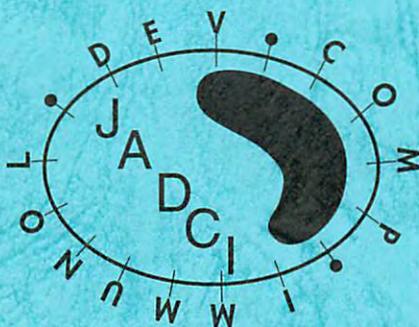


PROCEEDINGS
23rd JAPANESE ASSOCIATION FOR
DEVELOPMENTAL & COMPARATIVE IMMUNOLOGY
Yokohama Japan
August 21 to 23, 2011

日本比較免疫学会
第23回 学術集会講演要旨

会期：2011年8月21日（日）～23日（火）
会場：独立行政法人 海洋研究開発機構，横浜研究所
学術集会会長：丸山 正（JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域）
学術集会 事務局長：大石和恵（JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域）



日本比較免疫学会
— 2011 —

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 5
Session C	4 2
・古田賞受賞者講演	4 9
・特別講演	5 1
・シンポジウム I	5 3
・シンポジウム II	5 7
学会会則	6 1
(Constitution & Bylaws of JADCI)	
英文役員名簿・会則等	6 3
(Officers, Constitution & Bylaws of JADCI)	
協賛企業・団体	6 6
(Contributors)	

日本比較免疫学会 第23回 学術集会

(2011年度)

会 期：2011年8月21日（日）～23日（火）
 場 所：独立行政法人海洋研究開発機構，横浜研究所
 学術集会会長：丸山 正（JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域）

学術集会日程表

	時間	プログラム 内容
第1日目 (21日)	11:00～	受付
	12:30～	開会の辞
	12:45～	一般講演 (23 演題)
第2日目 (22日)	9:00～	一般講演 (13 演題)
	13:50～	総会・学会賞表彰式
	15:00～	古田賞受賞講演「 Molecular activation and regulatory mechanisms of innate immune responses after pathogenic microbe challenges in insects 」 Lee Bok Luel (National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy, Pusan National University)
	15:40～	特別講演 「原索動物ホヤ類における自己と非自己の配偶子認識機構」 澤田 均 (名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所)
	16:40～	記念写真撮影
	17:00～	オークション展示分の配分 および 口頭オークション
	18:30～	懇親会
第3日目 (23日)	9:00～	シンポジウム I 「深海生物の共生」 1) 化学合成共生システムの多様性と進化 藤原義弘(JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域) 2) 化学合成共生二枚貝の共生菌ゲノムの進化 吉田尊雄, 高木 善弘, 島村 繁, 丸山 正 (JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域) 3) サツマハオリムシおよびヒゲムシ(環形動物)の巨大ヘモグロビンの生理機能と構造 中川太郎 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学科) 沼本 修孝 (京大 原子炉実験所) 山本 正浩 (JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域), 三木 邦夫 (京大 院 理) 福森 義宏 (金沢大 院 自然科学), 今井 清博 (法政大 生命科学)
		シンポジウム II 「海洋無脊椎動物の比較免疫学」 1) クルマエビ類の自然免疫関連因子ノックダウンによる生体防御機構に関する研究 廣野育生 (東京海洋大 院 海洋科学技術) 2) 生体防御関連因子からみる二枚貝の防御システム 伊藤直樹 (東北大 院 農 水圏生物生産科学) 3) ヴァージニアカキの免疫系を巧妙に利用する寄生虫の戦略 田角聡志 (東大 農学部付属水産実験所), Gerardo R. Vasta (メリーランド州立大 医)
	12:00～	閉会の辞

参加者へのご案内

学術集会会場:独立行政法人海洋研究開発機構、横浜研究所
(〒236-0001 神奈川県横浜市金沢区昭和町 3173 番 25)

連絡先:〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15 独立行政法人海洋研究開発機構
海洋・極限生物圏領域 海洋生物多様性研究プログラム 丸山 正
TEL:046-867-9520, FAX:046-867-9525, E-mail:tadashim@jamstec.go.jp

受付:会場にて、8月21日(日)昼の11時00分より開始致します。ネームプレートを用意致しますので着用して下さい。なお、ネームプレートは学術集会終了後に必ずご返却願います。
学会への入会手続き、年会費の納入受付も併せて行います。

参加費:学会参加費:5,000円(会員、非会員)、3,000円(博士課程以上 学生)
学部学生および修士課程(博士課程前期)学生は無料。
当日参加も受け付けています。

懇親会参加費:4,000円【懇親会場:JAMSTEC、横浜研究所 ゲストハウス (同一敷地内)】
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:宿泊のご予約については以下の会社に取り扱っております。

株式会社 マリン・ワーク・ジャパン 旅行事業部
〒236-0042 神奈川県横浜市金沢区釜利谷東 2-16-32
TEL:045-787-0616、FAX:045-787-0630、e-mail: mwj-travel@mwj.co.jp

会場へのアクセス:横浜研究所へは、東京、横浜などから根岸線(最寄り駅は「新杉田」徒歩15分)あるいは東京、横浜、羽田空港からは京浜急行(最寄り駅は「杉田」徒歩20分)が便利です。詳しくはJAMSTECのホームページをご覧ください。

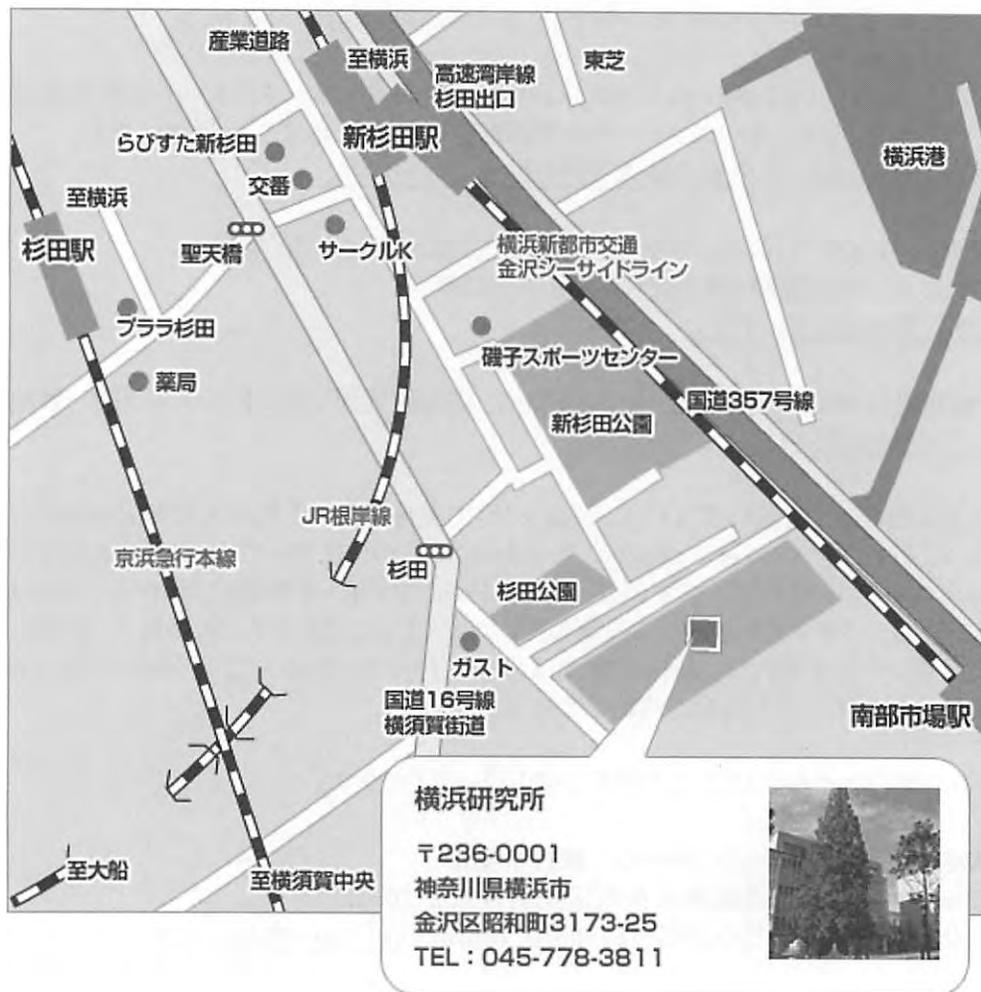
【JAMSTEC(独立行政法人海洋研究開発機構) 公式ページ】
<http://www.jamstec.go.jp/j/about/bases/yokohama.html>

1)京急の主要駅から杉田駅までの所要時間と料金

○羽田空港から 41分 580円

(空港から新逗子、久里浜、三崎口行などへ乗ったときは上大岡までは乗り換えなしだが、品川方面行に乗った場合には京急蒲田で乗り換え。快速や急行、エアポート急行は杉田駅に止まらないので、上大岡駅で普通に乗り換える必要あり。)

- 京急横浜駅から 15分 (230円)
- 2) JR 主要駅から新杉田駅までの所要時間と料金
- 東京駅から 47分 620円
- JR 横浜駅から 17分 210円
- JR 新横浜駅から(東神奈川乗り換え) 32分 290円



日本比較免疫学会・役員名簿
(2011年度)

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

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

第 23 回学術集会プログラム

第 1 日目 8 月 21 日 (日)

開会挨拶 12:30~12:45

【一般演題】

Session A 無脊椎動物の生体防御

座長：古川 亮平 (慶応大)

- A 1 12:45~ 深海産二枚貝ヒラノマクラの共生現象に関与する発現遺伝子の探索
○河戸 勝¹, 野田 智佳代², 植松 勝之³, 丸山 正¹, 大石 和恵¹, 藤原 義弘¹
(¹海洋研究開発機構, ²京急油壺マリンパーク, ³株式会社マリン・ワーク・ジャパン)
- A 2 13:00~ シンカイヒバリガイの免疫機構の解明に向けた抗血液細胞のモノクローナル抗体の作製
○関根 大介^{1,2}, 大石 和恵², 中村 欽光², 本郷 悠貴^{2,3}, 多米 晃裕⁴,
吉田 尊雄², 中澤 正年⁵, 三宅 裕志¹, 丸山 正²
(¹北里大学大学院, ²海洋研究開発機構, ³東京海洋大学大学院, ⁴株式会社マリン・ワーク・ジャパン, ⁵横浜市立大学)
- A 3 13:15~ シンカイヒバリガイの鰓細胞による食作用の解明
○多米 晃裕¹, 吉田 尊雄², 大石 和恵², 丸山 正²
(¹(株)マリン・ワーク・ジャパン, ²海洋研究開発機構)

座長：矢野 環 (東北大)

- A 4 13:30~ マガキPGRP-S1Sによるグラム陰性菌認識
○飯塚 真生¹, 長崎 稔拓^{1,2}, 高橋 計介¹, 尾定 誠¹, 伊藤 直樹¹
(¹東北大大学院農学研究科, ²東京大学大気海洋研究所)
- A 5 13:45~ プラナリアにおける黒化現象の生体防御的役割
○木村美智代, 原井ますみ, 和合治久
(埼玉医科大学・保健医療学部・健康医療科学科)
- A 6 14:00~ コユビミドリイシサンゴにおける NACHT/NB-ARC ドメインタンパク質遺伝子の増幅とドメイン構造の多様性と拘束性
○濱田麻友子, 将口栄一, 新里宙也, 川島武士, 佐藤矩行
(独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・マリングenomixユニット)

休憩 14:15~14:25

座長：伊藤 直樹 (東北大)

- A 7 14:25~ ヒトデApSRCR1 タンパク質はオプソニンとして機能する
○古川亮平^{1,2}, 松本緑^{1,2}, 金子洋之¹
(¹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・基礎理工学専攻)

A 8 14:40～ イオン液体はマボヤ (*Halocynthia roretzi*) 血球の走査型電子顕微鏡観察に利用できるか？

○大竹伸一¹, 地家豊治², 阿部健之¹, 澤田知夫³, 石井照久⁴, 宮澤七郎⁵
(¹日本大学・医学部・生物, ²日本大学・医学部・電顕室, ³山口大学・医学研究科・器官解剖, ⁴秋田大学・教文・生物, ⁵大阪大学・工学部・応用化学)

A 9 14:55～ カプトガニ補体系の感染微生物に対する活性化機構

○田川圭介¹, 吉原豊貴¹, 山本恭平², 柴田俊生², 小柴琢己^{1,2}, 川畑俊一郎^{1,2}
(¹九大院・システム生命, ²九大・理・生物)

座長：佐々木 年則 (国立感染研)

A10 15:10～ 多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの寄主侵入における免疫関連分子の探索

○井上 普, 岩淵 喜久男 (東京農工大学・応用昆虫学研究室)

A11 15:25～ ショウジョウバエ体液細胞におけるオートファジー誘導による病原体排除

○矢野 環, 若林 康介, 倉田 祥一郎 (東北大・院・薬)

A12 15:40～ 昆虫表皮マトリクス内の免疫因子

○朝野 維起¹, 帖佐 直幸², 栗林 寛¹, 新川 高志³, 磯辺 俊明³
(¹首都大学東京・生命科学, ²岩手医科大学・生化学講座, ³首都大学東京・物質分子化学)

休憩 15:55～16:05

Session B 魚類の比較免疫学 (1)

座長：中西 照幸 (日大)

B 1 16:05～ ヒラメ Toll 様受容体 3 遺伝子のクローニングおよび機能解析

○黄 晟敦¹, 大谷 真紀², 引間 順一², Tae Sung Jung², 近藤 秀裕¹, 廣野 育生¹, 青木 宙^{1,2}
(¹東京海洋大学・ゲノム科学講座, ²国立慶尚大学・獣医)

B 2 16:20～ 鱗移植片の急性拒絶反応に関わるメダカMHC遺伝子の同定

○坂内 英美, 野中 勝 (東京大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻)

B 3 16:35～ 魚類栓球の貪食作用とその活性化に伴う形態変化

○長沢 貴宏¹, 中易 千早², 松山 知正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・増養殖研究所)

座長：中村 弘明 (東京歯科大)

B 4 16:50～ 魚類における補体活性化制御因子の多様性

○辻倉 正和, 柚本 智軌, 鶴木 陽子, 中尾 実樹 (九州大学大学院・農学研究院)

B 5 17:05～ ギンプナの移植片対宿主反応におけるCD8陽性T細胞の動態

○田中 洋枝, 柴崎 康宏, 藪 健史, 森友 忠昭, 中西 照幸

(日本大学・生物資源科学部)

B 6 17:20～ コイTP0の遺伝子クローニングおよび性状解析

○林 潔高, 片倉 文彦, 藪 健史, 森友 忠昭, 中西 照幸
(日本大学・生物資源科学部)

休憩 17:35～17:45

座長：柚本 智軌 (九大)

B 7 17:45～ 魚類の造血機構解明を目的としたコイ kit ligand A の機能解析

○尻無浜 由希, 片倉 文彦, 藪 健史, 森友 忠昭, 中西 照幸
(日本大学・生物資源科学部)

B 8 18:00～ 墨汁投与時のトラフグ二次リンパ組織における免疫応答

○前田 知己¹, 末武 弘章¹, 田内 博久², 金田 充¹, 臼井 陽子¹, 菊池潔², 鈴木 譲²,
宮台 俊明¹
(¹ 福井県立大学・海洋生物資源学部, ² 東京大学・水産実験所)

B 9 18:15～ ギンブナCD3 ϵ 分子の特性解明

○村田 憲史, 大橋 健, 柴崎 康宏, 藪 健史, 森友 忠昭, 中西 照幸
(日本大学・生物資源科学部)

座長：中尾 実樹 (九大)

B10 18:30～ トラフグ腎臓に存在する形質芽球様細胞

○小高 智之^{1,2}, 筒井 繁行¹, 宮台 俊明², 菅又 龍一³, 末武 弘章^{2,3}, 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)

B11 18:45～ トラフグ gp130 はSTAT3 をリン酸化する

○金田 充, 末武 弘章, 宮台 俊明 (福井県立大学・海洋生物工学研究室)

第2日目 8月22日 (月)

Session B 魚類の比較免疫学 (2)

座長：森友 忠昭 (日大)

B12 9:00～ パターン認識受容体によるヒラメI型インターフェロンプロモーター領域の転写制御

○青木宙^{1,2}, 大谷 真紀², Seong Don Hwang¹, 加藤 剛司¹, 引間 順一², 近藤 秀裕¹,
廣野 育生¹, Tae Sung Jung²
(¹ 東京海洋大学・ゲノム科学講座, ² 慶尚国立大学校・獣医学部)

B13 9:15～ Rag1欠損ゼブラフィッシュにおける獲得免疫不全の検証

○白水 正道¹, 徳永 弓枝¹, 吉浦 康寿², 乙竹 充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 増養殖研究所)

B 14 9:30～ 寄生虫の宿主特異性に関わるフグ遺伝子の探索

- 平林陽¹, 木戸慎一¹, 木南竜平², 細谷将¹, 甲斐涉¹, 菊池潔¹, 城夕香¹,
末武弘章³, 良永知義², 小川和夫², 鈴木讓¹
(¹東京大学・水産実験所, ²東京大学・魚病学研究室, ³福井県立大学・
海洋生物工学研究室)

B 15 9:45～ The immune milieu of fish gill and skin appear Th2-skewed

- F. Takizawa¹, U. Fischer¹, K. Hashimoto², O.J.M. Dijkstra²
(¹Friedrich Loeffler Institute, Insel Riems, Germany, ²藤田保健衛生大学
Fujita Health University, Toyoake, Aichi)

座長：末武 弘章 (福井県立大)

B 16 10:00～ 新規の可変性リンパ球受容体VLRCを発現するリンパ球様細胞集団の同定

- 須藤 洋一¹, 笠松 純¹, 富居 一範¹, 大塚 紀幸¹, 岩淵 和也², 笠原 正典¹
(¹北海道大学大学院医学研究科・分子病理学分野, ²北海道大学遺伝子病制御研究所・
免疫生物分野)

B 17 10:15～ 条鰭類におけるPSMB8 遺伝子の二型性の進化

- 藤戸尚子¹, 塚本健太郎², 源島裕祐¹, 野中勝¹
(¹東京大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻, ²藤田保健衛生大学・総合医科学
研究所)

B 18 10:30～ 胸腺プロテアソームの系統発生

- 笠原 正典, 須藤 洋一, 外丸 詩野
(北海道大学・大学院医学研究科・分子病理学分野)

休憩 10:45～10:55

Session C 哺乳類の比較免疫学

座長：橋本 香保子 (千葉工大)

C 1 10:55～ 脂肪酸結合蛋白質 FABP7 によるクッパー細胞のサイトカイン産生制御

- 宮崎 啓史, 澤田 知夫, 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)

C 2 11:10～ マウスにおける血リンパ節様構造の形成誘導について

- 大塚 裕忠, 中村 雅典
(昭和大学・口腔解剖学教室)

座長：澤田 知夫 (山口大)

C 3 11:25～ コモンマーモセット骨髄由来CD34+CD117+細胞からヒトに類似したマスト細胞が分化する

- 嶋田 新¹, 亀谷 美恵¹, 布村 聡⁶, 山田 祐子¹, 末水 洋志², 伊藤 登志雄², 佐竹 正延³,
羅 智靖⁶, 谷 憲 一⁵, 佐々木 えりか², 伊藤 守², 垣生 園子⁴, 安藤 潔¹
(¹東海大学医学部, ²実験動物中央研究所, ³東北大学加齢医学研究所分子免疫分野)

⁴順天堂大学医学部免疫学教室, ⁵九州大学生体防御医学研究所ゲノム病態学
⁶日本大学医学部先進医学総合研究センター分子細胞免疫・アレルギー学講座)

C 4 11:40～ コモンマーモセット免疫系ツールの開発

○亀谷 美恵¹, 嶋田 新¹, 末水 洋志², 佐々木えりか², 伊藤 登志雄², 佐竹 正延³,
八木田 秀雄⁴, 谷 憲一⁵, 垣生 園子³
(¹東海大学・医学部・生体防御学, ²実験動物中央研究所, ³東北大学・加齢医学
研究所・分子免疫分野, ⁴順天堂大学・医学部・免疫学教室, ⁵九州大学・生体防御
医学研究所・ゲノム病態学)

座長：亀谷 美恵 (東海大)

C 5 11:55～ シロイルカの白血球を分類するモノクローナル抗体の作製

○齋藤 千明^{1,2}, 大石 和恵¹, 中村 欽光¹, 本郷 悠貴^{1,2}, 柿添 裕香³, 中澤 正年⁴,
丸山 正^{1,2}
(¹海洋研究開発機構, ²東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科, ³名古屋港水族館,
⁴横浜市立大学・医学部)

C 6 12:10～ 北西太平洋に棲息する鯨類の抗ブルセラ抗体の保有率とその特異性

○阿部 瑛理香^{1,2}, 大石 和恵¹, 坂東 武治³, 藤瀬 良弘³, 丸山 正^{1,2}
(¹海洋研究開発機構, ²東京海洋大学・大学院・海洋科学技術研究科,
³財団法人日本鯨類研究所)

C 7 12:25～ LPS 刺激バンドウイルカ白血球の EST 解析と免疫因子の変動

○大石 和恵¹, 宍戸 玲子^{1,2}, 岩田 泰尚^{1,2}, 斎藤 雅史^{1,2}, 竹中 良太³, 大津 大³,
奥津 健司³, 丸山 正^{1,2}
(¹海洋研究開発機構, ²東京海洋大学・大学院・海洋科学技術研究科,
³横浜・八景島シーパラダイス)

昼 食 12:40～13:50

総会・表彰式 13:50～14:50

休憩 14:50～15:00

古田賞受賞講演 (座長：吉田 彪)

FP: 15:00～

『Molecular activation and regulatory mechanisms of innate
immune responses after pathogenic microbe challenges in insects』

Lee Bok Luel (National Research Laboratory of Defense Proteins,
College of Pharmacy, Pusan National University)

休憩 15:30～15:40

特別講演 (座長：丸山 正)

SL: 15:40～

『原索動物ホヤ類における自己と非自己の配偶子認識機構』
澤田 均 (名大・院・理・附属臨海実験所)

16:40～ 写真撮影

17:00～ オークション展示分の配分 および 口頭オークション

18:30～ 懇親会 (JAMSTEC, 横浜研究所 ゲストハウス (同一敷地内))

第3日目 8月23日 (火)

シンポジウム I 『深海生物の共生』 司会：丸山 正

S1 9:05～ 化学合成共生システムの多様性と進化
藤原 義弘 (JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域)

S2 9:30～ 化学合成共生二枚貝の共生菌ゲノムの進化
吉田 尊雄, 高木 善弘, 島村 繁, 丸山 正
(JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域)

S3 9:55～ サツマハオリムシおよびヒゲムシ (環形動物) の巨大ヘモグロビンの生理機能と構造
○中川 太郎^{1,5,6}, 沼本 修孝^{2,4,5}, 山本 正浩³, 三木 邦夫⁴, 福森義宏⁵, 今井 清博⁶
(¹長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部, ²京都大学・原子炉実験所, ³JAMSTEC 海洋・極限環境生物圏領域, ⁴京都大学大学院・理学研究科, ⁵金沢大学大学院・自然科学研究科, ⁶法政大学・生命科学部)

休憩 10:20～10:40

シンポジウム II 『海洋無脊椎動物の比較免疫学』 司会：川畑 俊一郎

S4 10:45～ クルマエビ類の自然免疫関連因子ノックダウンによる生体防御機構に関する研究
廣野育生 (東京海洋大学・大学院・海洋科学技術)

S5 11:10～ 生体防御関連因子からみる二枚貝の防御システム
伊藤直樹 (東北大学・大学院・農学研究科・水圏動物生理学分野)

S6 11:35～ ヴァージニアカキの免疫系を巧妙に利用する寄生虫の戦略
田角 聡志¹, ヘルルド R. ヴァスタ²
(¹東大・農・附属水産実験所, ²メリーランド州立大・医・微生物学免疫学)

閉会の辞：12:00

昼食：12:05～13:00

〈見学会〉

★横浜研究所見学会：13:00～14:00（終了後自由解散）

★横須賀本部見学会：13:00～14:00 JAMSTEC 横須賀本部へ移動

（乗合タクシーあるいは貸切バスなど）

14:00～16:00 横須賀本部の見学（終了後自由解散）

一般演題 : A1 ~ A12
 B1 ~ B17
 C1 ~ C7

深海産二枚貝ヒラノマクラの共生現象に関与する発現遺伝子の探索

河戸 勝¹, 野田 智佳代², 植松 勝之³, 丸山 正¹, 大石 和恵¹, 藤原 義弘¹
¹海洋研究開発機構, ²京急油壺マリンパーク, ³株式会社マリンワークジャパン

Search for the genes involved in symbiosis in the deep-sea mussel *Adipicola pacifica*

Masaru Kawato¹, Chikayo Noda², Katsuyuki Uematsu³, Tadashi Maruyama¹, Kazue Ohishi¹, Yoshihiro Fujiwara¹
¹Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, ²Keikyu Aburatsubo Marine Park, ³Marine Works Japan, Ltd.

