

PROCEEDINGS
21st JAPANESE ASSOCIATION FOR
DEVELOPMENTAL & COMPARATIVE IMMUNOLOGY
Fujisawa Japan
August 3 to 5, 2009

日本比較免疫学会
第21回 学術集会講演要旨

会期：2009年8月3日（月）～5日（水）
会場：日本大学生物資源科学部本館3階中講堂
学術集会会長：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）
学術集会事務局長：森友忠昭（日本大学生物資源科学部獣医学科魚病学研究室）



日本比較免疫学会
—2009—

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	1 3
Session B	2 2
・一般講演 Session C	3 5
Session D	4 1
Session E	4 6
・古田賞受賞者講演	4 9
・特別講演	5 1
・シンポジウム	5 3
学会会則	5 9
(Constitution & Bylaws of JADCI)	
英文役員名簿・会則等	6 1
(Officers, Constitution & Bylaws of JADCI)	
協賛企業・団体	6 4
(Contributors)	

日本比較免疫学会 第21回 学術集会

(2009年度)

会期：2009年8月3日(月)～5日(水)

場所：日本大学生物資源科学部本館3階中講堂

学術集会会長：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)

学術集会日程表

	時間	プログラム内容
第1日目 (3日)	12:00～	受付
	13:00～	開会の辞
	13:05～	一般講演 (22 演題)
第2日目 (4日)	9:00～	一般講演 (14 演題)
	14:00～	総会・学会賞表彰式 古田賞受賞講演「ショウジョウバエ自然免疫における病原細菌の認識と排除の分子機構」 倉田祥一朗(東北大・院・薬)
	15:30～	特別講演 「CD4 陽性 T 細胞の機能分化：機能獲得と維持のメカニズム」 中山俊憲(千葉大・院・医)
		記念写真撮影
	16:45～ 17:30～	懇親会
第3日目 (5日)	9:00～	シンポジウム 「リンパ球の起源と分化」
		1) T細胞とB細胞の起源：個体発生過程から系統発生過程を考察する 河本 宏(理研免疫・アレルギー科学総合研)
		2) Novel insights into the protein structure, function and production of IgT, a monomeric rainbow trout immunoglobulin. J. Oriol Sunyer(ペンシルバニア大学・獣医)
		3) 両生類造血に学ぶ ～アフリカツメガエル血球産生のダイナミクス～ 加藤尚志(早大・院・先進理工/教育学部) 他
		4) 魚類の造血幹/前駆細胞の分離と同定 森友忠昭(日大・生物資源科学) 他
		5) 無顎類における抗原受容体遺伝子の再編成とその制御 名川文清(東大・理)
	6) ホヤ免疫細胞の分化と機能 澤田知夫(山口大・医)	
12:50～	閉会の辞	

参加者へのご案内

学術集会会場：日本大学生物資源科学部本館 3 階中講堂（神奈川県藤沢市亀井野 1866）

連絡先：〒252-8570 神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学生物資源科学部獣医学科魚病学研究室 森友忠昭

TEL：0466-84-3374 FAX：0466-84-3380 E-mail:vetfish@brs.nihon-u.ac.jp

受付：会場にて、8月3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：学術集会参加費：5,000円(会員、非会員)、3,000円(学生)

懇親会参加費：3,500円

【懇親会場はスエヒロ（日本大学生物資源科学部本館 ガレリア階）です。皆様、奮ってご参加ください。】

発表要領：すべて口頭発表（講演時間12分、討論3分）で実施いたします。PC用液晶プロジェクターにより投影して行います（Power Point2003/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になります。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：ご予約の斡旋はいたしておりません。申し訳ございませんが、各自でご予約ください。会場付近（六会日大前駅）にはホテルはありませんが、湘南台駅および藤沢駅付近には多数のホテルがあります。

会場および交通案内図

(Meeting Site and Transportation)



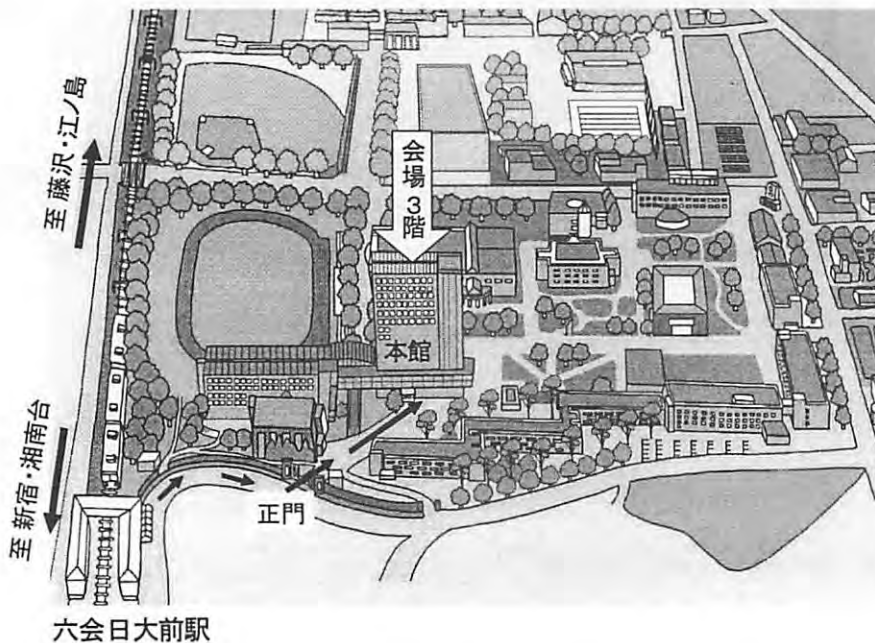
路線案内

東京駅から：JR東海道線にて、東京→品川→横浜→藤沢下車。小田急江ノ島線にて、藤沢→六会日大前下車

六会日大前には急行は止まりません。藤沢駅からは普通列車をご利用ください。

新宿駅から：小田急線にて、新宿→相模大野→(江ノ島方面)→六会日大前下車

小田急線は相模大野駅で江ノ島方面と小田原方面に分かれます。ご注意ください。また、六会日大前駅には急行列車は止まりません。大和または湘南台駅で普通列車にお乗換えください。



会場案内

小田急江ノ島線 六会日大前駅下車 徒歩 2分 日本大学生物資源科学部 本館 3階 中講堂

六会日大前駅西口→日本大学生物資源科学部 正門→本館→(エスカレーター)→本館 3階 中講堂

日本比較免疫学会・役員名簿
(2009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
	杉本 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
抄 録 委 員	飯島 亮介	帝京大学
会 計 監 査	和合 治久	埼玉医科大学
	中西 照幸	日本大学
ホームページ委員	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
jadci2@agr.kyushu-u.ac.jp

第21回学術集会プログラム

第1日目 8月3日(月)

【一般演題】

開会挨拶 13:00~13:05

Session A 無脊椎動物の防御因子

座長：佐々木 年則 (感染研)

A 1 13:05~ ヒト胚の間充織細胞における *ApDOCK* タンパク質の構造及び発現解析

○古川 亮平¹, 船橋 宏美², 金子 洋之¹

(¹慶應大・自然科学研究教育センター, ²慶應大・院・生命システム情報)

A 2 13:20~ DNA-ADPリボシル化蛋白質 *pierisin-1* のモンシロチョウにおける生体防御の関与

○中口(高橋) 梓¹, 山本 真史¹, 堀内 悠², 岩田 健一¹, 岩淵 喜久男², 戸塚 ゆ加里¹, 杉村 隆¹, 若林 敬二¹ (¹国立がんセンター研究所・がん予防基礎研究プロジェクト, ²東京農工大・応用昆虫学研究室)

A 3 13:35~ ショウジョウバエ *PGRP-LE* の細胞内認識依存的なオートファジー誘導によるリステリア菌の増殖抑制

○矢野 環¹, 三田 静香¹, 大森 弘子^{2,3}, 大島 吉輝¹, 上田 龍⁴, 吉森 保^{2,3}, 倉田 祥一朗¹ (¹東北大・院・薬, ²阪大・微研, ³CREST, ⁴遺伝研)

座長：矢野 環 (東北大)

A 4 13:50~ 蚊の細胞障害性因子

○佐々木 年則¹, 平岡 毅², 小林 睦生¹

(¹国立感染症研究所・昆虫医科学部, ²東京農工大・農・応用生物学)

A 5 14:05~ *Drosophila* の外皮形成に及ぼすトランスグルタミナーゼの機能解析

○柴田 俊生¹, 宮地 隆太¹, 陶山 晴香¹, 有木 茂¹, 新澤 直明², 嘉糠 洋陸², 小柴 琢己¹, 川畑 俊一郎¹

(¹九大・院・システム生命, ²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)

A 6 14:20~ マボヤ血リンパのフェノール酸化酵素 (PO) に関する研究 4

○大竹 伸一¹, 阿部 健之¹, 石井 照久², 澤田 知夫³

(¹日大・医・生物, ²秋田大・教文・生物, ³山口大・医学研究科・器官解剖)

座長：大竹 伸一 (日大)

A 7 14:35~ マボヤ体腔細胞のAllo認識機構解明を目指して

—フェノールオキシダーゼ放出誘導抗体の作製—

○岡田 泰三¹, 宮川 一志², 久保 英夫³, 松本 緑¹

(¹慶應大・院・理工・基礎理工, ²北大・院・環境科学院, ³都臨床研・総合)

A 8 14:50～ **Characterization of hemolymph proteome of the sea squirt, *Halocynthia roretzi*, using proteomic tools**
○T.S. Jung¹, S.W. Nho¹, R.S. Dalvi¹, M.A. Ha¹, I.S. Cha¹, H.B. Jang¹, S.B. Park¹,
Y.R. Kim¹, M. Ohtani¹, J. Hikima¹, and T. Aoki^{1,2}
(¹Aquatic Biotechnology Center of WCU project, Gyeongsang National University,
²Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and
Technology)

A 9 15:05～ **海産無脊椎動物におけるインターロイキン17遺伝子数の増大**
○日比野 拓¹, Jonathan Rast²
(¹埼玉大・教育, ²トロント大・サニーブルック健康科学センター&生物物理)

休憩 15:20～15:35

Session B 魚類の生体防御関連因子・遺伝子

座長：末武 弘章（東大）

B 1 15:35～ **ヒラメ Toll-like receptor 5 膜結合型および分泌型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)

B 2 15:50～ **ヒラメの PU.1/Spi-1 cDNA の構造解析および発現組織について**
○引間 順一¹, 大谷 真紀¹, Rhoda M Cerbo¹, In-Seok Cha¹, Young-Rim Kim¹,
Tae-Sung Jung¹, 青木 宙^{1,2}
(¹国立慶尚大・Aquatic Biotechnology Center, ²東京海洋大・ゲノム科学)

B 3 16:05～ **ヒラメ LGP2 cDNA の同定**
○大谷 真紀¹, 引間 順一¹, Rhoda M Cerbo¹, In-Seok Cha¹, Young-Rim Kim¹,
Tae-Sung Jung¹, 青木 宙^{1,2}
(¹国立慶尚大・Aquatic Biotechnology Center, ²東京海洋大・ゲノム科学)

座長：引間 順一（国立慶尚大学校）

B 4 16:20～ **表皮特異的に発現するトラフグケモカイン**
田内 博久^{1,2}, ○末武 弘章¹, 菊池 潔¹, 村山 司², 鈴木 譲¹
(¹東大・水産実験所, ²東海大・海洋)

B 5 16:35～ **トラフグ胸腺とメラノマクロファージセンターにおけるIL-7受容体の発現**
河崎 将史, ○金田 充, 宮台 俊明
(福井県立大・海洋生物学)

B 6 16:50～ **アユ AID 遺伝子のクローニングとその発現解析**
○濃野 絢, 福島 祐二, 堀内 浩幸, 松田 治男, 古澤修一
(広島大・院・生物圏科学・免疫生物学)

休憩 17:05～17:20

座長：大谷 真紀（国立慶尚大学校）

- B 7 17:20～ コイ補体 C1 複合体を構築するサブユニットの同定
市居 敬¹, 辻倉 正和¹, 杣本 智軌¹, 鶴木 陽子¹, 加藤 慎一², 吉国 通庸²,
○中尾 実樹¹（九大・院・農・¹生物機能科学部門, ²動物資源科学部門）
- B 8 17:35～ ギンブナ Fas ligand の cDNA クローニングと発現解析
○中村 一規¹, 杣本 智軌¹, 中西 照幸², 中尾 実樹¹
（¹九大・院・農, ²日大・生物資源科学）
- B 9 17:50～ **Molecular characteristics of the leukocyte markers CD4-1, CD4-2, LAG-3, CD8 α and CD8 β in teleost fish**
○Johannes Martinus Dijkstra¹, Nobuhiro Hayashi¹, Teruyuki Nakanishi², Keiichiro Hashimoto¹
（¹Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, ²College of Bioresource sciences, Nihon University）

座長：杣本 智軌（九大）

- B 10 18:05～ トラフグ腎臓の IgM⁺CD8 α ⁺細胞
○小高 智之¹, 筒井 繁行¹, 宮台 俊明², 菅又 龍一³, 末武 弘章³, 鈴木 譲³, 中村 修¹
（¹北里大・海洋生命科学, ²福井県立大・海洋生物資源, ³東大・水産実験所）
- B 11 18:20～ 魚類赤血球及び栓球における ITAM を有する CD4 様分子の存在
○大橋 健¹, Johannes M. Dijkstra², 瀧沢文雄³, 中易千早⁴, 森友忠昭¹, 中西照幸¹
（¹日大・生物資源, ²藤田保健衛生大・総合医科学研究所, ³Friedrich-Loeffler-Institute, ⁴養殖研究所）
- B 12 18:35～ ギンブナのアロ鱗移植部位における T リンパ球サブセットの動態
○今林 望¹, 戸田 秀明¹, 乙竹 充², 森友 忠昭¹, 中西 照幸¹
（¹日大・生物資源, ²水研センター・本部）
- B 13 18:50～ 混合リンパ球培養における細胞性免疫関連遺伝子の動態
○戸田 秀明¹, 乙竹 充², 森友 忠昭¹, 中西 照幸¹
（¹日大・生物資源, ²水研センター・本部）

第2日目 8月4日（火）

Session C 生体防御担当細胞

座長：倉田 修（日本獣医生命科学大）

- C 1 9:00～ 化学合成共生細菌を有するシマイシロウリガイの血球細胞形態観察
○多米 晃裕^{1,2,3}, 吉田 尊雄^{1,2}, 大石 和恵², 植松 勝之³, 丸山 正^{1,2}
（¹東京海洋大, ²海洋研究開発機構, ³（株）マリン・ワーク・ジャパン）
- C 2 9:15～ 魚類の好中球顆粒
○近藤 昌和, 高橋 幸則（水産大学校・生物生産）

- C 3 9:30～ コイ栓球は異物を貪食する
○長沢 貴宏¹, 中易 千早², 杣本 智軌¹, 中尾 実樹¹
(¹九大・院・農, ²水産総合研究センター・養殖研究所)

座長：近藤 昌和 (水産大学校)

- C 4 9:45～ コイ腎臓中の造血前駆細胞の同定
○片倉 文彦, 吉田 美幸, 山口 卓哉, 森友 忠昭, 中西 照幸
(日大・院・獣医・魚病学研究室)

- C 5 10:00～ コイ造血細胞の培養 —増殖したT細胞のクローン性と分化段階の解析—
○山口 卓哉, 片倉 文彦, 四反田 聡, 吉田 美幸, 森友 忠昭, 中西 照幸
(日大・院・獣医・魚病学研究室)

- C 6 10:15～ ヒラメ白血球による異物包囲化におけるケモカイン様タンパクの検出
○倉田 修¹, 畑井 喜司雄¹, 松山 知正², 坂井 貴光², 中易 千早²
(¹日本獣医生命科学大・魚病学, ²水産総合研究センター・養殖研究所)

Session D 哺乳類・鳥類の生体防御系

座長：大石 和恵 (海洋研究開発機構)

- D 1 10:30～ フェレットの末梢血単核球における炎症性サイトカインの分子生物学的特徴
○中田 真琴, 伊藤 琢也, 酒井 健夫 (日大・動物医科学研究センター)

- D 2 10:45～ 哺乳類におけるNKG2D ligand 領域の比較ゲノム解析
○近藤 瑞穂^{1,2}, 丸岡 尊子¹, 笠松 純¹, 大塚 紀幸¹, 吉田 繁¹, 富居 一範¹,
半澤 直人³, 笠原 正典¹
(¹北大・院・医・分子病理, ²山形大・院・理工・生物, ³山形大・理・生物)

休憩 11:00～11:15

座長：伊藤 琢也 (日大)

- D 3 11:15～ 抗原特異的移行抗体によるニワトリヒナ免疫系の抑制機構
○モハメド・ファヒミ・アブエルアザブ, 福島 祐二, 堀内 浩幸, 松田 治男,
古澤 修一
(広島大・院・生物圏科学・免疫生物学)

- D 4 11:30～ 肥満脂肪組織における局所免疫異常～マクロファージ・CD8+ T細胞の検討～
○西村 智^{1,2,3}, 長崎 実佳^{1,4}, 真鍋 一郎^{1,2,3}, 田嶋 美智子¹, 若林 香織¹, 江藤 浩之⁵,
門脇 孝⁶, 永井 良三¹
(¹東大・院・医・循環器内科, ²東大・TSBMI, ³JST・さきがけ, ⁴東大・コンピュータ
画像診断学/予防医学講座, ⁵東大・医科研・幹細胞治療研究分野, ⁶東大・院・医・糖
尿病代謝内科)

- D 5 11:45～ 脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) のクッパー細胞における発現とその意義
○澤田 知夫, 中村 啓二, 中原 有海, 清平 美和, 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)

Session E 鯨類の生体防御反応

座長：古澤 修一（広島大）

E 1 12:00～ 鯨類の Toll-like receptor 1-9 の発現

○齋藤 雅史^{1,2}, 大石 和恵¹, 宍戸 玲子^{1,2}, 田島 木綿子³, 山田 格³, 浅川 弘⁴, 土屋 泰久⁴, 坂東 武治⁵, 藤瀬 良弘⁵, 大津 大⁶, 奥津 健司⁶, 丸山 正^{1,2}
(独立行政法人海洋研究開発機構¹, 東京海洋大・院², 国立科学博物館³, 下田海中水族館⁴, (財)日本鯨類研究所⁵, 横浜・八景島シーパラダイス⁶)

E 2 12:15～ モービリウイルスのレセプターSLAM分子の鯨類における結合部位のバリエーションと発現の解析

○清水 優衣^{1,2}, 大石 和恵¹, 鈴木 倫太郎³, 田島 木綿子⁴, 角田 恒雄⁴, 山田 格⁴, 浅川 弘⁵, 土屋 泰久⁵, 坂東 武治⁶, 藤瀬 良弘⁶, 樽 創⁷, 村山 司⁸, 丸山 正^{1,2}
(¹海洋研究開発機構, ²広島大・院, ³農業生物資源研究所, ⁴国立科学博物館, ⁵下田海中水族館, ⁶日本鯨類研, ⁷神奈川県立生命の星・地球博物館, ⁸東海大)

E 3 12:30～ イルカの造血は骨髄で行われている

○伊藤 琢也¹, 鯉江 洋², 瀬川 太雄¹, 柳澤 牧央³, 植田 啓一³, 桑野 涼⁴, 鈴木 美和⁵, 森友 忠昭¹, 酒井 健夫¹
(¹日大・動物医科学研究センター, ²日大・獣医内科学研究室, ³沖縄美ら海水族館, ⁴大分マリンパレス水族館, ⁵日大・海洋生物生理学研究室)

昼 食 12:45～

総会・表彰式 14:00～14:45

古田賞受賞講演（座長：吉田 彪）

FP: 14:45～『ショウジョウバエ自然免疫における
病原細菌の認識と排除の分子機構』
倉田 祥一朗（東北大・院・薬）

休憩 15:15～15:30

特別講演（座長：橋本 香保子）

SL: 15:30～『CD4 陽性 T 細胞の機能分化：
機能獲得と維持のメカニズム』
中山 俊憲（千葉大・院・医）

16:45～ 写真撮影

17:30～ 懇親会（スエヒロ）

第3日目 8月5日(水)

シンポジウム『リンパ球の起源と分化』 (司会：中西 照幸)

S1 9:00～ Insight into the phylogeny of T and B cells based on the ontogenic processes of hematopoiesis.

河本 宏 (理研 免疫・アレルギー科学総合研)

S2 9:40～ Novel insights into the protein structure, function and production of IgT, a monomeric rainbow trout immunoglobulin.

