的】

魚類の表皮には白血球が集積しており、皮膚からの病原体の侵入に備えていると考えられる。皮膚への白血球の集積には、哺乳類ではケモカインCCL20とCCL27が関与する。本研究ではこれらケモカインに着目し、魚類皮膚での白血球集積の仕組みについて理解を深めることを目指した。

#### 【材料と方法】

トラフグを材料として RACE 法により、CCL20 と CCL27 の cDNA クローニングを行った。次に様々な組織における遺伝子発現を RT-PCR 法で調べた。後者については *in situ* hybridization 法により発現細胞の同定を目指した。

#### 【結果】

トラフグで見出された2つのケモカインのうち遺伝子構造や系統樹解析からひとつは哺乳類 CCL20 とのオーソログであると推定された。もうひとつは一次構造からは哺乳類の CCL27 と CCL28 の両方に類似しているのに対して、シンテニー解析からは CCL28 に対応しており、どちらのオーソログとも同定できなかったことから CCL27/28 と名付けた。RT-PCR 解析により CCL20 遺伝子は皮膚と腸で、CCL27/28 遺伝子は皮膚で発現が確認された。また両遺伝子とも鰓と

胸線で発現していた。さらに、*in situ* hybridization 法で解析したところ、CCL27/28 は表皮の上皮細胞に強く発現していた。この発現パターンは表皮におけるリンパ球の分布と合致していた。

#### 【結論】

これらのことから皮膚の白血球の集積にはケモカイン CCL20 と CCL27/28 が関与しているものと考察され、魚類の皮膚の構造は哺乳類と異なるにも関わらず、両者とも同様の白血球集積システムが皮膚に存在していると考えられる。また CCL20 と CCL27/28 では発現パターンが異なることから、同じく皮膚に発現するケモカインでも異なった機能をもっている可能性が示された。このように、魚類の皮膚における白血球の集積システムは複数のケモカインによってコントロールされているものと推定される。

## コイ末梢血白血球の培養におけるBリンパ球の増殖

仁井田祥光, 片倉文彦, 山口卓哉, 森友忠昭, 中西照幸  
 日本大学・獣医学科・魚病学研究室

### Growth of B cells in culture of carp (*Cyprinus carpio*) peripheral blood leukocytes

Yoshimitu Nida, Fumihiko Katakura, Takuya Yamaguchi, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi  
 Laboratory of Fish Pathology, Department of Veterinary Medicine, Nihon University

#### 【目的】

現在、アメリカナマズ(*Channel catfish*)を除いて魚類の末梢血白血球を長期培養した報告はない<sup>1)</sup>。そこで本研究では末梢血白血球の長期培養が他の魚種においても可能であるかを検討するため、支持細胞を用いてコイ末梢血白血球の長期培養を試みた。

#### 【材料および方法】

24 穴プレートで単層培養したギンブナ胸腺由来細胞株(GTS9)上にコイの末梢血より得た白血球を1wellあたり  $2.5 \times 10^6$  個ずつ播種した。培養液として20%FBS および2.5%コイ血清加 ERDF 培地を用い、この培養液にLPSを加えていないものをLPS (-) 培養、LPSを加え最終濃度  $500 \mu\text{g/ml}$  にしたものをLPS (+) 培養とし、 $30^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  存在下で培養した。また、継代培養にはLPS 不含培地を用いた。

#### 【結果】

いずれの培養条件においても支持細胞上で白血球の活発な増殖が観察され、5日程で細胞がwell全体にまで増殖した。増殖した細胞の一部を新たな支持細胞上へ継代し、これを繰り返すと、10代以上(約60日間)に亘り長期培養が可能であった。増殖した細胞の性状を調べるため、各種血球マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法により解析したところ、LPS (-) 培養において増殖した継代2代目の細胞では、*lck* (T細胞) 遺伝子と *M-CSFR* (単球・マクロフ

ァージ) 遺伝子を発現していたものの、*C $\mu$*  (IgM 定常領域, B細胞) 遺伝子の発現はわずかしみられず、その他の血球マーカー遺伝子の発現はみられなかった。また、継代4代目以降では *lck* 遺伝子と *M-CSFR* 遺伝子の発現のみがみられた。

一方、LPS (+) 培養において増殖した細胞は上記と同様に *lck* 遺伝子と *M-CSFR* 遺伝子を安定して発現していたのに加え、4代目および6代目においても *C $\mu$*  遺伝子を発現していた。現在、増殖したB細胞を含む細胞系の性状について詳細に解析中である。

#### 【結論】

コイ末梢血白血球は支持細胞上で長期培養可能であることがわかった。このことから、支持細胞が存在する場合、他の魚類においても末梢血白血球の長期培養が可能であることが示唆された。また培養下で増殖した細胞はT細胞系や単球・マクロファージ系の細胞であり、さらにLPSを加えて培養することでB細胞系の細胞も長期増殖すると考えられた。

#### 【参考文献】

1. Norman W. Miller, V. Gregory Chinchar and L. William Clem "Development of leukocyte cell lines from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*)" *Journal of Tissue Culture Methods* 16:117-123, 1994

## ギンブナにおける CD4, CD8 陽性 T 細胞サブセットの組織分布

小川 詩乃、戸田 秀明、柴崎 康宏、森友 忠昭、中西 照幸  
日大・生物資源

Tissue distribution of T-cell subsets in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*

Shino Ogawa, Hideaki Toda, Yasuhiro Shibasaki, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi  
College of Bioresource Sciences, Nihon University,

## 【目的】

両生類から哺乳類に至る脊椎動物において、胸腺が T 細胞の成熟の場であることは良く知られているが、魚類においては細胞レベルでは不明である。最近、我々はギンブナの CD4 および CD8 $\alpha$  に対するモノクローナル抗体(MAb)の作製に成功し、細胞レベルで T 細胞サブセットの動態を解析することが可能になった。そこで本研究では、これらの抗体を用いて胸腺をはじめとする各器官・組織における T 細胞サブセットの成長に伴う分布の変化について解析した。

## 【材料と方法】

供試魚として体重 0.05~60g (30 日令~6 歳) の奥尻島産ギンブナ (OB1) とを用いた。組織における分布については、胸腺、頭腎、体腎、脾臓、肝臓、鰓、腸及び末梢血について検討した。0.05~5g の個体については、2~10 尾の個体から得た組織をプールして用いた。抗 CD4 MAb および抗 CD8 $\alpha$  MAb を用いて蛍光免疫染色し、フローサイトメーター(FACS)を用いて CD4 $^{+}$  および CD8 $^{+}$  細胞数の割合を解析した。また、凍結切片を作製し、蛍光免疫染色により CD8 $^{+}$  細胞の組織内分布についても検討した。

## 【結果】

成魚において CD4 $^{+}$  細胞は、検討した全ての組織において認められ、胸腺、頭腎、体腎においては 15~25%認められた。一方、腸においては 2~6%と少なかった。CD8 $^{+}$  細胞は、胸腺において最も多く (15~27%)、次いで腸に多く認められた (4~20%)。CD4 $^{+}$  および CD8 $^{+}$  を両方発現する細胞 (DP 細胞) は胸腺のみに認められた (21~33%)。

成長に伴う T 細胞サブセットの分布の変化については、0.05~0.1g (30~38 日令) の胸腺におけ

る CD8 $^{+}$  細胞の割合が 0.2g 以上の個体に比べ有意に低かった。また、0.05~5g (30~130 日令) の胸腺において体重の増加や加齢とともに DP 細胞が増加する傾向が認められた。さらに、5g 以上の個体の腸や鰓において CD8 $^{+}$  細胞の割合が 5g 以下の個体に比べ有意に高かった。

頭腎、体腎、鰓及び腸において、CD8 $^{+}$  細胞の割合が体重の増加あるいは成長に伴い増加する傾向が認められた。CD4 $^{+}$  細胞については、腸において成長に伴い増加する傾向が認められたが、脾臓及び肝臓を除く器官では顕著な変化は認められなかった。なお、脾臓及び肝臓では体重 5g を境として CD4 $^{+}$  細胞の割合が低下した。

胸腺における DP 細胞は体重 2g (約 130 日令) を境として有意に増加する傾向が認められた。一方、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$  いずれも発現していない細胞 (DN 細胞) の割合は体重 0.05~5g のサイズにおいて低下する傾向が認められた。

## 【考察】

胸腺においてのみ、CD4 $^{+}$  および CD8 $^{+}$  を両方発現する細胞 (DP 細胞) が認められたことから、魚類においても胸腺が T 細胞の成熟の場であることが明らかとなった。

未成魚や成魚の腸において CD8 $^{+}$  細胞の割合が高かったことから、哺乳類と同様に腸においては CD8 $\alpha$  鎖をホモダイマーとして持つ T 細胞サブセット (CD8 $\alpha\alpha$ -TCR $\alpha\beta$  あるいは CD8 $\alpha\alpha$ -TCR $\gamma\delta$ ) の存在が示唆され興味深い。