【目的】

真核生物と原核生物の間には様々な共生現象が成立する。深海では化学合成細菌を自らの体内に宿し栄養を得る化学合成共生システムを持つ無脊椎動物が多数発見されている。しかしながら本システムの分子メカニズムについては未解明な点が多く、分子レベルでの研究も昆虫類などの共生と比べると極めて少ない。我々は深海産共生二枚貝ヒラノマクラに着目した。本種は化学合成細菌を共生者とする深海動物としては例外的に長期飼育が可能であり、更に人為的に共生細菌を除去できることが示された。そこで本研究では本種の共生現象における分子メカニズムを解明することを目的とし、共生細菌の有無で宿主細胞の発現遺伝子を比較することにより、ヒラノマクラの共生に関与する分子を探索した。

【材料と方法】

飼育中のヒラノマクラに抗生物質処理を施し、鰓上皮細胞から共生細菌を除去した。通常飼育個体(共生細菌有り)および除菌個体(共生細菌無し)のそれぞれから mRNA を抽出し、網羅的発現変化測定法 HiCEP を用いて、鰓上皮細胞の遺伝子発現パターンを比較した。両個体間で発現量に顕著な違いがあった遺伝子について塩基配列を決定し、塩基配列およびアミノ酸配列データベースを利用して相同性解析を実施し、発現タンパク質の機能を推定した。

【結果】

HiCEP の結果、通常個体および除菌個体の両者から約 9000 の転写産物を検出した。このうち約 60% の遺伝子は両個体で発現量に変化はなかったが、残りの遺伝子はそれぞれ他方よりも 1.5 倍以上の発現量を示した。我々は通常個体で除菌個体よりも多く発現した遺伝子の中から、24 遺伝子の塩基配列を決定した。相同性解析からこれらの幾つかは免疫系因子(ペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP, マクロファージ発現タンパク質 Mpeg1, カテプシン L)の遺伝子であることを明らかにした。また細胞骨格や代謝酵素、その他数種の機能タンパク質の遺伝子も通常個体で多く発現していた。

【結論】

我々はヒラノマクラ鰓上皮細胞において共生細菌の有無により遺伝子発現が大きく変化することを示した。また共生細菌の存在により発現が誘導される遺伝子の幾つかを明らかにした。それらの発現タンパク質は免疫系因子、細胞骨格および代謝酵素などであった。本発現タンパク質と共生現象との関係は現在解析中であるが、これら分子が細菌との共生関係の維持に重要な働きを有する可能性がある。特に PGRP は免疫系において細菌認識の主要な分子であることから、ヒラノマクラ PGRP は共生細菌の認識に関与している可能性がある。本タンパク質の機能や細菌との特異性について明らかにすることにより、宿主-共生者間の認識メカニズムの理解に繋がると期待する。

シンカイヒバリガイの免疫機構の解明に向けた抗血液細胞 モノクローナル抗体の作製

関根 大介^{1,2}、大石 和恵²、中村 欽光²、本郷 悠貴^{2,3}、多米 晃裕⁴、

吉田 尊雄²、中澤 正年⁵、三宅 裕志¹、丸山 正²

¹北里大学大学院、²海洋研究開発機構、³東京海洋大学大学院、

⁴(株)マリン・ワーク・ジャパン、⁵横浜市立大学

Monoclonal antibodies for specific identification of hemocytes in *Bathymodiolus japonicus*

Daisuke Sekine^{1,2}, Kazue Oishi², Yoshimitsu Nakamura², Yuki Hongo^{2,3}, Akihiro Tame⁴,

Takao Yoshida², Masatoshi Nakazawa⁵, Hiroshi Miyake¹, Tadashi Maruyama²

¹Kitazato University, ²Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,

³Tokyo University of Marine Science and Technology, ⁴Marine Works Japan, ⁵Yokohama City University

【目的】

シンカイヒバリガイ *Bathymodiolus japonicus* は鰓上皮細胞内にメタン酸化細菌を共生させている深海性二枚貝である。共生機構を考える上で生体防御の理解が重要であると考えられるが、シンカイヒバリガイにおける情報は少ない。生体防御で重要な免疫学的役割を担っていると考えられている血球には形態学的に無顆粒細胞、顆粒細胞、および少顆粒細胞の3種類が観察されているが、その役割については、わずかに食能に関する情報がある程度である。本研究では、シンカイヒバリガイの生体防御の機構を明らかにするために、血球を機能的に分類するためのモノクローナル抗体の作製を試みた。

【材料と方法】

2010年5月に、海洋調査船「なつしま」/無人探査機「ハイパードルフィン」による調査潜航機(NT10-08)で採取されたシンカイヒバリガイを材料として用いた。血球を抗原として Balb/c 7週齢の雌マウスを2週間おき3回免疫し、脾臓を摘出して抗体産生細胞である脾臓リンパ球を得た。このリン

パ球とマウス由来の骨髄腫細胞(NS-1)を、ポリエチレングリコール法によって細胞融合させ、ハイブリドーマを作製した。2%パラホルムアルデヒドで固定した血球を抗原とする免疫蛍光染色法によって抗血球抗体を産生するものをスクリーニングし、さらに、限界希釈法によりクローン化した。

【結果】

免疫蛍光染色法によって、陽性反応を示す計285個のモノクローナル抗体を得た。これらには、すべての血球を認識するものや特定の血球のみを認識するものがあり、その認識部位も、血球内全体、細胞膜、細胞内顆粒等、多様であった。

【結論】

得られたモノクローナル抗体を用いて、シンカイヒバリガイの血球をいくつかに分類することができ、細胞マーカーとして利用できると考えられた。今後、各々の種類の血球の形態、生体での分布、免疫学的な機能との相関について調べたい。

*本研究の一部は「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」により行われた。

シンカイヒバリガイの鰓細胞による食作用の解明

多米 晃裕¹、吉田 尊雄²、大石 和恵²、丸山 正²¹ (株) マリン・ワーク・ジャパン, ² 海洋研究開発機構Morphological analysis of phagocytic gill cells in a deep-sea symbiotic mussel, *Bathymodiolus japonicus*.Akihiro Tame¹, Takao Yoshida², Ohishi Kazue², Tadashi Maruyama²¹ Marine Works Japan LTD, ² JAMSTEC

【目的】

深海に生息する二枚貝のシンカイヒバリガイは、環境からの伝播により、メタン酸化細菌を鰓細胞内に共生させて栄養を得ることが知られている。しかし、このような細胞内共生を確立する上で、共生細菌の獲得形式はあまり良く知られていない。近年、環形動物ガラパゴスハオリムシの細胞内共生細菌の獲得について、幼生時に体表から直接的に共生細菌を細胞内に取り込むという共生細菌の獲得形式が報告された (Nussbaumer et al. 2006)。このことから、共生細菌の獲得形式の一つとして、体表免疫または食作用により、環境中から直接的に外来微生物を取り込む機構を持つと考えられる。本研究では、まず、シンカイヒバリガイの共生組織である鰓細胞が外来微生物に対して、どのような生体防御反応を示すかについて明らかにすることを目的とし、光学および電子顕微鏡により鰓組織の観察を行った。

【材料と方法】

シンカイヒバリガイの飼育容器中に、FITC 標識大腸菌または GFP を発現させた生きた大腸菌を加え、最大で 24 時間飼育した。その後、鰓のホルマウント標本および凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。また、取り込まれる細菌数の経時変化と、取り込んだ細菌とリソソームの融合反応を調べるため、2、12、24 時間で経時的に採取し、蛍光顕微鏡による解析を行った。さらに、食作用を示す鰓細胞の性質や性状を調べるため、電子顕微鏡観察と、5 つの組織染色法 (HE 染色、PAS 染色、アルシアンブルー染色、ペルオキシダーゼ染色、リポフスチン染色) を用いた光学顕微鏡観察を行った。

【結果】

飼育実験の結果、シンカイヒバリガイの鰓細胞内に蛍光標識大腸菌の取り込みが観察された。また、取り込まれた細菌数の経時変化については、時間を追うごとにその数が増加し、さらに、リソソームとの融合が次第に多くなることも観察された。シンカイヒバリガイの鰓組織は、大きく前面鰓部位、反全面鰓部位、共生細菌細胞部位の 3 つの部位に分けられた。その中で、最も多く取り込みが見られた部位は、共生細菌細胞と介在細胞、繊毛細胞を含む共生細菌細胞部位であった。特に PAS やアルシアンブルー、ペルオキシダーゼ陰性を示す介在細胞に、取り込みが多い様に見られた。また、リソソームの残余異物と言われるリポフスチンが蓄積される細胞内に、取り込まれた細菌が存在することも観察された。

【結論】

これらの結果から、シンカイヒバリガイの鰓細胞は、食作用により、環境中から直接外来微生物を取り込む機構を備えていることが分かった。また、取り込まれた細菌はその後リソソームと融合し、処理され、残余物として残る、と考えられる。しかし、食作用を示す鰓細胞については未だ明確に特定できていないことや、それらの細胞における細菌消化および排除の過程についてほとんど明らかになっていないことから、今後それらについて、より詳細な研究を行う予定である。

【文献】

・Nussbaumer, A. D. et al. Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* 441, 18 (2006).

マガキ PGRP-S1S によるグラム陰性菌認識

飯塚真生¹、長崎稔拓^{1,2}、高橋計介¹、尾定誠¹、伊藤直樹¹

¹東北大学大学院農学研究科、²東京大学大気海洋研究所

Recognition of Gram-negative bacteria by oyster PGRP-S1S

Masao Iizuka¹, Toshihiro Nagasaki^{1,2}, Keisuke G. Takahashi¹, Makoto Osada¹, Naoki Itoh¹

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,

² Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

【目的】

ペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)は細菌細胞壁の主成分であるペプチドグリカン(PGN)を認識し、PGNのタイプ(DAP-type, Lys-type)に応じた効果的な種々の生体防御反応を誘起することがショウジョウバエでは明らかにされている。

二枚貝も PGRP を持つことが知られているが、その正確な生理機能に関する知見は少ない。そこで本研究では、5種類の PGRP が同定されているマガキ (*Crassostrea gigas*)^[1,2]を用いて、その一種である CgPGRP-S1S の機能解析を試みた。

【材料と方法】

His-tag 配列を加えた組み換え CgPGRP-S1S (rCgPGRP-S1S)を *Pichia pastoris* を用いて発現させ、結合試験及び抗菌活性試験に供した。

結合試験では、精製 PGN もしくは細菌と rCgPGRP-S1S 溶液を 26°C で 1 時間混合させ、その後、遠心分離によって上清と沈殿に分画した。それぞれの分画を抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロット法に供し、結合性を評価した。

抗菌活性試験では、rCgPGRP-S1S を添加した培地で各種細菌を培養し、濁度法により細菌の増殖を計測して抗菌活性を評価した。

また、アカザラガイ PGRP-S1(CfPGRP-S1)の機能には亜鉛イオンの有無が影響することが報告がされているため^[3]、5µM 亜鉛イオン存在下でも上述の実験を行い、CfPGRP-S1 との比較を行った。

【結論】

rCgPGRP-S1S は DAP-type PGN に結合したが、Lys-type PGN には結合しなかった。細菌に対する結合試験では DAP-type の PGN を持つ 3 種の細菌の中でも、*E.coli* に対してのみ結合性を示した。一方、抗菌活性はいずれの細菌に対しても観察されなかった。また、CfPGRP-S1 とは異なり、亜鉛イオンの有無による活性への影響は認められなかった。

以上のことから、CgPGRP-S1S は DAP-type PGN をもつ一部の細菌を認識することが考えられた。直接的抗菌活性は認められなかったことから、認識後に別の生体防御反応を誘起することが推測された。また、同じ二枚貝綱の PGRP でも、マガキ CgPGRP-S1S とアカザラガイ CfPGRP-S1 では、かなり異なる性質を持つことが明らかになった。

本研究により、CgPGRP-S1S は DAP-type、Lys-type による判別に加え、細菌の別の構造についても認識を行っていることが示唆された。CgPGRP-S1S の細菌認識メカニズムの解明は、ショウジョウバエで代表される PGRP 関連生体防御システムとは異なる系の解明につながるかもしれない。

【参考文献】

1. Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi (2008) Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 150:409-417
2. Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi (2009) Molecular Immunology 46:1768-1774
3. Jialong Yang, Wan Wang, Xiumei Wei, Limei Qiu, Lingling Wang, Huan Zhang, Linsheng Song (2010) Developmental and Comparative Immunology 34: 1300-1307

プラナリアにおける黒化現象の生体防御的役割

木村美智代、原井ますみ、和合治久
埼玉医科大学保健医療学部健康医療科学科

Role of Black Pigment Formation in Host Defense of Planaria

Michiyo Kimura, Masumi Harai, Haruhisa Wago
Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University

【目的】

扁形動物に属すプラナリアは三胚葉性に分化した最初の動物である。われわれはこれまでプラナリアの創傷治癒反応や再生現象に注目し、いかなる生体防御因子が関与しているか探索してきた。その結果、プラナリアの体表粘液中にはヒトの赤血球を凝集するレクチンが存在し、再生に関与していること^[1]、人為的に切断すると切断面は瞬時に黒化を起こすが、治癒と共に黒化部分は消失すること、メラニン色素形成阻害剤下で人為的切断を行っても黒化は阻害されないこと、紫外線照射により体表面が黒化するが、黒化部位は治癒せず、組織は損傷したままとなり、最終的には個体は死に至ることなどを報告してきた。そこで今回、メラニン色素形成阻害剤存在下で紫外線照射を行うとプラナリアの黒化にいかなる影響を及ぼすのか検討した。また、植物由来のレクチン存在下で紫外線照射を行い、黒化にレクチンが関与しているかについても検討する。

【材料と方法】

研究室で継代飼育したプラナリア *Dugesia japonica* を用いた。実験には体長 10~20mm の大きさで、実験前 1 週間の間、絶食させた個体を供した。プラナリアの紫外線照射は波長 302nm、強度 1 mW/cm² で行った。メラニン色素形成阻害剤としてフェニルチオウレア (PTU)、p-Nitrophenyl guanidinebenzoate hydrochloride (NPGB) を、レクチンはコンカナバリン A (Con A) を使用した。

PTU あるいは NPGB の溶液にプラナリアを入れ、紫

外線照射を行い、体表の黒化を観察した。また、PTU あるいは NPGB に Con A を加えた溶液にプラナリアを入れ、同様に照射を行い、黒化の様子を観察した。

【結果と考察】

メラニン色素形成阻害剤存在下でプラナリアに紫外線を照射すると体表面の黒化が観察された。したがって、人為的切断と同様、紫外線照射による体表面の黒化にはフェノール酸化酵素活性化系が関係しないことが判明した。これはメラニン顆粒が表皮細胞に存在し、切断や紫外線照射で組織が傷害された部分が瞬時に収縮して黒化すると考えられる。現在、このメラニン顆粒の放出にレクチンが関与しているか検討を進めている。

今後、黒化現象の機序を追究し、黒化が再生の誘導、防御物質やレクチンの放出に関与しているかを探索すれば、プラナリアにおける黒化現象の生体防御としての役割が明らかになると考えられる。

【参考文献】

- 1.和合治久 (2001)プラナリアの生体防御蛋白質、蛋白質核酸酵素, 46:408-413

コユビミドリイシサンゴにおける NACHT/NB-ARC ドメイン タンパク質遺伝子の増幅とドメイン構造の多様性と拘束性

濱田麻友子¹、将口栄一¹、新里宙也¹、川島武士¹、佐藤矩行¹

¹独立行政法人 沖縄科学技術研究基盤整備機構・マリンゲノミクスユニット

Expansion of NACHT/NB-ARC domain containing protein gene and diversification and constraint of the domain combination in *Acropora digitifera*

Mayuko Hamada¹, Eiichi Shoguchi¹, Chuya Shinzato¹, Takeshi Kawashima¹, Nori Satoh¹

¹Okinawa Institute of Science and Technology Promotion Corporation, Marine Genomics Unit

【目的】

造礁サンゴ・コユビミドリイシは細胞内に褐虫藻を共生させており、独自の免疫・異物認識システムを持っていると考えられる。共生システムの解明のためにはサンゴにおける生体防御機構を理解する必要がある。本研究グループにおいて、コユビミドリイシサンゴのゲノム解読が完了した[1]。本研究では、この情報を用いてサンゴゲノム中に含まれる細胞内異物認識レセプターである Nod-like 受容体関連遺伝子を同定し他の動物と比較した。

【材料・方法】

コユビミドリイシのゲノム情報から Nod-like 受容体で見られる NACHT/NB-ARC ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子を Pfam ドメインデータベースを使って探索し、これらのゲノム上での位置関係を調べた。また、他の動物のゲノムにおける遺伝子数やドメイン構造と比較し、これらの遺伝子の種内・種間での系統関係を調べた。

【結果】

サンゴにおいて NACHT/NB-ARC タンパク質をコードする遺伝子は 496 遺伝子見付き、この数は他の動物と比較して圧倒的に多かった（ヒトの約 10 倍）。系統解析の結果、このタンパク質のほとんどがサンゴ内で 1 つのクレードを形成したことから、これらの遺伝子は進化の過程において種特異的に増幅したものと考えられる。

サンゴゲノム上でのこれらの遺伝子の位置関係を調べたところ、2 もしくは 3 遺伝子が並んで存在していることが多く、遺伝子の tandem duplication による重複が示唆される。

他のドメインとのコンビネーションを調べたところ、N 末側には Death などアポトーシス関連ドメインの他、Glycos_transf_1、PNP_UDP_1 を持つものが多く、このドメインコンビネーションは他の動物には見られない。他の動物の NACHT/NB-ARC タンパク質のドメイン構造も種特異性が見られたが、N 末側のアダプタードメインであるアポトーシス関連ドメイン、C 末側のリガンド認識部位であるリピートドメイン、これらの間に NACHT/NB-ARC ドメインという共通の構造を持つものが多く、このコンビネーションは進化的拘束を受けているものと考えられる。

【結論】

サンゴゲノムでは NACHT/NB-ARC タンパク質遺伝子の大規模な重複が起こっており、これは tandem duplication による種内増幅によると考えられる。また、他の動物では見られないサンゴ独自のドメインコンビネーションが見られ、ドメインシャッフリングにより多様化した結果であると考えられる[2]。その一方、そのドメイン構造には種内・種間で共通性があり、ドメインの機能による収斂進化であることが考えられる。以上のような NACHT/NB-ARC ドメインタンパク質遺伝子の増幅はいくつかの海産無脊椎動物[3, 4]や植物で報告されており、その機能的重要性が示唆される。

【参考文献】

1. Shinzato, C et al. (2011) Nature, in press.
2. Kawashima, T et al. (2009) Genome Res. 19, 1393-1403.
3. Huang, S et al. (2008) Genome Res. 18, 1112-1126.
4. Hibino, T. et al. (2006) Dev. Biol. 300, 349-365.