J. Oriol Sunyer (ペンシルバニア大・獣医)

S3 10:20～ 両生類造血に学ぶ ～アフリカツメガエル血球産生のダイナミクス～

小坂(野川) 菜美, 前川 峻, 永澤 和道, 家村 仁美, 奥井 武仁,
加藤 尚志 (早大・院・先進理工学研究科/教育学部)

休憩 10:50～11:05

S4 11:05～ 魚類の造血幹/前駆細胞の分離と同定

森友 忠昭, 関谷 麻優子, 小林 功, 片倉 文彦, 吉田 美幸,
山口 卓哉, 高野 晃一 (日大・生物資源科学)

S5 11:35～ 無顎類における抗原受容体遺伝子の再編成とその制御

名川 文清 (東大・理)

S6 12:05～ ホヤ免疫細胞の分化と機能

澤田 知夫 (山口大・医)

総合討論：12:35～ (12:50 終了予定)

閉会の辞：12:50

一般演題 : A1 ~ A9
B1 ~ B13

ヒトデ胚の間充織細胞における *ApDOCK* タンパク質の構造及び発現解析古川亮平¹、船橋宏美²、金子洋之¹¹慶應義塾大学・自然科学研究教育センター、²慶應義塾大学大学院・生命システム情報Molecular characterization and expression analyses of *ApDOCK* in starfish mesenchyme cellsRyohei Furukawa¹, Hiromi Funabashi², Hiroyuki Kaneko¹¹Center for Natural Sciences, Keio University, ²Department of Biological Science and Informatics, Keio University

【目的】

ヒトデ幼生の間充織細胞は、メチニコフにより細胞の食食作用が初めて報告された記念碑的な細胞であり、系統進化的に脊椎動物マクロファージの細胞祖先であると考えられる。現在私たちは、間充織細胞を特徴づける食食作用の分子機序の解明に向け、培養間充織細胞を中核に据えたプロテオミクス解析を進めている。この過程で、食食作用動態の制御に関与すると考えられるタンパク質を探索したところ、食食作用時に葉状仮足の伸展を制御すると考えられる DOCK180 タンパク質に相同性のあるタンパク質断片が、培養間充織細胞でのみ検出された。そこで本研究では、イトマキヒトデ培養間充織細胞 cDNA ライブラリーから、DOCK180 相同遺伝子を単離し、種々の動物の DOCK 遺伝子との比較解析及び発現解析を試み、ヒトデ幼生における DOCK タンパク質の機能を検討した。

【材料・方法】

イトマキヒトデの DOCK 相同遺伝子を得るために、MS/MS 解析でヒットしたタンパク質断片及びヒトを始めとする種々の動物の DOCK タンパク質のアミノ酸配列から、CODEHOP 法を用いて degenerate primer を設計した。この degenerate primer を用いて、培養間充織細胞 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR を行い、部分配列を得た。得られた配列を元に、RACE 法を行い、イトマキヒトデ DOCK 相同遺伝子 *ApDOCK* の全長配列を決定した。

RT-PCR は、胞胚（受精後 16 時間）、中期原腸胚（受

精後 24 時間）及び培養間充織細胞から抽出した全 RNA を逆転写して行った。免疫染色は、抗ヒト DOCK180 抗体を用いて、RT-PCR と同様の 3 種のサンプルに対して行った。

【結果】

ApDOCK 遺伝子の翻訳産物は DOCK-A サブファミリーに属するドメイン構造を有し、ヒト DOCK180 とアミノ酸レベルで 70%以上の相同性を示した。胞胚、中期原腸胚及び培養間充織細胞において、RT-PCR を行ったところ、*ApDOCK* 遺伝子はいずれのサンプルでも mRNA へ転写されていた。続いて、抗ヒト DOCK180 抗体を用いて胞胚、中期原腸胚を免疫染色したところ、*ApDOCK* タンパク質の発現は両サンプルで認められなかった。一方、同抗体を用いた培養間充織細胞の免疫染色では、*ApDOCK* タンパク質は、食食作用の指標となる、葉状仮足を伸展させ始める細胞体領域の一部に偏在していた。

【結論】

イトマキヒトデ培養間充織細胞 cDNA ライブラリーから、DOCK180 相同遺伝子 *ApDOCK* 遺伝子の単離に成功した。*ApDOCK* タンパク質の構造解析ならびに培養間充織細胞の免疫染色結果から、このタンパク質は哺乳類 DOCK180 と同様、食食作用時の葉状仮足の伸展制御に関与している可能性が高い。また、RT-PCR 及び免疫染色の結果は、間充織細胞のみで発現する *ApDOCK* タンパク質の翻訳制御機構の存在を示唆する。

DNA-ADP リボシル化蛋白質 pierisin-1 の モンシロチョウにおける生体防御への関与

中口(高橋) 梓¹, 山本 真史¹, 堀内 悠², 岩田 健一¹, 岩淵 喜久男², 戸塚 ゆ加里¹, 杉村 隆¹,
若林 敬二¹

¹国立がんセンター研究所・がん予防基礎研究プロジェクト, ²東京農工大学・応用昆虫学研究室

Involvement of DNA-ADP ribosylating protein, pierisin-1 in immune systems of white butterfly

Azusa Takahashi-Nakaguchi¹, Masafumi Yamamoto¹, Yu Horiuchi², Ken-ichi Iwata¹, Kikuo Iwabuchi², Yukari
Totsuka¹, Takashi Sugimura¹, Keiji Wakabayashi¹

¹National Cancer Center Research Institute, ²Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的】

Pierisin-1 はモンシロチョウ体液中に存在する DNA mono-ADP リボシル化蛋白質で、哺乳動物のがん細胞にアポトーシスを誘導する。Pierisin-1 に相同性を示す蛋白質はシロチョウ科に存在しているが、pierisin-1 のチョウ体内での生理活性は不明である。Pierisin-1 はモンシロチョウの全てのステージで発現が確認されているが、特に終齢から蛹の時期に多く産生されており、変態時の不要組織の除去に関わる可能性が示唆されている。一方、pierisin-1 は強い細胞障害性を示す事より、モンシロチョウの生体防御に関与している可能性も考えられる。そこで本研究では、モンシロチョウに寄生蜂や細菌が感染した場合の pierisin-1 の発現動態に注目し研究を行った。

【材料と方法】

数種寄生蜂の培養液中に pierisin-1 を添加し、pierisin-1 の毒性による傷害の有無を調べた。次に、モンシロチョウ幼虫の体腔内に寄生蜂を注入し、pierisin-1 の発現動態を調べた。さらに生体防御反応時の詳細な機構を調べるために、モンシロチョウの脂肪体または血球を寄生蜂とインキュベートし、脂肪体と血球における pierisin-1 の発現動態について、免疫染色、リアルタイム PCR およびウェスタンブロットリングを用いて観察した。

【結果】

Pierisin-1 はモンシロチョウを寄主としない寄生蜂には毒性を示した。一方、モンシロチョウを寄主とするアオムシコマユバチには毒性を示さなかった。寄生蜂をモンシロチョウに寄生させた時の pierisin-1 の mRNA およびタンパク質の発現動態について比較した結果、モンシロチョウを寄主としない寄生蜂を寄生させた場合にピエリシン-1 の発現が誘導され、アオムシコマユバチが寄生した場合には影響が見られなかった。さらにモンシロチョウの脂肪体および血球と寄生蜂をインキュベートすると、モンシロチョウを寄主としない寄生蜂に反応して脂肪体の pierisin-1 発現量が上昇する事、また血球においてはプロテアーゼが活性化され、pierisin-1 を分解・活性化する可能性が示唆された。

【結論】

DNA-ADP リボシル化蛋白質 pierisin-1 が、モンシロチョウ体内で生体防御に関わっている可能性が示された。生体防御時の pierisin-1 の産生は主に脂肪体で行われ、血球は異物を包囲し局所的に pierisin-1 を活性化していると考えられた。現在、寄生蜂以外の異物である細菌等についても同様に検討を行い、pierisin-1 による生体防御メカニズムについて検討を進めている。

シヨウジョウバエ異物認識分子 PGRP-LE によるリステリア菌認識

依存的なオートファジー誘導の分子機構解析

矢野 環, 塩川 裕子, 白田 陽一, 大島 吉輝, 倉田 祥一朗
 東北大・院・薬

Analysis of the molecular mechanism that induces autophagy via recognition of *Listeria* by PGRP-LE, a *Drosophila* pattern recognition protein

Tamaki Yano, Yuko Shiokawa, Yoichi Shirata Yoshiteru Oshima and Shoichiro Kurata¹
 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。シヨウジョウバエでは、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、シグナル伝達経路であるIMD経路を活性化して抗菌ペプチド産生を誘導する^[1]。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を認識するという、他のPGRPにない特徴を持つ^[1]。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^[2]。PGRP-LEのリステリア菌認識によるオートファジー誘導は、IMD経路依存的である抗菌ペプチド発現誘導とは異なり、既知の自然免疫経路であるToll経路、IMD経路のいずれにも依存しておらず^[2,3]、新規の経路に依っていることが予想された。そこで、PGRP-LEによるリステリア菌認識に応じた自然免疫誘導、特にオートファジー誘導の分子機構を解析した。

【材料と方法】

シヨウジョウバエ培養細胞株でありPGRP-LEを発現していないS2細胞、PGRP-LE、あるいは欠損または変異を有するPGRP-LEを発現させたS2細胞を用いてリステリア菌の感染を行い、抗菌ペプチド誘導と、

細胞内におけるリステリア菌の増殖を測定した。これにより、抗菌ペプチド発現誘導、オートファジー誘導に必至なアミノ酸に関するPGRP-LEの構造活性相関を行った。

【結果】

345アミノ酸からなるPGRP-LEはC末端半分にペプチドグリカン結合ドメインであるPGRPドメインを持つ。N末端半分のうち、96番目から106番目のアミノ酸はRHIM様ドメインとよばれ、ヒトRIP1、TRIFといった自然免疫経路に働く因子に類似した配列がある。リステリア菌感染による抗菌ペプチド発現誘導とオートファジー誘導にはどちらもRHIM様ドメインを必要としたが、114番目から117番目のアミノ酸領域は抗菌ペプチド発現誘導に必要だがオートファジー誘導には必要なく、オートファジー誘導と抗菌ペプチド発現誘導はPGRP-LEの異なるアミノ酸領域を必要とすることが明らかとなった。

【結論】

PGRP-LE依存的なリステリア菌感染に応じたオートファジーと抗菌ペプチド発現誘導は、異なる分子機構によっていると考えられた。

【参考文献】

1. Kaneko, T. *et al. Nat. Immunol.* 7, 715-723 (2006)
2. Yano, T. *et al. Nat. Immunol.* 9, 908-916 (2008)
3. Yano, T and Kurata, S. *Autophagy* 4, 958-960 (2008)

蚊の細胞障害性因子

佐々木 年則¹、平岡 毅²、小林 睦生¹¹国立感染症研究所昆虫医科学部, ²東京農工大学農学部応用生物科学科

Cytolytic factor of mosquito

*Toshinori Sasaki¹, Tsuyoshi Hiraoka², Mutsuo Kobayashi¹¹Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases, ²Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的】

蚊の細胞障害性因子として、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* 由来の溶血因子が古くに報告された。また、一酸化窒素 (NO)も哺乳動物と同様に細胞障害性因子と考えられる。その他、細胞障害性因子として細菌や真菌に対する抗菌ペプチドがあげられる。補体様因子として知られる Thioester-containing protein (TEP)はマラリア原虫に対する細胞障害性因子として考えられ^[1]、Leucine rich-repeat immune gene (LRIM) 1, *Anopheles Plasmodium*-responsive leucine-rich repeat 1 (APL1, LRIM2)もマラリア原虫に対する細胞障害性因子として考えられる^[2, 3]。以前に、オオクロヤブカの溶血因子(細胞障害性因子)について報告したが、今回更に詳細に細胞障害性因子について検討した。

【材料と方法】

Armigeres subalbatus 406 系統の蛹体液を用いた。溶血活性は、吸光度法にて測定した。リガンドプロテイングは、グライコホリンをリガンドとしてウエスタンプロテイングと同様に ECL を用いた。抗ペプチド抗体は、リガンドプロテイングで反応した 14.0 kDa (p14), 12.5 kDa (p12.5)の N 末端アミノ酸配列 19 残基に keyhole limpet hemocyanin 結合させて抗原として作製した。

【結果】

溶血活性は、シアル酸特異的レクチンが関与することを報告してきた。蚊の体液による溶血活性は、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)やグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)によって用量依存的に阻害された。さらに、Ca²⁺選択性の高い EGTAの方が、EDTA より低濃度で阻害した。

セリンプロテアーゼ阻害剤である p-amidinophenylmethane sulfonyl fluoride (paPMSF)は、溶血活性を阻害した。また、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤である pepstatin A もさらに強力に溶血活性を阻害した。リガンドプロテイングによって 15.4 kDa (p15.4), p14, p12.5 が陽性の反応を示した。p14 と p12.5 の N 末端アミノ酸配列に対するポリクローナル抗体は、溶血活性を阻害した。

【結論】

溶血活性には、セリンプロテアーゼ以外にアスパラギン酸プロテアーゼが関与することが考えられた。さらに、Ca²⁺要求性の C 型レクチンであるシアル酸特異的レクチン p14, p12.5 が、細胞障害に関わることが示唆された。

【参考文献】

1. Blandin, S., Shiao, S.-H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C. and Levashina, E. A., Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116, 661-670, 2004.
2. Osta, M. A., Christophides, G. K. and Kafatos, F. C., Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Nature*, 303, 2030-2032, 2004.
3. Riehle, M. M., Markianos, K., Niare, O., Xu, J. Li, J., Toure A. M., Podiougou, B., Oduol, F., Diawara, S., Diallo, M., Coulibaly, B., Ouatarra, A., Kruglyak, L., Traore, S. F., Vernick K. D., Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science*, 312, 577-579, 2006.

Drosophila の外皮形成に及ぼすトランスグルタミナーゼの機能解析

柴田俊生¹、宮地隆太¹、陶山晴香¹、有木茂¹、新澤直明²、嘉糠洋陸²、小柴琢己¹、川畑俊一郎¹
¹九大・院・システム生命、²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

Transglutaminase is essential for cuticle formation in *Drosophila*.

Toshio Shibata¹, Ryuta Miyaji¹, Haruka Suyama¹, Shigeru Arikawa¹, Naoaki Shinzawa², Hiroataka Kanuka², Takumi Koshiba¹, Shun-ichiro Kawabata¹.

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

【目的】

アシル転移酵素であるトランスグルタミナーゼ (TGase) は、哺乳類においては、タンパク質間にイソペプチド結合を形成させ、外皮形成や体液凝固などの生理機能を果たしている。一方、無脊椎動物の外皮形成における TGase の機能はほとんど不明である。本研究は、RNAi の手法を用いて、*Drosophila* における TGase の機能解明を目的とする。

【材料と方法】

Drosophila の各発生段階における TGase の発現パターンをウエスタンブロットにより確認した。また、GAL4/UAS システムにより TGase を全身で RNAi し、その表現型を観察した。さらに、温度感受性の変異体を用いて、TGase の時期特異的な RNAi を行った。TGase を RNAi した個体の翅を回収し、タンパク質を抽出後、TGase の合成基質であるビオチンアミドペンチルアミンを用い、翅中の基質タンパク質を特定した。また、そのタンパク質を質量分析により同定した。

【結果】

選択的スプライシングで生じる 2 種類の TGase (同一性 95%) は、ウエスタンブロットにより、発生段階特異的に発現していることが分かった。これら 2 種類のアイソザイムは各発生段階で異なった役割を果たしており、異なった基質特異性を示す可能性がある。次に、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、蛹の段階で大部分が致死となり、コントロールの系統と比べ、羽化率は 20%程度であった。また、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。さらに、温度感受性の変異体を用いた時期特異的な RNAi を行ったところ、卵や幼虫の発生段階で RNAi を開始すると、高い致死率を示し、ほとんどの個体が異常な外皮形態を示した。一方、蛹で RNAi を開始してもほとんどが羽化し、正常な表現型を示した。

外皮形成に関与する TGase の基質を同定する目的で、翅からタンパク質の抽出を行ったところ、野生型では羽化後 30 分で抽出された翅のタンパク質は 24 時間後にはすべて抽出されなくなった。一方、TGase を RNAi した個体では羽化後 24 時間経過しても複数のタンパク質が抽出された。これらのタンパク質は翅の形態形成における TGase 依存的な架橋反応の基質タンパク質と推定されたので、TGase の合成基質を取り込ませた。基質が導入されたタンパク質について質量分析を行ったところ、数種類のキチン結合性タンパク質が同定された。

【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、外皮形成に必要なと推測される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。

A6 マボヤ血リンパのフェノール酸化酵素 (PO) に関する研究 4

大竹伸一¹, 阿部健之¹, 石井照久², 澤田知夫³

¹ 日本大学・医学部・生物, ² 秋田大学・教文・生物, ³ 山口大学・医学研究科・器官解剖

A study on the Phenoloxidase in hemolymph in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* 4

Shin-Ichi Ohtake¹, Takeyuki Abe¹, Teruhisa Ishii², Tomoo Sawada³

¹Division of Biology, Nihon University, ²Division of Biology, Akita University, ³Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

【目的】

脊索動物であるマボヤは、フェノール酸化酵素 (PO) を有しており、同種内他個体接触反応時^[1]や異物の貪食時^[2]に血球から PO がプラズマ中に放出されることが知られている。我々は、マボヤ血リンパ中に PO の活性だけでなく、抑制する制御システムも存在する可能性があることを報告してきた。マボヤの体内で PO による生体防御システムがどのように機能しているのか非常に興味深い。しかし、異物や被囊の損傷に関連して生体内の PO 活性が変化するか否か、マボヤの生体防御機構の一つとして機能しているかどうか詳細は分かっていない。

今回は、マボヤ生体内に侵入した異物や、被囊の損傷にตอบสนองして、PO 活性が変化するか否かを調べ、これまでの結果との比較を行った。また、血リンパ中の PO 活性がマボヤの生理状態を表す一つの指標として用いられるかどうか検討したので報告したい。

【材料と方法】

異物侵入のモデル実験として、マボヤ (陸奥湾産) に大腸菌由来リポポリサッカライド (LPS) 5mg/個体を注入した後、経時的に採血して PO 活性を測定した。活性は、血リンパを採取後、直ちに遠心 (0℃, 5分, 450G) して血球を除き、PO によるドーパの酸化で生じるドーパキノンと MBTH との反応物 (505nm に最大吸光度を有す) の量を一定時間後の OD 値として測定した。また、被囊突起部を切除後の PO 活性の活性変化も同様な方法で、経時的に測定した。

【結果】

LPS 注入後経時的に採血した血リンパ中の PO 活性の変化をみると、時間経過とともに上昇が認められる例、ほとんど変化が認められない例があり、一

定の傾向は認められなかった。イオン交換水を注入した対照群でも、活性が変化しない例と採血が刺激になるためか経時的に活性が上昇する例があった。被囊突起部を切除し切除部位から採血した場合、血リンパ中の PO 活性の顕著な上昇が認められた。活性はその後低下し、6 時間後にはほぼ、被囊突起部切除前の測定値に近い値を示した。しかし、切除部位から離れた突起部から採血した場合は、被囊切除前と比較して顕著な活性の変化は認められなかった。

【結論】

体内に異物が侵入したことを想定して LPS を注入した場合、活性が顕著に上昇する個体と上昇しない個体が認められた。試験管内での実験では、マボヤ血球が PO を放出することを確認できるが、今回の注入実験の結果は、マボヤ生体内では、血球を含む血リンパ以外の要素が加わることや個体ごとに生体防御に関する生理状態が異なっていることを反映しているものと考えられた。そこから、PO 活性の変動に関する個体間の相違はマボヤの生理状態を表す一つの指標となる可能性もあると考えるが、個体差そのものを評価する方法も確立されていないために、さらにデータを積み重ねていく必要がある。一方、被囊の損傷実験では、被囊切除後短時間で PO 活性の上昇が起こり、その後活性が低下することから、創傷治癒反応と関連しているのではないかと考えられた。また、被囊が損傷した場合 PO 活性の上昇が局所的に起こることが示唆された。

【参考文献】

1. Akita N, Hoshi M (1995) Cell Struc Func, 20:81-87
2. Hata S, Azumi K, Yokosawa H (1998) Comp Biochem Physiol B, 119:769-776

マボヤ体腔細胞の Allo 認識機構解明を目指して —フェノールオキシダーゼ放出誘導抗体の作製—

岡田泰三¹, 宮川一志², 久保英夫³, 松本緑¹,

¹ 慶應義塾・院理工・基礎理工, ² 北海道・院環境科学院, ³ 都臨床研・総合

Study on Mechanism of an Allogeneic Interaction of Hemocytes, in the Ascidian *Halocynthia roretzi*. -using phenoloxidase release-inducing monoclonal antibody

Taizo Okada¹, Hitoshi Miyakawa², Hideo Kubo³, Midori Matsumoto¹

¹ Biosciences and Informatics, Keio University, ² Graduate School of Environmental Science Hokkaido University,

³ The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

【目的】

尾索動物マボヤでは、異個体由来の体腔細胞同士が接触すると細胞が崩壊し、フェノールオキシダーゼ活性 (PO 活性) が上昇する Contact Reaction (CR) という現象が知られている^{[1],[2]}。この現象はマボヤが Allo 認識能を持つことを示しており、自己マーカー分子を介した「自己」認識であると予想されている。しかし、現在のところ自己マーカー分子は同定されておらず、CR の作用機序の詳細は不明である。

自己マーカーは細胞膜上の個体間で多型に富んだ分子であることが予想される。この予想から、本研究では、マボヤの Allo 認識を解明の手がかりとなる抗体の作製を目的に、マボヤ体腔細胞と混合した際の PO 活性上昇の誘導効率に個体差を生じるモノクローナル抗体の作製を試み、PO の放出量を指標に CR との関係性を調べた。

【材料と方法】

マボヤ血球細胞の膜画分をマウスに免疫し、抗体産生するハイブリドーマを作製した。

【結果】

目的抗体をスクリーニングするため、最初に PO 活性を誘導する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。次にその PO 活性の誘導効率にマボヤの個体によって差が生じるハイブリドーマを選択した。

マボヤ個体群について、このスクリーニングによ

り得られたモノクローナル抗体に反応して細胞から放出される PO 活性による分類群と CR において放出される PO 活性による分類群を比較した。マボヤ体腔細胞に対し、個体ごとに異なった PO 活性上昇を誘導するモノクローナル抗体 11B16B10 (Mab11B16B10) が得られた。

また、マボヤ 24 個体について、Mab11B16B10 と CR 双方における PO 活性の分類群が一致することを確認できた。

【結論】

マボヤの自己マーカー分子に関わる可能性の高いモノクローナル抗体を作製した。今後は、Mab11B16B10 のマボヤ Allo 認識機構における役割をより詳細に検討する。

【参考文献】

1. Fuke, M. T. (1980). "Contact Reactions" between xenogeneic or allogeneic coelomic cells of solitary ascidians." *Biol Bull* 158: 304-315.
2. Akita, N. and M. Hoshi (1995). "Hemocytes release phenoloxidase upon contact reaction, an allogeneic interaction, in the ascidian *Halocynthia roretzi*." *Cell Struct Funct* 20(1): 81-7

Characterization of hemolymph proteome of the sea squirt, *Halocynthia roretzi*, using proteomic tools

T.S. Jung¹, S.W. Nho¹, R.S. Dalvi¹, M.A. Ha¹, I.S. Cha¹, H.B. Jang¹, S.B. Park¹, Y.R. Kim¹, M. Ohtani¹, J. Hikima¹, and T. Aoki^{1,2}

¹Aquatic Biotechnology Center of WCU project, Gyeongsang National University, ²Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

[Introduction]

Tunicates (sea squirts; *phylum Chordata*) are a group of underwater sac-like filter feeders with incurrent and excurrent siphons. Like other chordates, tunicates have a notochord during their early development, but lack myomeric segmentation throughout the body and tail as adults. Tunicates begin life in a mobile larval stage that resembles a tadpole, later developing into a barrel-like, sedentary adult form. It lives by filtering tiny plankton and detritus. Among tunicates, especially *halocynthia roretzi* is an important mariculture species in Korea and Japan, where it is relished as a favorite food. The tunicate is cultured by hanging culture method similar to the method of oyster culture. However, there is no report on a holistic approach for identifying the hemolymph proteome using modern proteomic techniques.