## トラフグの TNF 受容体スーパーファミリー遺伝子の cDNA クローニング

末武弘章<sup>1</sup>、菊池潔<sup>2</sup>、鈴木譲<sup>2</sup>、宮台俊明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>福井県立大学・海洋生物資源, <sup>2</sup>東京大学・附属水産実験所

cDNA cloning of fugu TNFRSF genes

Hiroaki Suetake<sup>1</sup>, Kiyoshi Kikuchi<sup>2</sup>, Yuzuru Suzuki<sup>2</sup>, Toshiaki Miyadai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University,

<sup>2</sup>Fisheries Lab. The University of Tokyo

### 【目的】

TNF や LT などは免疫応答や免疫器官の形成において重要な役割を果たすサイトカインである。これらのサイトカインは TNF 受容体スーパーファミリー (TNFRSF) の受容体を介して作用することが知られている。そこで、これらのサイトカインの作用を明らかにすることを目指し、まず TNFRSF 遺伝子の cDNA クローニングを行った。

### 【材料と方法】

トラフグゲノム情報を利用し、TNFRSF 遺伝子を探索し、これらに特異的なプライマーを設計した。次に、トラフグの頭腎から抽出した全 RNA を材料に、RACE 法による cDNA クローニングを行った。得られた演繹アミノ酸配列をもとにドメイン解析や相同性解析、さらにゲノム情報を利用したシンテニー解析を行った。

### 【結果】

トラフグゲノム上で近接する 2 つの TNFRSF 遺伝

子の cDNA クローニングを行い、その演繹アミノ酸配列を解析したところ、ともに TNFRSF の膜タンパク質であった。一方は細胞内領域にデスドメインをもっており、BLAST 解析ではデスドメインをもつヒトなどの TNFRSF1A と最も高い相同性を示した。一方、もう一つはデスドメインを持たず、BLAST 解析によると哺乳類の TNFRSF の中では CD40 と最も相同性が高かった。シンテニー解析の結果、このゲノム領域はヒト CD40 遺伝子ではなくヒト TNFRSF1A 遺伝子周辺ゲノム領域と近い構成をとっていた。

### 【結論】

魚類でも哺乳類と同様に TNFRSF 遺伝子はゲノム上でクラスターを形成しており、少なくともこのうちの一つは一次構造やゲノム上の位置からヒト TNFRSF1A 遺伝子のオーソログであると考えられた。

## 北西太平洋に棲息するミンククジラの精巣組織における ブルセラ菌感染と炎症に関する研究

阿部 瑛理香<sup>1,2</sup>、大石 和恵<sup>1</sup>、斎藤 雅史<sup>1,2</sup>、坂東 武治<sup>3</sup>、藤瀬 良弘<sup>3</sup>、丸山 正<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究プログラム、  
<sup>2</sup>東京海洋大学大学院・海洋科学研究科、<sup>3</sup>財団法人日本鯨類研究所

### Infection of *Brucella* spp. and the inflammation in the testes of common minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) inhabiting western North Pacific.

Erika Abe<sup>1,2</sup>, Kazue Ohishi<sup>1</sup>, Masafumi Saitoh<sup>1,2</sup>, Takeharu Bando<sup>3</sup>, Yoshihiro Fujise<sup>3</sup>, Tadashi Maruyama<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,  
<sup>1</sup>Marine Biodiversity Research Program, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,  
<sup>3</sup>Institute of Cetacean Research, Research Division

#### 【目的】

北西太平洋に棲息する鯨類のブルセラ菌の感染を調べるため、標的となる生殖組織を中心に菌の検出を試みた。同時に病巣の認められる精巣組織における免疫応答を病理学的に調べた。

#### 【材料と方法】

2008、2009年の北西太平洋鯨類捕獲調査(JARPNII)ならびに南極海鯨類捕獲調査(JARPAII)により得たミンククジラ(*Balaenoptera acutorostrata*)、ニタリクジラ(*Balaenoptera edeni*)、クロミンククジラ(*Balaenoptera bonarensis*)の生殖器官(精巣、胎盤)と脾臓サンプルを材料とした。凍結組織からDNAとRNAを抽出し、特異的プライマーを用いたPCRとRT-PCRによりブルセラ菌遺伝子の検出と発現を調べた。同時に、宿主の免疫応答を調べるために、TLR4、Hsp70、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ の特異的RT-PCRを行い、発現を調べた。ホルマリン固定組織からは薄型切片を作成し、HE染色と免疫染色により病理学的検索を行った。

#### 【結果】

調べた33個体のサンプルの中で、肉芽腫の観察された2008年捕獲のミンククジラ精巣組織1サンプルでブルセラ菌特異的なDNA断片が検出された。調べたミンククジラの残り4個の精巣、8個の胎盤、ニタリクジラの9個の胎盤、3個の脾臓、2個の精巣、クロミンククジラの2個の精巣、1個の胎盤からは検出されなかった。検出されたDNAの解析から2000年に報告されたミンククジラと同じタイプのブルセラ菌であることが示唆された。しかし、ブルセラ菌のmRNAは検出されなかった。この固定組織サンプルではリンパ球の浸潤、多核巨細胞が観察され、ブルセラ菌の感染が示唆されたが、特異的抗体では染色されなかった。Hsp70は調べたすべての組織で発現が見られたが、その他の免疫因子の発現はいずれのサンプルでも極めて低かった。

#### 【結論】

今回調べた北西太平洋のミンククジラ1個体で、肉芽腫を伴う精巣が観察され、ブルセラ菌遺伝子がPCRによって検出されたが、その生菌濃度と活性は極めて低かった。病巣と今回調べた免疫因子の発現の間に相関は認められなかった。

## 脾臓摘出マウスへの窒素含有ビスホスホネート投与により誘導された肝臓 内赤血球造血について

大塚 裕忠<sup>1</sup>、中村 雅典<sup>1</sup>

<sup>1</sup>昭和大学・口腔解剖学教室

**Hepatic erythropoiesis induced in splenectomized mice by nitrogen-containing bisphosphonates treatment**

Hirotsuda Otsuka<sup>1</sup>, Masanori Nakamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Anatomy, Showa University

### 【目的】

マウスにおいて、骨吸収抑制剤である窒素含有ビスホスホネート（以下 NBP）の腹腔内投与により、骨髄常在性マクロファージが駆逐され、脾臓での髄外造血が亢進することが知られている<sup>[1]</sup>。

今回、脾臓摘出マウスに NBP を投与することによって生じる造血系の変化について確認するとともに、そのメカニズムを考察するために、形態学的手法を中心に検索を実施した。

### 【材料と方法】

6 週齢雌マウス (BALB/c) を用い、脾臓摘出 1 週間後に、臨床的に使用されている NBP であるアレンドロネートを腹腔内投与し、経日的に血液、肝臓及び骨髄を採取し、ヘマトクリット値の計測、HE 染色、免疫組織化学、RT-PCR、通常電顕及び免疫電顕により検索をおこなった。

### 【結果】

NBP 投与群において、骨髄の白色化が確認された。しかしながら、NBP 投与群においても、貧血を呈する個体は確認されなかった。

NBP 投与群の肝臓において、投与 4 日後から巨核球の出現と単核細胞の集簇が認められた。これら細胞群に対して免疫組織化学を実施したところ、TER119 陽性の細胞集団が確認された。さらに二重免疫蛍光染色および免疫電顕により、これらの細胞集団がマクロファージを中心とした赤芽球の集団である

erythroblastic island であることが確認できた。

また、RT-PCR により、造血に関する転写因子 GATA-1 や EPO レセプターの発現が亢進していることが確認された。

### 【結論】

今回、赤血球系分化・成熟に関与しているストローマである骨髄常在性マクロファージを駆逐することにより、肝臓への髄外造血の誘導が出来た。また、この肝臓内造血に関与しているセントラルマクロファージは、クッパー細胞である可能性が高い。このことは、高度に分化の進んだ組織マクロファージであっても、生理的または病理的な状態の変化により、正常時以外の機能を発揮することにより、恒常性の維持に関与する可能性を示唆している。

### 【参考文献】

1. Nakamura M, Yagi H, Endo Y, Kosugi H, Ishi T, Itoh T. (1999) *Br J Haematol.* 107: 779-90.

## 乳酸はウマ多形核白血球の活性酸素産生を調節する

越後谷裕介<sup>1</sup>, 森田祥平<sup>1</sup>, 伊藤琢也<sup>1</sup>, 酒井健夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 日本大学動物医科学研究センター・獣医衛生学研究室