ヒトデ *Ap*SRCR1 タンパク質はオプソニンとして機能する

古川亮平^{1,2}、松本緑^{1,2}、金子洋之¹

¹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・基礎理工学専攻

***Ap*SRCR1 acts as an opsonin in the larval and adult immune systems of the starfish.**

Ryohei Furukawa^{1,2}, Midori Matsumoto^{1,2}, Hiroyuki Kaneko¹

¹Department of Biology, Research and Education Center for Natural Sciences, Keio University

²School of Fundamental Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Keio University

【目的】

Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR)ドメインを有する多くのタンパク質は、幅広い動物種において免疫応答の調節や異物表面のパターン認識などの重要な局面を担うと考えられている。

我々はこれまでの研究で、ヒトデ幼生の間充織細胞の cDNA ライブラリーから SRCR ドメインを有する *Ap*SRCR1 遺伝子の単離に成功し、その機能分子である *Ap*SRCR1 タンパク質の発現解析を行ってきた。その結果、*Ap*SRCR1 タンパク質は、個体発生の異なった時期に機能する 2 種の免疫細胞（幼生期の間充織細胞；成体期の体腔細胞）の細胞質内の小胞膜に局在することを明らかにしていた。本研究では、ヒトデ幼生および成体の免疫細胞における *Ap*SRCR1 タンパク質の機能解析を行った。

【材料と方法】

モルフォリノアンチセンスオリゴ（Morpholino Antisense Oligo; MO）を用いて *Ap*SRCR1 遺伝子の翻訳を阻害したイトマキヒトデ幼生の体内にバクテリア（BC）を顕微注射し、免疫応答の状態を調べた。また、*Ap*SRCR1 タンパク質に対するポリクローナル抗体（*Ap*SRCR1-pAb）存在下における幼生及び成体の BC に対する免疫応答も検討した。さらに、成体に BC チャレンジを行った後、体腔細胞を除去した体腔液（cell-free coelomic fluid: cell-free CF）を用いて、*Ap*SRCR1 タンパク質の動態と BC 結合能をウエスタンブロットにより解析した。

【結果】

（1）コントロール MO 幼生への BC チャレンジでは、間充織細胞は BC に対する貪食作用に伴って、1 個の大きな凝集塊を形成した。一方、MO 幼生では比較的小さな複数の凝集塊しか形成されず、BC の食べ残しが観察された。*Ap*SRCR1-pAb を用いた BC チャレンジ実験でも、MO 幼生と同様の結果が得られた。

（2）成体における *Ap*SRCR1-pAb 存在下の BC チャレンジ実験では、体腔細胞による凝集塊形成は完全に阻害された。一方、非特異的 IgG を用いた対照実験では、体腔細胞が形成する凝集塊のサイズは時間依存的に増加した。両実験における食べ残し BC 量は、凝集塊形成と負の相関があった。

（3）BC チャレンジ後の成体から調製した cell-free CF 中で、細胞外領域で切断されたと考えられる *Ap*SRCR1 タンパク質が検出された。次に、cell-free CF 中で BC をインキュベートしたところ、cell-free CF に含まれる *Ap*SRCR1 タンパク質が BC に結合することが明らかとなった。

【結論】

イトマキヒトデ *Ap*SRCR1 タンパク質は、BC チャレンジによって細胞質内の小胞膜から切断、細胞外に分泌された後、BC に結合しオプソニンとして機能すると考えられる。また、*Ap*SRCR1 タンパク質のオプソニンとしての寄与の程度は、幼生と成体で異なることが示唆された。

イオン液体はマボヤ (*Halocynthia roretzi*) 血球の 走査型電子顕微鏡観察に利用できるか？

大竹伸一¹, 地家豊治², 阿部健之¹, 澤田知夫³, 石井照久⁴, 宮澤七郎⁵

¹ 日本大学・医学部・生物, ² 日本大学・医学部・電顕室, ³ 山口大学・医学研究科・器官解剖,
⁴ 秋田大学・教文・生物, ⁵ 大阪大学・工学部・応用化学

Is ionic liquid an effective tool for SEM observation of hemocytes of *Halocynthia roretzi*?

Shin-Ichi Ohtake¹, Toyoharu Jike², Takeyuki Abe¹, Tomoo Sawada³, Teruhisa Ishii⁴, Shichiro Miyazawa⁵

¹Division of Biology, Nihon University, ²Laboratory of Electron Microscope, Nihon University,

³Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University, ⁴Division of Biology, Akita University,

⁵Department of Applied Chemistry, Osaka University

【目的】

イオン液体は、有機系の塩で、融点は室温以下、導電性をもつことのほか、蒸気圧が限りなく0に近いので加熱しても、真空中でも蒸発することがない。このような特性をもつため、イオン液体を走査型電子顕微鏡(SEM)観察に応用することが考えられ、様々な試料の観察結果が報告され始めている。未固定または固定試料をイオン液体に浸漬後、余分な液体を除くだけで直ちにSEM観察が可能であるため、標本を短時間で簡便に作製できる大きな利点がある。今回、我々は、マボヤ血球のSEM観察にイオン液体

(1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate:

BuMeIm⁺BF₄⁻) が利用可能か否か、従来の臨界点乾燥法と比較して検討することを試みた。

【材料と方法】

マボヤ(陸奥湾産)の血リンパを、0.22 μm のマイレックスフィルターで濾過した海水で5倍希釈した血球浮遊液を試料として用いた。血球浮遊液 100 μl を、温室中の直径 10 mm の円形カバーガラス上に30分間静置して血球を付着させた。血球を、1%グルタルアルデヒド溶液(0.2M カコディレート緩衝液 pH7.4 に 1.5%NaCl を添加)で固定後、オスミック酸で後固定した試料について、BuMeIm⁺BF₄⁻ の濃度、希釈溶媒、浸漬時間について検討した。これらの固定試料の一部は脱水・臨界点乾燥後、白金-パラジウムを蒸着させた従来の方法で標本を作製して観察し、イオン液体を用いた結果と比較した。

【結果】

イオン液体を用いると、低倍率では未固定標本でも観察可能だが、グルタル前固定後、オスミック酸後固定した試料で最も良い結果が得られた。イオン液体の濃度は、現在のところ70%エタノールで2%に希釈した場合に最も良い像が得られた。高濃度の場合、試料表面にイオン液体が過剰に残ることがあり微細構造が観察しにくい場合があった。従来の臨界点乾燥法では、葉状仮足の前縁がガラス表面からめくれ上がることや、糸状仮足が切断されることがあったが、イオン液体の場合、葉状仮足はガラス表面に密着し、糸状仮足の断裂も認められなかった。一方、イオン液体の場合、長時間の観察で像が不安定になる、アルミと化学反応を起こしやすくカーボン試料台を使う必要があるなどの課題もあった。

【結論】

イオン液体を用いた試料作製法は、まだ改良の余地はあるが、今回の結果から簡便なうえに、従来の臨界点乾燥法に匹敵する像が得られることが分かった。イオン液体は、マボヤの血球に限らず、培養細胞などを含め幅広く生物試料のSEM観察に利用できるものと考えられた。

【参考文献】

S. Arimoto, S. Kuwahata, et. Al., (2008) Chem Pys Chem., 9:763

カプトガニ補体系の感染微生物に対する活性化機構

田川 圭介¹、吉原 豊貴¹、山本 恭平²、柴田 俊生²、小柴 琢己^{1,2}、川畑 俊一郎^{1,2}

¹九大院・システム生命 ²九大・理・生物

Mechanism of complement activation against infectious microorganisms in horseshoe crab hemolymph plasma.

Keisuke Tagawa¹, Toyoki Yoshihara¹, Kyohei Yamamoto², Toshio Shibata²

Takumi Koshiba^{1,2}, Shun-ichiro Kawabata^{1,2}

¹Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University

【目的】

カプトガニ (*Tachypleus tridentatus*, Tt) の血漿中では、グラム陰性菌の侵入に伴い、リポ多糖 (LPS) 感受性セリンプロテアーゼ前駆体である factor C が LPS 依存的に活性化し、補体因子 TtC3 を直接切断・活性化させる^[1]。一方、グラム陽性菌や真菌に対しても TtC3 は活性化されるが、その分子機構についてはよくわかっていない。カプトガニ補体 B 因子 TtB がこれらの反応に関与することが示唆されているが、詳細な機能は不明である。本研究では TtB の機能解明を目指すと同時に、グラム陽性菌や真菌における補体活性化開始因子の探索を行った。

【材料と方法】

TtB の組み換えタンパク質を抗原とし、TtB1 または TtB2 に対するポリクローナル抗体を作製した。作製した抗体を用いたウエスタンブロットや免疫沈降法により、TtB1 や TtB2 の機能解析を行った。TtB の補体系への関与を調べるため、フローサイトメトリーによりグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌に対する TtC3 の活性化への陽イオン依存性を調べた。また、Ca²⁺ 要求性レクチンが TtC3 の活性化に関与するかどうかを検討した。

【結果】

ウエスタンブロットの結果、カプトガニの血漿中

には TtB が発現していることがわかった。筋肉、心臓、胃にも発現がみられたが、N-結合型糖鎖の修飾が異なっていた。血漿に感染微生物を加えると TtB は Mg²⁺ 依存的に活性化された。TtB は LPS や真菌の表層成分である β グルカンによっても強く活性化された。フローサイトメトリーの結果、グラム陽性菌や真菌に対する TtC3 の活性化には Ca²⁺ や Mg²⁺ が必要であった。グラム陽性菌に対する TtC3 の活性化には Ca²⁺ 要求性レクチンが関与していた。

【結論】

哺乳類と同様、TtB は感染微生物の侵入に伴って Mg²⁺ 依存的に活性化することが判明した。フローサイトメトリーの結果より、グラム陽性菌や真菌に対する TtC3 の活性化が Mg²⁺ 依存的であったことから、TtB が関与していることが示唆される。また、グラム陽性菌に対する TtC3 の活性化には Ca²⁺ 要求性レクチンが関与していた。以上の結果から、カプトガニの血漿中には感染微生物の種類によって異なる補体活性化機構が存在していると考えられる。

【参考文献】

1. Arika S, Takahara S, Shibata T, Fukuoka T, Ozaki A, Endo Y, Fujita T, Koshiba T, Kawabata S (2008) J immunol, 181:7994-8001

多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチの 寄主侵入における免疫関連分子の探索

井上 普¹、岩淵 喜久男¹
¹東京農工大学・応用昆虫学研究室

The searching for immune-related molecules about a host invasion of polyembryonic plasitoid wasp, *Copidosoma floridanum*.

Hiroki Inoue¹, Iwabuchi Kikuo¹

¹Laboratory of Applied Entomology, Tokyo University of Agriculture and Technology

【目的】

キンウワバトビコバチは、鱗翅目昆虫を宿主とする多胚性の卵幼虫寄生蜂である。本種では他の寄生蜂とは異なり、桑実胚期胚子の運動性を利用した組織親和的な寄主侵入が確認されており^[1]、この機構には分子擬態の関与が示唆されている。このため、本種は自己-非自己認識機構を解明する重要な研究モデルとなりうる。

先行研究より寄主侵入に関連が予想される分子^[2]はあるものの、本種ではゲノム決定が進んでおらず、同定されている遺伝子数もごく少数のみとなっている。我々は本種の特殊な寄主侵入における分子基盤を解明することを目的とし、本種の桑実胚期胚子の転写物から関連分子の探索を行った。

【材料と方法】

本寄生蜂により産卵を受けた寄主卵を改変 MGM450 培地^[3]中で解剖し、本種胚子のみをマイクロディスペンサーで単離した。そのまま無菌条件下で発生を進行させ、産下後 48 時間以内に桑実胚になった胚子を 80 個程度集めて RNA を抽出した。RNA を逆転写、クローニングし、各クローンについてキャピラリーシーケンサーを用いて配列決定を行った。配列決定の結果をまとめて、本種の桑実胚期胚子の cDNA ライブラリーとした。

【結果】

選択された 515 クローンの cDNA を配列決定し、BLAST を利用して既知の配列と比較した。その結果、細胞運動、核酸修復に関連する遺伝子群、複数種類の転写因子など多数の機能クラスターにまたがった分子が確認された。免疫関連では E3 ユビキチンリガーゼ、Ephrin B1 等に相同性があるとされる分子が確認された。

【結論】

キンウワバトビコバチの組織親和的な寄主侵入における分子基盤を解明する事を目的として、本種の桑実胚期胚子の cDNA ライブラリーを作製した。多数の新規遺伝子を同定する事に成功し、その中に免疫関連の分子も確認する事ができた。これらの分子について機能解析を行うことにより、本種の寄主侵入における分子基盤を解明していくことが可能であると考えられる。

【参考文献】

1. Nakaguchi A., Hiraoka T., Endo Y., Iwabuchi K. (2006) *Cell Tissue Res.*, 324: 167-173.
2. Takahashi-Nakaguchi A., Hiraoka T., Iwabuchi K. (2011) *FEBS Letters*, in press.
3. Iwabuchi K. (1991) *Appl. Entomol. Zool.* 26 (4): 563-570.

ショウジョウバエ体液細胞におけるオートファジー誘導による病原体排除

矢野 環, 若林 康介, 倉田 祥一朗
東北大・院・薬

Elimination of pathogens by autophagy induction in *Drosophila* hemocytes

Tamaki Yano, Kosuke Wakabayashi 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。ショウジョウバエでは、Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)ファミリー因子が侵入した病原体を認識し、自然免疫応答を誘導する。PGRPファミリー因子の一つであるPGRP-LEは、細胞外に分泌されて体液中の細菌を認識するが、我々は、PGRP-LEが体液細胞の細胞質において細胞内寄生細菌であるリステリア菌を認識し、認識依存的にオートファジーを誘導することにより、その増殖を抑制することを明らかにしてきた^[1]。オートファジーは酵母からは哺乳類細胞にまで保存された、細胞内小器官やタンパク質等の物質の代謝回転に機能する分解系であるが、感染依存的に誘導される。このような、感染依存的なオートファジー誘導は、さまざまな種において細胞内に侵入する病原体の排除にも機能している可能性があるが、その分子機構は不明である。この解明のため、p62 (ref(2)P)に注目した解析を行った。ほ乳類で同定されているp62/SQSTM1は、飢餓時におけるオートファジー誘導に機能し、また、ポリユビキチン化したタンパク質の凝集体形成の制御に機能している。そこで、p62のショウジョウバエホモログref(2)Pが、病原体認識分子依存的なオートファジー誘導に機能して、細胞内に感染する病原体に対する抵抗性に寄与しているかを検討した。

【材料と方法】

ref(2)P遺伝子の変異体ショウジョウバエとそ

の体液細胞を用いて、ref(2)Pがリステリア菌感染に対する抵抗性を、また、体液細胞内におけるリステリア菌増殖抑制に機能しているか、オートファジー誘導に必要であるかを検討した。また、ref(2)Pがウイルス感染に対する抵抗性においても機能しているかを検討した。

【結果】

ref(2)P変異体はリステリア菌感染に感受性であり、その体液細胞はリステリア菌の細胞内増殖抑制能が低下しており、かつオートファジー誘導に必要であった。また、ref(2)Pタンパク質は、細胞内に侵入したリステリア菌の周囲に局在するPGRP-LE、ユビキチン、オートファゴゾーム膜上に局在する因子LC3と局在を共にした。さらに、ref(2)P変異体はDrosophila C virusおよびVesicular stomatitis virusの感染抵抗性に機能していた。

【結論】

オートファジーの無秩序な亢進は自己成分の不必要な分解につながるため、病原体排除に機能する際は、病原体の周囲に空間的に厳密に制御される。この誘導のきっかけは認識分子による病原体成分の認識であり、病原体の種類に応じた複数の認識分子が機能していると考えられた。これに対し、いったん認識分子によりトリガーがひかされると、p62(ref(2)P)を介した共通の経路により誘導が起きると考えられた。

【参考文献】

1. Yano, T. *et al. Nature Immunol.* 9, 908-916 (2008)

昆虫表皮マトリクス内の免疫因子

朝野 維起¹, 帖佐 直幸², 栗林 寛¹, 新川 高志³, 磯辺 俊明³

¹首都大学東京・生命科学, ²岩手医科大学・生化学講座, ³首都大学東京・物質分子化学

Immune proteins in insect cuticle

Tsunaki Asano¹, Naoyuki Chosa², Hiroshi Kuribayashi¹, Takashi Shinkawa¹, Toshiaki Isobe¹

¹Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, ²Department of Biochemistry, Iwate Medical University, ³Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University,

【目的】

昆虫の外骨格（クチクラ）はキチン及びキチン結合性構造蛋白質からなるマトリクスである。クチクラは一般的に“単なる殻”として認識されがちであるものの、実際は水分に富み様々な生化学反応が生じている場所である。既に、抗菌ペプチドや^[1]、メラニン合成に関わるフェノール酸化酵素前駆体カスケードの存在^[2]が示されている。本研究では、昆虫クチクラ内で機能する免疫因子を探索する為に、バクテリア感染によって新たに出現するタンパク質の同定を行った。

【材料と方法】

カイコ幼虫に黄色ブドウ球菌を注射し、24時間後クチクラから蛋白質を抽出した。その試料を2次元電気泳動で展開し、未処理幼虫からの試料と泳動パターンを比較した。スポットの大きさに違いが見られたものをLC-MSによって分析し、含まれているタンパク質を同定した。また、2次元電気泳動とは別に、安定同位体を用いたショットガン法を用いる解析も同時に行い、より広範なタンパク質の分析を行った。

【結果】

感染後に増加するタンパク質として、免疫因子として既に知られている分子が今回の解析でも同定された。また、機能は未知ながら他の昆虫でバクテリア感染後に発現量が増加するものなども同定できた。よって、本解析法が免疫因子の探索法として妥当で

あることが確認できた。発現パターンに関するデータベースなどを参照することで、表皮を含む外胚葉由来の上皮組織特有に発現が見られる因子の候補が得られた。ここで得られた情報などをもとに、クチクラ特有の免疫因子の候補について、現在機能解析を進めている。

【結論】

昆虫のクチクラは、常に環境中の病原に接しており、生体防御の最前線として重要な研究対象である。本研究では、クチクラ内に様々な免疫因子が存在することが明らかとなった他、傷が生じた後の修復や、クチクラマトリクス内に傷・バクテリア感染の情報を伝達すると思われる因子なども同定された。これらは、今後研究を進めていく上で、有用な示唆に富む情報であると我々は考えている。

【参考文献】

1. Ashida M, Brey, PT (1995) PNAS, 92: 10698-10702
2. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL (2000) Immunity, 13: 737-748

ヒラメToll様受容体3遺伝子のクローニングおよび機能解析

黄 晟敦¹, 大谷 真紀², 引間 順一², Tae Sung Jung², 近藤 秀裕¹, 廣野 育生¹, 青木 宙^{1,2}
¹東京海洋大学・ゲノム科学講座, ²国立慶尚大学・獣医

Molecular cloning and functional analysis of Toll-like receptor 3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*.

SeongDon Hwang¹, Maki Ohtani², Jun-ichi Hikima², Tae Sung Jung², Hidehiro Kondo¹, Ikuo Hirono¹, Takashi Aoki^{1,2}
¹Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology
²Aquatic Biotechnology Center, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

[Objective]

Toll-like receptors (TLRs) regulate immune response by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in the first line of defense against pathogens. Double-stranded (ds) RNA, which is synthesized as a replicative intermediate of most viruses, is recognized by mammalian TLR3 in both the endosome and the cell surface. Subsequently, dsRNA recognition by TLR3 results in NF- κ B activation and type I interferon (IFN) production via its downstream signaling cascade. However, little is known about TLR3-mediated immune response to dsRNA in teleosts. To understand potential roles of TLR3 in the immune system of teleost fish, we identified TLR3 gene from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and examined its expression and functional significance.

[Materials and Methods]

To clone Japanese flounder TLR3 (JfTLR3) cDNA, degenerate- and RACE-PCR were conducted. The exon/intron organization of JfTLR3 gene was determined using the screened Japanese flounder BAC clone encoding JfTLR3 gene. The gene expression of JfTLR3 in several organs infected with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) was investigated. After the expression vector pcDNA cloning JfTLR3 was co-transfected with poly I:C (synthetic dsRNA) into the HINAE cells (Hirame natural embryo cells) and YO-K cells (flounder kidney cells), the expression of several inflammatory- and IFN-inducible genes in TLR3-overexpressing HINAE cells was measured by real

time quantitative PCR (Q-PCR). Furthermore, reporter assay was conducted with a mammalian NF- κ B-based reporter construct (pGL4.32/NF- κ B) to analyze the expression of NF- κ B-regulated genes in TLR3-overexpressing HINAE and YO-K cells.

[Results]

The deduced amino acid sequence of JfTLR3 showed that the structure of JfTLR3 consisted of an extracellular LRR domain for ligand recognition, a transmembrane domain and an intracellular Toll/interleukin 1 receptor (TIR) signaling domain. The JfTLR3 gene consisted of 4 exons and 5 introns. The VHSV experimental exposure led to significant up-regulation of JfTLR3 gene expression in the blood, liver, kidney and spleen. The reporter activities of pGL4.32/NF- κ B enhanced by JfTLR3-overexpression in the presence of poly I:C. Furthermore, JfTLR3-overexpression increased the expression of TNF- α , IL-1 β , Mx, ISG15, IRF-3 and IRF-7 genes in HINAE and YO-K cells stimulated by poly I:C.

[Conclusion]

The expression of JfTLR3 gene was up-regulated in immune-related organs after viral infection. In response to dsRNA, JfTLR3 enhanced promoter activity of NF- κ B-regulated genes and triggered induction of several inflammatory- and IFN-inducible genes. These results suggest that JfTLR3 plays an important role in the induction of antiviral immune response.

鱗移植片の急性拒絶反応に関わるメダカ MHC 遺伝子の同定

坂内 英美¹、野中 勝¹

¹ 東京大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻

Identification of the Medaka MHC genes responsible for acute rejection of transplanted scales

Hidemi P. Bannai¹, Masaru Nonaka¹

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

【目的】

殆どの有顎脊椎動物の MHC 領域には、MHC 遺伝子を含む多くの免疫関連遺伝子が連鎖して存在していることが知られているが、硬骨魚類では例外的に MHC 遺伝子が別々の染色体上に散在している。この特徴により、硬骨魚類を用いることにより、個別の MHC 遺伝子について急性拒絶反応への関与を明らかにすることができると考えられる。しかし、硬骨魚類の MHC 遺伝子は、コピー数が多く、ゲノム上に散在していることからすべての MHC 遺伝子の遺伝子座や発現等の解析が完了している硬骨魚はいない。今回、我々は genome database および近交系が利用でき、すでに MHC class I 遺伝子の網羅的解析が完了しているメダカを用い、MHC class II 遺伝子を網羅的に同定し、鱗移植における急性拒絶反応の有無と MHC 遺伝子型との関係を解析した。

【材料・方法】

近交系メダカ Hd-rR、HNI の total RNA および genome DNA を抽出し、database search で得た配列情報をもとに設計したプライマーを用いて、PCR・cloning・sequencing を行い、遺伝子構造・発現等の解析を行った。また、野生メダカの genome DNA を用いて、多型解析を行った。

Backcross (HNI × (HNI × Hd-rR)) を donor、HNI を recipient として鱗移植を行い、各個体のすべての MHC 遺伝子座の allele type を調べ、急性拒絶反応との関連を解析した。

【結果】

Database search の結果 MHC class II 遺伝子としてのモチーフを持っていることがわかった 10 の class II 遺伝子候補のすべてについて、genome 配列・mRNA 配列を決定し、発現を確認した。

野生個体の genome DNA を用いた多型解析の結果、DAA、DAB は南北集団の垣根を越えた多型を示し、残りの遺伝子は北日本集団は HNI と、南日本集団は Hd-rR と塩基配列が完全一致し、多型を示さなかった。

鱗移植とタイピングの結果、急性拒絶反応が起きなかったすべての例で、遺伝子型が donor と recipient で一致していたのは MHC class I 領域と *UGA* 遺伝子だった。

【結論】

メダカは 5 つの class IIA 遺伝子 (*DAA*, *DBA*, *DCA*, *DDA*, *DEA*) と 5 つの class IIB 遺伝子 (*DAB*, *DBB*, *DCB*, *DDB*, *DEB*) を持っていることがわかった。これらの遺伝子は異なる 5 つの染色体上にそれぞれ α 鎖遺伝子と β 鎖遺伝子が対になって存在していた。多型の有無により、*DAA* と *DAB* が classical class II 遺伝子、それ以外は non-classical class II 遺伝子と認定された。ほ乳類のヒトやマウスの研究結果では class I 分子だけでなく class II 分子も急性拒絶反応に重要な役割を果たしていると言われている。今回の結果は、メダカの急性拒絶反応を決定づけている遺伝子は、*UAA/UBA* 遺伝子座と *UGA* 遺伝子座にあることを示し、メダカ MHC class II 遺伝子は、メダカの急性拒絶反応には関与しないことを明らかにした。

魚類栓球の食食作用とその活性化に伴う形態変化

長沢 貴宏¹、中易 千早²、松山 知正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・増養殖研究所

Phagocytic activities of teleost thrombocytes with dramatic morphological changes.