[Materials & Methods]

Proteome analysis of hemolymph of *H. roretzi* was performed by employing proteomic tools, such as 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE), Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

[Results]

In the present study, the components of hemolymph were analyzed 2-DE and MALDI-TOF MS, which was compared with the results of LC-MS/MS. A total of 114 proteins were identified using LC-MS/MS technique. Among these proteins, 14 proteins related to Immune functions included the, Complement factor B, C-reactive proteins (a, b and C), Ficolin (1, 2, 3 and 4), Mannose binding lectins, Mannose associated serine protease, Transferrin and Superoxide dismutase; and 7 proteins were related to embryonic

development and gene transcription. About 91 proteins were predicted/hypothetical proteins which included, entactin/nidogen, synaptotagmin, ubiquitin, HSP70, Titin, actin etc. Interestingly, 2 proteins were also identified as putative Spiroplasma proteins.

[Conclusion]

The holistic analysis for hemolymph of tunicate was able to identify many reported proteins; there are still many proteins in the hemolymph of *H. roretzi* that need to be thoroughly characterized. Understanding the functions of these substances may help develop management strategies to prevent disease in the tunicate, which is presently the major problem faced for the tunicate culture in Korea.

[References]

- Shin GW, et al (2007) Journal of chromatography B 849: 315-322.
 Moon PG, Cho JY, et al (2008) Electrophoresis 29: 4324-4331.
 Dehal, P. et al. (2002) *Science* 298, 2157–2167

This work was supported by a grant from World Class University Program (R32-10253) funded by the Ministry of Education, Science and Technology.

A9 海産無脊椎動物におけるインターロイキン 17 遺伝子数の増大

日比野 拓¹、Jonathan Rast²

¹ 埼玉大学教育学部, ² トロント大学サニーブルック健康科学センター&生物物理学部

Expansion of interleukin-17 family in the genome of invertebrates.

Taku Hibino¹, Jonathan Rast²

¹ Faculty of Education, Saitama University, ² Sunnybrook Research Institute and
Department of Medical Biophysics, University of Toronto

【目的】

ユニゲノムが解読され Toll-like receptor (TLR) や NACHT leucine-rich repeat protein (NLR) など、脊椎動物において病原体を認識する受容体の遺伝子数が、ウニで増大していることが明らかになった^[1]。ナメクジウオやゴカイにおいても TLR 遺伝子数が増大していることが明らかになり^[2]、海産無脊椎動物は、病原体認識受容体のレパートリーを増やして生体防御を行うという類似した戦略をとっていることが示唆された。

免疫において細胞間コミュニケーションの役割を果たすインターロイキン (IL) ファミリーの進化を調べるため、ユニゲノムを探索したところ、IL17 のみが存在し、その遺伝子数が増大していることが明らかになった。本研究では、IL17 と IL17 受容体をクローニングし、成体組織と発生過程における遺伝子発現解析を行った。また他の無脊椎動物のゲノムから IL17 をアノテーションし、遺伝子数の増大がウニ以外にも見られるのかどうかを調べた。

【材料と方法】

アメリカムラサキウニ *Strongylocentrotus purpuratus* のゲノムからドメイン検索と tBlastn 検索により、IL17 と IL17 受容体をアノテーションした。IL17 は成体の管足とプルテウス幼生の cDNA から、IL17 受容体は成体の腸とプルテウス幼生の cDNA からそれぞれ全長をクローニングし、5' & 3' RACE 法により末端配列を確認した。

発現量の解析は、ABI7000 リアルタイム PCR を用

いて行い、最終的に 18S rRNA で標準化した。

【結果】

ユニゲノム上には 35 個の IL17 が存在し、ヒト (6 個)、線虫 (3 個)、ハエ (0 個) と比較すると、遺伝子数が多いことが明らかになった。ユニゲノム上には IL17 のタンデムな重複が見られることや、ウニ IL17 は爆発型の系統樹を示すことから、最近ウニの系統で IL17 が増大したことが示唆された。IL17 受容体は 2 個しか見つからず、受容体の増大は見られなかった。リアルタイム PCR により IL17 と IL17 受容体は、正常な状態では著しく発現量が低いことが明らかになった。

他の海産無脊椎動物の IL17 をアノテーションしたところ、ナメクジウオでは 19 個、ゴカイでは 13 個、イソギンチャクでは 1 個の遺伝子が存在することが明らかになった。

【結論】

いくつかの海産無脊椎動物では、IL17 遺伝子数が増大していることが明らかになった。発現パターンは不明であるものの、IL17 を多く持つ動物は、TLR などの病原体認識受容体数が増大しているため、なんらかの機能のリンクがあるのかもしれない。

【参考文献】

1. Hibino T., et al. (2006) Dev. Biol., 300:349-65
2. Rast JP, Messier-Solek C. (2008) Biol. Bull., 214:274-83

B1 ヒラメ Toll-like receptor 5 膜結合型および分泌型遺伝子の

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

Gene cloning and characterization of membrane and soluble form of Toll-like receptor 5 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) are major pattern recognition receptors, binding to the pathogen-associated molecule patterns (PAMPs), and triggering the innate and acquired immune system to combat pathogen in the first line of defense. In teleost fish, more than 13 types of TLR have been identified including novel fish TLRs such as TLR 5 soluble (5S). Previously, TLR 5S of rainbow trout is up-regulated by bacterial flagellin stimulation and binds to the TLR 5 membrane (5M) for signal transduction and activation of inflammatory responses. To further gain insights on the involvement of TLR 5 during fish and pathogen interaction, we cloned TLR 5M and 5S of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and investigated its expression profile upon *Edwardsiella tarda* infection.

[Methods]

Degenerate PCR and expressed sequence tags (ESTs) annotation were conducted to clone TLR 5M and 5S cDNAs of Japanese flounder. The genomic organization of their genes was determined by Southern blot analysis. Furthermore, the gene response of Japanese flounder TLR 5M and 5S in immune-related organs after *E. tarda* infection were also investigated.

[Results]

The coding region of Japanese flounder TLR 5M and 5S cDNAs were 2,670 bp and 1,923 bp, encoding 889 and 640 amino acid residues, respectively. The

structure of TLR 5M consisted of LRR, transmembrane and TIR domains, while TLR 5S only contain LRR domain similar to TLR 5S genes of other teleost fish. Southern blot hybridization analysis indicated that both TLR 5M and 5S exist as single copies in the genome. After *E. tarda* experimental exposure, TLR 5M was highly induced in the intestine, while TLR 5S was highly induced in the intestine and liver at 3 and 5 days post-infection. Moreover both TLR 5M and 5S expression were pronounced in liver.

[Conclusion]

TLRs play a central role in immune responses as PAMPs. TLR 5 system of fish is unique as it has been not reported from mammals. Our results showed that TLR 5M and 5S is present in Japanese flounder and is very much involved in immune responses.

B2 ヒラメの PU.1/Spi-1 cDNA の構造解析および発現組織について

引間 順一¹、大谷 真紀¹、Rhoda M Cerbo¹、In-Seok Cha¹、Young-Rim Kim¹、
Tae-Sung Jung¹、青木 宙^{1,2}

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

Characterization and expression of PU.1/Spi-1 cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jun-ichi Hikima¹、Maki Ohtani¹、Rhoda M Cerbo¹、In-Seok Cha¹、Young-Rim Kim¹、
Tae-Sung Jung¹、Takashi Aoki^{1,2}

²Aquatic Biotechnology Center, Gyeongsang National University,

²Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

【目的】

ホ乳類の PU.1/Spi-1 は Ets ファミリーに属する転写因子でミエロイド系細胞や B 細胞における発現が見られ¹、多くの免疫関連遺伝子の発現を制御している。また、この遺伝子は造血系細胞の分化を根幹のレベルで調節しているマスター遺伝子の一つとされ、B 細胞やマクロファージの増殖や分化に大きく関与している^{2,3}。しかし、魚類における B 細胞やマクロファージの研究は不明な点が多い。そこで、本研究ではヒラメより PU.1/Spi-1 cDNA をクローン化し、その構造および遺伝子発現解析を試みた。

【材料と方法】

既知の PU.1/Spi-1 のアミノ酸配列をもとに保存性の高かった Ets ドメインをターゲットとした縮重プライマーを作製し、末梢血白血球(PBL)および腎臓の cDNA を鋳型として PCR を行なった。予想される目的のサイズの DNA 断片を TA クローニングし、その塩基配列を決定した。BLAST 検索にて確認後、ヒラメ PU.1 cDNA の部分配列を得た。この配列をもとに SMART RACE Kit (Clontech 社) を用いて 5'および 3'RACE を行ないヒラメ PU.1 mRNA 配列の全長を決定した。決定した配列を用いて既知の PU.1/Spi-1 配列と比較し、そのアミノ酸配列の構造の特徴を明らかにした。また組織での遺伝子発現を観察するためにヒラメの各組織より抽出した Total RNA を用いて一本鎖 cDNA を合成し、RT-PCR 法を用いて PU.1/Spi-1 遺伝子の発現量を観察した。

【結果】

ヒラメの腎臓よりクローン化された PU.1/Spi-1

cDNA の全長は 1,429 bp で、推定されるアミノ酸 264 残基がコードされていた。既知の脊椎動物 PU.1/Spi-1 のアミノ酸配列と比較したところ DNA 結合領域を含む Ets ドメインが 87%以上と最も高い相同性を示し、次いで PEST ドメインが約 40%の相同性であった。しかし、N 末端側の転写活性化ドメインやグルタミンリッチドメインは保存性が低かった。また、ヒラメの PU.1/Spi-1 遺伝子は、主に腎臓や脾臓などの造血系組織での発現が観察された。

【考察】

本研究でクローン化されたヒラメ PU.1/Spi-1 は DNA 結合領域を含む Ets ドメインが他の脊椎動物のもの比べて非常によく保存されていたことから、ヒラメ PU.1/Spi-1 はコンセンサス配列である 5'-GAGGAA-3'に結合することが予想された。また、造血系組織での遺伝子発現が多く観察されたことから、ヒラメ PU.1/Spi-1 はホ乳類同様、多くの免疫関連遺伝子の発現制御や造血幹細胞において何らかの役割を担っている可能性が推察された。

【参考文献】

1. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, van Beveren C, Maki RA (1990) Science, 61:113-124.
2. Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG (1994) Proc Natl Acad Sci USA, 91:7932-7936
3. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H (1994) 265:1573-1577

大谷 真紀¹, 引間 順一¹, Rhoda M Cerbo¹, In-Seok Cha¹, Young-Rim Kim¹,
Tae-Sung Jung¹, 青木 宙^{1,2}

¹国立慶尚大学校・Aquatic Biotechnology Center, ²東京海洋大学・ゲノム科学講座

Characterization of LGP2 cDNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Maki Ohtani¹, Jun-ichi Hikima¹, Rhoda M Cerbo¹, In-Seok Cha¹, Young-Rim Kim¹, Taesung Jung¹, Takashi Aoki^{1,2}

¹ Aquatic Biotechnology Center, Gyeongsang National University,

² Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

【目的】

自然免疫機構は病原体成分パターンを認識して活性化する。ウイルス感染時における代表的なパターン認識受容体である TOLL 様受容体 (Toll-like receptor : TLR)-3, -8, -9 は免疫細胞のエンドソーム内において細胞外のウイルス核酸を認識し、IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。最近、TLR による認識経路とは別に、細胞質内のウイルス核酸を認識する分子として RIG-I 様受容体 (RIG-I like receptor : RLR) が見出された^[1]。RLR ファミリーの一つである LGP2 は N 末端側に RNA ヘリカーゼドメインを持ちウイルスの dsRNA を認識するだけでなく、RLR シグナルの抑制に関与することも報告されている^[2]。

下等脊椎動物である魚類において、TLR などの自然免疫機構が生体防御に重要な役割を果たしていることは明らかであるが、RLR を介したウイルス核酸の認識機構に関する報告は未だない。そこで、ヒラメにおける RLR ファミリーの機能を明らかにするため、ヒラメ LGP2 遺伝子を単離し、その構造および組織発現解析を試みた。

【材料と方法】

GenBank に登録されている既知のヒト、マウス、アフリカツメガエル、大西洋サケの LGP2 mRNA 配列をもとに縮重プライマーを設計し、ヒラメ腎臓から作製した cDNA を鋳型として部分配列を得た。この配列をもとにヒラメ LGP2 遺伝子特異的プライマーを設計し、SMART RACE Kit (Clontech 社) を用いて 5' および 3' RACE を行い、ヒラメ LGP2

mRNA 配列の全長を決定した。また、ヒラメ各組織から RNA を抽出し、RT-PCR による発現解析を行った。

【結果】

ヒラメ LGP2 の N 末端側には RNA ヘリカーゼドメインが保存されており、既知の LGP2 アミノ酸配列と比較した結果、ヒト、マウス、ウシとは約 40%、ツメガエルとは約 50%、大西洋サケとは約 60% の相同性を示した。また、組織発現解析により、腎臓や脾臓における発現が見られた。

【結論】

ヒラメの LGP2 遺伝子は既知の LGP2 と同様に N 末端側に RNA ヘリカーゼドメインを持ち、アミノ酸配列の相同性の高さから機能的にも相同であることが示唆された。このことから、魚類においても、RLR ファミリーによるウイルス核酸認識機構の存在が推察された。

【参考文献】

1. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. (2004) *Nat Immunol*, 5: 730-737.
2. Murali A, Li X, Ranjith-Kumar CT, Bhardwaj K, Holzenburg A, Li P, Kao CC. (2008) *J Biol Chem*, 283: 15825-15833.

表皮特異的に発現するトラフグケモカイン

田内博久^{1,2}、末武弘章¹、菊池潔¹、村山司²、鈴木譲¹¹東京大学・水産実験所、²東海大学・海洋学部

A fugu chemokine expressed in skin

Hirohisa Tauchi^{1,2}, Hiroaki Suetake¹, Kiyoshi Kikuchi¹, Tsukasa Murayama²,Yuzuru Suzuki¹¹Fisheries Lab. The Univ. of Tokyo, ²School of Marine Science and Technology, Tokai Univ.

【目的】

トラフグでは腸への抗原刺激により、腸だけでなく皮膚にも特異的免疫応答が誘導される。また、体表に IgM を運搬する機構を解明する過程で、その抗体は局所の B 細胞由来との示唆も得ている。このような体表免疫応答に関わる白血球はどのように皮膚に集まるのだろうか？本研究では、ケモカインに着目し、その発現を調べるとともに、進化的な考察を行った。

【材料と方法】

皮膚への白血球の集積に関わると予想されるケモカインについて cRNA プローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにより、発現細胞を同定した。

【結果】

我々が同定したトラフグ皮膚のケモカインは、表皮細胞で強く発現していた。また、発現細胞周辺には白血球が密に存在していることから、本ケモカインが皮膚の上皮内白血球の

集積に関与してもものと推察された。これらのことから、魚類とほ乳類では皮膚の構造が大きく異なるにも関わらず、同様の皮膚への白血球集積システムが存在しているものと考えられる。

本ケモカインを構造の類似したほ乳類の 2 つのケモカインと比較すると、ゲノム上での遺伝子の位置については、ほ乳類の粘膜組織や唾液腺や乳腺で強く発現しているケモカインとの類似性を示した。一方で、発現パターンはほ乳類の皮膚で発現するケモカインと同様であった。これらのことから、トラフグで同定された本ケモカインは、構造的類似性をもつほ乳類の 2 つのケモカインの両方の性質を持つことが示された。

【結論】

本研究で同定したトラフグ表皮特異的に発現するケモカインは、表皮への白血球の蓄積に関与すると推測された。また、本ケモカインは脊椎動物のケモカインの進化を考える上で非常に興味深いモデルとなる。

トラフグ胸腺とメラノマクロファージセンターにおける IL-7 受容体の発現

河崎 将史、金田 充、宮台 俊明

福井県立大学・海洋生物工学研究室

Thymus and melanomacrophage center express IL-7 receptors in fugu, *Takifugu rubripes*.Masafumi Kawasaki, Mitsuru Kaneda, Toshiaki Miyadai
Department of Marine Biotechnology, Fukui Prefectural University

【目的】

インターロイキン7 (IL-7) は胸腺におけるT細胞の成熟を促し、末梢T細胞の増殖と生存に関わっている^[1]。また、マウスではプロB細胞の増殖を促進し^[2]、胚中心での再遺伝子編成を誘導するとされている^[3]。このように、IL-7はリンパ球の増殖・分化に深く関わっている。IL-7受容体(IL-7R)を保持するリンパ球は上記のような影響をIL-7から受ける。魚類リンパ球の分化に関する知見は乏しく、IL-7Rを持つ細胞がどの組織に存在するかも特定されていない。そこで、本研究ではトラフグIL-7Rを構成する2つのサブユニット、IL-7R α と γ CのcDNAをクローニングし、RT-PCRと*in situ*ハイブリダイゼーションによって、これらを発現する細胞および組織の検出を行なった。

【材料と方法】

トラフグゲノムデータベースから、IL-7R α と γ Cの相同配列を検索し、プライマーを作成後、cDNAおよびクローニングを行った。ゲノムとの比較から、exon, intron構造を比較した。系統解析には近隣結合法を用いた。演繹アミノ酸配列から予測されるモチーフを検討した。RT-PCRは定法に従って行なった。*in situ*ハイブリダイゼーションには組織のパラフィン切片を用い、Dig標識プローブを使用した。トラフグの白血球を調製する際には、培養シャーレに吸着する細胞と非吸着細胞の分離、ならびに抗トラフグIgMモノクローナル抗体を用いたMACSによる分離を試みた。

【結果】

膜結合型および、選択的スプライシングによって生じたと考えられる可溶性IL-7R α がクローニングできた。WSWSモチーフ、Short hematopoietin receptor family 1 signature, Fibronectin type 3ドメインなど、IL-7 α に特徴的なモチーフを確認した。 γ Cについても同様に細胞外モチーフを確認できた。系統樹解析によると、それぞれが魚類のクラスターと一致した。IgM⁻のほうがIgM⁺よりも強く発現することが、RT-PCRにより明らかになった。*in situ*ハイブリダイゼーションによると、胸腺の皮質および髄質の縁辺が強染した。また、脾臓のマクロファージセンター(MMC)に強い反応が見られた。

【結論】

胸腺の髄質、皮質にIL-7Rの強発現が見られることから、T細胞の増殖および分化にIL-7が関与していることが推測される。また、脾臓のMMC内でのIL-7Rの強発現は、MMCが胚中心的な役割を果たしていることを示している可能性がある。

【参考文献】

1. Muegge K, Vila MP, Durum SK (1993) Science, 261:93-95.
2. Milne CD & Paige CF (2006) Seminars in Immunol., 18:20-30.
3. Hikida M, Nakayama Y, Yamashita Y, Kumazawa Y, Nishikawa S, Ohmori H (1998) J. Exp. Med., 188:365—372.