### Effect of Lactic acid on ROS production by equine polymorphonuclear leukocytes

Yusuke Echigoya<sup>1</sup>, Shouhei Morita<sup>1</sup>, Takuya Itou<sup>1</sup>, Takeo Sakai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Nihon University Veterinary Research Center

#### 【目的】

高強度運動は、多形核白血球 (PMN) の活性酸素種 (ROS) 産生を亢進し、組織障害を誘発する。一方、運動動物であるウマの乳酸は、高強度運動時において、血液内では 30 mM、骨格筋内では 250 mM にまで達し、運動によって PMN が曝される生体内環境の大きな変化の一つである。しかし、運動によって大量に産生される乳酸が PMN の機能にどのような影響を及ぼすのかは不明な点が多い。そこで本研究では、乳酸が自然免疫機構へどのような作用をもたらすのかを解明するため、ウマ PMN の ROS 産生に及ぼす乳酸の影響を調べた。

#### 【材料と方法】

競技馬としてトレーニングされたサラブレッド (5~11 歳) の頸静脈からヘパリン添加真空採血管により、40 ml の血液を採取した。PMN は、リンホブレップ (ニコメッド・ファーマ) を用いた比重遠心法により分離した。分離した PMN は、pH 7.4 に調整した各乳酸濃度 (0~300 mM) で、ウマの乳酸半減期に近い 30 分間インキュベートした後、ウマ PMN の ROS 産生量をルミノール依存性化学発光法によって測定した。また、乳酸インキュベート後に刺激剤として PMA、およびオプソニン化ザイモサン (OZ)、fMLF を添加し、PMN の ROS 産生量を測定した。刺激剤で誘導された ROS 産生能は、刺激時の ROS 産生量を非刺激時の産生量で除した値を反応割合として評価した。乳酸による PMN の形態変化は、フローサイトメトリーおよび光顕を用いて観察した。

#### 【結果】

運動後の血液中濃度付近である 1~50 mM 乳酸のインキュベートによって、刺激前のウマ PMN の ROS 産生量は乳酸無添加と比べて、有意に抑制された。一方、骨格筋内の乳酸濃度である 200~300 mM のインキュベートでは、約 2 倍に増強された。刺激剤によるウマ PMN の ROS 産生能は、PMA では 30 mM、OZ では 1 mM、fMLF では 50 mM の乳酸濃度においてそれぞれ最も高い反応を示した。100 mM 以上の乳酸濃度では、いずれの刺激剤に対してもウマ PMN の ROS 産生能は増強されなかった。また、乳酸のインキュベートによってウマ PMN は、細胞質の縮小および密度増加、核の膨化といった顕著な形態学的変化が認められた。

#### 【結論】

乳酸は運動によって最もその濃度変動する生体内物質であるにも関わらず、これまで乳酸が自然免疫細胞へ直接及ぼす影響は報告されていない。本研究により、乳酸は濃度依存的にウマ PMN の形態的变化をもたらし、また PMN の ROS 産生能を調節していることが明らかとなった。1~50 mM の低濃度の乳酸がウマ PMN の ROS 産生に対して抑制作用または抗酸化作用を持つことから、乳酸は ROS による組織障害から生体を保護する役割を持つことが推察された。また、特定の乳酸濃度においては PMN の ROS 産生能が増強されたことから、乳酸は PMN の機能的変化を誘導することによってウマの感染防御機構を調節することが明らかとなった。

## クッパー細胞の活性制御における脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) の関与

澤田知夫、清平美和、宮崎啓史、徳田信子、安達泰弘、大和田祐二

山口大学大学院 医学系研究科 器官解剖学分野

Fatty-acid binding protein 7 may regulate the Kupffer cell phagocytosis on damaged liver  
Tomoo Sawada, Miwa Kiyohira, Hirofumi Miyazaki, Nobuko Tokuda, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada  
Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

## [目的]

水に不溶な長鎖脂肪酸をリガンドとし、その細胞内キャリアーとして長鎖脂肪酸の細胞内動態を制御する脂肪酸結合蛋白質 (Fatty Acid Binding Protein: FABP) は、加えて細胞の分化や機能発現の制御にも関与する可能性が考えられている。FABP の一つである FABP7 はマウスのマクロファージ系細胞の中で肝クッパー細胞のみに発現している<sup>1)</sup>。昨年、本学会において我々は、FABP7 ノックアウトマウス (FABP7-KO) が四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) による肝傷害時に、野生型 (Wild) に比べて有意に高い血中 ALT 値の上昇を示すこと、また肝細胞壊死領域へのマクロファージ系細胞の集積が FABP7-KO において少ないことを報告した。このことから我々は、肝組織内で傷害を受けた細胞を除去する能力が FABP-KO マウスでは低下しているのではないかと考え、クッパー細胞の食食作用について Wild と FABP7-KO の間での比較を行った。

## [材料と方法]

デキサメサゾンでアポトーシスを誘導したマウス胸腺細胞を CMFDA で蛍光ラベルし、B57/BL マウスの Wild および FABP-KO の門脈に静注した。10 分後に肝を 10%ホルマリンで固定し、凍結切片を F4/80 の免疫染色した後に、F4/80 陽性細胞 (クッパー細胞) に捕捉された CMFDA 陽性胸腺細胞の数を計測した。また、Wild および FABP7-KO マウスに CCl<sub>4</sub> を投与し、6, 12, 24, 48 時間後に TUNEL 染色と F4/80 で二重染色し、TUNEL 陽性細胞への F4/80 陽性細胞の接触や集積について観察し、比較した。また、マクロファージ系細胞株 J774 に FABP7 遺伝子を導入した FABP7 強制発現株を作成し、それら細胞株のアポトーシス細胞に対する食食活性の変化について検討した。

## [結果]

肝クッパー細胞に捕捉されたアポトーシス胸腺細胞の数は、FABP-KO マウスでは Wild マ

ウスの約半分であり、FABP7-KO マウスのクッパー細胞では、アポトーシス細胞に対する認識あるいは食食活性が有意に低下していた。さらに、CCl<sub>4</sub> 投与後の肝の TUNEL 陽性細胞は投与後 12~24 時間で観察され、TUNEL 陽性細胞を F4/80 陽性細胞が取り囲む像は、FABP7-KO マウスの方が Wild マウスに比べて少なかった (投与 12 時間後)。

また、J774 に FABP7 遺伝子を導入した FABP7 強制発現株によるアポトーシス胸腺細胞の食食においては、phagocytosis 指数 (食食している細胞数 / 全細胞: %) でははっきりとした差が見られなかったが、attachment 指数 (胸腺細胞を付着させている細胞数 / 全細胞: %) と 1 個当たり付着した胸腺細胞の数においては、強制発現株でやや高くなる傾向が見られた。これらについては、さらに検討中である。

## [結論]

前回の発表で、CCl<sub>4</sub> 投与後の血清 ALT 値が FABP-KO で高い原因に関して、FABP-KO のクッパー細胞では肝細胞傷害に反応し分泌される炎症性サイトカインの量が多いという可能性と、FABP7-KO では傷害を受けた肝細胞を除去する能力が低下している可能性を提起した。

今回我々は、上記 2 つの可能性のうち、少なくともクッパー細胞の食食能が FABP7-KO マウスにおいて有意に低下し、クッパー細胞あるいは炎症により肝内に浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性) の傷害肝細胞への接触・包込み反応も FABP7-KO で低下していることを示すデータを得た。

FABP7 強制発現が培養細胞株 J774 の機能に及ぼす影響についてはまだ明確ではなく、今後サイトカイン産生や表面抗原発現の変化についても検討したい。

## [参考文献]

1. Abdelwahab SA, Owada Y, et al. (2003) *Histochem Cell Biol* 119, 469-475.

古田賞受賞講演：FP

# 魚類（トラフグ）の生体防御機構に関する研究

## —トラフグゲノム解読の魚類免疫学へのインパクト—

末武弘章<sup>1</sup>, 鈴木 譲<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福井県立大学・海洋生物資源学部, <sup>2</sup>東京大学・大学院農学生命科学研究科・水産実験所

**Defense mechanisms of fish: Impacts of fugu genome analysis on fish immunology.**

Hiroaki Suetake<sup>1</sup>, Yuzuru Suzuki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University, <sup>2</sup> Fisheries Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

水産増養殖の最大の課題である病気の克服には、生体防御機構の理解が必須であるが、特に重要な獲得免疫の核心部分でさえ長い間手つかずの状態であった。それを革新的に進展させたのが2002年に公表されたフグゲノムの解読であった。海産魚飼育設備の充実した水産実験所という場を活かし、我々はトラフグを材料とした免疫研究に取り組んできた。