Takahiro Nagasawa¹, Chihaya Nakayasu², Tomomasa Matsuyama², 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、血液凝固に関わる細胞である。哺乳類の血小板とは異なり有核の細胞であり、形態的特徴は白血球に近く、より原始的な血球と考えられる。これまでの研究で、コイ栓球が異物を取り込む食食細胞として機能することを示してきた。今回の研究ではその取り込み作用のより詳細な解析を行い、またこの栓球の食食活性を、ヒラメの栓球や、他の白血球サブポピュレーションと比較し、検証した。

【材料と方法】

コイの末梢血白血球に、抗コイ栓球モノクローナル抗体 (mAb) HB-8^[1] を用い栓球を蛍光染色した後、ラテックスビーズ、大腸菌を加えその食食活性を検証した。さらに顕微鏡下で 15 秒毎に撮影、コマ送り再生し、異物の刺激を受けた際の栓球の動態を観察した。また抗コイ膜型 IgM mAb, CI-14 を用いて同様に染色し、コイ B 細胞の食食能を解析した。ヒラメの末梢血白血球を抗ヒラメ栓球 mAb JFW10^[2]、抗ヒラメ B 細胞 mAb JFW20^[2] でそれぞれ標識し、同様に食食活性を解析した。

【結果】

フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡で検証したところ、コイの栓球はビーズ、大腸菌といった異物を細胞内へ取り込んでいた。

他の魚種で示されたように^[3]、コイの B 細胞も食食活性を示したが、栓球と比較すると B 細胞の食食活性は低いものであった。また透過型電子顕微鏡下で観察したところ、栓球が仮足を伸ばし菌体を取り込む様子が確認され、光学顕微鏡下でコマ送り撮影したところ紡錘状の栓球が異物の刺激を受け活性化、食食細胞様の動態を示す様子が観察された。ヒラメの栓球を用いた際にも同様の食食活性が検出された。またヒラメにおいては、B 細胞は栓球と同程度に高い食食活性を示した。

【結論】

栓球は異物を能動的に取り込む食食細胞であることが示された。栓球の食食活性は他の白血球と比較しても高く、また海産魚であるヒラメでも同様の結果が得られたことから、幅広い魚種において栓球が食食細胞として生体防御上の重要な役割を果たしていることが示唆された。

【参考文献】

1. Nakayasu C. *et al*; *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57 (1997) 337-346.
2. Matsuyama T. *et al*; *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (2010) 362-365.
3. Li J. *et al*; *Nature Immunology*, 7 (2006) 1116-24.

魚類における補体活性化制御因子の多様性

辻倉 正和、柚本 智軌、鶴木 陽子、中尾 実樹

九州大学大学院農学研究院

Diversity of the regulators of complement activation in teleost

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

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,

Kyushu University

【目的】

Regulators of complement activation (RCA) ファミリーは、補体制御タンパク質および補体レセプターを含んでいる。RCA タンパク質には液相で過剰な補体活性化を制御する分泌型と、補体の攻撃から自己細胞を保護する膜結合型が存在する。硬骨魚類の RCA としては哺乳類の factor H 様の分子が barred sand bass¹ とヒラメ² で同定されているのみであり、魚類の RCA にどれほどのバリエーションがあるのかは不明なままである。そこで、硬骨魚類の RCA 構成と進化を知るために、ゼブラフィッシュゲノムデータベースを用いて網羅的な RCA 遺伝子の探索を試みた。

【方法】

ゼブラフィッシュゲノムデータベースおよび Expressed Sequence Tags (EST) データベースを利用して、RCA タンパク質の網羅的な探索と同定を試みた。さらにこれらの遺伝子座周辺の遺伝子とヒトの RCA クラスター周辺の遺伝子の比較を行った。また、同定された RCA 遺伝子のゼブラフィッシュ組織における発現パターンを RT-PCR で解析した。

【結果】

Short Consensus Repeat モジュールの繰り返し構造をコードする RCA 遺伝子が、22 番と 23 番染色体に複数見つかかり、Teleost Complement Regulatory Secretory protein (Tecres)-A1~A6、Tecres-B、Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) -A、

および Tecrem-B と命名された。

Tecres-A 遺伝子群は 22 番染色体上にクラスターを形成しており、この Tecres-A 遺伝子クラスターとヒトの Factor H 遺伝子クラスターのシンテニーが保存されていた。一方で、Tecres-B、Tecrem-A と Tecrem-B 遺伝子はクラスターを作らないが、これらの遺伝子の上流と下流領域には互いに syntenic な関係が認められた。したがって、Tecres-B、Tecrem-A、および Tecrem-B 遺伝子は、倍数化や染色体レベルの大きな重複に伴って分岐した paralog であると考えられる。

組織別発現解析の結果、ゼブラフィッシュ RCA は、肝臓と脾臓で強い発現を示す因子 (Tecres-A 1, 3, 4, 5, 7) とユビキタスな組織分布を示す因子 (Tecres-A 2, 6, B, Tecrem-A) に大別されることが判明した。

【結論】

硬骨魚類では分泌型 RCA が哺乳類以上に高度に多重化している一方で、膜型 RCA の種類は少ないことが判明した。また、分泌型 RCA の多重化は、哺乳類と同様な直列的遺伝子重複によるが、染色体レベルでの重複によっても一部の分泌型 RCA と膜型 RCA が多様化したことが示唆された。

【参考文献】

1. Dahmen A., et al. Biochem. J. 301, 391-397 (1994)
2. Katagiri T., et al. Fish Pathol. 33, 351-355 (1998)

ギンブナの移植片対宿主反応における CD8 陽性 T 細胞の動態

田中洋枝、柴崎康宏、藪健史、森友忠昭、中西照幸
日本大学生物資源科学部

Kinetics of CD8 positive T cell in graft-versus-host reaction in ginbuna crusian carp

Hiroe Tanaka, Yasuhiro Shibasaki, Takeshi Yabu, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi
College of Bioresource Sciences, Nihon University

【目的】

移植片対宿主病 (GVHD) はドナー免疫担当細胞がレシピエントのアロ抗原を認識して組織を攻撃する移植片対宿主反応 (GVHR) に伴う疾病であり、哺乳類では T リンパ球の関与が示されている。我々は魚類においても感作白血球の移植により GVHR が誘導され、その誘導に CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が関与していることを報告してきた。しかし、CD8 陽性 T 細胞のレシピエントの各組織における局在および活性化については不明である。そこで、レシピエントの各組織における CD8 α 陽性 T 細胞の局在について検討するとともに、CD8 α 陽性 T 細胞の活性化についてインターフェロン γ (IFN γ)、及び魚類特有の IFN γ related (IFN γ rel) の産生を指標として免疫組織化学的手法により検討した。

【材料と方法】

3 倍体クローンギンブナ (ドナー、S3N) 及び S3N とキンギョを掛け合わせた 4 倍体雑種 (レシピエント、S4N) を用いた。S4N から S3N に鱗移植による前感作を行った後、S3N の頭腎及び体腎より分離したリンパ球分画を、感作に用いた S4N の尾部血管に投与した。移植後のレシピエントの組織を固定後、凍結切片を作成し、CD8 α 、IFN γ 、IFN γ rel に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を施した後蛍光顕微鏡下で観察した。

【結果】

移植後 3 日、7 日、14 日目の肝臓、脾臓において

は、CD8 α 陽性 T 細胞が未感作のコントロール群に比べて増加が認められた。また、移植後日数の経過に伴い CD8 α 陽性 T 細胞が増加した。一方、頭腎、体腎においては、CD8 α 陽性 T 細胞が移植後 3 日目から 7 日目にかけて一度減少し、14 日目に再び増加した。なお、腸管においては CD8 α 陽性 T 細胞の増加がみられず、コントロール群と比べても差は認められなかった。

【結論】

これまでギンブナの GVHR に関する研究では、体腎において移植後 7 日目よりドナー由来 CD4 陽性 T 細胞が増加し、CD8 α 陽性 T 細胞は 14 日目に最も高い値を示すことを観察している。また、肝臓、脾臓、頭腎、体腎だけでなく、腸管においてもドナー細胞の著しい浸潤と病理組織学的変化を観察している。

今回の観察においても、CD8 α 陽性 T 細胞は肝臓、脾臓において移植後日数の経過に伴って増加し、これまでの FACS 解析と同様な結果が得られた。しかし、腸管では増加が認められなかった。これまでの研究ではドナー由来 T 細胞に着目していたが、本研究ではドナー由来細胞に加えてレシピエント細胞も同時に観察していること、及び腸管には CD8 α 陽性 T 細胞が多数常在するためと考えられる。

腸管のように今回 CD8 α 陽性 T 細胞の増加が認められなかった組織においても質的・空間的变化が起きている可能性があり、現在 IFN γ の産生を指標として CD8 α 陽性 T 細胞の活性化について検討中である。

コイ TPO の遺伝子クローニングおよび性状解析

林 潔高、片倉 文彦、藪 健史、森友 忠昭、中西 照幸
日本大学生物資源科学部

Molecular cloning and characterization analysis of carp TPO.

Kiyotaka Hayashi, Humihiko Katakura, Takeshi Yabu, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi
College of Bioresource Sciences, Nihon University

【目的】

哺乳類では、巨核球系細胞に作用し血小板産生を促進するトロンボポエチン(TPO)が同定され、血小板産生機構が解明されている。一方、有核栓球を持つ哺乳類以外の脊椎動物では、ニワトリでTPOの生理活性が明らかになっているものの、魚類においてはゼブラフィッシュでTPO遺伝子が単離されているのみである。そこで本研究では魚類栓球造血機構を明らかにするために、コイを用いてTPO遺伝子のクローニングおよび性状解析を行った。

【材料と方法】

コイの脾臓または肝臓から得られたcDNAを用い、5' RACE法および3' RACE法を行い、コイTPOの全長配列を得た。本遺伝子の発現解析はコイの各組織(頭腎、体腎、脾臓、胸腺、心臓、肝臓、腸管、脳、鰓、生殖腺)および末梢血白血球を用い、RT-PCR法により行った。

【結果】

コイより2種類のTPO遺伝子(*tpo1*および*tpo2*)が単離された。アミノ酸数は各々177および157残基であり、両者の配列は131残基までは完全に一致していたが、その後の配列は大きく異なっていた。また、ゼブラフィッシュTPOのアミノ酸配列と比べたところ、コイ*tpo1*は高い同一性(87%)を示したが、*tpo2*は132残基目以降、大きく異なっていた。そこで*tpo2*の配列をゼブラフィッシュのゲノム配列と比較したところ、*tpo2*

のC末端部分はゼブラフィッシュのイントロン配列と高い相同性を示した。コイ*tpo1*と*tpo2*のアミノ酸数は、ゼブラフィッシュおよびニワトリ(177残基)と同程度であり、ドメイン解析の結果、活性領域であるEPO_TPOドメインを有していた。しかし、マウス・ヒト(319~356残基)がもつN型糖鎖修飾部位が存在しなかった。また、遺伝子発現解析の結果、*tpo1*は肝臓、心臓、脳で発現が強く、一方*tpo2*は肝臓、心臓で強いものの、脳での発現は弱かった。

【結論】

今回単離された*tpo1*、*tpo2*はニワトリやゼブラフィッシュと同様、EPO_TPOドメインのみを有していたが、哺乳類のTPOのC末端側に存在するN型糖鎖修飾部位が存在しなかった。しかし*tpo1*と*tpo2*とを比べると、*tpo1*はゼブラフィッシュTPOと相同性が高かったのに対し、*tpo2*はC末端側にイントロン様配列が残存した配列であった。以上のことから*tpo1*と*tpo2*はスプライシングバリエーションであり、発現解析の結果でも*tpo1*と*tpo2*で発現組織が異なるなど、機能的にも両者は異なっていると考えられた。

現在コイTPOの機能を調べるため、大腸菌または動物細胞発現系を用いてリコンビナントタンパク質を作製中である。

魚類の造血機構解明を目的としたコイ kit ligand A の機能解析

尻無浜由希、片倉文彦、藪健史、森友忠昭、中西照幸
 日本大学・生物資源科学部

Functional analysis of carp (*Cyprinus carpio*) kit ligand A in hematopoiesis

Yuki Shirinashihama, Fumihiko Katakura, Takeshi Yabu, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi
 College of Bioresource Sciences, Nihon University

【目的】

哺乳類の幹細胞因子(SCF)は、膜貫通型と可溶型が存在し、特に可溶型 SCF の造血細胞に対する機能の研究が進んでいる。可溶型 SCF は、造血幹/前駆細胞の増殖・分化を支持するとともに、他のサイトカインとの併用により特定の系統の前駆細胞の増殖促進効果を示す。魚類には SCF に相当する 2 つの分子、kit ligand A (kitla) 及び kit ligand B (kitlb) が存在するが、造血に及ぼす作用としてはキンギョの kitla が単球前駆細胞の増殖を誘導することが知られているのみである。そこで本研究は魚類の造血機構の解明を目指し、造血幹/前駆細胞に対する kitla の作用を調べるため、リコンビナントタンパクを作製し、コイ kitla の機能解析を行った。

【材料および方法】

コイの頭腎から kitla の cDNA を単離した。ドメイン解析により、コイ kitla 分子には、哺乳類や他魚種で見られる細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域が存在することを確認した。哺乳類の可溶型 SCF は、細胞表面から細胞外領域が切り離されて分泌することから、コイ kitla の細胞外領域を発現ベクター pET-16b に連結し、大腸菌へ形質転換後、リコンビナント kitla extracellular domain (rkitla-ed) を Ni アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

kitla の生理活性は、演者らが確立しているコイ腎臓造血細胞のバルク培養および半固形培地を用いたコロニーアッセイ法により調べた。遺伝子発現解析には RT-PCR 法を用いた。

【結果】

Rkitla-ed をコイ腎臓造血細胞のバルク培養に添加したところ、kitla の有無に関わらず活発な細胞増殖がみられた。また、増殖した細胞の遺伝子発現解析を

行った結果、kitla の有無に関わらず、T cell マーカー遺伝子である *lck* の発現が認められたが、造血幹細胞マーカー遺伝子である *gata2* の発現はみられなかった。kitla を添加しコロニーアッセイした場合でも、無添加のものとは比べてコロニー形成数に差はみられなかった。そこで、kitla と赤血球造血に作用するエリスロポエチン(EPO)のリコンビナントタンパクを共に添加しコロニーアッセイした結果、EPO 単独刺激の場合よりも kitla と EPO による共刺激の場合の方がコロニー形成数が多かった。共刺激下で形成したコロニーの中には、EPO 単独刺激においても認められた β -globin、*epor* および *gata1* などの赤血球マーカー遺伝子のみを発現するコロニーに加え、赤血球マーカー遺伝子と共に粒球マーカー遺伝子である *cd41* および *c-mpl* を発現しているコロニーも認められた。

【結論】

Kitla 単独ではコイ腎臓造血細胞中の造血幹細胞の増殖は誘導しなかったが、赤血球造血を促す EPO の作用を増強し、赤血球前駆細胞の増殖・分化を促したと考えられた。また、kitla と EPO の共刺激を加えたコロニーアッセイで得られたコロニーの中には、EPO 単独刺激の場合にはみられなかった粒球マーカー遺伝子が発現するものが存在したことから、kitla は赤血球前駆細胞よりも未分化な赤血球/粒球共通前駆細胞を刺激し、その増殖・分化を促していることが考えられた。

哺乳類の研究では、コロニーアッセイ法において SCF 単独でコロニー形成を誘導することが確認されており、このことから SCF 単独でも生理活性を示すことが証明されている。現在、バルク培養およびコロニーアッセイの条件を再度検討することで、コイ kitla 単独での生理活性の有無について検討中である。

墨汁投与時のトラフグ二次リンパ組織における免疫応答

前田知己¹、末武弘章¹、田内博久²、金田充¹、臼井陽子¹、菊池潔²、鈴木謙²、宮台俊明¹
¹ 福井県立大学・海洋生物資源学部, ² 東京大学・水産実験所

Immune responses to injected carbon colloid in fugu second lymphoid organs.

Tomoki Maeda¹, Hiroaki Suetake¹, Hirohisa Tauchi², Mituru Kaneda¹, Yoko Usui¹, Kiyoshi Kikuchi²,
 Yuzuru Suzuki², Toshiaki Miyadai¹.

¹ Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural Univ., ² Fisheries Lab. The Univ. of Tokyo.

【目的】

魚類の獲得免疫応答はどこで起こっているのだろうか。哺乳類において、獲得免疫応答は脾臓やリンパ節など二次リンパ組織で行われている。一方、魚類では脾臓と腎臓が二次リンパ組織であると考えられているが、獲得免疫応答がこれらのどこで起こっているかはわかっていない。トラフグは、近年全ゲノムが解読され、そのデータベースを用いて免疫関連遺伝子の同定が進んでいる。そのため、魚類免疫研究のモデルとして注目され始めている。しかし、トラフグにおいて二次リンパ組織に関する知見はない。そこで本研究では、異物を捕捉する場所を明らかにするとともに、炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子の発現量に注目して、トラフグ二次リンパ組織での免疫応答を観察した。

【材料と方法】

100-200 g のトラフグに墨汁（ペリカンインク）を 1 μL/g fish、腹腔より投与し、投与前、投与後 1、7、14 日後に黒化が見られた臓器を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋、HE 染色後、光学顕微鏡で観察した。また、このとき採取した臓器の一部から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

【結果】

墨汁投与後 1 日において、脾臓、腎臓の黒変が観察された。HE 染色した組織中の黒色粒子を光学顕微鏡観察した結果、脾臓では Ellipsoid にみられ、腎

臓では大型で丸い貪食細胞内に見られた。脾臓、腎臓ともに 7 日目以降に Melano-macrophage center (MMC) において黒色粒子が見られた。光学顕微鏡の倍率 100 倍での検鏡時に 1 視野中に存在する MMC 数を計数した結果、脾臓、腎臓ともに 7 日目以降に MMC 数の増加が見られた。脾臓、腎臓におけるサイトカインおよびケモカイン遺伝子の発現解析をおこなった結果、炎症性サイトカインと MMC 発現ケモカインの増加傾向が観察された。

【結論】

トラフグの二次リンパ組織は、他の魚種同様に脾臓および腎臓であると考えられる。脾臓と腎臓における初期の墨汁粒子捕捉様式は異なることが示唆された。脾臓は Ellipsoid に黒色粒子が捕捉された後、常在の貪食細胞により貪食されると考えられる。一方、腎臓は遊走してきた貪食細胞によるものと考えられる。その後の捕捉様式は脾臓、腎臓ともに共通で、MMC に捕捉されることが明らかとなった。MMC の増加とサイトカインおよびケモカインの増加傾向が見られたことから、これらが MMC の発達に関与することが示唆された。

ギンブナ CD3 ϵ 分子の特性解明

村田 憲史¹、大橋 健¹、柴崎 康宏¹、藪 健史¹、森友 忠昭¹、中西 照幸¹

¹ 日本大学・生物資源科学部

Characterization of CD3 ϵ in Ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*

Norifumi Murata¹, Ken Oohashi¹, Yasuhiro Shibasaki¹, Takeshi Yabu¹, Tadaaki Moritomo¹, Teruyuki nakanishi¹

¹ College of Bioresource Sciences, Nihon University

【目的】

魚類免疫機構の解明には、T 細胞の動態解析が必須である。我々はギンブナにおいて、T 細胞マーカー分子である CD4 及び CD8 α 鎖に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作製に成功し、T 細胞サブセットの動態を明らかにしてきた。しかし、未だ全 T 細胞 (Pan-T) に対する抗体は得られていない。

そこで、哺乳類において Pan-T 細胞マーカー分子として知られる CD3 ϵ に対する抗体を作製し、魚類 T 細胞の解析を試みた。

【材料と方法】

諏訪湖産 3 倍体クローンギンブナ系統 (S3N) より CD3 ϵ 遺伝子を単離した。各組織における CD3 ϵ 遺伝子の発現について RT-PCR により解析した。さらに、ギンブナ CD3 ϵ 組み換え蛋白質を作製し、ウサギを用いた定法に従って、抗ギンブナ CD3 ϵ 抗血清を作製した。なお、本抗血清の特異性は組み換え蛋白質を用いた免疫吸収試験により解析した。

本抗血清および抗ギンブナ CD4、CD8 α 、G6F (抗粒球・赤血球) モノクローナル抗体 (MAb) を用い、ギンブナの各組織における CD3 ϵ の分布・発現についてフローサイトメトリー (FCM)、及び免疫組織化学的手法 (IHC) により解析した。

【結果】

ギンブナ CD3 ϵ 遺伝子は、細胞外に 1 個の Ig ドメイン及び CXXC モチーフが存在し、細胞内に ITAM が存在するなど CD3 ϵ に特徴的な配列を有していた。

mRNA の組織発現解析により、本遺伝子は胸線、脾臓及び鰓で強く発現しており、頭腎、腸管及び末梢血では弱い発現が認められた。

FCM 解析では胸線、脾臓、鰓及び腸管で多数の CD3 ϵ ⁺ 細胞が認められた。一方、頭腎、末梢血では CD3 ⁺ 細胞は認められなかった。抗 CD4、CD8 α 、G6FMAb を用いた二重染色では、胸線、脾臓、鰓及び腸管において CD3 ϵ ⁺ CD4 ⁺ および CD3 ϵ ⁺ CD8 α ⁺ 細胞が認められたが、頭腎及び末梢血では CD3 ϵ ⁺ CD4 ⁺ 及び CD3 ϵ ⁺ CD8 α ⁺ の細胞集団のみ認められた。なお、G6F 陽性細胞は全ての組織で本抗血清と反応を示さなかった。

IHC による解析では、胸線及び脾臓で散在している CD3 ϵ ⁺ 細胞が多数認められた。鰓では鰓薄板及び基部に CD3 ϵ ⁺ 細胞が多数存在していた。腸管では上皮細胞間に多数の CD3 ϵ ⁺ 細胞が、粘膜固有層には少数の CD3 ϵ ⁺ 細胞が認められた。

【結論】

ギンブナ CD3 ϵ は、CD4 及び CD8 α 陽性 T 細胞の一部には発現してはいるが、全ての T 細胞サブセットには発現していないことから、Pan-T 細胞マーカーには成り得ないことが示唆された。また、CD4 及び CD8 α 陽性 T 細胞の中に CD3 ϵ 陽性及び陰性の細胞が存在することから、魚類において CD3 ϵ は分化・成熟に関連することも示唆された。

なお、今回作製した抗血清が CD3 ϵ 以外の分子を認識している可能性も考えられることから、本抗血清が認識している分子について現在解析中である。

トラフグ腎臓に存在する形質芽球様細胞

小高智之^{1,2}、筒井繁行¹、宮台俊明²、菅又龍一³、末武弘章^{2,3}、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

The plasmablast-like leukocyte in the kidney of fugu (*Takifugu rubripes*).