アユ AID 遺伝子のクローニングとその発現解析

濃野 絢¹, 福島祐二¹, 堀内浩幸¹, 松田治男¹, 古澤修一¹¹広島大学・大学院生物圏科学研究科・免疫生物学Cloning and expression of AID gene in ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*.Aya Nouno¹, Yuji Fukushima¹, Hiroyuki Horiuchi¹, Haruo Matsuda¹, Shuichi Furusawa¹¹Laboratory of Immunobiology, Department of Molecular and Applied Bioscience, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

【目的】魚の疾病対策の一つにワクチンによる予防が挙げられるが、その効果は一定でなく、抗病性が上がっても抗原特異的抗体価の上昇がないなど、抗病性について根本的な理解には至っていない。その背景には、魚類獲得免疫機構についての基礎的知見が少ないという現状がある。本研究では魚類獲得免疫機構の存在およびその場を明らかにするため、哺乳類獲得免疫機構において重要な AID (activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子に着目し、アユ AID 遺伝子のクローニングを行ったので報告する。

【材料と方法】広島県沼田川漁協から供与されたアユを実験に用いた。脾臓を採取し、抽出した total RNA から cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして行った degenerate PCR 法により AID 遺伝子の部分配列を決定し、5'、3' RACE 法により AID 遺伝子の全長配列を決定した。次に、各組織における発現を調べるため、頭腎・脾臓・肝臓・腸・鰓・皮膚から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA の発現を解析した。さらに、アユにアジュバントを用いて TNP-KLH (3.3 μg/g of body weight) を免疫し、脾臓を採取して凍結切片を作製した。現在この凍結切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、組織中の AID 遺伝子の局在を解析している。

【結果】決定したアユ AID のアミノ酸配列は他魚種 AID と 70~80% 以上、哺乳類 AID と 50% 以上の相同性を示し、抗体遺伝子の体細胞突然変異や、クラススイッチ誘導に必要なドメイン領域も高度に保存されていることがわかった。また RT-PCR 法による発現解析では、脾臓、頭腎、鰓において高い発現が観察された。

【結論】アユ AID は他魚種 AID、哺乳類 AID と高い相同性を示した。また、皮膚<腸<肝臓<頭腎<鰓<脾臓の順で高く発現されており、生体防御に関わる組織で高発現していることが確認された。このことから、アユ AID が獲得免疫機構に関与していることが考えられた。魚類では、脾臓が二次リンパ器官として機能していると考えられ、今回 AID の発現が脾臓で高かったことから、抗体の affinity maturation の場が脾臓に存在するのではないかと考えられた。現在、脾臓組織切片を用いて局在を解析中である。

コイ補体 C1 複合体を構築するサブユニットの同定

市居 敬¹・辻倉正和¹・杣本智軌¹・鶴木陽子¹・加藤愼一²・吉国通庸²・中尾実樹¹
九州大学大学院 農学研究院 ¹生物機能科学部門・²動物資源科学部門

Subcomponent structure of the first complement component (C1) in the common carp

Takashi Ichii¹, Masakazu Tsujikura¹, Tomonori Somamoto¹, Yoko Kato-Unoki¹, Shin-ichi Kato²,
Mitsuyasu Yoshikuni², Miki Nakao¹

¹Department of Bioscience & Biotechnology, ²Animal & Marine Bioresource Sciences, Kyushu University

【目的】

自然免疫の液性因子として異物排除活性を示す補体には、抗体依存的・非依存的な活性化経路がある。抗体依存的な活性化経路はその発見の古さから古典経路と呼ばれ、補体第一成分 C1 が抗原に結合した抗体の Fc 領域を認識することで活性化される。哺乳類の C1 は、亜成分 C1q、C1r、および C1s が 1:2:2 のモル比で Ca²⁺依存的に会合した複合体である。魚類補体にも古典経路の活性があるが、C1 は cDNA レベルでいくつかのサブユニットが同定されているだけで、タンパク質レベルでの構造と機能に関する情報は非常に僅かである。本研究は、コイ C1 複合体を構成する亜成分を解明することを目的とした。

【方法】

まず、コイ肝臓 cDNA ライブラリーから C1s 様の cDNA を 2 種単離した (C1s-1、C1s-2)。一方、既にクローニングされたコイ C1q-A、-B、-C 鎖の cDNA 塩基配列を元に、C1q-A 鎖の組換え球状ドメイン(gh) を大腸菌で用いて発現させた。これをウサギに免疫注射して抗血清を作成し、固相化抗体カラムによってコイ血清から C1 複合体を精製した。この複合体を SDS-PAGE および二次元電気泳動で分離後、主要ポリペプチドの N 末端および内部のアミノ酸配列を決定し、これまでに我々がクローニングした C1q-A、-B、-C、C1r/s-A、-B、および C1s-1、-2 の推定アミノ酸配列と比較した。

【結果】

C1s-1 と C1s-2 は約 80%のアミノ酸配列を共有し、既報の C1r/s-A、-B との同一性は 40%であったが、系統樹解析では、これらと哺乳類の C1r および C1s との対応関係は判然としなかった。

抗コイ rC1q-A-gh ウサギ抗体は、抗体感作ヒツジ赤血球に対するコイ補体古典経路の溶血活性を強く阻害し、ウエスタンブロッティングでコイ血清中の 27 kDa のポリペプチドを認識した。この抗体を固相化したカラムでコイ血清から精製した C1 複合体から、二次元電気泳動で等電点の異なる 26~28 kDa のポリペプチド 3 種と、C1r や C1s の H 鎖(約 60 kDa) および L 鎖(約 30 kDa)と予想されるポリペプチドが 2~3 種検出された。また、これら H 鎖、L 鎖様のポリペプチドは、抗体カラムに結合した C1 複合体から EDTA によっても溶出された。以上のポリペプチドの配列解析によって、コイ C1q-A、C1q-B、C1q-C、C1r/s-A または-B、および C1s-1 に帰属される部分アミノ酸配列が得られたことから、コイ C1 複合体は、既にクローニングされている C1q、C1r/s、および C1s を亜成分として含むことが判明した。

【結論】

コイ C1 も哺乳類の C1 と同様に 3 種の亜成分(C1q、C1r および C1s)から成ることが強く示唆されたが、依然として C1r と C1s の同定は確定的ではないので、C4 分解活性などの機能を解析する必要がある。

ギンブナ Fas ligand の cDNA クローニングと発現解析

中村 一規¹、柚本 智軌¹、中西 照幸²、中尾 実樹¹¹九州大学大学院・農学研究院、²日本大学・生物資源科学部

cDNA cloning and expression analysis of Fas ligand in ginbuna crucian carp

Ikki Nakamura¹, Tomonori Somamoto¹, Teruyuki Nakanishi², Miki Nakao¹¹Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University²Department of Veterinary medicine, Nihon University

【目的】

Fas は腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーに属し、リンパ球を含む種々の細胞上に発現している受容体である。そのリガンドである Fas ligand (FasL) は細胞傷害性 T 細胞上に発現し、標的細胞上の Fas に結合すると、アポトーシスを誘導し、標的細胞を傷害する。この Fas/FasL は、哺乳類の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞傷害機序において重要な役割を果たす。本研究で用いる三倍体クローニングギンブナは、雌性発生を行いクローン繁殖するため、細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の遺伝型が同系統内の個体間で一致し、T 細胞による細胞性免疫の研究に適している。本研究では、魚類における CTL の Fas/FasL による細胞傷害メカニズムを解明するため、ギンブナの脾臓細胞から FasL の cDNA クローニングおよび発現解析を行った。

【方法】

既知のゼブラフィッシュのアミノ酸配列を BLAST 検索にかけ、得られた配列 (ゼブラフィッシュ、カモノハシ、ウッドチャック) をもとに縮重プライマーを設計した。諏訪湖産クローニングギンブナ (S3n 系統) の脾臓由来 cDNA から標的 cDNA を増幅し、その増幅産物をサブクローニング後、塩基配列を決定した。その後、5' RACE 法、および 3' RACE 法により ORF 全長の塩基配列を決定した。得られたギンブナ FasL、他種の FasL および TNF スーパーファミリー分子である TNF、Lymphotoxin- α 、TRAIL を用いて

neighbor-joining 法により分子系統樹を作成した。また、ギンブナの各組織から total RNA を抽出し、RT-PCR により FasL mRNA の発現を解析した。

【結果】

ギンブナ FasL には、7 種類のアイソフォームが存在し、それらは 2 タイプ、FasL-A (FasL-A1, FasL-A2, FasL-A3, FasL-A4) と FasL-B (FasL-B1, FasL-B2, FasL-B3) に分類された。FasL-A は、264 残基のアミノ酸を、FasL-B は、268 残基のアミノ酸をコードしており、膜貫通領域および TNF ドメインを有していた。これら 7 種類のギンブナ FasL アイソフォーム間におけるアミノ酸配列同一性は、68-99% であった。ギンブナ FasL-A, FasL-B 各タイプ内での同一性は、95-99% であった。他種との比較では、ギンブナとゼブラフィッシュの FasL の相同性は、約 69% であり、哺乳類とは、約 26% の相同性を示した。neighbor-joining 法による分子系統解析では、ギンブナ FasL は、FasL とクラスターを形成した。また、RT-PCR による発現解析の結果、ギンブナ FasL はリンパ組織で強く発現していた。

【結論】

ギンブナの脾臓細胞より 7 種類の FasL 遺伝子を同定し、それらは大きく 2 タイプ (FasL-A, FasL-B) に分類された。今後、これらの 2 タイプの FasL の機能解析を進めていく。

Molecular characteristics of the leukocyte markers CD4-1, CD4-2, LAG-3, CD8 α and CD8 β in teleost fish

Johannes Martinus Dijkstra¹, Nobuhiro Hayashi¹, Teruyuki Nakanishi², Keiichiro Hashimoto¹

¹ Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, ² College of Bioresource sciences, Nihon University

[Introduction] In mammals the major markers of T helper (Th) cells and cytotoxic T (Tc) cells are CD4 and CD8 $\alpha\beta$, respectively. They are co-receptors of T cell receptor (TCR)/CD3 complexes for binding of MHC class I and class II molecules, respectively; their cytoplasmic tails can bind LCK kinase which can phosphorylate CD3 and thereby induce cell activity. LAG-3 is a homologue of CD4 which also binds MHC molecules but lacks LCK binding properties; LAG-3 is involved in down-regulation of immune responses. Like CD4 and LAG-3, CD8 α and CD8 β chains also originated by tandem gene duplication. Whereas CD8 $\alpha\beta$ heterodimers have an immune stimulatory function, CD8 $\alpha\alpha$ homodimers often have inhibitory functions. In fish orthologues/relatives of CD4 and CD8 molecules were found. In this study we discuss their genetic/molecular characteristics.

[Materials & Methods] Genes related to mammalian CD4 and CD8 were found in fish genomic and EST databases, and amplified from cDNA of rainbow trout, carp, goldfish and ginbuna crucian carp. Peptides were derived from the cytoplasmic tails of trout CD8 α and CD8 β and analyzed for binding to LCK derived peptides by means of surface plasmon resonance (SPR) analysis using a Biacore 2000 apparatus (Biacore).

[Results] After teleost CD8 α [1] and CD4-1 [2] were described, we found CD8 β [3] and CD4-2 [4]. In addition a teleost LAG-3 gene was found [5]. It is difficult to decide phylogenetic relationships between

mammalian CD4 and the very different teleost CD4-1 and CD4-2, but CD4-2 is the more probable CD4 orthologue because of a better resemblance in the MHC and LCK binding sites. We amplified LAG-3 from a few fish species and found a conserved tyrosine in the cytoplasmic tail in a setting similar to an ITIM motif; although such motif is absent in mammalian LAG-3 it agrees well with its immune inhibitory function. In addition to the CD4-like gene reported previously for lamprey [6] we found several other genes somewhat related to CD4 in lamprey, shark and teleosts.

Teleost CD8 differs from mammalian CD8 in that both the α and β chains have a potential LCK binding motif. We analyzed this by means of SPR analysis, but only could confirm LCK binding for trout CD8 α [7].

[References]

1. Hansen JD, Strassburger P (2000) *J Immunol* 164:3132-39
2. Suetake H, Araki K, Suzuki Y (2004) *Immunogenetics* 56:368-374
3. Moore L, Somamoto T, Lie KK, Dijkstra JM, Hordvik I (2005) *Mol Immunol* 42:1225-34
4. Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U (2006) *Mol Immunol* 43:410-9
5. Laing KJ, Zou JJ, Purcell MK, Phillips R, Secombes CJ, Hansen JD (2006) *J Immunol* 177:3939-51
6. Pancer Z, Mayer WE, Klein J, Cooper MD (2004) *PNAS* 101:13273-8
7. Hayashi N, Takeuchi M, Nakanishi T, Hashimoto K, Dijkstra JM. submitted to *Fish Shellfish Immunol*

小高智之¹、筒井繁行¹、宮台俊明²、菅又龍一³、末武弘章³、鈴木謙³、中村修¹

¹北里大学・海洋生命科学部、²福井県立大学・海洋生物資源学部、³東京大学・水産実験所

IgM⁺CD8α⁺ cells in the pufferfish, *Takifugu rubripes* kidney.

Tomoyuki Odaka¹, Sigeyuki Tsutsui¹, Toshiaki Miyadai², Ryuichi Sugamata³, Hiroaki Suetake³,
Yuzuru Suzuki³, Osamu Nakamura¹

¹School of Marine Biosciences, Kitasato University

²Research Center for Marine Bioresources, Fukui Prefectural University

³Fisheries Laboratory, The University of Tokyo

【目的】

我々は、トラフグ腎臓中にプラスチック表面に対して吸着能を有する、マクロファージとは形態の異なる細胞が存在することを見出した。そこで本研究では、この腎臓吸着細胞の本態解明を目指して、種々の白血球マーカーやB細胞分化マーカー遺伝子の発現解析を行うと共に、抗トラフグ IgM 抗体と抗トラフグ CD8α 抗血清を用いた免疫染色とフローサイトメーター (FCM) 解析も行った。

【材料と方法】

トラフグ腎臓からステンレスメッシュを用いて得た細胞懸濁液を組織培養フラスコに入れ、24h 静置培養した。その後、非吸着細胞を除去して、吸着細胞を得た。この吸着細胞の白血球マーカー (TCRα、CD3ε、CD4、CD8α、CD8β、IgM、IgD、IgT、CSF1R、TPO-R) 及び B 細胞分化マーカー (Pax-5、Bcl-6、Blimp-1) の発現を RT-PCR 法により解析し、非吸着細胞における発現と比較検討した。さらに、吸着細胞を抗トラフグ IgM 抗体と抗トラフグ CD8α 抗血清を用いた FCM 解析と免疫染色に供した。

【結果】

白血球マーカーの発現解析の結果、非吸着細胞では調べた全てのマーカー遺伝子が発現していたが、吸着細胞では IgM、IgD、CD8α、CD8β の発現が認められ、他のマーカーの発現は見られなかった。B 細胞分化マーカーについては、非吸着細胞では調べ

た分化マーカー全てが発現していたのに対し、吸着細胞では Pax-5 は発現せず、Bcl-6 と Blimp-1 が発現していた。このことは、吸着細胞中には活性化 B 細胞以降の B 細胞サブセットが存在することを示唆している。しかしながら、これらの遺伝子の発現は非常に微弱であったことから、吸着細胞の多くは Bcl-6 や Blimp-1 を発現していない可能性がある。つまり、腎臓吸着細胞の大半が、哺乳類で知られている B 細胞の分化段階には当てはまらない細胞なのかもしれない。また、FCM 解析の結果、この吸着細胞画分は IgM⁺CD8α⁻細胞 (39.24%)、IgM⁺CD8α⁺細胞 (43.74%)、IgM⁻CD8α⁺細胞 (0.26%)、IgM⁻CD8α⁻細胞 (16.76%) で構成されることが明らかとなった。免疫染色においても同様に、約 47% の IgM⁺CD8α⁺細胞を検出した。以上の結果は、IgM⁺細胞が CD8α を共発現していることを示している。

【結論】

腎臓吸着細胞の多くが IgM を発現していた。これは、魚類 IgM⁺細胞が吸着能を有するという初の報告である。

さらに、免疫染色及び FCM 解析の結果は、トラフグ腎臓に IgM⁺CD8α⁺細胞という新規の細胞集団が存在することを証明している。

IgM⁺CD8α⁺細胞が持つ CD8 がどのような役割を持つのかは、非常に興味深い問題である。今後、IgM⁺CD8α⁺細胞を単離し、この細胞の詳細な機能解析を行っていく必要があるだろう。

B11 魚類赤血球及び栓球における ITAM を有する CD4 様分子の存在

大橋健¹、Johannes M. Dijkstra²、瀧沢文雄³、中易千早⁴、森友忠昭¹、中西照幸¹

¹ 日本大学・魚病学研究室、² 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所、³ Friedrich-Loeffler-Institute、⁴ 養殖研究所

Expression of CD4-like molecule on erythrocytes and thrombocytes in teleosts.

Ken Ohashi¹, Johannes M. Dijkstra², Fumio Takizawa³, Chihaya Nakayasu⁴, Tadaaki Moritomo¹ and Teruyuki Nakanishi¹

¹ College of Bioresource sciences, Nihon University, ² Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University,

³ Friedrich-Loeffler-Institute, Germany, ⁴ Tamaki station, Natl. Res. Inst. of Aquaculture, FRA

【目的】

硬骨魚類において、哺乳類における CD4 分子とのホモログとして CD4-1 及び CD4-2 が報告されている。今回、我々は新たに CD4 に関連した CD4-3 遺伝子をギンブナにおいて単離した。さらに、CD4-3 に対するモノクローナル抗体(MAb)を作製し、CD4-3 発現細胞の同定を試みた。

【材料と方法】

ギンブナ CD4-3 遺伝子配列を含むレトロウイルスベクターを作製し、パッケージング細胞である PLAT-E にトランスフェクションした。産生されたレトロウイルスをラット腎臓線維芽細胞(NRK)に感染させ、CD4-3 安定発現 NRK(CD4-3/NRK)を得た。CD4-3/NRK を抗原としてラットに免疫し、抗ギンブナ CD4-3 抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

抗ギンブナ IgM、CD8 α 、CD4-1MAb 及び抗ギンブナ CD4-3MAb を用いて二重染色をおこないフローサイトメトリー(FCM)で解析を行った。末梢血白血球から MACS 法により CD4-3 陽性細胞と CD4-3 陰性細胞を分離し、細胞の形態観察及び遺伝子発現解析を行った。

【結果】

単離したギンブナ CD4-3 は細胞外に 4 つの Ig ドメイン、細胞内に ITAM を有していた。FCM を用いたスクリーニングにより、NRK には反応せず、CD4-3/NRK に反応するハイブリドーマを選択し、MAb5H2、4G9 及び 3B3 を樹立した。ギンブナの末梢血、脾臓、頭腎、体腎の白血球における MAb5H2 陽性細胞は、それぞれ 77.3%、41.6%、3.0%、2.9%であった。また、MAb5H2 はすべ

ての赤血球に対して反応性を示した。抗 IgM、CD8 α 及び CD4-1MAb と二重染色を行ったところ、MAb5H2 陽性細胞はいずれの抗体にも反応しなかった。MACS により分離した MAb5H2 陽性細胞(末梢血白血球)の形態を観察したところ、栓球様細胞が確認された。一方、CD4-3 陰性細胞においてはリンパ球様細胞や骨髄球様細胞が確認された。さらに RT-PCR 法を用いて発現解析を行ったところ、CD4-3 陽性細胞分画では栓球マーカーである CD41 の発現が認められ、CD4-3 陰性細胞分画では TCR、IgM、mpx などのリンパ球や骨髄球様細胞のマーカー遺伝子の発現が認められた。また、赤血球においても CD4-3 遺伝子の発現が認められた。免疫電顕法による解析では、栓球及び赤血球の細胞表面に金コロイド粒子が観察された。

【結論】

上記の実験結果から、ギンブナにおいて CD4-3 は栓球及び赤血球の細胞表面に発現していることがわかった。このことから CD4-3 は、主にリンパ球に発現している CD4-1 とは異なる機能を持つことが示唆される。CD4-3 は細胞質内領域に ITAM を持つが、赤血球で ITAM を持つ分子が発現しているという報告は今までなされておらず^[1]、魚類の赤血球の新たな機能の存在を示唆している。免疫細胞の活性化シグナルの伝達を担う ITAM が、魚類の赤血球及び栓球において、どのような機能を担っているか非常に興味深い

【参考文献】

1. Luciana Bordin et al. (2005) *Biochimica et Biophysica Acta* 1745 20-28

B12 ギンブナのアロ鱗移植部位における T リンパ球サブセットの動態

今林 望¹、戸田 秀明¹、乙竹 充²、森友 忠昭¹、中西 照幸¹

¹日大・生物資源、²水研センター・本部

Kinetics of T lymphocyte subsets at allograft site in ginbuna crucian carp

Nozomi Imabayashi¹, Hideaki Toda¹, Mitsuru Ototake², Tadaaki Moritomo¹, Teruyuki Nakanishi¹

¹College of Bioresource Sciences, Nihon University,

²Research Management Department, Fisheries Research Agency

【目的】

哺乳類において CD8 陽性 (CD8+) T 細胞は移植片拒絶において中心的な役割を果たし、CD4+T 細胞は CD8+T 細胞の活性化に関与する。最近、我々はギンブナの CD4 および CD8 α 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鱗移植部位における T 細胞サブセットの動態について解析を行った。