### 【魚類のヘルパーT細胞】

魚類でも抗体やその産生細胞であるB細胞に関する研究は盛んであったが、獲得免疫系の中心的な役割を果たすT細胞、中でも免疫応答を制御するヘルパーT細胞は同定されていなかった。ヘルパーT細胞は、哺乳類ではCD4分子を発現している。我々は公表されたトラフグゲノムデータを利用し、魚類で初めてトラフグのCD4遺伝子を同定した<sup>[1]</sup>。この分子は既知のCD4とは相同性が著しく低く、従来法ではその同定は無理であっただろう。CD4に対する抗体により分離したCD4陽性のリンパ球はヘルパーT細胞に特徴的なサイトカインを産生することから魚類のヘルパーT細胞であるものと考えている。

### 【魚類の抗原提示細胞】

獲得免疫応答はマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞が抗原を取り込み、その断片を、MHCクラスIIを介してT細胞に提示することから開始される。T細胞の活性は抗原提示細胞上の共刺激分子

B7により制御されるが、このB7を指標にトラフグ末梢血の単球画分中に魚類で初めて抗原提示細胞を同定することができた<sup>[2]</sup>。3種類のB7の内2種類はT細胞の増殖を促進するが、他の1種類は抑制するという興味深い結果も得られた。

### 【魚類の粘膜免疫系】

消化管だけでなく体表も覆う魚類の粘液には抗体も含まれている。体表の粘膜免疫系を探る目的で、腸管上皮に発現し、抗体の運搬に関与する分子pIgRを魚類で初めて同定した<sup>[3]</sup>。この分子が体表にも発現していることから、魚類体表も粘膜免疫系の一員として重要であることが示された。

トラフグのゲノム解読により、他にもサイトカインやケモカインなど、数多くの免疫系の因子が解明されてきた。魚類の獲得免疫機構解明に向けて、それらの情報をフルに活用することにより、さらに本格的な取り組みを進めて行きたい。

### 【参考文献】

1. Suetake H, Araki K, Suzuki Y (2004) Immunogenetics, 56: 368-374
2. Sugamata R, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y (2009) J Immunol, 182:6799-6806
3. Hamuro K, Suetake H, Saha N R, Kikuchi K, Suzuki Y (2007) J Immunol, 178: 5682-5689

特別講演：SL



## マダニの原虫媒介に血液消化酵素が果たす役割

藤崎 幸蔵<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大学・先端獣医科学講座

### A cysteine protease exerts a killing effect against the midgut-stage *Babesia* parasites in *Haemaphysalis* ticks.

Kozo Fujisaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Frontier Veterinary Medicine, Kagoshima University

#### 【背景】

バベシア症に代表されるマダニが媒介する原虫疾患 (Tick-borne Protozoan Diseases: TPD) の多くは、世界的流行を有する人獣共通感染症であり、罹患した動物やヒトに致死的なものが少なくない。また、感染から回復しても宿主動物体内に病原虫が潜伏しやすく、媒介マダニはこれを吸血・摂取して増幅し新たな感染源となることから、TPD の根絶は一般に極めて困難である。加えて、いずれの TPD に対しても特効的な薬剤やワクチンが未開発であり、国際交易の拡大・迅速化や地球温暖化と相まって、TPD によってヒトや動物がこうむる脅威は、急増・深刻化の一途にある。これらのことから、TPD に対する対策の開発と確立は、国内外において急務となっている。

#### 【材料と方法】

我々は、マダニの生存戦略と原虫媒介の分子基盤を解明することによって、TPD 防圧のための新たなパラダイムの構築が可能であるとの観点に立ち、アジア地域において最も重要な人獣寄生性のマダニであり、*Babesia* 原虫の主要媒介者となっているフタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* について、その生存戦略にとって必須の基盤である吸血・消化と、疾病媒介の成否を左右する自然免疫の分子機構を担っている生物活性分子群 tick-bioactive molecules (TBM) の特性と機能を解明するとともに、TBM がマダニ体内の *Babesia* 原虫の発育・伝搬増殖に及ぼす影響を明らかにするための総合的研究を展開してきた。

#### 【結果】

本講演では、研究成果の中から、マダニのヘモグロビン分解経路に参画するシステインプロテアーゼ (longipain) について、この酵素が中腸細胞における血液消化に加えて、バベシア原虫媒介においても大きな役割を果たしている多機能分子であることをまず紹介したい<sup>[1]</sup>。次いで、longipain を阻害するシスタチン (Hlcyst) の存在<sup>[2]</sup>とこれによるバベシア原虫の増殖阻害や、抗菌ペプチドとして有名なディフェンシン (longicin) がマダニ体内におけるバベシア原虫の発育阻止に機能しているという発見<sup>[3]</sup>について触れることにしたい。これらの一連の成績は、マダニ体内における *Babesia* 原虫の発育・伝播に関わる多様な TBM の存在を、世界に先駆けて明らかにしたものである。また、このように複雑な媒介者と病原体の分子間相互作用を支配・統合する可能性のあるシステムとして、我々は、TOR 情報伝達経路に注目しており、本講演ではこれまで明らかになったマダニの TOR 経路と原虫媒介の関わりについても、一部を紹介したいと考えている<sup>[4]</sup>。

#### 【参考文献】

1. Tsuji N et al. (2008) PLoS Pathog, 4:e1000062
2. Zhou J et al. (2006) Insect Biochem Mol Biol, 36: 27-535
3. Tsuji N et al. (2007) Infect Immun, 75:3633-3640
4. Boldbaatar et al. (2010): Insect Biochem Mol Biol, 40: 49-57

シンポジウム

免疫の応答と制御の比較生物学

S1 ~ S6

## 内因性リガンドに対する病原体センサー応答の制御機構

三宅健介

東京大学医科学研究所・感染遺伝学分野

### Molecular mechanisms controlling homeostatic activation of pathogen sensors by endogenous ligands

Kensuke Miyake

Department of Microbiology and Immunology, Inst. Med. Sci., the University of Tokyo

我々の免疫システムは、病原体由来の成分に特異的に応答し、感染防御反応を誘導する病原体センサーという分子群を有している。その中で、最初に報告されたファミリーが Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) である。TLR は免疫細胞ばかりでなく、上皮細胞などにも広範に発現しており、全身での免疫応答ばかりでなく、局所における炎症反応の誘導にも重要な役割を担っている。ヒトは TLR1 から TLR10 まで機能しており、菌体膜由来の糖質、脂質成分、病原体由来核酸などと特異的に結合することで、認識する。TLR と病原体成分の特異的結合は、構造生物学的に明らかにされつつある。

TLR は病原体に特異的な成分に結合するが、その特異性は必ずしも完全なものではなく、類似する自己成分にも応答することが分かりつつある。特に、TLR3、TLR7、TLR9 は病原体由来の核酸を認識するが、自己核酸に対しても反応しうることが報告されている。核酸は、自己免疫疾患において、代表的な自己抗原である。これまで、自己免疫疾患は獲得免疫の寛容破綻と説明されてきたが、本来タンパク質に対する応答である獲得免疫が、なぜ核酸に対して応答するのか、わかっていなかった。TLR の発見を契機に、自己免疫疾患の病態が、自然免疫系における寛容の破綻として、理解され始めている。実際にマウスモデルにおいては、RNA、DNA に応答する TLR7、TLR9 が様々な自己免疫疾患に関わっていることが報告されつつある。

核酸特異的 TLR がいかにして、自己に対する応

答性を制御しているのか、という点については、かなり理解が進んできた。核酸は細胞表面ではなく、エンドリソソームで認識される。核酸、およびセンサーのエンドリソソームへの輸送は、厳しく制限されており、その制御機構が、自己と病原体の核酸の識別に重要であることが明らかとなっている。特に、TLR の輸送については、輸送制御に関わる分子として、Unc93B1 という分子が重要な役割を果たしている。TLR7、TLR9 は Unc93B1 とともに小胞体に普段は局在している。核酸が取り込まれて、細胞が活性化された時にはじめて、TLR はエンドリソソームに輸送されるが、Unc93B1 は TLR7、TLR9 と直接会合し、輸送している分子である。この分子が核酸認識 TLR と会合できなくなると、TLR 依存性の核酸応答が欠損してしまい、ヒトでは、ヘルペス脳炎にかかりやすくなることが分かっている。

我々は、この Unc93B1 が TLR7、TLR9 と会合し、輸送する時に、TLR9 を優先していることを見出している。つまりこの分子は核酸応答に必須であるばかりでなく、その応答を DNA と RNA の間でバランスをとる様に制御しており、しかも普段は TLR 依存性の核酸応答を DNA (TLR9) 側に傾けている事を見出した。この結論についての我々の最近の結果を紹介するとともに、なぜ、そのような制御が必要なのか、という点について、我々の考え方も併せて紹介する。

## マウス免疫応答におけるヘルパーT細胞の役割と分化制御

吉村 昭彦

慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室

Function and developmental regulation of helper T cells in immune responses in mice