Tomoyuki Odaka¹, Sigeyuki Tsutsui¹, Toshiaki Miyadai², Ryuichi Sugamata³, Hiroaki Suetake^{2,3},
 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】

抗体産生は獲得免疫系の中でも最も重要なエフェクター作用であるが、それを担う形質細胞の分化・成熟の過程は、魚類において未だ不明な点が多い。そのため、魚類免疫系を理解するうえで、このメカニズムを知ることは非常に重要である。本研究では全ゲノム配列が解読されているトラフグをモデルとし、その主要な免疫器官である腎臓から、形質細胞の前駆細胞である形質芽球に相当する細胞の単離に成功したので、これを報告する。

【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。我々はこの細胞集団が IgM⁺CD8α⁺細胞、IgM⁺CD8α⁺細胞、IgM⁺CD8α⁺細胞によって構成されていることを既に明らかにしている。そこで、抗トラフグ IgM 抗体及び抗トラフグ CD8α 抗血清を用いた MACS により IgM⁺CD8α⁺細胞を単離した。得られた細胞は、形態観察及びマーカー遺伝子の発現解析に供した。さらに IgM⁺CD8α⁺細胞の培養上清を回収し、この細胞が実際に IgM を分泌しているかどうかをウェスタンブロッティングにより解析した。

【結果】

MACS により回収した IgM⁺CD8α⁺細胞の形態をメイグリュンワルド - ギムザ染色し形態を観察したと

ころ、ほとんどの細胞は核が偏在し、豊富な細胞質はほとんど染まらず、顆粒や空胞を有していなかった。白血球マーカー遺伝子の発現解析の結果、IgM⁺CD8α⁺細胞は分泌型 IgM (sIgM)、MHC class II、Bcl-6、Blimp-1 を発現していた。また、IgM⁺CD8α⁺細胞の培養上清をウェスタンブロッティングに供した結果、この細胞は IgM を分泌していることが明らかとなった。形態的特徴や sIgM 及び Blimp-1 の発現から、IgM⁺CD8α⁺細胞は哺乳類の形質細胞に類似している点がある。しかし、MHC class II や Bcl-6 も発現していたことから、この細胞は形質細胞よりもその前駆細胞である形質芽球に近い細胞であることが示唆された。

【結論】

トラフグの腎臓から形質芽球様細胞の単離に成功した。ニジマスにおいて形質芽球の存在が示唆されているものの、形質芽球様細胞を単離したのは、本研究が初めてである。魚類の主要な免疫器官である腎臓から形質芽球に相当する細胞が得られたことは、魚類の腎臓が B 細胞から形質細胞への分化の場の一つであることを示唆している。

本研究により形質芽球様細胞の単離が可能となったことから、今後、形質芽球から形質細胞への分化に関して、より詳細な分化機構を解明する大きな手掛かりとなることが期待される。

トラフグ gp130 は STAT3 をリン酸化する

金田 充、末武 弘章、宮台 俊明

福井県立大学・海洋生物工学研究室

A fugu gp130 phosphorylates STAT3.

Mitsuru Kaneda, Hiroaki Suetake, Toshiaki Miyadai

Department of Marine Biotechnology, Fukui Prefectural University

【目的】

魚類を抗原で刺激すると抗体産生細胞が増加することはよく知られているものの、その仕組みは不明である。哺乳類では、IL-6 が抗体産生細胞の分化や維持に関与している。抗原刺激を受け活性化した B 細胞表面に発現する IL-6 受容体 (IL-6R、gp130) と IL-6 が結合すると、gp130 は転写因子である STAT3 をリン酸化する。リン酸化した STAT3 は、Blimp-1 の発現を誘導することによって B 細胞から抗体産生細胞への分化を促す。魚類においても、抗原刺激により IL-6 が増加する。また、魚類で B 細胞を含む膜型 IgM⁺細胞集団に IL-6 受容体が発現している。これらのことから、魚類 IL-6 は抗体産生細胞分化の重要な因子であり、IL-6 受容体を介したシグナル伝達が抗体産生細胞の分化に関与していると予測した。そこで、本研究では、魚類の抗体産生細胞分化機構を理解するために、トラフグの gp130 に STAT3 をリン酸化する能力があるかどうかを検証した。

【材料と方法】

トラフグ gp130 の STAT3 活性化能について検証するため、マウスプロ B 細胞株 Ba/F3 にトラフグ gp130 を発現させた。gp130 発現細胞をヒトリコンビナント IL-6 とヒトリコンビナント可溶性 IL-6R 存在下で 30 分培養後、核抽出物を回収した。核抽出物をウェスタンブロットに供し、STAT3 がリン酸化されているかどうかを解析した。

【結果】

gp130 について、IL-6/IL-6R 複合体に結合するドメインと細胞内領域をトラフグとヒト、マウスで比較した。トラフグ gp130 の IL-6/IL-6R 結合ドメインは、ドメインを構成する 4 つのシステイン残基のうち、2 つが欠損していた。哺乳類 gp130 細胞内領域には、STAT3 リン酸化モチーフが 4 ヶ所保存されているが、トラフグ gp130 の細胞内領域では、3 ヶ所しか保存されていなかった。

ウェスタンブロット解析の結果、IL-6 で刺激したトラフグ gp130 発現 Ba/F3 において 90 kDa のリン酸化 STAT3 のバンドを検出した。

【結論】

ヒト IL-6 で刺激したトラフグ gp130 発現細胞において、リン酸化 STAT3 が検出された。このことは、トラフグ gp130 は、STAT3 リン酸化モチーフが 3 ヶ所のみであっても十分に機能することを示唆する。また、ヒトの IL-6/IL-6R 複合体でトラフグ gp130 の STAT3 シグナル系が活性化したことから、システインの欠損にも関わらずサイトカイン結合ドメインが機能的に保存されていることが示唆された。本研究により、魚類と哺乳類間で gp130 を介したシグナル伝達経路が保存されていることが示された。今後、トラフグにおいて、IL-6 の刺激に応じて抗体産生細胞分化が誘導されることを明らかにする。

パターン認識受容体によるヒラメ I 型インターフェロンプロモーター領域の転写制御

青木宙^{1,2}、大谷 真紀²、Seong Don Hwang¹、加藤 剛司¹、引間 順一²、近藤 秀裕¹、
廣野 育生¹、Tae Sung Jung²

¹東京海洋大学・ゲノム科学講座、²慶尚国立大学校・獣医学部

Transcriptional regulation of type I IFN promoter by pattern recognition receptors in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

Takashi Aoki^{1,2}, Maki Ohtani², Seong Don Hwang¹, Goshi Kato¹, Jun-ichi Hikima², Hidehiro Kondo¹, Ikuo Hirono¹,
Tae Sung Jung²,

¹Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, ²College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

【目的】

自然免疫応答に必要な不可欠なパターン認識受容体(PRRs)はウイルス感染後の I 型インターフェロン(IFN)遺伝子の発現誘導に重要である^[1]。I 型 IFN は抗ウイルス活性を強力に誘導するサイトカインであることは広く知られているが、魚類における I 型 IFN 遺伝子の転写制御機構や、IFN 遺伝子発現を誘導する PRRs からのシグナル伝達経路に関する知見には不明な点が多い。そこで本研究ではヒラメ I 型 IFN 遺伝子のプロモーター領域を同定し、その転写制御機構と PRRs との係わりについて解析を行った。

【材料と方法】

ヒラメゲノム BAC ライブラリーからヒラメ I 型 IFN 遺伝子をコードするクローンを探索し、転写開始点から上流 1.2kb について転写因子結合配列の解析を行った。次に、プロモーター活性を解析するため、pGL3 を元にレポーターベクターを作製し、IFN regulatory factor (IRF)-1, -3, -7 や Toll-like receptor-3 (TLR3), Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) 遺伝子を pcDNA4 へ挿入した発現ベクターと共にヒラメ胚由来細胞株 HINAE に遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後に 50µg/ml の Poly I:C を培養液に添加し、経時的に HINAE 細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果】

ヒラメ I 型 IFN 遺伝子のプロモーター領域には、IRF-1, -3, -4, -7 および NFκB など哺乳類 I

型 IFN 遺伝子の発現を制御する転写因子の結合配列が複数保存されていた。

このプロモーターを用いたルシフェラーゼ解析の結果、IRFs 結合部位が多数含まれる領域に Poly I:C 刺激に対する転写活性が確認されたことから、IRF-1, -3 および -7 を過剰発現させてこの領域の転写活性を測定したところ、IRF-3 はプロモーター領域の活性化を強く誘導したが、IRF-1 および -7 はほとんど誘導しなかった。しかし、Poly I:C 刺激を加えた結果、IRF-7 はプロモーター領域の活性化を誘導した。次に、I 型 IFN 遺伝子の発現誘導シグナルに重要とされる TLR-3 や MDA5、LGP2 を過剰発現させたところ、Poly I:C 刺激に対して同プロモーター領域の活性は強く誘導された。

【結論】

ヒラメ I 型 IFN 遺伝子の転写制御は、Poly I:C 刺激後に、TLR-3 や MDA5、LGP2 を含む PRRs によってシグナル伝達経路が活性化され、活性化した IRF-3 および IRF-7 がプロモーター領域を制御することで I 型 IFN 遺伝子の発現が誘導されると考えられた。

【参考文献】

1. Takeuchi O, Akira S (2010) Cell, 146: 805-820.

Rag1 欠損ゼブラフィッシュにおける獲得免疫不全の検証

白水 正道¹、徳永 弓枝¹、吉浦 康寿²、乙竹 充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 増養殖研究所

Functional evidence for the lack of vaccine-inducible acquired immunity
in *rag1*-mutant zebrafish: An insight into innate immune potency in teleosts

Masamichi Shirouzu¹, Yumie Tokunaga¹, Yasutoshi Yoshiura², Mitsuru Ototake²,
Tomonori Somamoto¹, Miki Nakao¹

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, ²National Research Institute of
Aquaculture, Fisheries Research Agency

【目的】 Recombination activating gene 1 (*Rag1*) は、抗体 (Immunoglobulin ; Ig) や T 細胞受容体の可変領域をコードする遺伝子の再構成に必須である。哺乳類では *Rag1* が欠損すると獲得免疫が働かなくなり、無菌状態でしか生存できない重症複合免疫不全となる。ところが、*Rag1* 欠損ゼブラフィッシュ (*Rag1*^{-/-}) は通常の飼育環境下で生育し、繁殖も可能である。そこで *Rag1*^{-/-} の獲得免疫が本当に欠損しているのか、また、病原体に対する抵抗性が低下しているのかを検証した。

【方法】 *Rag1*^{-/-} に市販のビブリオワクチンで 2 回免疫し、最終免疫から 2 週間後に血清を採取して凝集抗体価を測定した。次に、血清をゲルろ過し、IgM の分子量に相当するフラクションを SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロッティングを行った。また、腎臓および血液を摘出し、その細胞懸濁液を抗 IgM 抗体と FITC 標識した二次抗体を用いて B 細胞受容体を標識し、フローサイトメトリーで B 細胞を検出した。さらに、ホルマリンで不活化した *Vibrio anguillarum* 775 株を 1 週間毎に 3 回免疫し、最終免疫から 2 週間後に感染試験を行った。感染は *V. anguillarum* 775 株生菌を 1.0×10^7 cells/mL に調整し、1.5 時間浸漬

感染させ、その後 2 週間の死亡数を計測した。

【結果】 野生型の *Rag1* をヘテロに持つゼブラフィッシュ (*Rag1*^{+/-}) では 16~320 倍の凝集抗体価が見られたが、*Rag1*^{-/-} ではすべての個体で抗体価が検出されなかった。さらに、ウェスタンブロッティングでの解析の結果、*Rag1*^{-/-} では IgM の H 鎖のバンドは確認できなかった。フローサイトメトリーによる解析では、*Rag1*^{+/-} は蛍光標識による B 細胞のピークが検出されたが、*Rag1*^{-/-} ではピークは現れず、*Rag1*^{-/-} の腎臓と血液には細胞表面に B 細胞受容体を発現した B 細胞が存在しないことが示された。感染試験では、*Rag1*^{+/-} の死亡率はワクチン投与区が 18%、対照区での死亡率は 72% となりワクチン投与による生体防御効果が見られたが、*Rag1*^{-/-} のワクチン投与区と *Rag1*^{+/-} の対照区ではどちらも死亡率が 67% となり、ワクチン効果は得られなかった。

【結論】 *Rag1* 欠損ゼブラフィッシュは獲得免疫不全であることが明らかとなった。また、非免疫状態での感染試験においては病原体への抵抗性に差が見られないことから、*Rag1* 欠損ゼブラフィッシュは T 細胞、B 細胞の働きを補う何らかの免疫システムが働いていることが示唆された。

寄生虫の宿主特異性に関わるフグ遺伝子の探索

平林陽¹, 木戸慎一¹, 木南竜平², 細谷将¹, 甲斐涉¹, 菊池潔¹, 城夕香¹, 末武弘章³, 良永知義²,
小川和夫², 鈴木謙¹

¹東京大学・水産実験所, ²東京大学・魚病学研究室, ³福井県立大学・海洋生物工学研究室

Genetic approach for identifying the genes responsible for susceptibility against a parasite, *Heterobothrium okamotoi*, in fugu, *Takifugu rubripes*.

Yo Hirabayashi¹, Ryuichi Kido¹, Ryuhei Kinami², Wataru Kai¹, Kiyoshi Kikuchi¹, Yuka Jo,¹ Hiroaki Suetake³,
Tomoyoshi Yoshinaga², Kazuo Ogawa², Yuzuru Suzuki¹

¹DFisheries Laboratory, The University of Tokyo, ²DLaboratory of Fish Disease Research, The University of Tokyo,

³Faculty of Marine Bioscience, Fukui Prefectural University

【目的】

全ゲノムが解読されたトラフグ *Takifugu rubripes* は、近縁種との雑種第1世代 (F₁) にも生殖能力があり、次世代の作成が可能である。我々は養殖トラフグに甚大な被害をもたらす単生類の寄生虫 *Heterobothrium okamotoi* (エラ虫) に対してクサフグ *T. niphobles* が抵抗性を示すことに着目し、交雑第2世代 (F₂) を用いた攻撃試験により、寄生虫の宿主特異性関連遺伝子の探索を進めている。

【材料と方法】

クサフグとトラフグの種間交雑 F₁ の雌雄から F₂ 世代を作出し、寄生虫の攻撃試験を行なった。寄生の成立には浮遊幼生が鰓に着定する過程と、その後の脱落の2つが関わっていることから、実験は2群に分け、攻撃3時間後(着定)、および3週間後(脱落)に寄生虫数を計数した。すでに作製した1219マーカーからなる詳細な連鎖地図を用いて^[1]、寄生虫数に関与する量的形質遺伝子座 (QTL) の解析を行なった。

さらなる詳細なマッピングを進めるため、トラフグとクサフグの F₁ 個体にクサフグを交配して同胞個体を作成した。個体ごとのゲノムの遺伝子型を解析することで、親魚候補の選抜を行なった。

【結果】

曝露3週間後の寄生虫体数に関わるフグゲノム領域は、第9(QTL-9)、第18染色体上(QTL-18)にあった。一方、曝露3時間後の虫体数に関わるフグゲノム領域は検出されなかった。従って、QTL-9およびQTL-18は、寄生虫の着定ではなく、脱落過程に関与するものと考えられる。

得られた二つのゲノム領域を分離して解析する系統を得るための親魚候補を探索した。その結果、QTL-9がトラフグとクサフグに由来するゲノムのヘテロ接合で、QTL-18がクサフグ由来のゲノムのホモ接合である個体を、180尾中9尾得ることができた。今後、解析家系の親魚として用いる予定である。

【結論】

寄生虫 *H. okamotoi* の宿主特異性に関わるフグのゲノム領域が特定された。さらなる解析に用いる親魚も選抜し、今後の遺伝子特定をめざしている。

【参考文献】

1. Kai W, Kikuchi K, Tohari S, Chew SK, Tay A, Fujiwara A, Hosoya S, Suetake H, Naruse K, Brenner S, Suzuki Y, Venkatesh B (2011) Genome Biol Evol, in press

The immune milieus of fish gill and skin appear Th2-skewed

F. Takizawa¹, U. Fischer¹, K. Hashimoto², J.M. Dijkstra (speaker)²

¹Friedrich Loeffler Institute, Insel Riems, Germany,

²藤田保健衛生大学 (Fujita Health University, Toyoake, Aichi)

【目的】

The mammalian immune system is characterized by a Th1/Th2 divide, where Th2 is important for anti-parasite immunity and Th1 for combating intracellular pathogens. Th1 responses inhibit Th2 responses and vice versa, and thus it is relevant for example during vaccination whether the cytokine profile of a tissue is Th1- or Th2-skewed. To investigate whether fish may also have a Th1/Th2 divide, we searched for a typical Th2 cytokine gene, “IL-4/13A” [1], in rainbow trout and Atlantic salmon, in order to compare its expression pattern with that of the pivotal Th1 cytokine gene interferon γ (IFN γ).

【材料と方法】

Despite very low sequence similarity, rainbow trout and Atlantic salmon IL-4/13A ESTs could be identified by looking for matches with a conserved teleost IL-4/13 protein motif. Full-length transcript and genomic DNA sequences were determined, and tissue distribution was examined by real-time as well as by conventional RT-PCR. Expression was also studied in isolated gill cells and pronephrocytes which had been stimulated with poly I:C or PHA.

【結果】

IL-4/13A was identified in rainbow trout and Atlantic salmon. IL-4/13A expression was

highest in thymus, gill and skin, while also the ratio of IL-4/13A to IFN γ expression was highest in these tissues. As a typical Th2 cytokine, IL-4/13A was enhanced by PHA but not by poly I:C, whereas IFN γ expression was enhanced by both agents.

【結論】

Comparison of IL-4/13A with IFN γ expression in salmonid fishes indicated that thymus, gill and skin represent Th2-skewed immune environments. This is particularly relevant for vaccination methods that target gill or skin, such as for example bath or spray vaccination. Our data suggest that differences in Th2-skewage between tissues are much more pronounced in fish than in mammals.

【参考文献】

1. Ohtani M, Hayashi N, Hashimoto K, Nakanishi T, Dijkstra JM (2008) *Immunogenetics* 60:383-397
2. Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer U, Dijkstra JM (2011) *Mol Immunol* [Epub ahead of print]

新規の可変性リンパ球受容体 VLRC を発現するリンパ球様細胞集団の同定

須藤 洋一¹, 笠松 純¹, 富居 一範¹, 大塚 紀幸¹, 岩渕 和也², 笠原 正典¹

¹北海道大学大学院医学研究科・分子病理学分野, ²北海道大学遺伝子病制御研究所・免疫生物分野

Identification of a lymphocyte-like cell subset expressing a novel variable lymphocyte receptor VLRC

Yoichi Sutoh¹, Jun Kasamatsu¹, Kazunori Fugo¹, Noriyuki Otsuka¹, Kazuya Iwabuchi² and Masanori Kasahara¹

¹Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, ²Division of Immunobiology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University

【目的】

哺乳類リンパ球は B 細胞と、 $\alpha\beta$ 型及び $\gamma\delta$ 型 T 細胞の計 3 種類に大別される。現存する脊椎動物のうち最も原始的な特徴を持つ円口類からは、可変性リンパ球受容体 (VLR) とそれを発現するリンパ球様細胞が同定されている^[1]。これまでに T 細胞様の特徴を示す VLRA 陽性細胞と、B 細胞様の特徴を持つ VLRB 陽性細胞の 2 種類のサブセットが見つかった。遺伝情報データベースの解析を基に、我々が新たに同定した VLRC を発現する細胞が、これら既存の細胞集団とは異なる第 3 のサブセットを形成している可能性を考慮し、以下の実験を行った^[2]。

【材料と方法】

カワヤツメ *Lethenteron japonicum* 末梢血からフイコール比重遠心によりリンパ球様細胞を分離し、多数の VLRC cDNA クローンを得て、分子系統解析により、末梢における多様性を解析した。また、得られた配列から予想立体構造モデルを作成し、既知の VLR と比較した。VLRA 及び VLRB のリコンビナントタンパクを作成し、それを抗原として、モノクローナル抗体を樹立した。樹立した抗体と磁性ビーズ並びにセルソーターを用いて、VLRA 陽性細胞、VLRB 陽性細胞、共陰性細胞の 3 群に分別した。これら 3 群における各 VLR 遺伝子座の組み換えを単一細胞からのゲノミック PCR により解析した。

【結果】

末梢リンパ球様細胞から得られた VLRC は既知の VLR と同様に高い多様性を示した。立体構造モデリ

ングにより、VLRC の LRRCT 領域には他の VLR では認められる突出構造が存在しないことが示唆された。樹立した抗体は VLRA 及び VLRB に対しいずれも高い特異性を示した。単一細胞からのゲノミック PCR の結果、VLRC 遺伝子座の組み換えが起きた細胞では、VLRA 及び VLRB の組み換えが起きていないことが示された。

【結論】

高い配列多様性を持つ VLRC は既知の VLRA 及び VLRB 同様、抗原受容体としての機能を持つと考えられる。LRRCT 領域に突出構造を欠く特徴的な予想立体構造は、VLRC 分子による抗原認識様式が既知の VLR とは異なっている可能性を示唆する。単一細胞からのゲノミック PCR の結果は、VLRC 遺伝子座の組み換えを起こした細胞は他の機能的な VLR を発現しないことを示唆している。したがって、VLRC を発現する細胞は、VLRA 及び VLRB 陽性細胞とは独立した、第 3 のリンパ球様細胞のサブセットを形成していると考えられる。

【参考文献】

1. Pancer, Z., Amemiya, C. T., Ehrhardt, G. R. A., Ceitlin, J., Gartland, G. L. and Cooper, M. D. (2004) *Nature*, 430(6996):174-180.
2. Kasamatsu, J.*, Sutoh, Y.*, Fugo, K., Otsuka, N., Iwabuchi, K. and Kasahara, M. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (32): 14304-14308. (*J.K. and Y.S. contributed equally to this work.)