【材料・方法】

供試魚として体重 15g の奥尻島産ギンブナ (OB1) と諏訪湖産ギンブナ (S3N) を用いた。S3N の鱗を OB1 に移植し、14 日後に再び鱗移植を行った。鱗の拒絶の程度を評価するため、鱗上の黒色素胞の崩壊・消失を指標に実体顕微鏡下で観察を行った。また 1 回感作から 5、10、14 日目、2 回感作から 3、5、7、14 日目に鱗移植部位の細胞を採取し、抗 CD4 MAb および抗 CD8 α MAb を用いて蛍光免疫染色し、フローサイトメーター (FACS) を用いて鱗移植部位における T 細胞サブセットの動態を経時的に観察した。また、最も激しく拒絶が起きた 2 回感作 3 日目の移植部位の凍結切片を作製し、抗 CD8 α MAb を用いて免疫染色を行った。

【結果】

1 回感作では移植 6 日後に拒絶が完了したが、2 回感作では移植後 1 日目から出血が起こり始め 3 日目に拒絶が完了した。未感作群の移植部位では、CD8+, CD4+T 細胞を含むリンパ球はほとんど認められなかったが、感作群では CD8+, CD4+T 細胞数のいずれも増加し、1 回感作後では移植 5~7 日目、2 回感作後では移植 3~5 日目に最高値を示した。また、免疫組織学的染色の結果、アロ鱗移植部位の真皮・表皮に CD8+T 細胞の浸潤が観察された。

【結論】

未感作個体の皮膚には CD8+, CD4+T 細胞を含むリンパ球はほとんど認められず、アロ抗原刺激により、これらの T 細胞サブセットが移植部位に遊走することが示された。また、移植部位におけるこれらの細胞の増加の時期は鱗移植片拒絶完了の時期とほぼ一致していた。さらに、免疫組織学的観察により、移植部位に CD8+T 細胞が浸潤することが判った。以上のことから、魚類の CD4+および CD8+T 細胞は哺乳類と同様に移植片拒絶に重要な役割を果たしていることが示唆された。

B13 混合リンパ球培養における T リンパ球サブセットの動態および

免疫関連遺伝子発現の解析

戸田 秀明¹、乙竹 充²、森友 忠昭¹、中西 照幸¹

¹日大・生物資源、²水研センター・本部

Kinetics of T-cell subsets and expression analysis of immune genes in mixed leukocyte culture

Hideaki Toda¹, Mitsuru Ototake², Tadaaki Moritomo¹, Teruyuki Nakanishi¹

¹College of Bioresource Sciences, Nihon University,

²Research Management Department, Fisheries Research Agency

【目的】

我々は最近、魚類においても CD8 陽性(CD8⁺)リンパ球が特異的細胞傷害活性を示すことを明らかにした。しかし、魚類の CD8⁺ 細胞の分化・成熟機構についてはほとんど判っていない。そこで本研究では、混合リンパ球培養に伴う、リンパ球サブセットの動態および免疫関連遺伝子の発現を解析した。

【材料と方法】

Responder として奥尻島産 3 倍体クローンギンブナ(OB1)系統の末梢血白血球、Stimulator として諏訪湖産 3 倍体クローンギンブナ(S3N) 系統のマイトマイシン処理末梢血白血球を用い、混合リンパ球培養 (allogeneic 培養) をおこなった。コントロールとして OB1 系統のマイトマイシン処理末梢血白血球を、stimulator として用いた (syngeneic 培養)。

混合リンパ球培養後 3、6、9 日目に細胞を回収し、抗 CD4 および CD8 抗体を用いて二重染色をおこない FACS 解析を行った。また、同様の日程で細胞を回収し RNA を抽出後、cDNA を合成した。免疫関連遺伝子として IL-12p35、IL-10 および IFN γ 1-2 などのサイトカイン遺伝子、哺乳類において分化・活性化に関与する Tbet および GATA3 などの転写因子遺伝子、細胞傷害に関わる perforin1 遺伝子を用い、リアルタイム PCR 法により遺伝子の発現を解析した。

【結果】

混合リンパ球培養 (allogeneic 培養) において responder 細胞の活発な増殖が観察された。CD4⁺ および CD8⁺ 細胞数は培養 3 日目に減少したが、6 日目には CD4⁺ 細胞の増加が認められ、9 日目に

は CD4⁺ および CD8⁺ 細胞いずれも増加した。

Th1 分化に伴い産生されるサイトカインである IFN γ 1-2 は allogeneic 培養において 3 日目に強い発現が認められた。一方、Th1 分化を促進する IL-12 の発現はコントロール (syngeneic 培養) に比較して低い値を示した。Th1 分化を抑制するサイトカインである IL-10 は培養 3 日目にやや強い発現が認められた。また、Th1 分化を促進する転写因子である Tbet の発現に有意な変化は認められなかったが、Th2 分化に関与する GATA3 はコントロールと比較してやや強い発現を示した。

Perforin1 は、培養 9 日目にコントロールと比較して強い発現を示した。

【考察】

お互いにアロ抗原が異なる細胞の混合リンパ球培養においてのみ CD4⁺、CD8⁺ いずれの細胞も増殖し、培養の初期及び後期にそれぞれ IFN γ 1-2 および perforin1 の顕著な発現の増加が認められた。このことから in vivo と同様に in vitro においてアロ抗原に対する免疫応答が誘導されたと考えられる。

CD4⁺ 細胞は CD8⁺ 細胞に先立って増殖し、CD8⁺ 細胞の増殖は perforin1 の発現と同時期であったことから、哺乳類における報告と同様な機序で CD4⁺ 細胞は CD8⁺ 細胞の増殖及び活性化に関与したと考えられる。

GATA3 および IL-10 の発現が認められたことから、混合リンパ球反応によって Th1 分化だけではなく Th2 分化も誘導されることが示唆された。

一般演題 : C1 ~ C6
D1 ~ D5
E1 ~ E3

C1 化学合成共生細菌を有するシマイシロウリガイの血球細胞形態観察

多米 晃裕^{1,2,3}、吉田 尊雄^{1,2}、大石 和恵²、植松 勝之³、丸山 正^{1,2}

¹東京海洋大学, ²海洋研究開発機構, ³(株) マリン・ワーク・ジャパン

Morphological characterization of the immunological responses of hemocytes in a deep-sea bacteria symbiosing, *Calypptogena okutanii*.

Akihiro Tame^{1,3}, Takao Yoshida², Kazue Oishi², Katsuyuki Uematsu², Tadashi Maruyama^{1,2}

¹Tokyo University of Marine Science and Technology, ²JAMSTEC, ³Marine Work Japan Co., Ltd.

【目的】

海洋性二枚貝の外来微生物に対する生体防御反応では、血球細胞が重要な役割を担っていると考えられている。海洋性二枚貝は深海の化学合成生態系にも多くの種類が生息しており、その多くは化学合成細菌との共生関係を構築しているものが知られている。しかし、深海性共生二枚貝における生体防御反応は未だ明確にされておらず、また共生細菌と外来微生物に対する生体防御にどのような相違があるのかについても明らかにされていない。本研究では、深海性共生二枚貝の一種であるシマイシロウリガイ (*Calypptogena okutanii*) を用いて、血球細胞を光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察し、その種類と性質を明らかにしようを試みた。

【材料と方法】

シマイシロウリガイの閉殻筋から注射器で血液を採取し、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とで分画した。各分画をそれぞれ抜き出し、メイグリュールド・ギムザ (MG) 染色により顆粒の有無や好酸性や好塩基性を光顕により観察した。また、血球細胞の食食能を調べるため、蛍光標識大腸菌 (BioParticle, *E.coli*) を加えて暗室下4℃で2時間反応させ、トリパンブルー染色液による消光法を用いて、食食反応を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、オスミウムで後固定後、エポン包埋、ウラン・鉛で染色、透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果】

密度勾配遠心分離法により、シマイシロウリガイの血球細胞は3種類に分画された。この3種類の血球細胞を密度勾配の低い順からそれぞれを Small granular cell (SGC)、Large granular cell (LGC)、Red blood cell (RBC) に分類、命名した。SGCは顆粒が比較的小さく(直径0.5 μm)、MG染色では細胞全体が好塩基性に染まった。LGCは顆粒が比較的大きく(直径0.7~1.0 μm)、MG染色で好酸性に染まった。RBCは顆粒が無く、好塩基性に染まった。血液中の全血球細胞密度は約120 × 10⁶ cells/ml であり、そのうち約95%はRBCが占める。SGCの細胞密度は約3 × 10⁶ cells/ml であり、またLGCは約4 × 10⁶ cells/ml であった。食食反応はLGCに強く見られ、その7割が食食反応を示した。SGCは、その2割程に食食反応が見られた。RBCは食食能が見られなかった。

【結論】

シマイシロウリガイの血液中には3種類の血球細胞があることが分かった。血液における細胞密度の大部分はRBCが大半を占めるが、これに食食能は見られず、比較的血球細胞密度の割合が少ないLGCやSGCに食食能があることが分かった。このように、3種類の血球細胞にその性状や食食能に違いがあることが分かったが、それぞれの血球細胞の役割の相違については未だ明らかでないため、TEMによる微細形態観察等をより詳細に行い、明確にしていく必要がある。

魚類の好中球顆粒

近藤 昌和¹, 高橋 幸則¹¹水産大学校・生物生産学科

Granule of fish neutrophil

Masakazu Kondo¹, Yukinori Takahashi¹,¹Department 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た。ハイギョ類はシーラカンス類とともに、肉鰭綱に分類され、同綱には四肢動物も含まれることから、四肢動物の進化を知るうえで興味深い魚類である。本研究では、アフリカハイギョ *Protopterus annectens* の好中球顆粒の形態学的特徴を調べ、これまでに著者らが報告した各種魚類の好中球との相違点について明らかにし、魚類好中球顆粒の系統進化について考察した。

【材料と方法】

熱帯魚店で購入したアフリカハイギョを実験に供した。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。

【結果】

アフリカハイギョの好中球には円形から桿形の顆粒が観察された。この顆粒は、Romanowsky 染色において、染色条件（希釈液の pH やモル濃度）を変えることで好酸性、好塩基性あるいは異調アズール好性を呈した。また、それぞれの染色性を示す顆粒は、数や形状が類似することから、同一顆粒が種々の染色性を呈すると考えられた。

【結論】

本研究において、アフリカハイギョの好中球には、異なる染色条件によって、種々の染色性を示す1種類の顆粒（多染色性顆粒）が存在することが明らかと

なった。また、本顆粒は、アズール色素（青色）によって、赤紫調を呈することから、異調アズール好性を示すと言える。

これまでに、魚類を含む脊椎動物の原始の系統とされているヌタウンギでは、好中球に好塩基性顆粒（ γ 顆粒）のみが観察される。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* の好中球には、2種類の好酸性顆粒（ α 顆粒）と γ 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ロワナ下区のアジアアロワナやアロワナ下区について出現したカライワシ下区のウナギおよび真骨魚類からアロワナ下区とカライワシ下区を除いたクルペオセファラ類のうち、最初に分岐したニシン・骨鰈下区に属するコイ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、 α 顆粒、難染色性顆粒（ β 顆粒）および γ 顆粒の3種類の顆粒が認められている。これらのことから、魚類好中球の α 顆粒は少なくとも真骨亜綱と腕鰭亜綱の共通の祖先の出現時に、 β 顆粒は真骨魚類の出現時にそれぞれ得られた形質であると推察されている。また、 γ 顆粒の起源は、脊椎動物の共通の祖先にまで遡ると考えられている。上述の魚類において、 γ 顆粒はアズール色素に正染され、青色を呈する（正調アズール好性）。アフリカハイギョの好中球顆粒の染色性が他の魚類と異なることは、顆粒の成分や機能においても違いがあることを示していると考えられる。

長沢 貴宏¹、中易 千早²、柚本 智軌¹、中尾 実樹¹

¹九州大学大学院・農学研究院, ²水産総合研究センター・養殖研究所

Phagocytic Ability of Carp thrombocytes

Takahiro Nagasawa¹, Chihaya Nakayasu², Tomonori Somamoto¹, Miki Nakao¹

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University,

²National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

【目的】

栓球は哺乳類以外の脊椎動物に存在する、血液凝固に関わる血球であり、哺乳類の血小板に相当する血球である。しかし、血小板とは異なり有核の細胞であり、形態的には白血球に近い。本研究では栓球の血液凝固以外の働きに着目し、特に免疫系への関与の解明を目的とした。今回はその中でも主に貪食作用に関する実験を行った。

【材料と方法】

コイの末梢血白血球(PBL)に対し、コイ栓球特異的なモノクローナル抗体⁽¹⁾HB-8 を反応させ、MACSによって栓球を単離し、貪食作用に関連する遺伝子の発現解析を行った。

蛍光ラテックスビーズを貪食させた PBL に HB-8 抗体を反応させ栓球を免疫染色し、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡でビーズの貪食を確認し、さらに、透過型電子顕微鏡を用いて細胞質内への取り込みを確認した。

また、細胞質内に取り込んだ異物に対する殺菌作用を確認するため、非蛍光のビーズと Dihydrorhodamine を用いて、栓球の活性酸素産生能を調べた。

【結果】

RT-PCR の結果、MHC class II, iNOS といった貪食に関連する遺伝子の発現が確認された。

フローサイトメトリーの結果、1 μ m のビーズを 25%、2 μ m のビーズを 15%の栓球が貪食していた。

蛍光顕微鏡下でこれを観察したところ、ビーズを貪食した球形、紡錘形の栓球が確認され、さらに透過型電子顕微鏡で確認したところ、細胞質内にビーズを取り込んだ様子が確認された。また、取り込んだビーズに対し活性酸素を放出していることが明らかとなり、栓球による殺菌作用が示唆された。大腸菌を用いた実験でも、同様の貪食作用が確認された。

【結論】

コイ栓球が、ビーズ、大腸菌といった異物を貪食する食細胞であり、活性酸素を産生しそれらを除去していることが明らかとなった。この結果から、栓球は血液凝固のみならず、生体防御の面でも重要な役割を担う細胞であることが示唆された。

【参考文献】

1. C. Nakayasu *et al.*: *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57 (1997) 337-346

片倉文彦、吉田美幸、山口卓哉、森友忠昭、中西照幸
 日本大学大学院・獣医学研究科・魚病学研究室

Identification of carp (*Cyprinus carpio*) hematopoietic progenitor cells in kidney

Fumihiko Katakura, Miyuki Yoshida, Takuya Yamaguchi, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi
 Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】

魚類造血機構の解明には、造血幹・前駆細胞の増殖・分化が再現可能な培養系が必要である。我々はフィーダー細胞株を用いてコイ腎臓造血細胞を長期間にわたって継代・維持できる培養法を確立している^[1]。さらにこの培養法を用いて、1個のコイ腎臓造血細胞からコロニーを形成させることにも成功している。本研究ではそのコロニー性状を解析することによりコイ腎臓中に含まれる造血前駆細胞の同定を試みた。また、培養液中に hydrocortisone を加え、その効果を検討した。

【材料および方法】

● Bulk 培養による馴らし培地の作製

ギンブナヒレ由来細胞株 (CFS) を 25cm² フラスコに confluent になるまで増やした。この細胞層上にコイの主な造血部位である頭腎および体腎の細胞を 1x10⁶ 個播種した。培養液として 20% FBS および 2.5% コイ血清加 E-RDF 培地を用い、この培養液に hydrocortisone を 1x10⁻⁷M 加えたものを H+ 培養、加えていないものを H- 培養とした。30°C、5% CO₂ 存在下で培養を行い、活発な増殖が見られる 4~8 日後に培養上清を回収し、馴らし培地として用いた。

● Colony forming assay

上記の培養法に倣い、96 穴プレートで単層培養した CFS 細胞株上にコイ造血細胞を 1 well あたり 1 個ずつ播種した。培地には 30% 馴らし培地を添加し、同様の条件にて培養を行った。

【結果】

H- の bulk 培養において増殖したコイ造血細胞は T 細胞系遺伝子と単球・マクロファージ系遺伝子を安定して発現していた。H- 培養の馴らし培地を用いた colony forming assay では、大型で辺縁が不定形な細胞が塊を形成する (Type1) コロニーと、Type1 コロニ

ーで見られた大型の細胞とともに小型で円形の細胞が混在する (Type2) コロニーの 2 種類が観察された。各種造血細胞マーカー遺伝子の発現解析を行った結果、Type1 コロニーは、*M-CSFR*, *granulin*, *coro1A* などの単球・マクロファージ系遺伝子を発現しており、Type2 コロニーでは *M-CSFR*, *coro1A* 遺伝子に加え、*gata3*, *lck*, *TCR β* などの T 細胞系遺伝子も発現していた。また、Type2 コロニーのなかでも小型の細胞が占める割合の高いものでは、T 細胞系遺伝子の発現が強く、割合の低いものでは T 細胞系遺伝子の発現が弱い傾向が認められた。

H+ の bulk 培養では、造血細胞を 1 ヶ月以上に亘る数代の継代培養をしてもなお好中球のマーカー遺伝子である *mpx/mpo* の発現が維持されたが、T 細胞系遺伝子の発現は認められなかった。この培養の馴らし培地を用いて colony forming assay を行い、現在、形成されたコロニーの解析中である。

【結論】

H- 培養におけるコロニー細胞の遺伝子発現解析より、大型の細胞は単球・マクロファージ系、小型の細胞は T 細胞系の細胞であり、Type1 コロニーは単球・マクロファージ前駆細胞由来、Type2 コロニーは単球・マクロファージと T 細胞の共通前駆細胞由来であると考えられた。このように、H- 培養の colony forming assay により、コイ腎臓中に 2 種類の前駆細胞が存在することが明らかとなった。

H+ 培養の馴らし培地中には好中球系の細胞の増殖を促す因子が含まれている可能性が高く、現在 colony forming assay により好中球前駆細胞の存在証明を試みている。

【参考文献】

[1] F. Katakura *et al.* (2009) *Vet. Immunol. Immunopathol.* (In press)

—増殖した T 細胞のクローン性と分化段階の解析—

山口卓哉、片倉文彦、四反田聡、吉田美幸、森友忠昭、中西照幸
 日本大学大学院・獣医学研究科・魚病学研究室

Cell culture of carp (*Cyprinus carpio*) T cells

Takuya Yamaguchi, Fumihiko Katakura, Satoshi Shitanda, Miyuki Yoshida, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi
 Laboratory of Fish Pathology, Graduate school of Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】

魚類 T 細胞の分化・成熟機構を明らかにするためには、魚類 T 細胞の分化や増殖を支持できる培養系が必要である。我々は、支持細胞株上でコイの腎臓造血細胞を培養することにより、コイ T 細胞が活発に増殖し、長期間に亘って継代維持できる培養系を確立している。本研究では増殖したコイ T 細胞で発現している T 細胞レセプター (TCR) α 鎖、 β 鎖および γ 鎖遺伝子の発現の有無や可変領域の多様性を調べることにより、本培養で増殖する T 細胞の分化段階やクローン性などを解析した。

【材料および方法】

単層の支持細胞株 (GTS9, CFS) 上にコイの腎臓より得た造血細胞を 5×10^5 個播種し、20% FBS および 2.5% コイ血清加 E-RDF 培地を用いて 30°C、5% CO₂ 存在下で培養した。コイ造血細胞がフラスコ全体にまで増殖した後に細胞を回収し、一部を新たな支持細胞株上へ継代し、8 代 (約 45 日間) までこれを繰り返した。

TCR α 鎖、 β 鎖および γ 鎖遺伝子の可変領域について、初代培養と継代培養 5 代目でそれぞれ増殖した細胞を用いて 5'RACE 法による cDNA クローニングを行った。さらに、得られた塩基配列からアミノ酸配列を予想し、BLAST 解析およびアライメント解析を行った。

【結果】

本培養系で増殖した細胞から得られた TCR α 鎖、 β 鎖および γ 鎖遺伝子の可変領域の配列は、TCR でよく保存されている FR2、FR3、J 領域の各モチーフを保有し、かつ遺伝子再編成が完了している機能的な配列であると考えられた。また、各遺伝子とも複数種類のクローンが得られた。次に、TCR α 鎖および β 鎖遺伝子可変領域の多様性について初代培養と継代培養 5 代目の細胞で比較したところ、両遺伝子とも初代培養の配列には多様性が認められたが、継代培養 5 代目においてはその多様性は減少し、全体の約 50% を占める配列が存在した。

【結論】

TCR α 鎖および β 鎖遺伝子可変領域の解析により、本培養系では成熟した $\alpha\beta$ T 細胞が増殖していることが示唆された。初代培養で増殖した細胞から得られた TCR α 鎖・ β 鎖遺伝子の可変領域の配列には多様性があり、初代培養においてポリクローナルな T 細胞が増殖していると考えられた。一方で継代培養 5 代目の細胞では TCR α 鎖・ β 鎖遺伝子可変領域の多様性が低下しており、継代培養をさらに繰り返すことによってモノクローナルな $\alpha\beta$ T 細胞を得ることができると考えられた。また、TCR α 鎖および β 鎖と同様に機能的な配列と考えられる TCR γ 鎖遺伝子の可変領域も確認され、本培養系では $\gamma\delta$ T 細胞も増殖している可能性が考えられた。

C6 ヒラメ白血球による異物包囲化におけるケモカイン様タンパクの検出

倉田 修¹、畑井喜司雄¹、松山知正²、坂井貴光²、中易千早²

¹日本獣医生命科学大学・魚病学教室, ²水産総合研究センター・養殖研究所

Detection of a chemokine-like protein in encapsulation by Japanese flounder leukocytes

Osamu Kurata¹, Kishio Hatai¹, Tomomasa Matsuyama², Takamitsu Sakai², Chihaya Nakayasu²