Akihiko Yoshimura

Department of Microbiology and Immunology,

Keio University School of Medicine

ヘルパーT細胞は免疫の中樞と呼ばれ、正の応答を起こすエフェクターT細胞と、積極的に負の応答を促す抑制性T細胞が存在し、互いに相互抑制することで適正な免疫応答が進行する。エフェクターT細胞としてこれまでTh1およびTh2細胞が、また制御性T細胞として胸腺由来のFoxp3陽性Treg (naturally occurring Treg, nTreg) が知られていた。Th1はIL-12やIFN $\gamma$ によって分化誘導され主にIFN $\gamma$ を産生する。マクロファージを活性化し細胞内寄生細菌の排除の他、炎症性疾患に関与する。Th2はIL-4によって分化し、IL-4, IL-5, IL-13などを産生する。好酸球やIgEを介して寄生虫感染防御に働く他アレルギー性疾患に関与する。nTregはFoxp3をマスター遺伝子とし、Th1やTh2の抑制に働く。

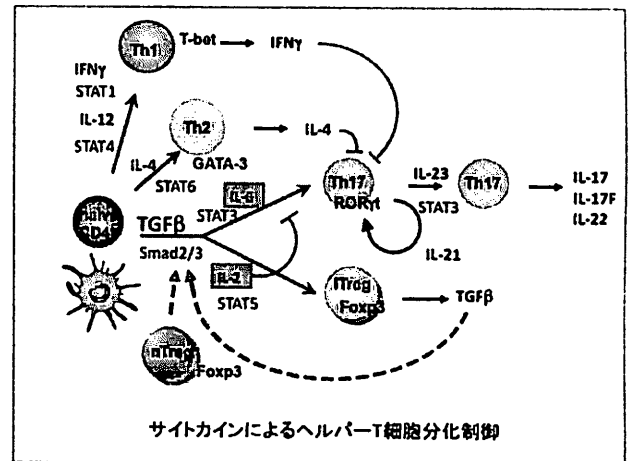
Foxp3は抑制性T細胞Tregのマスター遺伝子として機能し、CD25やCTLA4の発現を上昇させ、一方でエフェクターサイトカイン(IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17など)の産生を抑制する。Foxp3は、自己免疫のみならず、食物、アレルゲンといった非自己抗原に対する免疫応答、すなわちアレルギー反応をも負に調節していると考えられる。

これら古典的なTh細胞に対して、2000年以降にTh1, Th2とは異なり、IL-17を産生するCD4<sup>+</sup>T細胞サブセットTh17が存在することが知られるようになった。IL-17は多くの細胞に作用し、IL-6, TNF $\alpha$ , G-CSFやCXCL1/2, IL-8などの好中球遊走ケモカイン、iNOS, COX-2等の産生を誘導する。またIL-17は $\beta$ ディフェンシンなどの抗菌ペプチドを誘導するなど真菌感染の防御にも重要な役割を果たす。

Th17の初期分化にはTGF $\beta$ とIL-6が、増幅や成熟にはIL-21とIL-23が作用する。IL-6, IL-21, IL-23は転写因子STAT3の活性化する。したがってSTAT3はTh17分化に必須である。一方Th1サイトカインであるIFN $\gamma$ 、Th2サイトカインであるIL-4はそれぞれSTAT1, STAT6を活性化し、Th17を抑制する。

同時期に未感作(ナイーブ)T細胞にTGF $\beta$ 存在下

で抗原刺激を与えるとFoxp3が誘導され、nTregと同じく抑制的に機能することが明らかにされた。すなわちTGF $\beta$ はFoxp3陰性T細胞からFoxp3陽性T細胞を生み出す作用がある。このようにTGF $\beta$ で誘導されるFoxp3陽性細胞を、inducible-Treg (iTreg)と呼ぶ。このようにTGF $\beta$ には炎症性Th17と免疫抑制性iTregを誘導する相反する作用を持っている。



我々はTGF $\beta$ の免疫抑制機構について転写因子のレベルでの解析を行っている。Foxp3プロモーターの解析およびSmad2, Smad3欠損マウスの解析からTregのマスター遺伝子であるFoxp3の誘導にはSmad2とSmad3が必要であること、Th17のマスター遺伝子であるROR $\gamma$ tにはSmad2/3は必要ないことなどを明らかにした。またTGF $\beta$ によるIFN $\gamma$ の抑制にはFoxp3に依存しないことも明らかにした。このようなサイトカインネットワークによるヘルパーT細胞制御のメカニズムの解明は自己免疫疾患やアレルギー性疾患の新しい治療法の開発につながるものと期待される。

参考文献:

Akihiko Yoshimura, Cellular and Molecular Basis for the Regulation of Inflammation by TGF- $\beta$   
*J. Biochemistry, in press doi:10.1093/jb/mvq043*

## ショウジョウバエの免疫応答と制御

倉田 祥一朗<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北大学・大学院薬学研究科

### Regulation of immune responses in *Drosophila*.

Shoichiro Kurata<sup>1</sup>

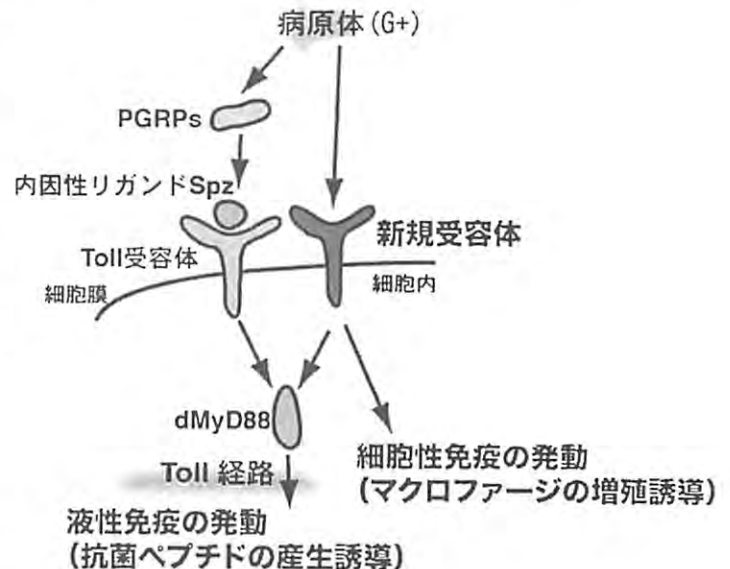
<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

ショウジョウバエは、病原体が体内に侵入すると、細胞性と体液性の免疫応答を誘導し排除する。その際、病原体を認識しそれらの免疫応答を誘導する病原体認識タンパク質として、ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) ファミリーと、グラム陰性菌認識タンパク質 (GNBP) ファミリーが機能していることが明らかとなっている。

我々は、機能獲得型変異体のゲノムワイドスクリーニング系を確立し、PGRP-LE を同定した<sup>[1]</sup>。PGRP-LE は、ジアミノピメリン酸 (DAP) 型ペプチドグリカンを認識し、DAP 型ペプチドグリカンを有する細菌に対する感染抵抗性に重要な役割を果たしている<sup>[1, 2]</sup>。ショウジョウバエの主要な体液性免疫応答として抗菌ペプチドの産生誘導があり、imd 経路と Toll 経路と呼ばれる細胞内シグナル伝達系によって制御されている。PGRP-LE は、この imd 経路を特異的に活性化して抗菌ペプチドの産生誘導に関わると共に<sup>[3, 4]</sup>、これとは独立して細胞内分解系であるオートファジーを誘導して細胞内寄生細菌の排除を行う<sup>[5]</sup>。

PGRP-LE を同定したゲノムワイドスクリーニング系は、GAL4/UAS システムを利用してゲノムワイドに特定の遺伝子の過剰発現を誘導し、それにより感染が無くとも抗菌ペプチドの産生が誘導される系統を同定する。これまでに、おおよそ 12, 000 系統の解析を終了し、遺伝学的に独立した 4 系統を同定している。ショウジョウバエゲノムに同定された遺伝子数が 13, 000 あまりであることからわかるように、世界有数の規模でのスクリーニングである。

本シンポジウムでは、このゲノムワイドスクリーニングで同定した新規受容体について紹介する。この新規受容体は、Toll 経路を制御する Toll 受容体とは独立して働くものの、Toll 受容体の下流で働く dMyD88 を介して体液性免疫応答を誘導すると共に、dMyD88 を介さないで細胞性免疫応答を誘導することで、グラム陽性菌の感染抵抗性の発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (下図)。



#### 【文献】

1. Takehana et al. (2002) PNAS 99, 13705-13710.
2. Takehana et al. (2004) EMBO J. 23, 4690-4700.
3. Lim et al. (2006) JBC 281, 8286-8295.
4. Kaneko et al. (2006) Nature Immunol. 7, 715-723.
5. Yano et al. (2008) Nature Immunol. 9, 908-916.