条鰭類における *PSMB8* 遺伝子の二型性の進化

藤戸尚子¹、塚本健太郎²、源島裕祐¹、野中勝¹

¹ 東京大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻、² 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

Long-term Transspecies Dimorphism of the *PSMB8* gene in Actinopterygii

Naoko T. Fujito¹, Kentaro Tsukamoto², Yusuke Genjima¹, Masaru Nonaka¹

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo

² Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University

【目的】

ヒト MHC 領域には 100 以上の発現している遺伝子が高密度に存在し、そのなかには MHC クラス I、II 遺伝子や補体遺伝子など免疫関連遺伝子が多く含まれる。MHC 領域の基本構造は、軟骨魚類のサメからヒトに至る有顎脊椎動物の各系統において保存されており、獲得免疫の出現とほぼ同時期に有顎脊椎動物の祖先により獲得されたものと考えられる。しかし、クラス I 遺伝子と、*PSMB8* 遺伝子などクラス I の抗原提示に直接関わる遺伝子の緊密な連鎖は、他の系統では保存されているにも関わらず、哺乳類では失われている。

PSMB8 は免疫プロテアソームを構成するサブユニットの一つであるが、当研究室において、データベースから得たゼブラフィッシュ、及びニジマスの *PSMB8* 遺伝子配列をアラインしたところ、基質特異性を決定する残基に異なるアミノ酸(A と F)をもち、切断特異性が異なると思われる二系統の *PSMB8* が、種を超えて保存されていることが判明した。その後の系統解析により、肉鰭類、及び上位条鰭類では F 系統が失われていること、メダカとツメガエルでは更に、F 系統と同じ切断特異性を示すと思われるアリル (F タイプ) が A 系統から独立に再生されていることが明らかとなった。クラス I 遺伝子と *PSMB8* 遺伝子の緊密な連鎖が失われた哺乳類で、二型性が失われたままになっていることから、*PSMB8* の二型性は近傍のクラス I 遺伝子との共進化に何らかの役割を果たしているのではないかと疑われる。

本研究ではまず、*PSMB8* 遺伝子の特異な進化過程の全容を明らかにするため、ゼブラフィッシュやニジマスに見られる二系統がアリル/パラログ

のいずれであるのか、アリルとしての起源はどれくらい古いのか、F 系統の消失はいつ起きたのかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

条鰭類のうち、早期に分岐した古代魚ポリプテルスを材料に選び、他動物の *PSMB8* 遺伝子の配列をもとに作成した縮退プライマーによる RT-PCR、及び 5' -、3' -RACE により *PSMB8* 遺伝子の全長の塩基配列を決定した。ポリプテルス、ゼブラフィッシュ、及びニジマスについて、ゲノム PCR によるタイピングを行い、二系統の遺伝子がアリル/パラログのいずれであるのか検討した。現在、F 系統の消失時期を明らかにするため、上位の条鰭類であるハダカイワシ目、ギンメダイ目、マトウダイ目に属する真骨魚を用いて、二系統の *PSMB8* 遺伝子の単離を試みている。

【結果】

ポリプテルスから、二系統の *PSMB8* 遺伝子が単離された。二系統の *PSMB8* 遺伝子はポリプテルス、ゼブラフィッシュ、ニジマスのいずれにおいてもアリルであることが示された。

【結論】

二系統の *PSMB8* 遺伝子の起源はポリプテルスの出現する約 4 億年前まで遡ることを示した。これはアリルとしては例のない驚くべき結果であり、極めて強い平衡淘汰の存在を示唆している。

胸腺プロテアソームの系統発生

笠原 正典¹、須藤 洋一¹、外丸 詩野¹

¹北海道大学・大学院医学研究科・分子病理学分野

Phylogeny of thymoproteasomes

Masanori Kasahara¹, Yoichi Sutoh¹, Utano Tomaru¹

¹Department of Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

【目的】

タンパク質分解に中心的役割を担う巨大分子複合体であるプロテアソームは、MHC class I 分子によって提示されるペプチドを産生する装置でもある。これまで、抗原提示に関与する特殊なプロテアソームとして免疫プロテアソームが知られていたが^[1]、最近新たに胸腺プロテアソームが同定された^[2]。胸腺プロテアソームは胸腺皮質上皮細胞のみで発現するサブユニット $\beta 5t$ を含むプロテアソームである^[2,3]。本プロテアソームは、1) キモトリプシン様活性が低く、MHC class I 分子との結合親和性が低いペプチドを産生すると予想されること、2) $\beta 5t$ 欠損マウスで末梢血 CD8⁺ T 細胞数が著しく低下することなどから、胸腺における CD8⁺ T 細胞の陽性選択に重要な役割を果たしていると考えられる。今回、われわれは胸腺プロテアソームの系統発生について解析したので報告する。

【材料と方法】

NCBI、Ensembl 等のデータベースは標準的手法を用いて解析した。ゼブラフィッシュの cDNA cloning は PCR 法を用いて行った。プロテアソーム・サブユニットの 3 次元構造は SWISS-MODEL server を用いて予測した。

【結果】

$\beta 5t$ サブユニットをコードする *PSMB11* 遺伝子は、軟骨魚類から哺乳類に至るまで有顎類に広く存在するが、無顎類や無脊椎動物には存在しないことから、MHC の出現とともに有顎類の共通祖先において誕

生したことが判明した。興味深いことに、免疫プロテアソームを欠く鳥類は胸腺プロテアソームも欠損していた。また、ゼブラフィッシュなどの硬骨魚類では、魚類特異的全ゲノム重複の結果と想定される 2 コピーの *PSMB11* 遺伝子が同定された。硬骨魚類の 2 個の $\beta 5t$ サブユニットは触媒活性部位近傍の荷電が異なっていることから、酵素活性に差異がある可能性が示唆された。哺乳類、爬虫類、両生類、硬骨魚類のゲノムでは、*PSMB11* 遺伝子と $\beta 5$ サブユニットをコードする *PSMB5* 遺伝子は隣接していた。また、1) 硬骨魚類から哺乳類に至るまで *PSMB11* 遺伝子はイントロンをもたない特異な構造を有していること、2) *PSMB5* 遺伝子のゲノム構造は有顎類と無顎類・無脊椎動物では大きく異なっていることが明らかになった。

【結論】

PSMB11 遺伝子は有顎類の祖先において、*PSMB5* 遺伝子から直列重複によって誕生したことが示唆された。また、*PSMB5* 遺伝子は直列重複前にイントロンを失い、その後再び獲得した可能性が示唆された。

【参考文献】

1. Tanaka K, Kasahara M (1998) Immunol Rev, 163:161-176
2. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K (2007) Science, 316:1349-1353
3. Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, Fugo K, Otsuka N, Tanaka K, Kasahara M (2009) Blood, 113:5186-5191

脂肪酸結合蛋白質 FABP7 によるクッパー細胞のサイトカイン産生制御

宮崎啓史 澤田知夫 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

Regulation of Kupffer cell cytokine production by Fatty Acid Binding Protein 7

Hirofumi Miyazaki, Tomoo Sawada, Miwa Kiyohira, Nobuko Tokuda, Yasuhiro Adachi, Yuji Owada

Department of Organ Anatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

【目的】

細胞内キャリアーである脂肪酸結合蛋白質 FABP は、長鎖脂肪酸と結合することにより脂質の代謝やシグナル伝達などに関与し、細胞の機能制御にも関わると考えられている。マクロファージ系細胞が持つ FABP は分布する組織によって発現するサブタイプが異なり、それぞれの組織に特徴的なマクロファージの機能制御と関連性を持つのではないかと考えられる。肝のクッパー細胞は、マクロファージ系細胞で唯一脳型 FABP (FABP7) を発現し、肝特有の環境への順応や肝における免疫制御機能の独自性を示しているのではないかと我々は考えている。我々はこれまで、FABP7 ノックアウトマウス (KO) において四塩化炭素 (CCl₄) 投与による肝傷害時の血清 ALT 値が野生型マウス (WT) と比較して高値を示すことや肝傷害領域へのクッパー細胞の集積が低下することを明らかにし、さらに昨年の本学会で KO の、アポトーシス細胞に対する認識や食食活性が低下していることを報告した。今回はさらに、急性肝炎モデルにおけるサイトカインの産生を比較検討し、それに伴う炎症細胞浸潤について検討した。

【材料と方法】

マウスは C57BL/6 の野生型 (WT) と FABP7 ノックアウトマウス (KO) を用いた。D-galactosamine (GalN : 500 mg/kg) / LPS (3 µg/kg) を腹腔内投与して急性肝炎モデルを作成し、1, 2, 4 時間後の血清中サイトカイン TNF-α、MCP-1 量を ELISA キットにて測定した。

また、同試薬を投与後、1, 6 時間の肝臓を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を CD11b で免疫染色した。投与後 1 時間と 6 時間の CD11b 陽性細胞の増加を観察し、さらに投与後 6 時間の陽性細胞の数を WT と KO で比較した。

FABP7 の発現増強の影響を調べる in vitro のモデ

ルとして、FABP7 強制発現マクロファージ様細胞株 J774 を用い LPS 刺激後 20 時間の培養上清中のサイトカイン量を同キットにて測定した。

【結果】

GalN/LPS 投与後 1、2、4 時間の血清中 TNF-α は 1 時間、MCP-1 は 2 時間でそれぞれピークを示した。それぞれピーク時の値を比較したところ、TNF-α は WT が、MCP-1 では KO が有意に高値を示した。

1~6 時間において浸潤してくるのはほとんど好中球で、GalN/LPS 投与後 1 時間と比較し、6 時間では CD11b 陽性細胞が増加した。6 時間後の陽性細胞数をそれぞれ WT と KO で比較すると、KO では陽性細胞数が低下していた。

FABP7 強制発現株では、TNF-α、MCP-1 のいずれのサイトカイン産生についても Mock (空のベクターのみを感染させた株) と比較して増加していた。

【結論】

急性肝炎モデルによる血清中の TNF-α 量が KO で低下していた。クッパー細胞は全身のマクロファージの大半を占め、かつ FABP7 を発現するマクロファージはクッパー細胞のみであることから、FABP7 欠損によって引き起こされたこのような差はクッパー細胞のサイトカイン産生の差を反映したものと考えた。一方、FABP7 の発現増強モデルにおいて LPS 刺激による TNF-α 産生が増加したことから、マクロファージ系細胞の TNF-α 産生を誘導する機構に何らかの形で FABP7 が関与していることが示唆される。

今後、FABP7 が TNF-α 産生を制御する分子機構やシグナル伝達に、どのように関与しているのかについて研究を進めたい。

マウスにおける血リンパ節様構造の形成誘導について

大塚 裕忠¹、中村 雅典¹

¹昭和大学・口腔解剖学教室

Induction of hemal node like structure in mice.

Hirotsuda Otsuka¹, Masanori Nakamura¹

¹Department of Oral Anatomy and Development Biology, Showa University

【目的】

哺乳類において、血リンパ節は脾臓様の網内系リンパ性器官として様々な種に認められるものの、あまり研究がなされてこなかった。また、マウスにおいては、血リンパ節の存在は知られていない。今回我々は、マウスにおける主要な造血系を抑制することにより、血リンパ節様の構造を形成誘導することに成功したので、形態的な手法を中心に、この構造物について検索し、他種動物における血リンパ節と同様のものであるかを解析することとした。

【材料と方法】

脾臓摘出マウスに窒素含有型ビスホスホネート

(NBP) を投与し、骨髄内での赤血球造血を抑制した上で、フェニルヒドラジン (PHZ) を投与し、溶血性貧血を誘導した。検索方法として、HE 染色、免疫組織化学、通常電顕、免疫電顕、RT-PCR、末梢血におけるヘマトクリット値及びエリスロポエチン測定と血液塗抹標本の観察を実施した。

【結果】

末梢血では、著しい貧血とそれに伴うエリスロポエチン濃度の有意な上昇を認め、末梢血中に有核赤血球が多数認められた。また、腹腔内に暗赤色の粟粒大構造物の形成が確認された。この構造物について、組織形態学的検索を実施したところ、脾臓やリンパ節の様な被膜に隔てられ中に骨髄様の細胞が密集していた。免疫組織化学の結果から、これらの細胞群

は有核の TER119 陽性の細胞がほとんどを占めており、これらの細胞と一致して PCNA 陽性の細胞が分布していた。また、一部で B220 陽性の細胞集団が濾胞を形成されるとともに、F4/80 陽性の細胞や Gr-1 陽性の細胞が認められた。さらに、リンパ管マーカーである LYVE-1 陽性の管腔が認められるとともに、その管腔内に赤芽球が認められた。電顕所見においては、TER119 陽性有核細胞はマクロファージから独立して認められることが多く、マクロファージの多くは、赤血球を貪食している状態で存在していた。また、RT-PCR の結果から、胎生期に発現しているグロビン遺伝子の発現が認められた。

【結論】

今回、形成誘導することが出来た血リンパ節様構造については、偶蹄類等で認められる血リンパ節と非常に構造が類似していた。しかしながら、実質内にリンパ管を認めるなどの異なる点もあり、同定するには至らなかった。また、ある種の免疫不全マウス系統においては、副脾や milky spot が髄外造血を行うことが知られており、それらについても比較検討を行うべきと考える。

胎生期グロビン遺伝子の発現が認められたことと有核赤血球の関係や、この構造物での赤血球造血におけるマクロファージの役割についても、より詳細に検討を進めていく必要があると考えている。

コモンマーモセット骨髄由来 CD34+CD117+細胞から ヒトに類似したマスト細胞が分化する

嶋田 新¹、亀谷 美恵¹、布村 聡⁶、山田 祐子¹、末水 洋志²、伊藤 登志雄²、佐竹 正延³、
羅 智靖⁶、谷 憲一⁵、佐々木 えりか²、伊藤 守²、垣生 園子⁴、安藤 潔¹

¹東海大学医学部、²実験動物中央研究所、³東北大学加齢医学研究所分子免疫分野
⁴順天堂大学医学部免疫学教室、⁵九州大学生体防御医学研究所ゲノム病態学
⁶日本大学医学部先進医学総合研究センター分子細胞免疫・アレルギー学講座

Mast cells of common marmoset arise from CD34+CD117+progenitors; a similarity to human mast cell's development

Shin Shimada¹, Yoshie Kametani¹, Satoshi Nunomura⁶, Yuko Yamada², Hiroshi Suemizu², Chisei Ra⁶, Toshio Ito²,
Masanobu Satake³, Kenichi Tani⁵, Erika Sasaki², Mamoru Ito², Sonoko Habu⁴, Kiyoshi Ando¹

¹Tokai University School of Medicine, ²Department of Marmoset Research, Central Institute for Experimental
Animals, ³Department of Molecular Immunology, Institute of Development, Aging Cancer, Tohoku University,
⁴Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, ⁵Medical Institute of Bioregulation, Kyushu
University, Fukuoka, Japan, ⁶Division of Molecular Cell Immunology, Advanced Medical research Center,
Nihon University School of Medicine

【目的】

マスト細胞は I 型アレルギーを誘導する主たる細胞である事が知られている。アレルギー性炎症モデル動物の作製においては、この細胞の同定および誘導が重要な位置を占める。私たちは、遺伝子改変可能な小型の新世界ザルであるコモンマーモセットにおいて骨髄にマスト細胞前駆細胞が存在し、in vitro、in vivo でマスト細胞に分化するのかを検討した。

【材料と方法】

マーモセット骨髄細胞からヒトのマスト細胞前駆細胞マーカーを指標に CD117⁺CD34⁺細胞 (DP 細胞)、CD117⁺CD34⁻細胞、CD117⁻CD34⁺細胞、CD3⁻CD20⁻細胞 (DN 細胞) をセルソーターで精製し、マウス SCF 存在下での培養 (in vitro) および NOG マウスへの移植を行った。移植 4 週後の NOG マウスの各種リンパ臓器を摘出し 20%ホルマリン固定あるいは細胞浮遊液の調製を行った。浮遊細胞はサイトスピンの後メタノール固定し HE, トルイジン青, アルシアン青, サフラニン 0 による組織化学染色により異染性を評価した。また、フローサイトメトリーにより IgE レセプターおよび CD117 の発現解析を行った。更にこれ

らの細胞より total RNA を抽出し、キマーゼ、トリプターゼ、各種サイトカインおよびミエロイドマーカーの発現を RT-PCR により確認した。

【結果】

①マスト細胞培養条件 (SCF 存在下) で培養すると DP 細胞が増殖率、IgE レセプター陽性 CD117⁺マスト細胞分化効率共に最も高いことが明らかとなった。②DP 細胞を移植した NOG マウスの脾臓、骨髄に最も多く CD117⁺CD34⁻マスト細胞が確認された。③in vivo でトルイジン青, アルシアン青, サフラニン 0 染色によりメタクロマジーを起こした細胞がクラスターとして検出された。また、RT-PCR の結果よりキマーゼ、トリプターゼ, IL-4, CD11c, CD13, CD14 の発現が確認された。

【結論】

以上の結果、マーモセット骨髄にはヒトと同様、CD117⁺CD34⁺マスト細胞前駆細胞が存在し、その細胞からヒトとの類似性を持つマスト細胞が分化することが示唆された。これらの細胞の機能を更に詳細に解析し、非ヒト霊長類を用いた I 型アレルギーモデルとしての有用性を評価する予定である。

コモンマーモセット免疫系ツールの開発

亀谷 美恵¹、嶋田 新¹、末水 洋志²、佐々木えりか²、伊藤 登志雄²、佐竹 正延³、
八木田 秀雄⁴、谷 憲一⁵、垣生 園子³

¹東海大学・医学部・生体防御学、²実験動物中央研究所、³東北大学・加齢医学研究所・分子免疫分野、⁴順天堂大学・医学部・免疫学教室、⁵九州大学・生体防御医学研究所・ゲノム病態学

Development of Monoclonal Antibodies for Analyzing Immune and Hematopoietic Systems of Common Marmoset.

Yoshie Kametani,¹ Shin Shimada¹ Hiroshi Suemizu,² Erika Sasaki,² Toshio Ito,³ Masanobu Satake,³ Hideo Yagita⁴, Kenzaburo Tani,⁵ and Sonoko Habu⁴

¹ Department of Immunology, Tokai University School of Medicine, ² Central Institute for Experimental Animals, ³ Department of Molecular Immunology, Institute of Development, Aging Cancer, Tohoku University, ⁴ Department of Molecular Genetics, Division of Molecular and Clinical Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, ⁵ Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine

【目的】

非ヒト霊長類であるコモンマーモセット免疫系を解析するツールとして免疫関連遺伝子 cDNA と免疫担当細胞の膜表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、リンパ組織の細胞についてフローサイトメトリー及び RT-PCR を用いて遺伝子発現を解析し、ヒトとの比較を行った。

【材料と方法】

コモンマーモセット脾臓細胞を TSST-1 刺激後総 RNA を抽出し、cDNA を増幅して配列解析を行った。この配列を元に作製した cDNA を BALB/c マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製した。また、これらの配列からプライマーをデザインし、半定量的 RT-PCR により活性化 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルを解析した。

【結果】

33 種類のマーモセット免疫系遺伝子の cDNA 単離を行った後その配列を明らかにしたところ、ヒトとの高い相同性が示された¹。これらのうち CD4 を含む 6 種類の抗原に対するトランスフェクタントおよびモノクローナル抗体を作製した²。これを用いてマーモセット末梢リンパ組織のリンパ球サブセットの

動態を解析したところ、ヒト、マウスに類似の割合で T/B リンパ球が存在していた²。マーモセット脾臓細胞に TCR 刺激を行ったところ、脾臓 CD4T 細胞において IL-4, IL-5, TGF- β , IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17A, IL-17F の mRNA 発現が亢進し、ヒトおよびマウスと同様、Th1, Th2, Treg, Th17 タイプのすべてのサイトカイン産生が起こることが確認された²。

【結論】

マーモセット T 細胞はヒトと同様にスーパー抗原刺激により活性化し、Th1/Th2/Treg/Th17 サブセットのサイトカイン産生能を有する。

【参考文献】

1. Kohu K, Yamabe E, Matsuzawa A, et al. Comparison of 30 immunity-related genes from the common marmoset with orthologues from human and mouse. *Tohoku J Exp Med.* (2008) 215:167-80.
2. Kametani Y, Suzuki D, Kohu K, et al. Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. *Exp Hematol.* (2009) 37:1318-29.