¹Laboratory of Fish Diseases, Department of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University

²National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

【目的】

生体内に侵入した病原体に対する宿主細胞による包囲化反応は、多くの動物種において認められる。我々は、魚類における異物包囲化のメカニズムを解明するために、*in vitro*において異物包囲化を誘導する試験モデル (*In vitro* 白血球包囲化モデル) を確立した (1)。包囲化反応には、顕著な白血球動因が伴われることから、ケモカインの関与が推測される。実際に、包囲形成過程では数種のケモカイン遺伝子の発現上昇が観察されている。一方、これらケモカインタンパクの検出に成功していないこともあり、ケモカインによる包囲化反応の制御機構については不明である。本研究では、包囲形成過程で発現上昇を示すケモカイン遺伝子の遺伝子産物 (ケモカイン様タンパク) に対するモノクローナル抗体を作製し、包囲形成時における本タンパクの検出を試みた。

【材料と方法】

ヒラメ CC ケモカイン様遺伝子 (AB427185) を大腸菌発現ベクター pColdTF に挿入後、宿主大腸菌 (BL21 株) を形質転換し、組換えタンパクの作出を行った。組換えタンパク (6×His タグを含む) は、大腸菌溶解液から Ni-NTA レジンにより精製された。本精製タンパクを抗原として、マウス (Balb/c 系) に免疫した後、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは、哺乳類発現ベクター pcDNA4HisMax により組換えタンパクを発現させたヒト培養細胞 (293 T 株) への抗体反応を確

認することで行った。ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法により行った。

In vitro 白血球包囲化モデルにより、ヒラメ腎臓由来白血球による異物包囲化を誘導した。包囲化標本に対する樹立モノクローナル抗体の反応性を蛍光抗体法およびウエスタンブロット法により確認した。

【結果】

ヒラメ CC ケモカイン様組換えタンパクに反応するモノクローナル抗体 (#86-2) を樹立した。本抗体は包囲形成に関与する一部のヒラメ白血球集団に反応することが確認された。包囲化誘導後のヒラメ白血球溶解液を用いたウエスタンブロットの結果、本抗体は分子量約 14kDa および約 25kDa のタンパクに反応した。低分子タンパクの分子量 (約 14kDa) は CC ケモカイン様遺伝子の塩基配列から推定される分子量と一致した。

【結論】

ヒラメ CC ケモカイン様タンパクに対するモノクローナル抗体を樹立した。ケモカインによる異物包囲化反応の制御機構を解明することを目的としたタンパクレベルの解析が可能になった。

【参考文献】

1. Kurata, O., Nakabayashi, M. Hatai, K. (2008). *Dev. Comp. Immunol.*, 32: 726-734.

フェレットの末梢血単核球における 炎症性サイトカインの分子生物学的特徴

中田 真琴¹、伊藤 琢也¹、酒井 健夫¹

¹ 日本大学動物医科学研究センター

Molecular characterization of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of the ferret

(Mustela putorius furo)

Makoto Nakata¹, Takuya Itou¹, Takeo Sakai¹

¹Nihon University Veterinary Research Center

【目的】

フェレット (*Mustela putorius furo*) は、ペットとして多くの頭数が飼育されていて、またインフルエンザや SARS 等のヒト感染症のモデル動物としても注目されている。このように、近年、フェレットにおける病態およびその機序解明に関する報告が増えつつあるが、その基礎的な免疫応答に関する報告は少ない。

そこで、本研究ではフェレットのサイトカイン、特に炎症反応に関連したサイトカインの遺伝子およびその発現解析を行った。

【材料と方法】

フェレットの末梢血単核球 (PBMCs) を密度勾配遠心法によって分離した後、全 RNA を抽出し、RT 反応により cDNA を合成した。次いで GenBank に登録されている他種哺乳類の塩基配列を基に、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 および TNF- α のプライマーを設計し、遺伝子クローニング、相同性検索および系統樹解析を実施した。

解析したサイトカインは IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IL-10 で、リアルタイム PCR によって経時的な遺伝子発現量を定量した。フェレット PBMCs を分離し BSA を添加した RPMI1640 培養液に再懸濁後、LPS を添加した。培養 0、2、4、8、12、24 時間後に、それぞれから全 RNA を抽出し、これをテンプレートとして解析した。リアルタイム PCR 法には TaqMan プローブ法を用い、解析法に

は housekeeping gene (GAPDH) による相対定量法を用い、刺激直後を 1 とした各時間における発現量を示した。

【結果】

他種哺乳類 (イヌ、ネコ、ヒト、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジおよびマウス) との相同性は、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 および TNF- α でそれぞれ 64.3~92.9%、73.0~83.9%、58.1~84.8%、58.1~89.7% および 79.0~95.0% であった。遺伝子を解析したすべてのサイトカインにおいて、特定のアミノ酸モチーフおよびリガンド結合部位を構成するアミノ酸配列やシステイン残基は、高度に保存されていた。系統樹解析によりフェレットサイトカイン遺伝子は、イヌと最も近縁であることが明らかになった。

定量解析の結果、IFN- γ 、IL-6 および TNF- α は刺激後 2 時間で発現のピークがみられたのに対し、IL-10 は 8 時間後にピークを認めた。

【結論】

フェレットのサイトカイン定量発現は、他種哺乳類におけるサイトカインの報告と同様で、サイトカインの発現ピークはすべて 8 時間以内にみられた。IL-10 の発現ピークは他のサイトカインに比べ遅れたが、これは刺激によって誘導された大量の IFN- γ 分泌に反応して発現した可能性が示唆された。

D2 哺乳類における NKG2D ligand 領域の比較ゲノム解析

近藤 瑞穂^{1,2}, 丸岡 尊子¹, 笠松 純¹, 大塚 紀幸¹, 吉田 繁¹, 富居 一範¹,
半澤 直人³, 笠原 正典¹

¹北大院・医学・分子病理, ²山形大院・理工学・生物, ³山形大・理学・生物

Comparative genomic analysis of NKG2D ligand regions in mammals

Mizuho Kondo^{1,2}, Takako Maruoka¹, Jun Kasamatsu¹, Noriyuki Otsuka¹, Shigeru Yoshida¹, Kazunori Fugo¹,
Naoto Hanzawa³, Masanori Kasahara¹

¹Department of Pathology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University ²Department of Biology, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University ³Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University

【目的】

NKG2D ligands は、感染や癌化などのストレスによって細胞表面に発現される分子群であり、NK細胞の主要な活性化型レセプターである NKG2D と結合する。この結合は NK 細胞による感染細胞や癌細胞の破壊に重要な役割を果たしている。ヒト、マウスでは複数の NKG2D ligands が同定されており、詳細な解析が行われている。しかし、他の哺乳類の NKG2D ligand については、ほとんど情報がない。そこで本研究では、ラット、ウシ、オポッサムから NKG2D ligand 遺伝子を同定し、ヒト、マウス、ラット、ウシ、オポッサム NKG2D ligand 領域を比較することにより、NKG2D ligand システムの進化プロセスとその特徴を明らかにしようとした。

【材料と方法】

ヒト、マウスで報告されている NKG2D ligands のアミノ酸配列をクエリーとして、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) 内のラット、オポッサムのゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行った。同定したラット、オポッサムの NKG2D ligand 様遺伝子とその近傍に位置する遺伝子は、Ensembl Genome Browser を用いてゲノム中の位置を特定した。ウシ NKG2D ligands は、Larson *et al.*⁽¹⁾ の BAC

clone 解析に基づき領域の特定を行った。

【結果と考察】

ラット NKG2D ligand 遺伝子は、1 番染色体の単一領域で多数回の遺伝子重複により多重化していることが分かった。これは、ヒトの ULBP ファミリーの NKG2D ligands が 6 番染色体の単一領域でコードされていることと類似している。また、ウシの NKG2D ligand 遺伝子も 9 番染色体の単一領域に存在しているが、マウスでは、NKG2D ligands の一部が同一染色体上の他部位に転座しており、NKG2D ligand 領域が二分されている。また、各生物種のもつ NKG2D ligand 遺伝子は種特異的な重複によって誕生したものであり、その進化速度は速いことが分かった。これは、NKG2D ligands が病原体による免疫回避の格好のターゲットとなっているためと考えられる。さらに、原始的な哺乳類であるオポッサムも NKG2D ligands 様遺伝子を保有していることから、NKG2D ligand を介した induced self recognition は、哺乳類全体が保有する免疫システムであることが示唆された。

【参考文献】

1. Larson JH *et al.* (2006) BMC Genomics, 7:227

D3 抗原特異的移行抗体によるニワトリヒナ免疫系の抑制機構

モハメド・ファヒミ・アブエルアザブ¹, 福島祐二¹, 堀内浩幸¹, 松田治男¹, 古澤修一¹
¹広島大学・大学院生物圏科学研究科・免疫生物学

Study on the suppression of chick immune response by antigen specific maternal antibody.

Mohamed Fahmy about Elazab¹, Yuji Fukushima¹, Hiroyuki Horiuchi¹, Haruo Matsuda¹, Shuichi Furusawa¹
¹Laboratory of Immunobiology, Department of Molecular and Applied Bioscience, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

【目的】移行抗体は出生直後の動物の免疫系を補填するものとして知られているが、他方で移行抗体による免疫抑制の報告も多い。我々は DNP 特異的な移行抗体を授かったニワトリヒナに DNP を免疫し、DNP に対する免疫抑制がヒナで起こるか否かについて検討を行ったので報告する。

【材料と方法】パーゼル免疫研究所から供与され、当研究室で継代維持している近交系ニワトリ H-B15 を実験に用いた。アジュバントを用いて抱卵ニワトリに DNP-KLH (2 mg/kg of body weight) を免疫し、抗体価が上昇した後に免疫鶏より卵を採取し、その卵黄より総 IgY を精製した。さらに DNP-BSA カラムを用いて、総 IgY より抗 DNP IgY をアフィニティー精製し、非免疫鶏由来卵の孵卵 16 日の卵黄領域に 30G の注射針を用いて投与した (1, 3, 5, or 8 mg/200 μ l/egg)。ふ化後 1 週と 4 週のヒナにアジュバントと共に、DNP-KLH あるいは RSA を免疫 (2, 6 or 20 mg/kg of body weight) し、抗体価の上昇および末梢血中の CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8 α ⁺細胞の割合を観察した。

【結果】DNP-KLH (2 mg/kg of body weight) に対するヒナの抗 DNP 抗体産生能力は、孵化前に投与された抗 DNP 抗体の量に依存的に抑制され、5 mg/egg 以上の量で抑制され、3 mg/egg 以下では非投与群と有意差がなかった。この抑制現象は、抹消血内で移行抗体が検出できなくなる孵化後 3-4 週後以降の 7 週におい

ても観察された。抗 DNP 抗体を投与された卵由来ヒナの RSA に対する抗体産生能力は、無処理卵由来ヒナと有意差がなかった。2 回免疫後 1 週のヒナの末梢血では、抗 DNP 抗体を投与された卵由来ヒナに DNP-KLH を免疫した場合にのみ、CD3⁺CD4⁺細胞の割合が低下し、CD3⁺CD8 α ⁺細胞の割合が昂進していた。抗原非特異的 IgY を投与された卵由来ヒナに DNP-KLH 免疫を行った群、無処理卵由来ヒナで非免疫の群、および、無処理卵由来ヒナに DNP-KLH 免疫を行った群では、CD3⁺CD4⁺細胞および CD3⁺CD8 α ⁺細胞の割合に変化は見られなかった。また、抗体産生能力の低下と末梢血 T 細胞サブセットの割合の変化は、大量の DNP-KLH 抗原 (6 or 20 mg/kg of body weight) を投与した場合には観察されなかった。

【結論】移行抗体による免疫抑制現象は、移行抗体の量に依存して起こり、またその現象は抗原特異的であることが確認された。この抑制現象が移行抗体の消失する時期においても継続されることから、抗体による抗原の一時的な吸収による拮抗的な抑制現象でないことが明らかとなった。また、この抑制は、抗原特異的抗体量と投与抗原量のバランスに依存していること、また、その抑制が起こるとき、T 細胞サブセットの変化を生じることが今回初めて観察された。これらの事は出生直後の動物のワクチン投与の際、移行抗体中の抗原特異的抗体の量を考慮した抗原量の決定が必要であることを意味している。

肥満脂肪組織における局所免疫異常～マクロファージ・CD8⁺T細胞の検討～

西村 智^{1,2,3}, 長崎実佳^{1,4}, 真鍋一郎^{1,2,3}, 田嶋美智子¹, 若林香織¹, 江藤浩之⁵, 門脇孝⁶, 永井良三¹

¹東京大学・医学系研究科循環器内科, ²東京大学・TSBMI, ³JST・さきがけ,

⁴東京大学・コンピュータ画像診断学/予防医学講座, ⁵東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究分野

⁶東京大学・医学系研究科糖尿病代謝内科

Immunological changes consisting by inflammatory macrophages and CD8⁺T cells in adipose tissue play a central in obese conditions

Satoshi Nishimura^{1,2,3}, Mika Nagasaki^{1,4}, Ichiro Manabe^{1,2,3}, Michiko Tajima¹, Kaori Wakabayashi¹

Koji Eto⁵, Takashi Kadowaki⁶, Ryozo Nagai¹

¹Department of Cardiovascular Medicine, ²Translational Systems Biology and Medicine Initiative, The University of Tokyo, ³PRESTO, Japan Science and Technology Agency, ⁴Computational Diagnostic Radiology and Preventive Medicine, ⁵Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science, ⁶Department of Metabolic Diseases, The University of Tokyo,

【目的】 心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患の重大なリスク要因として、内臓肥満を基礎とするメタボリックシンドロームが注目されている。最近の研究で、メタボリックシンドロームでは肥大した肥満組織が体内に慢性炎症を引き起こし、アディポサイトカインなどのホルモンの分泌異常や全身での糖・脂質代謝の変化とともに、インスリン抵抗性・糖尿病や動脈硬化といった病態を引き起こすと考えられている。その際に、肥満脂肪組織に炎症性(M1)マクロファージやT細胞が浸潤することが明らかとなったが、肥満した脂肪組織におけるこれらの細胞の役割は不明であった。

【方法】 我々は、「生体内で細胞をみて、働きを知る」「生体内分子イメージング手法」を独自に開発し、脂肪組織に適応し、メタボリックシンドロームの病態にアプローチを行った。肥満における、生体内の脂肪組織の再構築や、特定の細胞集団の細胞動態の変化を可視化し、FACSによる脂肪組織間質の網羅的検討と合わせて、肥満に伴う炎症がいかに脂肪組織の免疫学的機能異常を引き起こすかを明らかにした。

【結果】 イメージング手法を用いて肥満脂肪組織における脂肪組織の再構築を検討し、脂肪組織に浸潤した活性化マクロファージが間質の細胞と相互作用し、脂肪細胞分化・血管新生を引き起こし、肥満を形成することを示した^[1]。さらに、脂肪組織では炎症性の細胞動態が生じており、血管内皮・マクロファージ・血小板の相互の活性化と形質転換が内臓肥満に伴う慢性炎症を増幅し、炎症性マクロファ-

ージ浸潤をはじめとする組織リモデリング・組織機能異常に寄与していた^[2]。

さらに、FACSを用いた脂肪組織間質の網羅的解析により、脂肪組織の間質には多くのリンパ球が存在することを見いだした。肥満に伴い、CD8⁺T細胞の増加、CD4⁺T細胞・制御性T細胞の減少が認められた。CD8中和抗体・CD8ノックアウトマウスを用いたvivoでの検討、共培養によるvitroでの細胞連関の検討の結果から、肥満脂肪組織はCD8⁺T細胞をポリクローナルに活性化し、活性化されたT細胞は単球から炎症性マクロファージへの分化、および、炎症性マクロファージの脂肪組織への遊走と活性化を促進していた^[3]。

【結論】 以上より、肥満脂肪組織における炎症性マクロファージの浸潤の初期のトリガーがCD8⁺T細胞の浸潤であると示された。肥満脂肪組織における異常な局所免疫が、炎症性マクロファージの浸潤を伴う脂肪組織のリモデリング、肥満脂肪組織及び全身の炎症、さらにインスリン抵抗性病態を引き起こしていることが示された。

【参考文献】

1. Nishimura S et al. (2007) Diabetes. 56:1517-1526.
2. Nishimura S et al. (2008) J Clin Invest 118(2): 710-721.
3. Nishimura S et al. (2009) Nature Medicine, in publication

D5

脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) のクッパー細胞における発現とその意義

澤田知夫、中村啓二、中原有海、清平美和、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

Fatty-acid binding protein 7 may regulate the Kupffer cell function upon CCl₄ induced liver damage.

Tomoo Sawada, Keiji Nakamura, Yu Nakahara, Miwa Kiyohira, Nobuko Tokuda, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada

Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

[目的]

脂肪酸結合蛋白質 (Fatty Acid Binding Protein: FABP) は、水に不溶な長鎖脂肪酸を可溶化する細胞内キャリアーであり、リガンドである長鎖脂肪酸の細胞内動態を制御することで、脂質代謝の恒常性維持やシグナル伝達に関与すると考えられている。マウスのマクロファージ系細胞の持つ FABP を検索すると、肝クッパー細胞のみに FABP7/脳型 FABP が発現しており¹⁾、この FABP7 がクッパー細胞の機能調節を通して肝の炎症に影響を及ぼす可能性があると推測した。そこで四塩化炭素 (CCl₄) による肝傷害と肝線維化に関して、野生型 (Wild) および FABP7 ノックアウトマウス (FABP-KO) での比較を行った。

[材料と方法]

B57/BL6 マウスの Wild と FABP-KO に CCl₄ を腹腔投与した。1 回投与を肝傷害モデル (投与後、1, 2, 4, 7 日後にと殺)、4 週及び 8 週間の連続投与 (週 2 回) を線維化モデルとした。両モデルともに血清中の逸脱酵素の変化、肝の病理形態学的変化につき検討した。また、肝傷害モデルのクッパー細胞産生サイトカインの変化に関して、RT-PCR による発現比較を行った。

[結果]

正常野生型マウスの肝で FABP7 はクッパー細胞のみに発現しており、CCl₄ 投与後も発現分布の変化は見られなかった。CCl₄ 投与後、1 ないし 2 日後には中心静脈周囲に肝細胞壊死領域が観察され、4 日後までにはほぼ回復した。血清中の肝細胞逸脱酵素・ALT の値は 1・2 日後に上昇し、4 日後にはほぼ正常値に戻った。投与 1 日後の血清 ALT 値は Wild に比べて FABP-KO で高く、2・4 日後では差が無かった。クッパー細胞の抗 F4/80 免疫染色観察では、投与 2 日後

に、肝細胞壊死領域へのクッパー細胞の集積が見られたが、Wild に比べて FABP-KO ではクッパー細胞の集積が少なかった。CCl₄ 投与後数日間の肝組織中のサイトカインを検討した結果、肝星細胞の筋線維芽細胞への分化を誘導する TGF- β mRNA の発現量が FABP-KO で低く、 α -smooth muscle actin (α SMA) の量も Wild より低かった。4 週および 8 週連続投与の肝線維化モデルでは、FABP-KO においても線維化特有の膠原線維の増加が見られたが、線維化の程度は Wild に比べて低いと思われた。

[結論]

CCl₄ 投与後の血清 ALT 値が FABP-KO で高かったが、CCl₄ の傷害性にクッパー細胞が直接関わらないことから、この差はクッパー細胞による被傷害細胞の処理に関する差を表すものと考えた。クッパー細胞の肝細胞壊死領域への集積が FABP7-KO において少なかったことも、これと一致する。1 回投与モデルにおいて FABP7-KO で TGF- β mRNA の発現低下が見られ、 α SMA 増加の差と一致した点は興味深い。投与 1・2 日間に TGF- β mRNA が総量で減少し壊死組織からの影響も考えられることから、今後単離クッパー細胞の初代培養系での検討などが必要である。長期連続投与の線維化モデルで FABP-KO が線維化を著明に軽減するに至らなかったが、1 回投与後において上記のような差が見られたことは、クッパー細胞の機能調節において n-3 系高度不飽和脂肪酸に高い結合能を有する FABP7 が、役割を担っていることを示唆している。

[参考文献]

1. Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Iwasa H, Sakagami H, Kondo H (2003) Histochem Cell Biol 119, 469-475.