## 病原体媒介蚊の免疫ロジー

嘉糠 洋陸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>帯広畜産大学原虫病研究センター・節足動物衛生工学分野

### Host defense in pathogen-transmitting vector mosquito.

Hirota Kanuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vector Biology Unit, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

マラリアという病気は、蚊によって伝わることは誰でも知っている。それは時によって“吸血時の物理的な接触によって病原体がうつる”と誤解されていることが多い。しかし実際には、マラリア原虫などの病原体はそれを運ぶ節足動物の体内における固有のライフサイクルを持っており、その体内での増殖・分化の過程を経て、次の宿主へと媒介される。興味深いことに、節足動物自身は病気になることはなく、“病原体を運搬するカーゴ”としてのみ機能している。蚊によって媒介される感染症には、マラリアの他に西ナイル熱・日本脳炎・フィラリアなどがあり、依然として世界的に大きな問題となっている。

蚊の一種であるハマダラカは、マラリア原虫を媒介する重要な病原体媒介節足動物である。マラリア原虫にとってハマダラカの中腸は、「有性生殖からザイゴート形成→オーキネートによる中腸通過→中腸体腔におけるオーシスト形成」と連なる生活環の一部を展開するのに必須な器官である。多くの節足動物の中腸には、様々なポピュレーションによって構成される腸内細菌叢が存在し、複雑な中腸環境を作り出す一助になっていることが古くから知られている。また、これらの腸内細菌がマラリア原虫の生存、分化または増殖に何らかの影響を及ぼしている可能性が従来から示唆されている。

我々はこれまでの研究から、吸血依存性にハマダラカ腸内細菌数が一過性に増加すること、それに起因してマラリア原虫感染が抑制されることを見出している。この吸血後 24 時間というウィンドウでは、

マラリア原虫オーキネートが中腸組織を通過するタイミングが含まれる。

マラリア原虫を媒介する蚊を模した疑似昆虫宿主として、我々は研究室レベルの実験動物昆虫であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を後居している。マラリア原虫-ショウジョウバエ感染系を用いた遺伝学的スクリーニングにより、C 型レクチン蛋白質 Furrowed がマラリア原虫の発育を抑制することが明らかとなった。また、この Furrowed の発現は、吸血時に中腸において誘導されることも示された。この Furrowed の発現をハマダラカにおいて人為的に誘導すると、中腸体腔側に形成されるマラリア原虫オーシストの数が減少することが明らかとなった。これらのことから、ハマダラカ・腸管内細菌叢・マラリア原虫の三者の間には、複雑な相互関係が存在することが示唆された。自然界に広く存在する常在菌と節足動物媒介性病原体とのインターフェースは、吸血性節足動物により媒介される多くの感染症コントロールを目指す基盤構築に大きく貢献するものと考えられる。現在、腸内細菌によるマラリア原虫数制御のメカニズムについて解明を進めており、最新の結果を含めて報告する。

## 昆虫サイトカインによる細胞性自然免疫活性調節機構

早川 洋一

佐賀大学・応用生物科学科

Regulatory mechanism of insect cellular innate immunity by a cytokine, growth-blocking peptide (GBP).

Yoichi Hayakawa

Department of Applied Biological Sciences, Saga University

### 【背景】

キイロショウジョウバエにおける抗菌ペプチド遺伝子発現誘導調節に関する研究は、基礎生物学のみならず様々な研究分野における自然免疫研究に大きな影響を与えて来たことは周知の事実である。特に、その細胞内情報伝達経路に関する解析知見は、哺乳類の自然免疫系の研究にも大きな影響を与えて来た。こうした細胞内情報伝達系に関する活発な研究とは対比的に、自然免疫系活性調節に関与する昆虫サイトカインについては（哺乳類に比べ）非常に研究が遅れていることも事実である。さらに、また、昆虫においては、抗菌ペプチドによる生体防御のような液性免疫活性系の研究に比べ、血球細胞が直接生体防御に関与する細胞性免疫に関する研究例が極めて乏しいというのも事実である。

私達は、最近、昆虫サイトカイン growth-blocking peptide (以下、GBP と省略)による血球細胞活性化のメカニズムの解析を行い、新たな細胞成分を同定した。今回は、この細胞性免疫に関与する新規血球細胞因子について紹介したい。

### 【結果・考察】

今回、解析に用いたアワヨトウ幼虫は、蛾や蝶の仲間（鱗翅目昆虫）で、その形態の違いからおおよそ4種類の血球細胞に区別できる— 顆粒細胞、プラズマ細胞、エノシトイド、小球細胞。この内、顆粒細胞とプラズマ細胞が全体の約7割以上を占める免疫活性の高い血球細胞である。

アワヨトウ終齢幼虫から単離した血球細胞を96穴プラスチックプレートに撒き、数 nM 以上の GBP を添加すると、特に、プラズマ細胞が顕著な活性化

を示し、突起の伸長もしくは細胞同士の凝集塊形成反応が起る（活性化による形態変化の差は、主に、アッセイに用いるプレートの異物性の差異に因るところが大きく、異物性が高いと前者、低いと後者の反応が観察される）。

GBP による血球活性化に先立ち、血球細胞をチロシンリン酸化酵素阻害剤 genistein で処理すると、顕著にプラズマ細胞の活性化を抑制することを確認した。すなわち、GBP によるプラズマ細胞の活性化には GBP 刺激を細胞内に伝達する細胞膜タンパク質のチロシン残基リン酸化が関与しているものと解釈できる。

こうした知見に基づき、私達は、GBP によるチロシン残基リン酸化を指標に、GBP のプラズマ細胞活性化に関与すると予想される細胞膜タンパク質の同定と単離を試みた。その結果、分子量約 77kDa の糖タンパク質の精製に成功し、その一次構造を決定した。この新規タンパク質は、1カ所の膜貫通ドメインを有し、細胞質領域には、特にプロリン残基が豊富に含まれ、SH2/SH3 ドメイン結合モチーフが存在する。さらに興味深いことに、哺乳類の免疫関連受容体の多数のアダプター因子内に報告されている ITAM モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 様配列が存在することも確認した。すなわち、今回、同定した新規細胞膜タンパク質 P77 は、GBP によるチロシンリン酸化刺激をこうしたモチーフを介して細胞内の他の情報伝達因子に伝えるアダプター因子と考えられる。

## キチン受容体の認識を介した植物免疫応答

賀来華江、渋谷直人  
 明治大学・農学部・生命科学科

### Chitin receptor for plant innate immunity

Hanae Kaku, Naoto Shibuya  
 Department of Life Sciences, Meiji University.

植物は動物のようなマクロファージを中心とした自然免疫系やリンパ球を介した獲得免疫系を持っていない。しかし、植物は病原菌の細胞表層を構成する分子や病原菌が分泌するさまざまな分子（エリシター）を認識して防御応答を開始する能力をもつことが知られている。しかし、これらの受容・応答に関わる分子の実体に関しては不明の部分が多い。近年、これまでエリシターと呼ばれてきた分子の多くが動物の自然免疫で Pathogen/Microbe-Associated Molecular Pattern (PAMP/MAMP) と呼ばれる分子群と共通する構造や位置づけをもち、また、植物の基礎的病害抵抗性で重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本シンポジウムでは、MAMP の一つであるキチンエリシターに対する受容体を中心に、これまで得られた知見について報告する。

キチンは $\beta$ 1,4結合したN-アセチルグルコサミンの重合体であり、多くの菌類の細胞壁に共通して存在する分子である。我々はこのキチン断片がイネ培養細胞において活性酸素生成、防御応答関連遺伝子発現、ファイトアレキシン合成などの多様な防御応答を誘導する強いエリシター活性をもつことを明らかにした<sup>[1]</sup>。これらの防御応答は、キチンオリゴ糖の重合度（6量体以上）と構造に高い特異性を示し、また、nM以下という低濃度で活性を示した。これらの結果は、イネ細胞にはキチンオリゴ糖エリシターに対する特異的受容体が存在することを示唆した。我々は種々の生化学的手法により、エリシター結合タンパク質（Chitin elicitor binding protein: CEBiP）をイネ培養細胞原形質膜から可溶化し、CEBiPをキチンオリゴ糖カラムにより単離精製することに成功した<sup>[2]</sup>。

CEBiP遺伝子の発現抑制型形質転換体では、キチンオリゴ糖エリシター誘導性活性酸素応答が大

幅に抑制され、また、マイクロアレイ解析においても、キチンオリゴ糖エリシターで発現誘導される遺伝子の約70%が影響を受けていることを明らかにした。これらの結果はCEBiPがキチンオリゴ糖エリシターの情報を伝達する上で重要な役割を果たしていることを示した。しかし、アミノ酸配列に基づく構造予測からはCEBiPは細胞内ドメインを持たないと考えられたことからCEBiP単独では細胞内へのシグナル伝達が困難であり、別の分子と協力することによってシグナル伝達を行っている可能性が示唆された。