シロイルカの白血球を分類するモノクローナル抗体の作製

齋藤 千明^{1,2}、大石 和恵¹、中村 欽光¹、本郷 悠貴^{1,2}、柿添 裕香³、中澤 正年⁴、
丸山 正^{1,2}

¹海洋研究開発機構、²東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科、³名古屋港水族館、
⁴横浜市立大学・医学部

Classification of Beluga whales' leukocytes by the monoclonal antibody

Chiaki Sito^{1,2}, Kazue Oishi¹, Yoshimitsu Nakamura¹, Yuki Hongo^{1,2}, Yuka Kakizoe³, Masatoshi Nakazawa⁴,
Tadashi Maruyama^{1,2}

¹Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

²Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology

³Port of Nagoya Public Aquarium, ³Shool of Medicine, Yokohama City University

【目的】

鯨類の免疫機構の解明に強力なツールとなりうる末梢血白血球に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。

【材料と方法】

白血球は成熟雄シロイルカ (*Delphinapterus leucas*) の末梢血液より分離した。7週齢雌マウス (BALB/c) に白血球を2週間間隔で3回免疫をした。3回目の免疫の4日後に脾臓を摘出し、同系統マウスの NS-1 細胞とのハイブリドーマを作製し、HAT 培地で選択し、37°C, CO₂5% の条件で培養した。2%パラホルムアルデヒドで固定した同個体の白血球を抗原とし、培養上清を一次抗体とする免疫染色によりスクリーニングを行った。陽性コロニーは限界希釈法によるクローニングを行った。また一部のモノクローナル抗体を用いて、ホルマリン固定シロイルカ由来の組織を抗原とし免疫染色を行った。

【結果】

合計 189 個の免疫染色陽性コロニーが認められ、クローニングが終了した 48 個のクローンを得た。白血球抗原に対して、42 クローンは顆粒球 (分核球) のみを、2 クローンは単核球のみを認識した。また 4 クローンは顆粒球と単核球の両方を認識した。顆粒球を認識したもののうち細胞内顆粒を認識したものが 19、細胞膜を認識したものが 19 であった。また、組織切片を用いた免疫染色では、皮膚等の組織に局在する血球に対して陽性反応を示した。

【結論】

作製した 48 個のモノクローナル抗体は殆どが顆粒球を認識し、単核球を認識するものが 6 クローンあった。今後、より多くのクローンを解析し、組織における分布と機能を明らかにしたい。

北西太平洋に棲息する鯨類の抗ブルセラ抗体の保有率とその特異性

阿部 瑛理香^{1,2}、大石 和恵¹、坂東 武治³、藤瀬 良弘³、丸山 正^{1,2}

¹海洋研究開発機構, ²東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科, ³財団法人日本鯨類研究所

The prevalence and specificity of serum anti-*Brucella* antibody from whales inhabiting the western North Pacific

Erika Abe^{1,2}, Kazue Ohishi¹, Takeharu Bandoh³, Yoshihiro Fujise³, Tadashi Maruyama^{1,2}

¹Marine Biodiversity Research Program, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,

²Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,

³Institute of Cetacean Research, Research Division

【目的】

太平洋を含む世界のさまざまな海域に棲息する多くの種類の海棲哺乳類で、ブルセラ菌の感染が報告されている。最近の北西太平洋の鯨類における感染の実態を明らかにするために、血清疫学調査を行ない、血清中の抗体の特異性と性状を解析した。

【材料と方法】

2010年の北西太平洋鯨類捕獲調査(JARPNI)により得た沖合ミンククジラ(*Balaenoptera acutorostrata*)14個体、沿岸ミンククジラ(鮎川:41個体、釧路:42個体)、ニタリクジラ50個体、イワシクジラ100個体、マッコウクジラ3個体、ならびに2006年に得たミンククジラ99個体の血清をサンプルとして用いた。また、南極海鯨類捕獲調査(JARPA II)において得たクロミンククジラ(*Balaenoptera bonarensis*)100個体の血清サンプルも使用した。抗原として*Brucella abortus*の不活化菌体を用い、凝集テストにより抗ブルセラ菌抗体の保有率を調べた。次に、血清サンプル中の抗ブルセラ抗体の特異性を調べるために、不活化*B. abortus*と*B. canis*の可溶化抗原を用いて、Western Blot法とELISA法により解析した。二次抗体としてHRP標識したProteinA/G、抗ミンククジラIgG、IgMポリクローナル抗体を用いた。

【結果】

2010年の凝集テストによるブルセラ菌保有率は、沖合ミンククジラ14%、沿岸ミンククジラ鮎川:10%、釧路:31%、ニタリクジラ12%、イワシクジラ4%、マッコウクジラ0%、クロミンククジラ0%であった。2006年の沖合ミンククジラでは33%であった。Western Blot法とELISAを用いた解析では、ミンククジラの血清中の抗ブルセラ抗体は*B. canis*に比べ*B. abortus*の可溶化抗原に対し強い反応性を示した。クロミンククジラは、今回と過去のデータを合わせると792個体の血清の凝集テストが行われたが、全て陰性だった。

【結論】

凝集テストの結果から、調べた北西太平洋の鯨類では、抗ブルセラ菌抗体保有率は安定していることがわかった。一方で、凝集テスト、Western Blot、ELISAのどの方法においても、南極海のクロミンククジラの集団では、感染履歴を見いだすことはできなかった。また、北西太平洋のミンククジラの血清中の抗ブルセラ抗体は、*B. canis*よりも*B. abortus*に対して強い抗原特異性を有していることが示された。南半球の海域では、抗ブルセラ菌抗体を有する海棲哺乳類の集団も報告されており、継続的な血清のモニタリングが重要である。

LPS 刺激バンドウイルカ白血球の EST 解析と免疫因子の変動

大石 和恵¹, 宍戸 玲子^{1,2}, 岩田 泰尚^{1,2}, 斎藤 雅史^{1,2}, 竹中 良太³, 大津 大³,
奥津 健司³, 丸山 正^{1,2}

¹海洋研究開発機構, ²東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科, ³横浜・八景島シーパラダイス

Expression sequence tag analysis of LPS-stimulated leukocytes from bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)

Kazue Ohishi¹, Reiko Shishido², Yasunao Iwata², Masafumi Saitoh², Ryota Takenaka³, Dai Ohtsu³, Kenji Okutsu³,
Tadashi Maruyama^{1,2}

¹Marine Biodiversity Research Program, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,

²Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,

³Yokohama Hakkeijima Sea Paradise Aquarium

【目的】

近年、海棲哺乳類で、ブルセラ菌をはじめ複数の細菌感染が報告されているが、これらに対抗する鯨類の免疫についての情報は少ない。グラム陰性細菌の外膜成分である lipopolysaccharide (LPS) は、Toll like receptor (TLR) 4 のリガンドであり、強い免疫誘導分子として知られている。本研究の目的は LPS で刺激した鯨類の白血球を用いて EST 解析を行い、発現する生体防御因子についての知見を得ることである。

【材料と方法】

横浜・八景島シーパラダイスにて飼育されているバンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) 8 頭の血液から白血球を分離し、サンプルの半分を *Salmonella minnesota* R595 由来 LPS により刺激した。LPS 刺激ならびに未刺激白血球より mRNA を抽出し、メガクローン・メガソート法による Expression sequence tag (EST) 解析を行った。また同時に、バンドウイルカ 6 頭からの白血球を用いて、*Salmonella* または *E. coli* 055:B5 由来 LPS により免疫刺激し、mRNA を抽出した。EST 解析で発現の高かった因子ならびに TLR4 とその関連因子について RT-PCR 法により、経時的に発現の変化を調べた。

【結果】

EST解析において、LPS刺激により発現が上昇した849個のクローンのうち、フェリチンH鎖は全体の39.7%(337/849)を占めた。免疫関連因子の転写産物は全体の35.2%(299/849)で、interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra: 159クローン)はこのカテゴリーの約半分を占めた。次いでSerum amyloid A3 (SAA3:80クローン), intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 (32クローン)が多かった。逆に、発現がLPS刺激により低下した384個の遺伝子産物の中で、免疫関連因子は全体の31.3%(120/384)を占め、カルシウム結合蛋白質S100 familyに属するS100A2, S100A8, S100A6がこのカテゴリーのほとんど(96.7%:116/120)を占めた。経時的に発現を調べた結果、IL-1Raの発現は一過的でTNF- α の発現パターンと類似していた。TLR4, MD-2の発現はLPSの刺激には相関しなかった。

【結論】

LPS 刺激により、スーパーオキシドや IL-1 等の炎症性サイトカインの産生が起これ、それが IL-1Ra やフェリチンの誘導を促したと考えられた。また、S100 family に属する分子が消費されるような反応も同時に起きたと考えられた。IL-1Ra, SAA3, S100A8 は、自己免疫疾患や癌にも関連することが知られている。今後、鯨類の組織等でのこれらの因子の発現を観察し、生体防御や自然炎症の理解に役立てたい。

古田賞受賞講演：FP

Molecular activation and regulatory mechanisms of innate immune responses after pathogenic microbe challenges in insects

Lee Bok Luel

National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy,
Pusan National University, Busan, 609-735, Korea

Innate immunity is a crucial host defense mechanism against microbial infection in all animals. The insect Toll signaling pathway is activated upon recognition of Gram-positive bacteria and fungi, resulting in the expression of antimicrobial peptides via NF- κ B-like transcription factor. This activation is mediated by a serine protease cascade leading to the processing of Spätzle, which generates the functional ligand of the Toll receptor. Recently, we analyzed the serine protease cascade regulating the Toll signaling pathway using larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. This large insect enabled us to collect large amount of hemolymph (the insect blood) allowing purification of serine proteases, serpins and pattern recognition proteins. Our studies demonstrated that the recognition of bacterial Lys-type peptidoglycan (PG) by the PG recognition protein-SA (PGRP-SA)/Gram-negative binding protein 1 (GNBP1) complex and the recognition of fungal beta-1,3-glucan by GNBP 3 activates pro-Spätzle via the sequential activation of three serine proteases: modular serine protease (MSP), Spätzle processing enzyme-activating enzyme (SAE) and Spätzle processing enzyme (SPE). Additionally, we provide biochemical evidences of how the *Tenebrio* PGRP-SA/GNBP 1 complex-mediated bacteria recognition signal or GNBP3-mediated fungi recognition signal is transferred to pro-Spätzle leading to the production of antimicrobial peptides. Injection of β -1,3-glucan into *Tenebrio* larvae induced production of two antimicrobial peptides, Tenecin 1 and Tenecin 2, which are also inducible by injection of the active form of Spätzle-processing enzyme-activating enzyme or processed Spätzle. Furthermore, we identified four different serpins that are involved in the regulation of Toll signaling cascade. We examined in vitro and in vivo biological functions of these serpins during Toll activation cascade.

In summary, our work supports a new model in which bacterial Lys-type PG and fungal beta-1,3-glucan recognition signals activate a common proteolytic cascade involving three different serine protease zymogens that are sequentially processed. This Toll activation processes were also tightly regulated by specific serpins.

Lee Bok Luel (李 福律) 博士 略歷

**現職 : Professor、 National Research Laboratory of Defense Proteins,
College of Pharmacy, Pusan National University**

略歷 :

2008. 3.1-present Dean of College of Pharmacy, Pusan National University

2004. 7-present Chief, National Research Laboratory of Bio-Defense Proteins

1998. 4.1-present. Professor, College of Pharmacy, Pusan National University, Korea

**1994. 4.1-1998.3.31. Associate Professor, College of Pharmacy, Pusan National
University.**

**1988. 4. 1-1994.2.28. Assistant and Associate Professor in Kyung Sung University,
College of Pharmacy**

**1986.4.1-1988.3.31. Postdoctoral fellow, Johns Hopkins University, School of
Hygiene, Department of Biochemistry, USA**

**1982.3.1-1986.3.31. Ph. D. Osaka University, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Japan Supervisor: Prof. Morio Ikehara (Major: Biochemistry)**

1979.9.1-1981.8.31. Master, Pusan National University, College of Pharmacy

1973.3.1-1977.2.28. Bachelor, Pusan National University, College of Pharmacy

特別講演：SL

原索動物ホヤ類における自己と非自己の配偶子認識機構

澤田 均¹

¹名古屋大学・大学院理学研究科附属臨海実験所

Mechanisms of self- and nonself-gamete recognition in ascidians (Prochordata)

Hitoshi Sawada¹

¹Sugashima Marine Biological Laboratory, Graduate School of Science, Nagoya University

原索動物ホヤ類は雌雄同体で、精子と卵を同時に放出するが、カタユレイボヤやマボヤ等では、精子の卵黄膜接着段階で自己非自己認識が行なわれ、自家受精が起こらない。しかし、その分子機構は長年謎であった。当研究室では、マボヤとカタユレイボヤを用いて、ホヤ類の配偶子間相互作用における自己非自己認識機構（アロ認識機構：自家不和合性）について研究を行なっている。

マボヤでは、12回のEGF様リピート構造を有する卵黄膜タンパク質HrVC70が、自家不稔性を獲得する卵成熟過程で卵黄膜に接着し、自家不稔性を失う弱酸処理により卵黄膜から離脱すること、さらに個体間で多型に富み、非自己精子に対する結合能が高いことから、HrVC70がマボヤの受精におけるアロ認識候補分子であると考えている¹。

一方、カタユレイボヤでは、ポジショナルクローニングと卵黄膜プロテオーム解析により、2ペアのアロ認識候補分子を同定することに成功した²。卵側のリガンド分子は、卵黄膜に存在して多型に富むフィブリノーゲン様タンパク質でv-Themis-Aおよびv-Themis-Bと命名した。また、精子側のレセプター分子は、精巣で発現し多型に富む超可変領域を持つPKD1様チャンネルで、s-Themis-Aとs-Themis-Bと命名した。s/v-Themis-Aは第2染色体長腕の遺伝子座Aにs/v-Themis-Bは第7染色体長腕の遺伝子座Bに局在し、いずれもs-Themis遺伝子の第1イントロンの相補鎖にv-Themis遺伝子がコードされている²。この両遺伝子座におけるシンテニーは見られないが、この遺伝子ペアのみがこの領域

に共通して見られる。遺伝学的解析から、精子側のs-Themisが両者ともv-Themisを自己と認識すると受精が阻止され仕組みになっていることが示された。その機構は、被子植物における自家不和合性の機構（その遺伝子が多型に富み、近接している点、アラナ等では自己を識別する仕組みである点）と酷似しており、動植物共通のアロ認識機構といえる^{2,3}。分子系統樹解析から、A、B両Themis遺伝子の進化速度は異なるが、v-Themisとs-Themisのアレル間には共進化の傾向があることが示された。最近、遺伝子座Bにもう一つ新しいアロ認識分子s/v-Themis-Cが存在することが判明し、その機能について現在解析を進めている。また、s-Themis-BのC末端側にはカチオンチャンネルドメインが存在することから、自己非自己シグナルがCa²⁺を介する可能性を検討したところ、精子が自己の卵黄膜に結合した時のみ頭部と尾部で細胞内Ca²⁺濃度の上昇が引き起こされ、激しく運動した後に静止するか、卵黄膜から離脱することを見出した。細胞内Ca²⁺濃度の上昇が自己シグナルとして利用される例はケシ科等の被子植物でもよく知られており、シグナル伝達においても動植物共通の機構が存在する可能性が考えられる。

【参考文献】

1. Sawada, H., Tanaka, E., Ban, S., Yamasaki, C., Fujino, J., Ooura, K., Abe, Y., Matsumoto, K., and Yokosawa, H. (2004). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 15615-15620.
2. Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., Shoguchi, E., and Sawada, H. (2008). Science 320, 548-550.
3. Harada, Y., and Sawada, H. (2008). Int. J. Dev. Biol. 52, 637-645.

シンポジウム I

深海生物の共生

S1 ~ S3

化学合成共生システムの多様性と進化

藤原義弘

海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域 化学合成生態系進化研究チーム

Diversity and evolution of symbioses between eukaryotes and chemoautotrophic bacteria

Yoshihiro Fujiwara

Chemo-Ecosystem Evolution Research (ChEER) Team, Institute of Biogeosciences
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC)

深海底の還元環境，すなわち，熱水噴出域や湧水域，海底に沈んだ動植物遺骸周辺からは，真核生物と化学合成細菌との共生現象が数多く報告されている^[1]．本シンポジウムでは化学合成共生システムの多様性を様々な角度から紹介し，現在見られる化学合成共生システムがどのようなプロセスを経て誕生したのかについて，最近の知見を紹介するとともに免疫系との関連についても議論したい．

【化学合成共生システムの多様性】

化学合成細菌を宿す宿主として報告されているものは大型無脊椎動物が多い^[1]．中でも軟体動物（シロウリガイ類，シンカイヒバリガイ類など）や環形動物（ハオリムシ類など）が各地の還元環境で卓越しており，共生細菌を共生器官の細胞内に宿すものが多い．また，熱水噴出域を中心に，化学合成細菌との共生現象を営む十脚類が出現する．この場合，共生細菌は体表に分布しており，宿主はそれらを直接摂食することで栄養を得る．それ以外に，海綿動物，扁形動物，線形動物といった無脊椎動物からも化学合成細菌との共生現象を営むものが知られる^[1]．化学合成共生を営む原生生物に関する報告はわずかであるが，浅海域に沈んだ木材や鯨骨から化学合成細菌を外部共生者とする繊毛虫類が知られる^[1, 2]．

共生細菌には，化学合成の基質として無機物を利用するものと有機物を利用するものが存在し，前者は硫黄細菌が，後者はメタン酸化細菌がその代表である^[1]．また一部の分類群では従属栄養細菌を共生

者とするものも報告されている^[3, 4]．

【化学合成共生システムの進化】

化学合成共生システムがどのようなプロセスを経て進化したのかを明確に示す事例は少ないが，イガイ科二枚貝についてはいくつかの研究例がある．現在熱水噴出域や湧水域に生息するシンカイヒバリガイ類の起源は，沿岸域に生息し，共生細菌を持たないイガイ類であること，沿岸域のイガイ類はまず海底に沈んだ動植物の遺骸周辺に形成されるゆるやかな還元環境に進出した後に，熱水噴出域等に進出したこと，共生システムの起源は細胞外共生であり，やがて細胞内共生システムを発達させたことが明らかになりつつある^[4, 5]．

【参考文献】

1. Dubilier, N., Bergin, C., Lott, C., *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 725–740 (2008).
2. Kawato, M., Uematsu, K., Kaya, T., Fujiwara, Y., *Cah. Biol. Mar.* **51**: 413–421 (2010).
3. Rouse, G. W., Goffredi, S. K., Vrijenhoek, R. C., *Science* **305**: 668–671 (2004).
4. Fujiwara, Y., Kawato, M., Noda, C., Kinoshita, G., Yamanaka, T., Fujita, Y., Uematsu, K., Miyazaki, J.-I., *PLoS One* **5**: e11808 (2010).
5. Distel, D. L., Baco, A. R., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., Smith, C. R., *Nature* **403**: 725–726 (2000).

化学合成共生二枚貝の共生菌ゲノムの進化

吉田 尊雄¹、高木 善弘¹、島村 繁¹、丸山 正¹

¹海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域

Evolution of symbiotic bacterial genome in chemosynthetic bivalves.

Takao Yoshida¹, Yoshihiro Takaki¹, Shigeru Shimamura¹, Tadashi Maruyama¹

¹Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-earth Science and Technology

真核生物の誕生と進化を理解する上で、ミトコンドリアや葉緑体の祖先が共生によって獲得され、オルガネラ化したメカニズムを明らかにすることは重要である。特に、共生者がオルガネラとして宿主細胞に統合される過程で共生者のゲノムが縮小し宿主核のコントロール下に置かれる過程は最も重要な過程の1つである。その過程については、主に昆虫の細胞内共生菌のゲノム解析や比較ゲノム解析から共生者のゲノム縮小進化とその過程を明らかにすることが試みられている。よく議論されているアブラムシの細胞内共生菌**ブフネラ**は、ゲノムサイズが約 0.4-0.6M と祖先と考えられている大腸菌の約 10 分の 1 と小さく、細胞内共生によりゲノムが縮小している。また複数種のゲノム解析の結果、ゲノムの変異速度はこれまでに知られている細菌よりも 10 倍速いと推定されている。アブラムシ宿主の核 DNA から、**ブフネラ**の遺伝子は検出されなかったが、それとは異なる細菌由来の遺伝子が検出されており、異種の共生菌ゲノムに存在した遺伝子が宿主の核に転移している可能性が示唆されている。また、キジラミの細胞内共生菌**カルソネラ**は、ゲノムサイズが 0.16M と**ブフネラ**よりも更に小さく、葉緑体ゲノムと同等のサイズである。これらの昆虫の細胞内共生菌は、ゲノムの縮小段階としては、縮小がかなり進んでいる段階を示していると考えられる。既知の昆虫の細胞内共生菌のゲノム解析からでは、共生者のゲノム縮小の初期段階に、どのようなことが起こっているのか、今のところ詳細な過程の理解に至っていない。

我々は、深海の化学合成生態系に生息する二枚貝のシロウリガイ類の細胞内共生菌のゲノム縮小進化について研究を行っている。シロウリガイ類は、様々な種類が日本近海の深海に生息し、化学合成細菌が鰓細胞内に共生している。シロウリガイ類の口や消化管は機能的ではないことから、自らのほとんど全ての栄養を卵を介して伝達される共生菌に依存している。我々とアメリカのグループから 2 種類のシロウリガイ類の共生菌のゲノム解析が行われた。2 種のシロウリガイ類共生菌のゲノムサイズは、1.0M と 1.2M であり、近縁の自由生活型と比べると小さいが、**ブフネラ**と比べるとゲノムサイズが大きいことがわかった。シロウリガイ類の細胞内共生菌ゲノムは、自由生活型と比較すると、環境応答や DNA 修復といった多くの機能遺伝子を失っており、細胞内共生という生活様式を獲得することで、ゲノムが縮小していると考えられた。さらに、我々は 2 種の共生菌比較ゲノム解析から、シロウリガイ類共生菌はゲノム縮小進化の初期にあたる生物で、多くの昆虫の共生菌よりゲノム縮小進化途中にあり、ゲノム上に縮小進化の痕跡が残されている可能性を示した。シロウリガイ類の共生菌は、進化スピードが異なる 2 つのクレードに分かれている。現在、進化スピードの遅いクレードに属するナギナタシロウリガイ細胞内共生菌のゲノム解析を行っている。本発表では、シロウリガイ類の細胞内共生菌の比較ゲノム解析から、ゲノム縮小進化メカニズムについて考察してみたい。

サツマハオリムシおよびヒゲムシ（環形動物）の巨大ヘモグロビンの生理機能と構造

○中川 太郎^{1,5,6}, 沼本 修孝^{2,4,5}, 山本 正浩³, 三木 邦夫⁴, 福森 義宏⁵, 今井 清博⁶

¹長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部, ²京都大学・原子炉実験所, ³海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域, ⁴京都大学大学院・理学研究科, ⁵金沢大学大学院・自然科学研究科, ⁶法政大学・生命科学部

Physiological function and three dimensional structure of the giant hemoglobins of *Lamellibrachia satsuma* and *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida)

○Taro Nakagawa^{1,5,6}, Nobutaka Numoto^{2,4,5}, Masahiro Yamamoto³, Kunio Miki⁴, Yoshihiro Fukumori⁵, Kiyohiro Imai⁶

¹Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, ²Research Reactor Institute, Kyoto University, ³Institute of Biogeosciences, JAMSTEC, ⁴Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, ⁵Department of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, ⁶Faculty of Bio Science and Applied Chemistry, Hosei University

サツマハオリムシ (*Lamellibrachia satsuma*) は、1990年初頭に鹿児島県錦江湾北東部の水深約100mの「たぎり」と呼ばれる火山性ガスの噴出する海底で発見された、世界で最も浅い海底に棲息するハオリムシである。虫体はキチン質の棲管内に定在し、大きいものでは棲管長が約100cm、体長が約40cm、幅約8mmにも達し、上部から鰓蓋部、ハオリ部、栄養体部の3つのパーツからなる。また、動物でありながらも口や肛門、消化器官を持たず、代わりに栄養体組織に硫黄酸化細菌を共生させている。(図1)

一方、マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) は、石川県能登半島九十九湾の水深25mの硫化水素に富む海底泥中に埋在して棲息するヒゲムシであり、ハオリムシと同様、虫体はキチン質の棲管内に定在するが、大きいものでも棲管長は約60cm、体長は約20cm、幅約1mmと非常に小さく細長い。また、前体部、中体部、後体部の3つのパーツからなり、ハオリムシと同様、動物でありながらも口や肛門、消化器官を持たず、代わりに栄養体組織に硫黄酸化細菌を共生させている。(図1)

また、これら有鬚動物（環形動物）の血液中に

は、酸素と硫化水素を同時に運搬することができる特殊な細胞外巨大ヘモグロビン(Hb)が多量に存在しており、これを用いて、後体部の栄養体組織の共生細菌に硫化水素を安全に運搬して、有機物を合成させ、これを吸収するという独自のエネルギー合成・獲得システムを有していると考えられている。

一般的に環形動物の血液中には、エリトクロルオリンやクロクロルオリンと呼ばれる分子量360万タイプのHbが存在しているが、有鬚動物の場合、分子量40万タイプのHbも見られ、ハオリムシ類では両タイプが、ヒゲムシ類では40万タイプのみが血中に存在している。