齋藤 雅史^{1,2}, 大石 和恵¹, 宍戸 玲子^{1,2}, 田島 木綿子³, 山田 格³, 浅川 弘⁴, 土屋 泰久⁴, 坂東 武治⁵, 藤瀬 良弘⁵, 大津 大⁶, 奥津 健司⁶, 丸山 正^{1,2}

独立行政法人海洋研究開発機構¹, 東京海洋大学大学院², 国立科学博物館³, 下田海中水族館⁴, 財団法人日本鯨類研究所⁵, 横浜・八景島シーパラダイス⁶

Expression of Toll-like receptor 1-9 in Some Cetacean Tissues

Masafumi Saito^{1,2}, Kazue Oishi¹, Reiko Shishido^{1,2}, Tadasu Yamada³, Yuko Tajima³, Hiroshi Asakawa⁴, Yasuhisa Tsuchiya⁴, Takeharu Bando⁵, Yoshihiro Fujise⁵, Dai Otsu⁶, Kenji Okutsu⁶, Tadashi Maruyama^{1,2}

Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology¹, Tokyo University of Marine Science and Technology², National Museum of Nature and Science³, Shimoda floating Aquarium⁴, The Institute of Cetacean Research⁵, Yokohama Hakkeijima Sea Paradise⁶

【目的】

Toll-like receptor (TLR) は哺乳類では 13 種類が同定されており、それぞれが病原体の構造をパターン的に認識している^[1]。現在、ヒトやマウス、ウシなど数種の陸棲哺乳類で TLR の組織発現が報告されており、肺や末梢血白血球、脾臓などに多く発現することが知られている^[2]。

鯨類における TLR の知見は部分的な遺伝子情報があるだけで、組織における発現に関するものはない。そこで本研究では、鯨類の組織における TLR1-9 の発現を分子生物学的に調べた。

【材料と方法】

白血球は、横浜・八景島シーパラダイスで飼育中の健常なバンドウイルカの末梢血から分離した。また、組織は解剖の機会があったバンドウイルカ 2 個体から摘出した種々の組織 (脾臓や胸腺、浅頸リンパ節などのリンパ系組織、大脳や小脳などの中枢神経系組織など計 22 サンプル)、座礁したコマッコウの大脳、腎臓、精巣、浅頸リンパ節、並びに北西太平洋鯨類捕獲調査により捕獲されたイワシクジラの胎盤、及びミンククジラの精巣を用いた。

これらのサンプルから RNA を抽出し、TLR1-9 の特異的プライマーを用いて、RT-PCR 法により発現を調べた。

【結果と議論】

バンドウイルカの末梢血白血球から、TLR4, 5 及び TLR9 の発現が示された。一方、組織では、用いたサンプルのほとんどで TLR3, 4, 5, 6 及び TLR8 の発現が示された。中でも TLR4 は多くの組織で発現が認められたが、脾臓では発現が認められなかった。対照的に TLR1 と TLR7 はどのサンプルからも検出されなかった。

ヒトの TLR3, 5 は多くの組織に比較的に高い発現をすることが報告されており、本研究においても多くの組織で発現していることが示された。また全く検出されなかった TLR7 は、TLR8 と同様にウイルス一本鎖 RNA を認識している。ヒトの TLR7 の発現は肺や脾臓、胎盤など特定の組織に高く発現することが報告されているが、本研究における鯨類のそれらの組織には見られなかった。TLR7 に対し TLR8 は多くの組織での発現が示されたことから、鯨類のウイルス一本鎖 RNA 認識は、TLR7 と TLR8 の間に機能の相違があることが考えられた。さらに TLR は発現している細胞が決まっているものもあり、今後、組織だけではなく、その組織で TLR を発現している細胞を特定する必要があると考えられた。

【文献】

1. Shizuo Akira et al., 2006. *Cell*. 783-801
2. K. A. Zarembet et al. 2002. *J. Immunol.* 554-561

モービリウイルスのレセプターSLAM分子の鯨類における結合部位の バリエーションと発現の解析

清水 優衣^{1,2}、大石 和恵¹、鈴木倫太郎³、田島 木綿子⁴、角田 恒雄⁴、山田 格⁴、浅川 弘⁵、
土屋 泰久⁵、坂東 武治⁶、藤瀬 良弘⁶、樽 創⁷、村山 司⁸、丸山 正^{1,2}

¹海洋研究開発機構、²広島大院、³農業生物資源研究所、⁴国立科学博物館、⁵下田海中水族館、⁶日本鯨類研究所、⁷神奈川県立生命の星・地球博物館、⁸東海大学

Molecular analysis of expression and morbillivirus binding interface

of Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM;CD150) in cetacean.

Yui Shimizu^{1,2}, Kazue Ohishi¹, Rintarou Suzuki³, Yuko Tajima⁴, Tsuneo Kakuda⁴, Tadasu Yamada⁴, Hiroshi Asakawa⁵, Yasuhisa Tsuchiya⁵, Takeharu Bando⁶, Yoshihiro Fujise⁶, Hajime Taru⁷, Tsukasa Murayama⁸,
Tadashi Maruyama^{1,2}

¹Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, ²Hiroshima University, ³National Institute of Agrobiological Sciences, ⁴National Museum of Nature and Science, ⁵Shimoda floating Aquarium, ⁶The institute of Cetacean Research, ⁷Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, ⁸Tokai University

【目的】

モービリウイルス感染症は鯨類の大量死の主要な要因の一つで、SLAM(Signaling Lymphocyte Activation Molecule; CD150)は、その主要なウイルスレセプターである^[1]。これまで、海棲哺乳類である鯨類、鯨脚類、海牛類のSLAMの細胞外領域の高次構造モデルを構築し、細胞外領域のVドメインの結合面上にある21個のアミノ酸がウイルスとの結合に関わる可能性が示唆されている^[2]。本研究では、様々な鯨種のSLAMのVドメインのアミノ酸配列のバリエーションを調べ、ウイルスとの結合との関係を考察した。また、SLAMの生体内組織での発現を知るため、2種の鯨類について、各種組織のSLAMmRNAの量を解析した。

【材料と方法】

遺伝子配列決定：ハクジラ15種、ヒゲクジラ4種の組織からDNAを抽出し、特異的プライマーを用いたPCR法によりVドメインを含むエクソン3領域のDNAを増幅させ、遺伝子配列を決定した。

発現解析：バンドウイルカおよびコマッコウの種々の組織からRNAを抽出し、特異的プライマー

を用いたRT-PCR法により発現量を解析した。

【結果】

鯨類SLAMのVドメインの塩基配列から予想される100個のアミノ酸配列を比較した。ウイルス結合面上にあり、その結合に関与する21個のアミノ酸のうち、ウイルス結合面の端に位置する66、68、82、74、130番目の5つのアミノ酸において鯨類間で相違が認められた。

バンドウイルカでは、胸腺等のリンパ系組織と腸に、コマッコウでは脾臓等のリンパ系組織と微弱ながら大脳にSLAMの発現を認めた。

【結論】

鯨類間で認められた5つのアミノ酸変異の中で、68番目と130番目のアミノ酸変化は電荷の変化を伴い、電荷変化の無い他の3つのアミノ酸の変異に比して、ウイルスとの結合への影響が大きいと考えられた。

SLAMは鯨類のリンパ系組織で恒常的に発現していると考えられた。

【参考文献】

1. Tatsuo et al. (2000) Nature, 406:893-897
2. Ohishi et al., CIMID, in press

伊藤琢也¹, 鯉江洋², 瀬川太雄¹, 柳澤牧央³, 植田啓一³, 桑野涼⁴, 鈴木美和⁵, 森友忠昭¹, 酒井健夫¹
¹日大・動物医科学研究センター, ²日大・獣医内科学研究室,
³沖縄美ら海水族館, ⁴大分マリーナパレス水族館, ⁵日大・海洋生物生理学研究室

Hematopoiesis in dolphin bone marrow

Takuya Itou¹, Hiroshi Koie², Takao Segawa¹, Makio Yanagisawa³, Keiichi Ueda³,
 Ryo Kuwano⁴, Miwa Suzuki⁵, Tadaaki Moritomo¹, Takeo Sakai¹

¹Nihon University Veterinary Research Center, ²Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Nihon University,
³Okinawa Churaumi Aquarium, ⁴Oita Marine Palace Aquarium, ⁵Department of Marine Science and Resources,
 Nihon University

【目的】

鯨類の造血に関する知見は乏しく、造血器官の特定、またはその機構に関しては未解明な部分が多い。本研究は、特異な生息環境に適応進化してきた哺乳動物であるイルカの生体防御機構を解明する手がかりを得るために、各種イルカの死亡個体を用いて造血部位の検索に取り組んだ。

【材料と方法】

飼育下、あるいは野外で捕獲されたコビレゴンドウ、シワハイルカおよびハンドウイルカの死体を供試検体とした。イルカの全身骨格構造を把握するために、出生直後に死亡し、凍結保存されていたハンドウイルカをCTスキャン

(Toshiba Aquilion 16)で撮影し、得られた骨格断層画像データをイメージ解析装置(AZE Virtual Place Lexus)によって3次元構築した。

また、シワハイルカおよびコビレゴンドウの死体から前ビレを摘出し、CTスキャンを行った後、前腕骨および橈骨に骨髓バイオプシー用の穿刺針を刺入し、吸引またはコア穿刺による試料採取を試みた。得られた組織の塗抹標本作製し、May-Grunwald Giemsa染色を施した後、顕微鏡で観察した。

【結果】

CT3次元構築画像解析によって、イルカは、陸生哺乳動物の骨盤および四肢の長管骨に相当する骨格構造が著しく退化していることが再確認された。イルカ骨格の断層画像より、四肢骨のうち、上腕骨および橈骨の内部に骨髓腔様構造の存在が示唆された。しかし、供試したイルカの上腕骨および橈骨の内部は、陸生哺乳動物の長管骨に見られる明瞭な骨髓腔が観察されず、微細小腔である多孔質(海綿状)骨構造で満たされていた。

上腕骨および橈骨へ骨髓針を穿刺後、シリンジ吸引によって血様液体を得ることができたが、末梢血の混入が著しく、良好な標本が得られなかった。一方、上腕骨頭に刺入した穿刺針内部に採取されたコアは、粘性のある骨髓様組織であった。それらの塗抹標本には、赤芽球、骨髓芽球、前骨髓球、後骨髓球、巨核球および顆粒球等、様々な分化段階の血液細胞が観察された。

【結論】

イルカの造血は、陸生哺乳動物と同様に骨髄で行われていることが判明した。今回行った骨髓採取法はイルカ類における骨髓バイオプシーとして臨床診断に応用できる可能性がある。

古田賞受賞者講演：FP

シヨウジョウバエ自然免疫における病原細菌の認識と排除の分子機構

倉田 祥一朗
東北大学 大学院 薬学研究科

Molecular mechanisms of recognition and elimination of pathogenic bacteria in *Drosophila* innate immunity.

Shoichiro Kurata
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

動物種を越えて、そして植物までが示す免疫応答に、抗菌ペプチドの産生誘導が挙げられる。シヨウジョウバエでは、7種の抗菌ペプチドが同定されており、それらの感染に応じた発現誘導は、主にToll経路とimd経路と呼ばれる二つの細胞内シグナル伝達系で制御されている。Toll経路を制御するToll受容体のヒトの相同因子、Toll様受容体(TLR)が同定され、哺乳動物のTLRが病原体を認識するパターン認識受容体であることが明らかになった。その一方で、シヨウジョウバエのToll受容体はパターン認識受容体としては機能しない。

我々は、シヨウジョウバエでの過剰発現系を利用したゲノムワイドな遺伝子探索系を確立し、パターン認識受容体として、ペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)-LEを同定した。PGRP-LEは、imd経路を選択的に活性化すると共に、メラニン化を誘導する。一方、他の研究グループによりPGRP-SAがToll経路の活性化に必要であり、PGRP-LCがimd経路の活性化に必要であることが示された。我々は、PGRP-LEがグラム陰性菌と一部のグラム陽性菌が有するジアミノピメリン酸(DAP)型ペプチドグリカンの特異的に認識し、多くのグラム陽性菌が有するリシン型ペプチドグリカンを認識しないことを明らかにした。その後、他の研究グループによりPGRP-LCもDAP型ペプチドグリカンを認識し、PGRP-SAがリシン型ペプチドグリカンの認識に関わることが示された。これらにより、シヨウジョウバエでは、PGRPファミリーの因子が、感染する病原細菌の有するペプチドグリカンの構造の違いを識別し、それぞれ対

応する免疫応答を誘導することが明らかとなった。哺乳動物自然免疫でも、NODタンパク質がペプチドグリカンの構造の違いを識別することが明らかとなり、現在では自然免疫におけるペプチドグリカン構造の識別の重要性は広く受け入れられている。

PGRP-LEの細胞外での機能を確認するために行ったモザイク解析により、PGRP-LEは細胞外での機能に加えて、細胞内でもパターン認識受容体として機能していることが示唆された。このことは、PGRP-LEが細胞内寄生細菌の認識と排除に関わる事を示唆している。実際、PGRP-LEは細胞内寄生細菌でDAP型ペプチドグリカンを持つリステリア菌に対する感染防御に重要であった。その際、PGRP-LEは感染したリステリア菌を細胞質中でDAP型ペプチドグリカンを介して認識し、オートファジーを誘導して排除する事が明らかとなった。これらの結果は、細胞内寄生細菌に対する抵抗性におけるオートファジーの重要性を初めて示すと共に、細胞内寄生細菌を認識してオートファジーを誘導する因子を初めて明らかにした。また、これまでほとんど理解されていなかった細胞内感染防御機構の一端を明らかにした。

【発表論文】

1. Takehana et al. (2002) PNAS, 99: 13705-13710
2. Yajima et al. (2003) Biochem. J., 371: 205-210
3. Takehana et al. (2004) EMBO J., 23: 4690-4700
4. Lim et al. (2006) JBC, 281: 8286-8295
5. Kaneko et al. (2006) Nature Immunol., 7: 715-723
6. Yano et al. (2008) Nature Immunol., 9: 908-916

特別講演：SL

中山 俊憲

千葉大学大学院医学研究院・免疫発生学教室

Functional Differentiation of CD4 T cells: Acquisition and Maintenance of Their Functional Identity

Toshinori Nakayama

Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University

CD4 や CD8 陽性の T 細胞は胸腺で分化成熟し末梢リンパ組織に移行する。胸腺を離れた T 細胞は成熟しているがまだ生体防御の最前線で働くことはできない。末梢のリンパ組織で特異的な抗原と一度反応し、機能型 T 細胞に機能分化して初めて役に立つ免疫反応を起こすことが出来るようになる。これらの機能型の T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞の場合、Th1, Th2, Th17, Treg という名前が付いている。これらの細胞分画は病原微生物等の外来抗原と反応した場合に産生するサイトカインが異なるため、それぞれ違った形の免疫反応を誘導し違った病原微生物の排除に役立っている。また、それぞれの細胞分画はお互いにバランスを保って存在しており、バランスが崩れると特定の免疫疾患にかかりやすくなる、といわれている。Th2 細胞が優位な状態はアレルギー疾患と関連があり、臓器特異的な自己免疫疾患の一部は Th17 細胞によって発症する。機能

分化したこれらの CD4 陽性 T 細胞の一部はメモリー T 細胞として生体内で長期間生存し続ける。メモリー T 細胞は2回目の感染の際には敏速な免疫反応を起こし病原微生物をする。今回の講演では、CD4 陽性 T 細胞の機能分化の全体像をレビューするとともに、どのようにメモリー CD4 T 細胞が形成され、機能が維持されるのかについて、私たちの研究成果と考察を紹介したい。(1, 2)。

参考文献

1. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Initiation and maintenance of Th2 cell identity. *Curr. Opin. Immunol.* 20:265-271 (2008).
2. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83 (2009).

シンポジウム

リンパ球の起源と分化

S1 ~ S6

S1 Insight into the phylogeny of T and B cells based on the ontogenic processes of hematopoiesis.

Hiroshi Kawamoto

Laboratory for Lymphocyte Development, RIKEN Research Center for Allergy
and Immunology

T細胞とB細胞の起源：個体発生過程から系統発生過程を考察する

河本 宏

理研 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫発生研究チーム

The classical model of hematopoiesis postulates that in the first step of differentiation, the stem cell generates common myelo-erythroid progenitors (CMEP) and common lymphoid progenitors (CLP). Based on our previous studies in fetal mice, however, we have proposed a different model, namely “myeloid based model”, in which the first branch from HSC produces CMEP and common myelo-lymphoid progenitors (CMLP), which subsequently produces myeloid-B and myeloid-T progenitors¹⁻³. Recently, we provided clonal evidence that the early cell populations in the adult thymus contain progenitors that have lost the potential to generate B cells but retain substantial macrophage potential⁴. We also showed that such thymic T cell progenitors can give rise to macrophages in the thymic environment *in vivo*. These findings argue against the classical dichotomy model in which T cells are derived from CLP, and instead support the validity of the myeloid-based model for both adult and fetal hematopoiesis.

Myeloid based model proposes a new concept, where blood cells are reallocated into prototype (myeloid) vs specialized types (erythroid, T and B). This model also enables us to provide insights into the evolutionary

events through which erythroid, T and B lineages have developed. Segregation of primitive phagocytes into erythroid cells and innate immune cells, and segregation of innate immune cells into cytotoxic cells and phagocytes, had already been completed by the stage of jawless fish. Infection of a transposon containing ancestral Rag genes and signal sequences took place at a stage between jawless and cartilaginous fish. It is presumed that cytotoxic cells and phagocytes independently came to use this infected gene, evolving into T and B cells, respectively. According to this scenario, the segregation of T and B cell lineages occurred much earlier than the emergence of an acquired immune system. The ontogenic events during hematopoiesis thus seem to recapitulate these phylogenetic processes.

References:

1. Kawamoto H et al. *Int Immunol.* 9: 1011-1019, 1997.
2. Kawamoto H et al. *Immunity.* 12: 441-450, 2000.
3. Kawamoto H and Katsura Y. *Trends Immunol.* 27: 193-200, 2009.
4. Wada H et al. *Nature.* 452: 768-772, 2008.

Novel insights into the protein structure, function and production of IgT, a monomeric rainbow trout immunoglobulin.

J. Oriol Sunyer

Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania

Teleost fish are known to have three immunoglobulin isotypes, IgM, IgD and IgT/IgZ. Since its discovery 5 years ago, nothing has been reported regarding the protein structure, function and distribution of IgZ/IgT. We have raised polyclonal and monoclonal antibodies against IgT that have enabled us to affinity purify it from trout plasma. We found that IgT is a 180 kDa Ig, thus representing the first monomeric immunoglobulin to be reported in a teleost fish. The anti-IgT mAb has enabled us to identify a unique B cell subset expressing exclusively surface IgT. The existence of this new B cell subset was verified both by flow cytometry and immunohistochemistry analysis. Interestingly, sorted IgT+ B cells are devoid of IgD expression, whereas IgM+ B cells express abundantly IgD transcripts. This finding indicates that teleost fish contain at least two major B cell populations, one expressing surface IgT, and the other expressing IgM and IgD. Importantly, flow cytometric and double immunofluorescence analyses showed that in the spleen, head kidney and peripheral blood, IgT+ B cells comprise 10-20% of all B cells. Similar to IgM+ B cells, we found that a large percentage of IgT+ B cells from all these organs are capable of phagocytosing large particles.

Thus far, IgM is the only known teleost fish immunoglobulin involved in eliciting antigen-specific immune responses in teleost fish. However, here we present for the first time exciting data showing that rainbow trout produces IgT-specific responses upon antigenic stimulation. More specifically we show that rainbow trout immunized with a model protein antigen (Glutathione-S-transferase) or with *Vibrio anguillarum* bacterin induce in both cases antigen-specific IgT responses. The results were confirmed both by ELISA and immunoprecipitation studies. This is a fundamental finding as it indicates that teleost fish have not only one (as originally thought) but two immunoglobulin isotypes responding to antigenic stimulation, IgM and IgT.

Our results represent the first structural and functional studies of IgT at the protein level. Our findings open a new area in the study of fish immune responses and, are expected to have crucial implications for the assessment and development of new strategies and tools to vaccinate fish. Overall, our results show the rise of new player in teleost fish immunity.