我々はこうした観点からCEBiP受容体のパートナー分子を探索し、逆遺伝学的アプローチによりシロイヌナズナのキチンオリゴ糖エリシター受容・伝達に不可欠な新規受容体キナーゼ（Chitin Elicitor Receptor Kinase 1: CERK1）を同定した<sup>[3]</sup>。さらに、この情報をもとにCERK1と高い相同性をもつイネのOsCERK1を同定し、その機能解析を進めた結果、この分子がイネのキチンオリゴ糖エリシターのシグナル伝達に重要な役割を持つことを見出した。本シンポジウムでは、CEBiPとOsCERK1との受容体複合体形成への可能性を含め、最新の知見について報告する。

#### 【参考文献】

1. Shibuya N, Minami E (2001) *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **59**, 223-233
2. Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11086-11091
3. Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19613-1961



和文・英文会則

# 日本比較免疫学会会則

## I.名称

1. 本会は、日本比較免疫学会 (The Japanese Association for Developmental & Comparative Immunology; JADCI)と称する。

## II.目的

1. 本会は、比較免疫学に関する研究の進歩をはかることを目的とする。

## III.事業

1. 本会は、その目的を達成するため、次の事業を行う。
  - 1) 学術集会の開催
  - 2) 学術集会 Abstract 集の発行
  - 3) News の発行
  - 4) 国際比較免疫学会との交流
  - 5) アジア・オセアニア地区研究者との交流
  - 6) 日本比較免疫学会古田賞および古田奨励賞受賞者の選考と表彰
  - 7) その他、本会の目的に必要なと認められる事業

## IV.会員

1. 本会の会員は、その趣旨に賛同し所定の入会手続きを経たものとする。
  - 1) 個人会員：個人会費を納める者。
  - 2) 賛助会員：本会の趣旨に賛同し賛助会費を毎年継続的に納める者。
  - 3) 2年以上会費を滞納し、催告に応じないときは会員の資格を失う。
2. 名誉会長・名誉会員は本人の承諾を得て、役員会が推薦し、総会で承認を得て決定する。
  - 1) 名誉会長・名誉会員は年会費および学術集会費を免除される。

## V.役員

1. 本会に、会長1名、副会長1名、庶務・会計1名、会計監査2名、学術集会担当2名、広報担当2名の役員をおく。
2. 会長は本会を代表する。会長は役員会を主催する。
3. 会長は全個人会員の投票によって、得票数の最も多かった者に決定する。また、役員会は候補者を推薦することができる。
4. 会長を除く他の役員は会長が委嘱する。
5. 役員任期は2年とし、重任、再任を妨げない。会計監査は他と重任できない。

## VI.会議

1. 総会は議決機関であり、会長は原則として年1回学術集会時にこれを招集し、出席会員を以って構成する。
2. 役員会は会長が主催し、原則として年1回開く。

## VII.会計

1. 本会の経費は会費その他の収入をもってあてる。会費は事務局に納める。
2. 会計年度は毎年4月1日より始まり翌年3月31日に終わる。
3. 会計監査役員は、会計年度の終わりにその年度の決算を審査承認し、総会に報告する。

## Ⅷ.会則改正

1. 本会則の改廃は、総会において出席者の 2/3 以上の賛成を必要とする。

### 附則

1. 個人会員の年会費のうち、一般会員は年額5000円、博士課程大学院生は年額3000円とする。
2. 学生会員（博士課程未満の学生）および外国会員の年会費は無料とする。
2. 賛助会員の会費は、1口20000円とする。
3. 本会の事務局は、庶務・会計役員が所属する機関の施設におく。
4. 事務局には役員に準ずる補助役員を置くことができる。
5. 講演者は本会員に限る。
- 6 古田賞および古田奨励賞の選考に係る詳細は別途定める。

(平成 21 年 8 月 4 日 一部修正)

**THE JAPANESE ASSOCIATION FOR  
DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY  
(JADCI)**

**OFFICERS**

**September 2008-August 2010**

**PRESIDENT**

**Takeshi YOSHIDA**  
(NPO) Clinical Pastoral  
Education & Research Institute  
1-28-2 Seta, Setagaya-ku,  
Tokyo, 158-0095

**VICE PRESIDENT**

**Shunichiro KAWABATA**  
Department of Biology  
Faculty of Sciences  
Kyushu University  
Fukuoka, 812-8581

**SECRETARY/TREASURER**

**Miki NAKAO**  
Laboratory of  
Marine Biochemistry  
Department of Bioscience  
and Biotechnology  
Graduate School of  
Bioresource and  
Bioenvironmental Science  
Kyushu University  
Fukuoka, 812-8581

**SECRETARY/TREASURER**

**(assistant)**  
**Tomonori SOMAMOTO**  
Laboratory of  
Marine Biochemistry  
Department of Bioscience  
and Biotechnology  
Graduate School of  
Bioresource and  
Bioenvironmental Science  
Kyushu University  
Fukuoka, 812-8581

**PROGRAM OFFICERS**

**Hiroaki NAKAMURA**  
Department of Biology  
Tokyo Dental College  
Masago, Mihama  
Chiba, 261-8502

**Kahoko HASHIMOTO**  
Department of Life and  
Environmental Sciences  
Faculty of Engineering  
Chiba Institute of Technology  
Narashino  
Chiba, 275-0016

**ABSTRACT OFFICER**

**Ryosuke IJIMA**  
Faculty of Pharmaceutical  
Sciences  
Teikyo University  
Sagamiko  
Kanagawa, 199-0195

**TRUSTEES**

**Haruhisa WAGO**  
Laboratory of Immunology  
School of Medical  
Technology and Health  
Faculty of Health and  
Medical Care  
Saitama Medical University  
Yamane, Hidaka  
Saitama, 350-1241

**Teruyuki NAKANISHI**  
Department of Veterinary  
Medicine  
College of Bioresource Sciences  
Nihon University, Fujisawa  
Kanagawa, 252-8510

**WEB ADMINISTRATOR**

**Euichi HIROSE**  
Faculty of Science  
University of the Ryukyus  
Nishibaru  
Okinawa, 903-0213

# CONSTITUTION

## Article I. Name

1. The name of the Association shall be The Japanese Association for Developmental and Comparative Immunology (JADCI).

## Article II. Object

1. The Association shall be an organization to advance studies on developmental and comparative immunology.

## Article III. Business

1. The Association shall conduct business described below to achieve the Object of the Association.
  - 1) Scientific meeting.
  - 2) Publication of Abstracts of papers read in the Scientific Meeting.
  - 3) Publication of a News Letter.
  - 4) Communications with International Society for Developmental and Comparative Immunology (ISDCI).
  - 5) Communications with scientists in the Asia-Pacific Area.
  - 6) Selection and conferment of Furuta Award and Furuta Young Investigator Award.
  - 7) Other business which considered essential to achieve the Object of the Association.

## Article IV. Membership

1. Membership in the Association shall be open to scientists who share the stated purpose of the Association. The membership shall be authorized by registration.
  - 1) Active (Individual) members shall pay yearly dues.
  - 2) Corporate Affiliate. Any individual, company, agency, or organization interested in accomplishing the purposes of the Association may become a Corporate Affiliate on the payment of a fee for annual dues to be set at the Business Meeting.
  - 3) Members whose annual dues remain unpaid for 2 fiscal years or more are to be notified in writing by the Treasurer, and if still unpaid such a member shall forfeit membership.
2. An executive board composed of the Association officers can nominate a person with distinctive contributions to the Association as a candidate for Honorary member and Honorary President, upon nominee's agreement. The candidate shall be approved and authorized by the Association members in business meeting.
  - 1) Honorary members and Honorary President are not subjected to payment of fee for annual membership and for scientific meetings.

## Article V. Officers

1. Officers of the Association shall be a President, a Vice-President, a Secretary-Treasurer, two Trustees, two Program Officers and an Abstract Officer.
2. The President will always serve as a Chairperson. The President will preside over the Council composed of officers of the Association.
3. Candidates of the President shall be recommended in the Council, and then the President shall be elected by a majority vote of all Active (Individual) members of the Association.
4. All Officers except the President shall be asked and nominated by the President.
5. Terms of all Officers shall be 2 years, however, they can be reappointed. Officers except two Trustees can assume two or more appointments.

## **Article VI. Meeting**

1. Business Meeting shall be the most authorized body which will be opened by the President's call. The business Meeting, consisting of attended members, shall be held once a year as a rule, in conjunction with a Scientific Meeting.
2. The Council composed of the Officers and presided over by the President shall be held annually as a rule.