両生類造血に学ぶ～アフリカツメガエル血球産生のダイナミクス～

小坂(野川)菜美, 前川 峻, 永澤 和道, 家村 仁美, 奥井武仁, 加藤 尚志
早稲田大学 先進理工学研究科生命理工学専攻・教育学部理学科生物学専修

The dynamics of hematopoiesis in African clawed frog

Nami Nogawa-Kosaka, Shun Maekawa, Kazumichi Nagasawa, Hitomi Iemura, Takehito Okui, Takashi Kato
Graduate School of Advanced Science and Engineering, and Department of Biology, School of Education
Waseda University

造血(血球産生)は多くの脊椎動物に共通に備わっている仕組みであり, 赤血球による酸素供給, 白血球による生体防御, 血小板(栓球)による止血・血栓形成によって生命維持を担う基幹系である。動物の成体造血では, 造血幹細胞から様々な因子や組織環境との相互作用を受けて, 末梢循環血球が誕生する。様々なヒトの血球減少症治療薬として造血因子(サイトカイン)の遺伝子組換え医薬が実用化され, あるいは造血幹細胞移植による疾病治療が一般化するに至った過程では, 実験血液学や細胞生物学分野の基礎研究と応用研究の両輪による貢献がある。しかし脊椎動物全体を俯瞰すると, 造血に関する科学的知見の蓄積は乏しく, 未知の探求課題は多い。現代生物学の諸手法を活用してこれらをつぶさに調べ, 生物種間で比較するためには, i) 血球や血球前駆細胞の鑑別法の確立, ii) 遺伝子, 蛋白質, 抗体など生物資源の系統的な準備, iii) *in vivo/in vitro* 実験系の確立, などによって実験環境の整備が必要となる。

2002年, 私達は無尾両生類アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の成体における造血研究に着手した。先駆的研究によって, ツメガエル成体の主たる造血の場が肝臓や脾臓であることや, 血球形態は古くに報告されていた。しかし血球産生の分子基盤は不明であり, 血球前駆細胞の鑑別や分離法も未確立であった。鳥類や魚類と同様, ツメガエルの赤血球と栓球は有核であり, 栓球は血小板(粒子)にならずに血液循環に移行する。血球形態からだけみても,

ツメガエルの血球の増殖・分化様式は, ヒトやマウスと比較してかなり異なると考えられた。実際にツメガエルの赤血球産生因子 erythropoietin の構造を明らかにしたところ, 驚くべきことに哺乳類では安定した血液循環に必須の構造として知られているN結合型糖鎖の分子付加は, ツメガエルでは欠失していた。このことよりツメガエルでは肝臓内のパラクライン刺激によって赤血球が産生されるという新たな仕組みを見出した。栓球産生因子 thrombopoietin の機能と構造についても検討を進めているが, 活性・機能は明らかではない。これに対し, 先人によるツメガエルの免疫系に関する研究は散見され, また白血球系細胞の形態はヒトやマウスと類似している。しかし顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの相同分子の活性・機能は不明である。

造血制御についても興味深い結果が得られつつある。外温(変温)動物であるツメガエルを低温に暴露すると, 全末梢血球数が低下し, 可逆的な汎血球減少症となる。この現象を追求して, 造血制御の温度応答性を調べるモデルはほぼ確立しており, 現在, マウスの実験系との比較を進めている。

新たな動物モデル確立には, 相当の労力と時間の投入を要する。比較生物学の視点から実験に取り組む者の共通の悩みに違いない。私達のツメガエル造血解析はまだ途上であり, 7年間で得た知見はさほど多くはない。しかし生物種それぞれの造血系を比較し, 造血の多様性と普遍性を明らかにしていくことは, 格好の探求課題であると実感している。

森友 忠昭・関谷麻優子・小林 功・片倉 文彦・吉田美幸・山口卓哉・高野晃一

Isolation and characterization of fish hematopoietic stem/progenitor cells

Tadaaki Moritomo, Mayuko Sekiya, Isao Kobayashi, Fumihiko Katakura, Miyuki Yoshida,
Takuya Yamaguchi and Koich Takano
Laboratory of Fish Pathology, Department of Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】哺乳類では純系マウスを用いた”移植実験”や特定の造血因子の存在下でコロニーを形成させる”コロニー形成法”等により、造血幹/前駆細胞が同定されて来た。しかし魚類では、移植に適した大型純系魚が確立されていないことや、リコンビナント蛋白の作製に必要な造血因子の情報が少ない等の理由で、造血機構の解明は主に形態学的手法に限られて来た。そこで、我々は魚類造血機構の解明に必要な、これら基本技術の開発を試みた。

移植実験による魚類造血幹細胞の存在証明：日本に生息する3倍体クローンギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) のある系統では、卵を近縁のキンギョ (*Carassius auratus*) 精子で受精させると、4倍体雑種をつくるものがある。この4倍体雑種に3倍体の細胞を移植した場合、3倍体細胞は拒絶されず生着し、さらにDNA含量の違いから移植細胞の動態を容易に追跡できる。そこで我々は、魚類の主要な造血部位である腎臓の造血細胞を3倍体(ドナー)より分離し、これを4倍体(レシピエント)に移植した。その結果、4倍体血中に3倍体由来のすべての種類の血球が1年以上に亘って観察され、長期造血維持能と多分化能をもった造血幹細胞がドナー腎臓中に存在することが判った。

魚類造血幹細胞の分離・濃縮：次に我々は、造血幹細胞の分離法を検討した。すなわち、幹細胞の持つ色素排出能を利用し、DNA結合色素(Hoechst33342)で3倍体の腎臓造血細胞を染色後、フローサイトメトリーにより難染性分画(SP細胞)を分離した。このSP細胞を4倍体に移植したところ、非常に少ない細胞数で3倍体由来の造血が構築され、SP細胞分画中に造血幹細胞が濃縮されていることがわかった。

魚類造血幹細胞の性状解析：魚類においてもSP細胞分画中に造血幹細胞が濃縮されていることがわかった。そこで、遺伝子解析が進んでいるゼブラフィッシュよりSP細胞を分離し、マイクロアレイによる網羅的発現解析をおこなった。その結果、*abcg2* や *gata2* などの哺乳類造血幹細胞と同様の遺伝子発現が確認された。

造血細胞の培養(Bulk培養)：哺乳類では、造血支持能を持った細胞株と造血細胞を共培養することで、造血前駆細胞の分化能を調べる方法が確立されている。そこで、我々は魚類の造血関連組織(腎臓・脾臓・胸腺など)から細胞株の樹立を試み、いくつかの造血支持能を持った細胞株を得ることに成功した。これらの支持細胞層上にギンブナやコイの腎臓造血細胞を播種したところ、造血細胞の活発な増殖が認められ、最長で60日間・20代以上の継代維持が可能であった。また、増殖した細胞の性状を調べたところ、T細胞およびマクロファージ関連遺伝子の発現が認められ、さらに抗体を用いた解析により、CD4陽性CD8陰性T細胞が増殖していることもわかった。

造血細胞の培養(コロニー形成試験)：上記造血細胞培養の“ならし培地”中にはT細胞またはマクロファージの増殖因子が含まれると考えられた。そこで、あらかじめ96穴プレートに支持細胞層を形成させ、これに1個/穴になるように腎臓造血細胞を播種し、ならし培地を加えて培養した。その結果、96穴中2~3穴でコロニーが形成され、これらは、マクロファージ関連遺伝子のみを発現するコロニー(type I)とマクロファージのみならずT細胞関連遺伝子も発現するコロニー(type II)からなっていた。

【結論】魚類成熟血球の組成は、哺乳類とほぼ同じであり、血球分化機構も共通点が多い。このことは両者の共通祖先ですでに脊椎動物造血機構の基本型が確立されていたことを意味する。実際、本発表のSP細胞の解析でも、哺乳類の造血幹細胞と似た遺伝子発現が認められ、両者を比較することで造血幹細胞維持機構の本質的な解明に役立つものと考えられる。また、近年、河本・桂らによって、新たな血球分化モデル(ミエロイド基本モデル)が提唱されたが、本研究のコロニー形成試験でも、マクロファージとT細胞の両方の性質を持った細胞の存在が示唆された。今後、ミエロイド基本モデルとの関連性をさらに検討する必要がある。

魚類の造血機構を解明することは、ヒトを含む哺乳類造血の本質的な理解につながると考えられる。

名川文清

東京大学大学院・理学系研究科・生物化学専攻

Jawless fish lamprey diversifies antigen receptor genes via variable crossover points during gene conversion

Fumikiyo Nagawa

Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo

獲得免疫系は、外界から侵入してくる病原体を特異的に認識・排除するために脊椎動物が持つ高度なシステムであり、ゲノム再編成により多様化される抗原受容体が重要な役割りを果たしている。獲得免疫系をもつ最も下等な脊椎動物であるヤツメウナギやヌタウナギ等の無顎類は、イムノグロブリン型の抗原受容体ではなく、variable lymphocyte receptor (VLR) を抗原受容体として持っている。VLR には2種類 (VLR_A と VLR_B) があり、VLR_A を発現しているリンパ球は有顎類のT細胞に、VLR_B を発現しているリンパ球はB細胞に対応する可能性が最近 Max Cooper らによって報告された。これら2種類の VLR 遺伝子はどちらも複数の leucine-rich repeat (LRR) を含み、それぞれの分子は LRR の数とその配列において極めて大きな多様性を示す。VLR 遺伝子は、V(D)J 組み換えとは異なる遺伝子再編成機構により多様性を創出している。再編成前の定常領域遺伝子座には LRR は認められず、周辺にある多数の LRR 遺伝子セグメントうち、数個のセグメントが選択されて持ち寄られ、機能型遺伝子が創出される。我々は、この遺伝子再編

成の分子機構を解析し、"copy choice" あるいは "template switching" と呼ばれる遺伝子再編成機構が関与していることをすでに明らかにしている^[1]。copy choice とは、複製の際に DNA polymerase が短い繰り返し配列の間で基質を switch する現象であり、これにより様々な DNA の再編成が起こることが知られている。我々はさらに、VLR 遺伝子再編成がどのように制御されているのかについて調べるため、ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) の VLR 遺伝子 (VLR_A および VLR_B) の再編成を single-cell PCR を用いて解析した。その結果、これら2つの遺伝子の再編成は相互排他的に起こっていること、また、この系においても、イムノグロブリン型の抗原受容体遺伝子と同様、allelic exclusion が基本的に成立している事が明らかとなった。これらの結果を基に無顎類抗原受容体 VLR 遺伝子の再編成とその制御の仕組みについて考察したい。

Reference

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

澤田知夫

山口大学・医学研究科・器官解剖

Immune cells in tunicates : the function and differentiation of hemocytes in solitary ascidians.

Tomoo Sawada

Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

【はじめに】

ナメクジウオと共に脊索動物の祖先型動物とされるホヤ類は多様な生活及び生殖様式を実現し、様々な環境に適応した。そのためホヤ類の血リンパやその中の浮遊細胞（血球）には種差が大きく、血球分類も種により異なる¹⁾。敢えて大雑把に分ければ、液胞ないし大型顆粒をもつ vacuolated cells、小顆粒をもつ granular cells、顆粒の目立たない hyaline cells、小型で核占有率が大きい lymphocyte-like cells または hemoblasts に分けられる。さらにその中に亜型を含み、その分類・命名法は研究者により異なるのが現状である。

ホヤ類の血球機能のうち多くの種で明確に示されているのは食作用であり、hyaline cells（電顕観察では fine granular cells などとされる場合もある）が活発な食作用を示すことが多い。さらに、小さな粒子にはほとんどの血球が食作用を示す場合もあり、phagocytes の定義も研究者により異なる。また、vacuolated あるいは granulated cells は形態や染色性の違いに基づいてさらに細かく分類されるが、液胞や顆粒の内容物が解明されている例は少ない。ほ乳類リンパ球との機能的共通性が示されていない lymphocyte-like cells は、造血や血球分化の観点から hemoblasts と呼ばれる細胞と重なることが多いと思われる。

この状況を踏まえた上で、今回はマボヤとエボヤの血球を取り上げ、その種類や造血・分化と血球機能及びマボヤ血球の自他識別反応について紹介する。

【マボヤおよびエボヤの血球】

澤田ら（1991）は、マボヤ血球を vacuolated cells (v1-v4)、granular cells (g1-g3)、phagocytes (p1, p2) と lymphoid cells (ly) の 10 種類に分けた。

他の研究者による分類もあるが、ここでは澤田らの分類名を用いる。また澤田ら（1993）はエボヤ血球を 4 種類に分け、hyaline cells、eosinophilic granulocytes、basophilic granulocytes および hemoblasts とした。エボヤの hyaline cells はマボヤ p2 に、basophilic granulocytes は g1 に、hemoblasts は ly に相当すると思われる。

マボヤ p1, p2 はどちらも強い食能を示すが、大きさと行動様式が異なる。小さい p1 が基質上に薄く拡がり融合して多核細胞シートを作るのに対し、大きい p2 は基質上を動き回って異物を食食する。この p1 と p2 は同種別個体の血球を識別し、同種別個体のホルマリン固定血球を食食するが、自己の固定血球は食食しない。マボヤ血球は別個体の血球と混合されると接触反応²⁾、あるいは凝集反応³⁾を示し、10-20%の非反応性組合せが出現するが、p1 と p2 の対同種別個体識別パターンはそれらと一致した。

【血球分化】

澤田ら（1994）が報告したエボヤ鰓組織の培養系では、鰓組織中に数種の血球が互いに密着している細胞集塊が見られ、同種類の血球が 2・3 個ずつまとまって hemoblasts を囲んでいた。同様の血球細胞の集塊が、マボヤの造血組織でも観察されている。このような血球集塊の存在は、エボヤやマボヤの血球分化が hemoblast の増殖後に速やかに起こり、互いに血球間の接触を介して分化誘導を行っている可能性を示唆するものと考えている。

【参考文献】

1. Wright RT (1981) *Invertebrate blood cells*, vol.2, Ratcliff and Rowley eds., Academic press.
2. Fuke M (1980) *Biol Bull*, 158:7304-315.
3. Sawada T, Ohtake S (1994) *Zool Sci*, 11:817-820.

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、プログラム役員2名、抄録役員1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（一般および博士課程大学院生）の会費は、年額 3,000 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。
3. 賛助会員の会費は、1 口 20,000 円とする。
4. 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。
5. 事務局には役員に準ずる補助役員を置くことができる。
6. 講演者は本会員に限る。
7. 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 20 年 8 月 25 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
(assiatant)**

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

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 dues of the active (individual) members including PhD students are 3,000 Japanese yen a head
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.

**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 pay your membership dues (3,000 yen) at registration desk of JADCI meeting.*

協賛企業・団体

平成21年7月7日現在

【協賛】

株式会社 高長

株式会社 三啓

株式会社 メド城取

正晃株式会社

株式会社 菅原製作所

株式会社 トーヨー技術研究所

湘南和光純薬（株）

株式会社 国際文献印刷社

株式会社 立野商店

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21年7月

日本比較免疫学会会長 吉田 彪
第21回学術集会会長 中西 照幸

研究用試薬・輸入試薬・理化学機器 研究室内で必要な物は何でもご用命下さい



株式会社 高長

事業内容

- ・研究用一般試薬、バイオサイエンス関連試薬、輸入試薬、工業用薬品の販売
- ・医薬品、動物用医薬品、臨床検査薬の販売
- ・研究用理化学機器、臨床検査用機器の販売

登録・許可

- ・毒物劇物一般販売業
- ・医薬品卸売販売業
- ・動物用医薬品一般販売
- ・高度管理医療機器等販売業

本社

東京都文京区本駒込5-2-10

TEL:03-3941-7161 FAX:03-3946-3980

メール:juchuu@takacho.com

多摩営業所

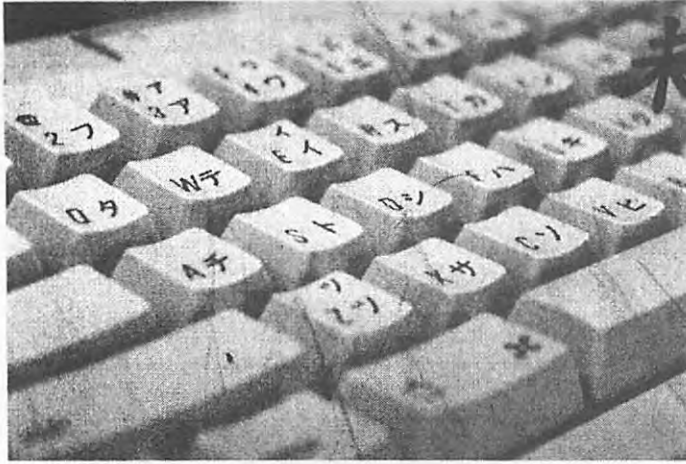
東京都国立市富士見台3-22-7-103

TEL:03-3941-7161 FAX:03-3946-3980

柏営業所

千葉県柏市豊四季167 マンション豊四季1F

TEL:03-3941-7161 FAX:03-3946-3980



未来を見る力

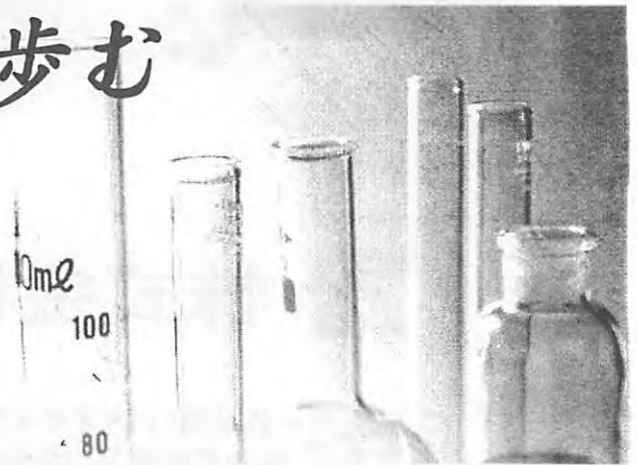
provide for think of the future

私たちは常に未来を見つめて歩み続けます。
お客様のどのようなニーズにも応えられる
よう時代の最先端を目指して...

技術の進化と歩む

together with new technology.

21世紀。ヒトゲノム・ITなどの時代を
先導する技術を支える企業として、私達は
日々たゆまぬ努力を続けます。



ご用命は、
お近くのオフィスまでどうぞ

東京オフィス

〒155-0032 東京都世田谷区赤堤3-3-4

tel(03)5355-0310 fax(03)5355-0311

E-mail:tokyo@med-shirotori.co.jp

湘南オフィス

〒252-0813 神奈川県藤沢市金井野170-2

tel(0466)80-1536 fax(0466)80-1538

E-mail:shonan@med-shirotori.co.jp

Medical & Scientific Equipments Med.Shirotori co.,ltd



株式会社 メド城取

ANATOMICA **スガワラ**

各種解剖器具 ○ 各種解剖道具
解剖実習器具セット
解剖衣 ○ 解剖キャップ ○ 白衣 ○ 前掛
活性炭マスク ○ アームカバー
ラテックス手袋
ご遺体処置収納用品
標本容器 ○ ギブスカッター
動脈注入ポンプ ○ 解剖台
解剖照明灯 ○ ストレッチャー
ミニクレーン ○ パワーリフター
ドアスルーフォークリフト
器具等の修理も承ります



厚生省許可番号 13BZ2471号



株式会社 **菅原製作所**

〒131-0044 東京都墨田区文花 3-20-18
TEL 03-3611-7610
FAX 03-3611-7612



A1

共焦点レーザー顕微鏡システム

最新・最強の共焦点レーザー顕微鏡システム、登場!

- ・細胞内の生命現象を逃さず捉える、高速・高画質・スペクトルイメージング。
- ・高速・高画質・同時スキャンの3モードが一台で可能なハイブリッドスキャナー。
- ・VAASピンホールユニットで、光シグナルロスを最小限に。
- ・簡単操作で顕微鏡・カメラ・コンフォーカルのすべてをサポートする、画像統合ソフトウェア NIS-Elements C。

株式会社ニコンインステック 特約店

カタログパンフレット等のご請求は当社まで。

Yes! We can do it.
おかげさまで
60
年

Sankei 株式会社 三 啓

本 社：〒113-8534 東京都文京区本郷 2-17-7 Tel. 03(5805)0514 Fax. 03(5805)0524 <http://www.sankei-coltd.co.jp>

筑波営業所 〒305-0861	茨城県つくば市谷田部 6524-1	☎029(839)1320	名古屋出張所 〒451-0031	名古屋市西区城西 1-9-10	☎052(528)4155
横浜営業所 〒247-0072	神奈川県鎌倉市岡本 2-5-11	☎0467(41)1221	大阪営業所 〒533-0033	大阪市東淀川区東中島 2-9-15	☎06(6327)3850
静岡営業所 〒422-8076	静岡県駿河区宮竹 1-1-16	☎054(236)5500	神戸営業所 〒650-0022	神戸市中央区元町通 6-1-6	☎078(367)2301

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

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

営業所 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
医療関連ソフトウェア |
| ■動物用医薬品 | ■分析用機器 | 上記の開発・販売 |
| ■化学工業薬品 | ■その他機器、器具 | |
| 上記の販売 | 上記の販売・修理 | |

株式会社 トーヨー技術研究所 TOYO R&D INC.

本社 〒350-1332 埼玉県狭山市下奥富 883

TEL 04-2955-7200

FAX 04-2952-0027

営業品目 TOYO's Product Lines

●水産用医薬品

- | | | |
|----------------|---------------------|-------------------|
| - エリスロマイシン 20% | - アンピシリン 5%/10%/20% | - OTC 10%/20%/40% |
| - OTC-Q 20% | - リンコマイシン 20% | - チアンフェニコール 20% |

●水産用混合飼料・飼料添加物

- | | | | |
|-----------|-------------|--------------|------------|
| - 総合ビタミン剤 | - 強肝剤・免疫賦活剤 | - プレミックス混合飼料 | - OEM 受託生産 |
|-----------|-------------|--------------|------------|

●健康食品、健康食品原料

●米国 HACCP 認証取得コンサルタント、水産工場への導入

<http://www.bunken.co.jp/>

One Stop Service

PREPRESS・PRESS

DTP, L^AT_EX₂_ε, 組版専用機

学術定期刊行物, 辞書, 名簿, 報告書,
名刺, 封筒, シール, ポスター など

MANAGEMENT

学会事務代行, 編集事務代行

WEB SERVICE

WEB CONTENTS

ホームページ制作・運用

ON-LINE SYSTEM

電子投稿・査読システム

電子ジャーナル・オンラインジャーナル公開システム

Web posting system for Conference

国際会議・国内大会のオンライン投稿・査読システムなどの構築・運用サービス

国際文献印刷社は従来の印刷業務だけでなく、学会事務代行業務、編集事務代行業務、発送業務、システムインテグレーション業務の有機的なコラボレーションによる「One Stop Service」に取り組んでいます。それぞれの機能を担う各事業部門が、ニーズに合わせ横断的に連携し適切な対応を行い、学会活動に貢献することを目指しています。

各サービスに関するお問い合わせは、各営業または下記へお願いします。

株式会社 国際文献印刷社 営業部 笠井 健

E-mail: kasai@bunken.co.jp TEL: 03(3362)9741



株式会社 国際文献印刷社

本 社 169-0075 東京都新宿区高田馬場 4-4-19
TEL: 03-3362-9741 FAX: 03-3368-2827
工 場 169-0075 東京都新宿区高田馬場 3-8-8
TEL: 03-3367-6841 FAX: 03-3364-0041

日本比較免疫学会

第21回学術集会 講演要旨

原稿受付	2009年6月30日
発行日	2009年7月7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
-----	--------------------------------