## **Article VII. Financial**

1. Financial expense of the Association is based on annual dues of members and the other sources of income. Annual dues are payable to the Business Office.
2. Fiscal calendar shall start April 1 and end on March 31.
3. Trustees shall examine annual accounting by the end of fiscal calendar and report it at the Business Meeting.

## **Article VIII. Amendments**

1. This constitution may be amended at any business meeting of members. More than 2/3 of the votes of active (Individual) members present at the Business Meetings shall be necessary for Amendments.

## **APPENDIX**

1. Annual due of the active (individual) members excluding PhD students is 5,000 Japanese yen, and that of PhD students is 3,000 Japanese yen.
2. Annual dues of the students (undergraduate and master course) members and foreign members are free.
3. Annual dues of the corporate affiliate are 20,000 Japanese yen an affiliate.
4. Secretary-Treasurer shall be in charge of the Business Office of the Association.
5. The Secretary-Treasurer can nominate his/her assistant(s).
6. Only the members of JADCI are permitted to have a talk about the investigation.
7. Detailed procedures for selection and conferment of Furuta Award and Furuta Young Investigator Award are defined in a fine print.

---

Approved: November 28, 1989; Revised: August 28, 1991; Revised August 23, 1999; Revised August 29, 2003; Revised August 24, 2006; Revised August 25, 2008; Revised August 4, 2009.

---

*\*The JADCI is a national organization, but we open our membership to scientists all over the world. If one would like to join the JADCI as an active member, please make contact by e-mail to jadci2office@gmil.com .*

## 協賛企業・団体

平成22年7月2日現在

---

### 【協賛】

株式会社 プロ・デバイス

株式会社 ジーンネット

三洋電機株式会社

正晃株式会社

株式会社 トミー精工

株式会社 国際文献印刷社

---

### 【後援】

九州大学大学院農学研究院

本学術集会を開催するに当たり、上記企業・団体より多大なご援助を賜りました。  
ここに、ご芳名を記して感謝の意を表します。

平成22年7月

日本比較免疫学会会長  
第22回学術集会会長

吉田 彪  
川畑 俊一郎

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(過酸化水素)高速除染機能付き 新型CO<sub>2</sub>インキュベータ登場!

MCO-19AIC(UVH) メーカー希望小売価格 1,300,000円(税別)  
 MCO-19AIC(UV) メーカー希望小売価格 1,150,000円(税別)  
 MCO-19AIC メーカー希望小売価格 1,050,000円(税別)

## インテリジェント・インターフェース搭載

液晶表示によるコントロールパネルを搭載。操作性や視認性が向上。さらに、データログ機能により、一定期間の運転データを蓄積、グラフ化、オプションのインターフェースボード(MTR-480C)を接続し、PCへのログデータの転送が可能です。

## 新開発デュアルIRセンサ搭載 + 全自動校正機能(オプション)

CO<sub>2</sub>測定波長と対照波長、2つの波長を同時に測定する、デュアルIRセンサを開発。ゼロ調整不要で、安定したCO<sub>2</sub>測定が可能になりました。さらに、標準ガスの接続により、スパン校正も自動で行う、「全自動校正機能」を実現しました。

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(過酸化水素)高速除染で器内無菌管理を実現(MCO-19AIC(UVH)標準)

付属のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発生器で、超音波により過酸化水素を気化し、器内に充満させることで除染します。除染には専用試薬を使用し、除染中は電気錠の運動により扉が開かない安全設計です。

除染後のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ガスは、器内のUV照射で分解します。  
 除染開始から終了まで約130分の高速除染が可能です。(当社測定基準による)  
 除染操作はコントロールパネルの【H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>】ボタンでスタート。  
 簡単操作で行えます。

UV殺菌システムでの「培養しながらコンタミネーション防止」に加え、  
 新たな器内除染機能で、コンタミネーション防止機能が向上しました。



●仕様及びデザインは性能改善のため予告なく変更する場合があります。  
 ●弊社は製品の故障について一定の条件下で修理を保証しますが、内容物である試料、試薬等についてはその責任を負いかねますのであらかじめご了承ください。

三洋電機株式会社 [jp.sanyo.com](http://jp.sanyo.com)  
 コマーシャルカンパニー バイオメディカ事業部  
 〒113-8434 東京都文京区本郷3丁目10番15号

東日本営業部 TEL 011-231-7113 FAX 011-271-0714  
 北海道営業部 TEL 022-286-2131 FAX 022-215-5582  
 東北営業部 TEL 029-879-1700 FAX 029-879-1701  
 つばきセンター TEL 03-5803-4040 FAX 03-5803-4037  
 関東営業部 TEL 045-978-5134 FAX 045-978-5150

西日本営業部 TEL 052-551-0822 FAX 052-551-3490  
 中部営業部 TEL 06-6994-4742 FAX 05-6594-3553  
 北陸営業部 TEL 082-247-7532 FAX 082-240-2701  
 九州営業部 TEL 092-292-7719 FAX 092-291-5353

ハロー! 環境技術  
 エコ製品でより環境に貢献。チーム・マイベスト。  
 三洋電機グループは「チーム・マイベスト」に参加しています。

## ④ジーンネット ⑤委託解析サービス

サービス名	サービス内容	価格
DNA 合成	全製品 逆相カートリッジカラムでの精製品です。 @オリゴは高品質・低価格・早さがモットーです。	単品 ¥80~
DNA シークエンス	¥3,000/サンプルからの格安シークエンスサービス!	¥3,000~ /1サンプル
siRNA 用 RNA セット	27 mer までの定額料金で siRNA 用 RNA を 2 本セット(1 本鎖ずつ納品)でお届けいたします。また、RNAi 研究を始められる方や、Knock down 効率の高い siRNA 配列のスクリーニング実験を行う方におすすめの、少量で低価格のお試し siRNA もご用意しております。	¥20,000~/組
抗体作製	初回免疫から 9 週間でウサギ抗血清 60ml を納品いたします。 その他の動物種もご用意しております。	¥99,800 /ウサギ 1 羽
ペプチド合成	液体クロマトグラフィー(HPLC)データ 質量分析(Mass)データ 確認用アミノ酸配列・計算上分子量(MW)・等電点(pi)計算データシート その他オプションのご用意がございます etc; 合成量・精製純度・修飾	¥2,500~ /1アミノ酸残基当り

お問合せは・・・



株式会社 ジーンネット

福岡市東区多の津 5 丁目 22 番 8 号  
 TEL 092-626-2722 FAX 092-626-2723  
 E-mail [info@genenet.co.jp](mailto:info@genenet.co.jp)  
 URL <http://www.genenet.co.jp>



# Think Perfection

お客様にとっての"パーフェクト"をめざして、正晃は常にユーザーの視点で考えています。

ライフサイエンスをはじめとする科学技術は  
私たちの生活と未来を大きくリードし続けています。  
正晃は、総合試薬ディーラーとして培ったノウハウを  
お客様にとっての"パーフェクト"を起点に  
多彩な分野へ柔軟な対応で貢献いたします。

 **正晃株式会社**

[www.seikonet.co.jp](http://www.seikonet.co.jp)

本社 福岡市東区松島3丁目34番33号 / 〒813-0062  
TEL: 092-621-8199 (代) FAX: 092-611-4415

事業所 福岡第一・福岡第二・北九州・久留米・大分  
佐賀・山口・下関・熊本・沖縄・宮崎  
鹿児島・東京・長崎・広域

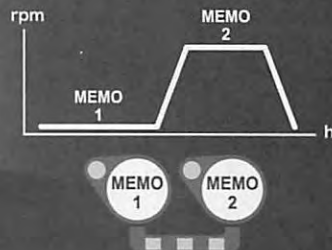
#### 事業内容

- |           |           |            |
|-----------|-----------|------------|
| ■基礎研究用試薬  | ■理化学機器    | ■家電製品      |
| ■体外診断用医薬品 | ■医療用機器    | ■コンピュータおよび |
| ■動物用医薬品   | ■分析用機器    | 医療及び研究分野向け |
| ■化学工業薬品   | ■その他機器、器具 | ソフトウェア     |
| 上記の販売     | 上記の販売・修理  | 上記の開発・販売   |

**TOMY**

新開発「W-Memory Program」搭載。

DNA / RNAの抽出をはじめ、さまざまなプロトコルに対応します。



バイオ研究の頼もしい新戦力

新製品

キットマン  
**kitman**

微量高速冷却遠心機 **フロアタイプ** 485,000円  
**KITMAN-24 / KITMAN-18**

株式会社 トミー精工  
TEL.03-5987-3111 <http://bio.tomys.co.jp>

日本比較免疫学会

第22回学術集会 講演要旨

原稿受付：2010年7月2日

発行日：2010年7月20日

発行者：日本比較免疫学会

編集者：学術集会プログラム委員会

委員：中村弘明、橋本香保子

印刷所：(株)国際文献印刷社

東京都新宿区高田馬場3-8-8