しかし、このような環形動物の巨大Hbの機能は、一般的にその種の生息環境に応じて大きく異なっているため、これら有鬚動物の巨大Hbの詳細な生化学的機能解析や硫化水素に富む生息環境の化学分析等を行うことで、初めてその適応生理機能を生物学的に論じることができると言える。また、これら巨大Hbの精密なX線結晶構造解析を行うことで、その構造-機能相関性を明らかにすることができる言える。

本シンポジウムでは、鹿児島湾と日光海山で採集したサツマハオリムシの2種類の巨大Hbの詳細な機能特性の結果と生息環境のデータを合わせて、また、現在進行中の結晶構造解析の結果を踏まえて、サツマハオリムシの巨大Hbより推察される適応生理機能について考察・報告したい。また同様に、近縁種のマシコヒゲムシの巨大Hbの機能および構造解析の結果とも比較して、有鬚動物の巨大Hbの一般性についても考察したい。

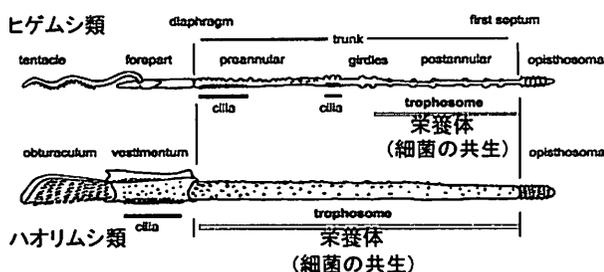


図1. ハオリムシ類とヒゲムシ類の虫体の形態的比較

シンポジウム II

海洋無脊椎動物の比較免疫学

S4 ~ S6

クルマエビ類の自然免疫関連因子ノックダウンによる 生体防御機構に関する研究

廣野育生

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

Characterization of kuruma shrimp immune system by RNAi

Ikuo Hirono

Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology

【目的】

クルマエビ類養殖は世界各地で行われ重要な産業となっている。しかし、クルマエビ類養殖が盛んになるとともに、病原微生物による感染症が発生し、その経済的な被害が問題となっている。感染症を撲滅するためには宿主となる生物の免疫・生体防御機構を知る必要があるが、クルマエビ類については、まだ詳細には明らかになっていない。さらに、宿主であるクルマエビの免疫・生体防御機構と病原微生物との相互作用についても不明であることから、RNA 干渉による遺伝子機能のノックダウンを行いし、特に、抗菌タンパク質の生体内での役割について検討した。さらに、クルマエビゲノム中にある巨大繰り返し配列中に存在するクルマエビ病原ウイルスであるホワイトスポット病ウイルス(WSSV)遺伝子の類似遺伝子の遺伝子発現についても解析した。

【材料と方法】

クルマエビの抗菌タンパク質 (c 型リゾチウム, i 型リゾチウム, クラスチンおよびペナエジン様タンパク質)、血液凝集関連因子およびプロフェノールオキシダーゼに対する 2 本鎖 RNA を作製し、クルマエビ尾部に接種し、目的遺伝子のノックダウンを行った。接種後、クルマエビの斃死について観察するとともに、感染実験を *Vibrio penaeicida* および WSSV を用いて行った。クルマエビゲノム中に存在する WSSV 類似遺伝子については、WSSV 感染により発現が

誘導されるかどうかを調べた。

【結果】

2 本鎖 RNA を接種したいずれの遺伝子 mRNA も RT-PCR レベルでは検出限界以下となり、ノックダウンが成功していることを確認した。i 型リゾチウム以外の抗菌タンパク質およびプロフェノールオキシダーゼをノックダウンするとクルマエビは病原微生物の人為感染なしに斃死した。これらの遺伝子をノックダウンすると血中の細菌数が増加する傾向に会った。さらに、c 型リゾチウムをノックダウンした際の細菌排除能が失われていることが示唆された。血液凝集関連因子をノックダウンすると病原微生物に対する感受性が高くなることがわかった。

遺伝子ノックダウンの際のコントロールとして用いた GFP を標的とした 2 本鎖 RNA を接種すると病原細菌ならびに WSSV に対して耐性が高まる結果が得られ、非特異的な免疫が活性化されていることが示唆された。

クルマエビゲノム中に存在する WSSV 類似遺伝子の発現は WSSV 感染により上昇することから WSSV 感染と何らかの関係があることが示唆された。

【結論】

クルマエビ類の生体防御機構の一部は生存に必要な因子であり、体内細菌の排除に重要な役割をしていると考えられた。

生体防御関連因子からみる二枚貝の防御システム

伊藤直樹

東北大学大学院農学研究科水圏動物生理学分野

Bivalve defense systems - perspectives from immune-related factors

Naoki Itoh

Laboratory of Aquacultural Biology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

【概要】

軟体動物二枚貝綱は周囲に多くの微生物が存在する水中に生息している。従って、生息水を介した微生物の侵入を受けやすいと考えられるが、感染症による大量死の例は比較的少ない。

二枚貝類の生体防御は、白血球様細胞による食食と各種液性因子による抗菌作用で構成される自然免疫に依存しており、そのため、原始的で非効率的であると考えられがちである。ところが、上述の様に感染症による死亡例が少ないことから、その生体防御能は適度に効率的であり、また生態に適応していることが推測される。

近年、無脊椎動物の生体防御研究より、自然免疫の各因子は完全に独立しているのではなく、ある程度の連携をもった防御システムを構築していることが分かってきた。

本講演では、最近の二枚貝防御因子の研究より想定される 1) 二枚貝類の効率的な防御システムの一例と、2) 生息環境に適応したと考えられる二枚貝類の防御システムについて紹介する。

【リゾチーム類】

細菌細胞壁を加水分解する酵素リゾチームは多くの二枚貝類に存在することが知られており、細菌感染防御に重要な役割を果たしている。これまでに、マガキ *Crassostrea gigas* は3種類のリゾチームを持つことが知られており、それぞれの機能について解析したところ、各リゾチームは最適活性条件が違っていた。これらは局在・発現部位についても異なっており、それぞれの分布組織で効率よく生体を防御するよう進化したと推測される。

ホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* やアカガイ *Anadara broughtoni* といった海底で生活する種は、軟体部が高いリゾチーム活性を有する粘液で覆われている。体表面に局在するリゾチームが、海底中に多く分布する微生物に対する防御に寄与していることが考えられる。

【パターン認識受容体】

節足動物を中心とした生体防御研究から、無脊椎動物では微生物をパターン認識受容体によって認識し、生体防御反応を誘起する反応が発達していることが知られている。

最近の研究より、マガキにおいても細菌および真

菌類細胞壁のβグルカンを認識するβグルカン認識タンパク質(βGBP)が存在することが明らかになった。そのうちの一種、CgβGBP-1は、甲殻類と同様に、βグルカンと結合した後にフェノールオキシダーゼ系(P0経路)を活性化することで殺菌を行うと考えられている。しかし、もう一種類のCgβGBP-2はP0経路活性化を引き起こすことはない。このCgβGBP-2の役割は不明であるが、もし他の防御反応を誘起するのであれば、一つの微生物に対して複数の反応で対応するという、より確実な生態防御システムを担っているのかもしれない。

細菌細胞壁主成分ペプチドグリカン(βGBP)を認識するペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)は、ショウジョウバエで良く研究されている。マガキにおいてもその存在が知られ、5つのタイプが確認されている。リゾチームと同様に、それぞれの発現組織は異なっており、各局在組織に適応して作用することが推測される。

二枚貝のPGRPの機能については不明な点が多いが、外套膜で発現するCgPGRP-S1Sはグラム陰性菌を認識するが抗菌作用は示さないため、何らかの防御反応を活性化することが想定されている。その一方、血球発現性のCgPGRP-Lはリゾチーム様ドメインを保有しており、認識と防御反応活性化だけではなく、直接的な抗菌機能を保持すると考えられる。このように、二枚貝類PGRPは、防御システムに様々な面から関与していると思われる。

その他、短鎖の二本鎖RNA(dsRNA)を接種したマガキでは血球数が増加することが観察されている。dsRNAはRNAウイルス認識における病原体関連分子パターン(PAMPs)として知られており、このことからマガキを始めとする二枚貝類のウイルス認識機構の存在が示唆される。

【血球】

二枚貝では白血球様血球による異物食食は防御の主要な部分を担っている。その中で、オプソニン活性をもつレクチン類は、液性因子と細胞性防御を関連づけており、効率的な防御システムにおいて重要であるだろう。一方、レクチン以外の液性因子による血球機能との関連研究はほとんどなく、今後はPGRPを始めとした認識因子の血球機能への関連性について研究が待たれる。

ヴァージニアカキの免疫系を巧妙に利用する寄生虫の戦略

田角 聡志¹、ヘラルド R. ヴァスタ²

¹ 東京大学・農学部附属水産実験所、² メリーランド州立大学医学部・微生物学免疫学研究科

A galectin from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*.

¹Satoshi Tasumi, ²Gerardo R. Vasta

¹Fisheries laboratory, The University of Tokyo, ²Department of Microbiology
and Immunology, University of Maryland School of Medicine

【目的】

ヴァージニアカキはメキシコ湾岸から北米東海岸を経てカナダにまで分布する在来種のカキである。その資源量は1950年代から激減しはじめた。その大きな原因がパーキンサス原虫 (*Perkinsus marinus*) によって引き起こされる”Dermo”病である。感染後の病態等に関する研究はこれまで盛んに行われてきたが、寄生虫の取り込み機構に関しては不明な点が多かった。2004年に植物レクチンのいくつかが *P. marinus* 細胞表面に結合するという報告があった^[1]。特異糖をみてもみるとガレクチンのそれと同一であった。同じころ、*P. marinus* を用いた攻撃試験によりカキ血球中で発現量が上昇する遺伝子が複数報告され^[2]、ガレクチンもその中に含まれていた。古来、カキの血球が消化管内と体内とを自由に往来し、餌となる藻類の取り込みや消化に関与していることが知られていた^[3, 4]。これら3つの知見から、我々はカキの血球に発現しているガレクチンが寄生虫の取り込みに関与しているのではないかと考えて研究を行った。

【材料と方法】

血球から得た cDNA からガレクチン cDNA 全長を単離し CvGal と命名した。CvGal に対するポリクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロット法および蛍光免疫染色法により分泌様式と血球における局在を調べた。次に組み換え CvGal (rCvGal) を用いて、カキ血球あるいは様々な微生物に対する結合特性を調べた。最後に、CvGal に対する抗体がカキ血球の *P. marinus* 食食能を阻害するかどうかについて検討した。

【結果】

CvGal は1分子内に4つの糖結合部位をもち、クロスリンカー様の働きをすることが考えられた。

CvGal は血球で合成され、浮遊血球では細胞内に局在している。一方、接着などの刺激を受けると細胞外へ分泌され、速やかに血球表面に結合することが認められた。興味深いことに、rCvGal は血球という自己ばかりでなく、餌の藻類を含む様々な微生物といった非自己に対しても結合した。そのうち、特に *P. marinus* に対して強く結合し、血球の *P. marinus* 食食活性は CvGal に対する特異抗体によって部分的ではあるが阻害された。これらのことから CvGal は *P. marinus* に対するレセプターであることが示された。

【結論】

CvGal は本来、生体防御や餌の取り込みに関与しているが、*P. marinus* は進化の過程において餌と共通のリガンドを獲得し、CvGal をうまく利用することで宿主に効率よく取り込まれるようになったのではないかと推察される。このように、本来防御に関わる分子が病原性生物によって逆利用され、宿主への取り込みに関与しているような例は他の生物でもしばしばみられる。そういった点から、本研究結果は比較較生物学的観点からも非常に興味深いものであるといえるであろう。

【参考文献】

1. Gauthier JD, Jenkins JA, La Peyre JF (2004) *J Parasitol*, 90:446–454
2. Tanguy A, Guo X, Ford SE (2004) *Gene*, 338:121–131
3. Galstoff PS (1964) *US Fish Wildl Serv Fish Bull*, 64
4. Morton BS (1971) *Biol J Linnean Soc Lond*, 3:329–342

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、本会の目的に必要と認められる事業

IV.会員

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

V.役員

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

VI.会議

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

VII.会計

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

VII. 会則改正

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

附則

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

(平成 21 年 8 月 4 日 一部修正)

THE JAPANESE ASSOCIATION FOR DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY (JADCI)

OFFICERS

September 2010-August 2012

PRESIDENT

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

VICE PRESIDENT

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

SECRETARY/TREASURER

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

SECRETARY/TREASURER (assistant)

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

PROGRAM OFFICERS

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

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

ABSTRACT OFFICER

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

TRUSTEES

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

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

WEB ADMINISTRATOR

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

CONSTITUTION

Article I. Name

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

Article II. Object

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

Article III. Business

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

Article IV. Membership

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

Article V. Officers

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

Article VI. Meeting

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

Article VII. Financial

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

Article VIII. Amendments

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

APPENDIX

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

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

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

協賛企業・団体

平成23年7月6日現在

【協賛】

日本電子株式会社

株式会社 ニッポンジーン

株式会社 日本バイオテスト研究所

株式会社 テクノスルガ・ラボ

日本海洋事業株式会社

株式会社 国際文献印刷社

株式会社 キーエンス

横浜・八景島シーパラダイス

株式会社 メイズ

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23年7月

日本比較免疫学会会長 吉田 彪
第23回学術集会会長 丸山 正

Intelligent and Interactive Microscope for All

電子顕微鏡 JEM-1400



- 分かりやすく、使いやすい新総合操作環境 (TEM Center) を搭載しました。
- 新設計の対物レンズで低倍から高倍まで専門家も納得する高コントラストで高品質な像が得られます。
- 新たに設けられたマルチユーザーログイン機能により常に各ユーザー独自の環境で快適操作できます。
- 新開発の操作案内機能 (TEM Navigation Jenie) により、高度な操作やルーチンではあまり実施しない操作も確実に実行できます。また、初心者の教育用として最適です。
- 高画質なデジタル CCD カメラを標準装備しました (デジタルカメラ構成)。
- フルデジタル化された走査像観察装置 (オプション) により、高機能の分析走査電子顕微鏡に拡張できます。
- 高性能ステージと TEM トモグラフ (オプション) の組み合わせにより、高性能な三次元再構成像が得られます。

EM UC7/FC7

ウルトラマイクローム



最新の電子制御システムと優れた機械精度とを統合させた、使いやすいマイクロームです。実体顕微鏡の高性能化、スポットLED照明の採用等の新たな機能が追加されました。

VELETA

TEM用CCDカメラ



TEM サイドマウントカメラ Veleta にはベルチェ冷却式の CCD チップが搭載されており、2k x 2k メガピクセルと14ビットのダイナミックレンジを実現します。

DiATOME

ダイヤモンドナイフ



マイクローム用ダイヤモンドナイフを各種用意しています。

JFD II (EM-19500)

凍結試料作製装置



凍結生物試料の細胞や組織の微細構造を冷却したまま高真空中でフリーズフラクチャやフリーズエッチング法などにより、「生体に近い状態」を保持したまま電子ビーム蒸着により超微粒子の金属レプリカ膜を作り、電子顕微鏡観察に適した試料を作ることができます。

EM-CPC

急速凍結装置



多様な凍結技法を1台の装置で可能にした凍結試料作製装置です。凍結後の凍結試料の各種処理操作も行えます。これらの機能はEM・CPCをモジュール構造にしたことで、モジュールの交換によって迅速かつ簡単に達成されます。

EM-PACT2

高圧凍結装置



従来の凍結固定法では、約20 μ mの深さまでしか無氷晶凍結ができませんでしたが、高圧凍結法を使用することで約200 μ mの深さまで良好な凍結を得ることができます。

JEOL

Serving Advanced Technology

日本電子株式会社

電子光学機器営業本部 〒190-0012 東京都立川市曙町2-8-3・新鈴春ビル ☎(042)528-3353 FAX(042)528-3386
札幌 (011) 726-9680・仙台 (022) 222-3324・横浜 (029) 856-3220・東京 (042) 528-3211・横浜 (045) 474-2181
名古屋 (052) 581-1406・大阪 (06) 6304-3941・広島 (082) 221-2500・福岡 (092) 411-2381

データソリューション事業部

ソリューションセールス本部 〒190-0012 東京都立川市曙町2-8-3・新鈴春ビル ☎(042)526-5098 FAX(042)526-5099

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

<http://www.datum.jeol.co.jp/>

日本バイオテスト研究所は、 診断薬用抗体作製の技術を活かし、 各種分野で広く応用される優れた 抗体の開発を行っています。

受託サービス

ポリクロナール抗体の作製

体外診断薬用抗体製造の豊富な経験と、過去の受託抗体作製実績を活かし、ウサギ・ニワトリ・マウス等の免疫動物に、天然型、および発現タンパク質・合成ペプチドハプテン等の抗原を免疫し、抗血清を作製致します。抗血清からのIgG分画精製、各種アフィニティー精製まで行うサービスです。

モノクローナル抗体の作製

マウス、ラットの免疫から細胞融合、クローニング、ハイブリドーマ細胞の確立まで行います。免疫、スクリーニングその他お客様との綿密な打ち合わせのもと、確かなクローンを選択いたします。

マウス腹水採取・培養上清作製

ハイブリドーマ株をお預かりし、腹水、培養上清を作製致します。腹水採取は、BALB/cマウス、ヌードマウス2匹から数百匹の大量受託生産までお受け致します。培養上清は、無血清培地への馴化よりお受け致します。

ペプチド合成

国内外の製造メーカーと提携して、抗体作製の為のペプチド合成を提供致します。お客様のご要望を含め、各種の検索パラメータよりペプチド配列を選択致します。

その他の受託

各種動物抗血清やマウス腹水、各種材料（血清・尿等）から塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等、御希望に応じた方法により抗体、抗原を精製致します。

動物由来製品

- ・動物血清、動物血液の製造販売
- ・各種動物の臓器販売
- ・動物用診断薬の製造販売

免疫化学製造

- ・診断薬用抗体の製造販売
- ・免疫血清学用試薬の販売
- ・精製抗原の製造販売

.....
 永年の経験を活かし、生産のサポートとして抗体原料の供給をいたします。



日本海洋事業株式会社
Nippon Marine Enterprises, Ltd.

〒238-0004 神奈川県横須賀市小川町14-1
Phone: 046-824-8572 Fax: 046-824-6577
URL <http://www.nmeweb.jp>

KEYENCE

HSオールインワン蛍光顕微鏡

新商品



暗室不要のオールインワン蛍光顕微鏡
高感度、高解像度のハイエンドモデル登場

バイオレボ

BIOREVO BZ-9000

モノクロ ↔ カラー 切換式カメラ

感度、解像度を大幅に向上したモノクロCCD。そして、カラーに切換できる2WAYの広い汎用性。



6穴電動レボルバ搭載

2~100倍の対物レンズを最大6種類搭載。ワンクリックで電動切換が可能。

ナビゲーションシステム

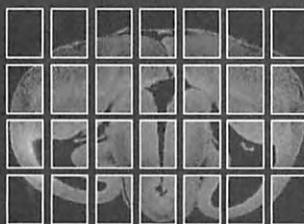
探さずに最適な撮影ポイントへクリックで導く、画期的な観察アプリケーション。

ダイナミックセルカウント

輝度の変化で個体を分離する抽出方法。増着の激しい細胞でも分離可能。

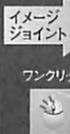
イメージジョイント

ワンクリックで広域画像の連結を高速・高品位に。



元画像

対物レンズ 10倍×28枚



イメージジョイント像

脳切片の多重染色 広域画像

カタログのご請求やお問合せは

株式会社キーエンス MECT事業部 ☎0120-739-007

本社・研究所 〒539-8555 大阪市東淀川区東中島1-3-14 FAX06-6379-1140

ホームページからの資料請求はこちら

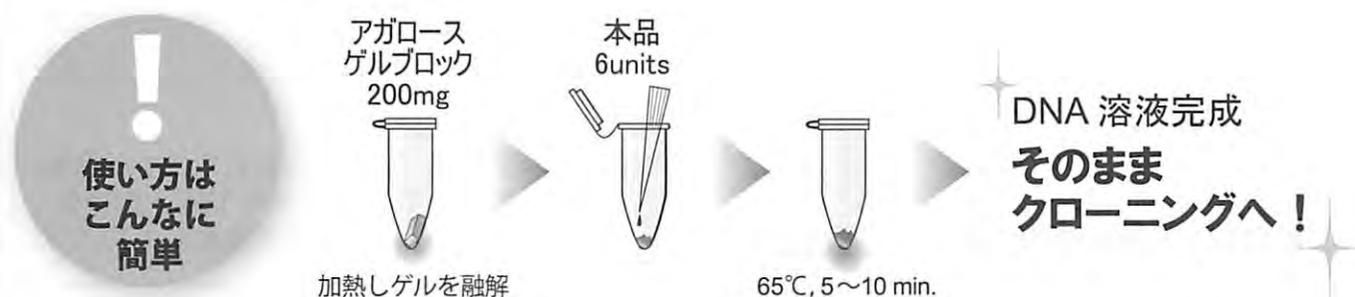
www.biorevo.jp



アガロースゲルからの核酸抽出には…

Thermostable β -Agarase

本品はアガロースゲルからの核酸抽出に用いる酵素です。
加熱融解したゲルに酵素を加えるだけの操作で、そのままクローニングに使えます。
 β -Agarase はアガロースを neoagar-oligosaccharides に分解する酵素で、分解後は再びゲル化することはありません。



特長



- 簡便 & 短時間な操作（最短 10 分間での反応が可能）
- 至適温度が 50~65°C の為、スタンダードタイプのアガロースにも使用可能
- ゲル分解溶液をそのままクローニングや制限酵素反応などに使用可能
- 大きな DNA 断片もせん断の影響が少なく回収可能

酵素添加量・コストの目安

200mg のアガロースゲルを完全分解するのに必要な酵素量（基本プロトコル: 6 μ l）（Buffer: TAE または TBE）

反応時間: 5 分間		
Agarose	酵素添加量 (1unit/ μ l)	1回分のコスト
1.0 % Agarose S	2.0 μ l	120 円
1.5 % Agarose S	3.0 μ l	180 円
2.0 % Agarose S	5.0 μ l	300 円
1.5 % Agarose XP	3.0 μ l	180 円

反応時間: 10 分間		
Agarose	酵素添加量 (1unit/ μ l)	1回分のコスト
1.5 % Agarose S	1.5 μ l	90 円
2.0 % Agarose S	3.0 μ l	180 円
3.0 % Agarose 21	5.5 μ l	330 円

(300 units 包装の場合)

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
317-07123	Thermostable β -Agarase	30 units	5,600 円
311-07121		300 units	18,000 円

有人潜水調査船「しんかい 6500」イラスト提供：©JAMSTEC

本酵素は独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センターにおける研究により、有人潜水調査船「しんかい 6500」を用いて深海から採取された耐熱性微生物に由来しています。詳しくは、シーエムシー出版『酵素開発・利用の最新技術』第5章 深海微生物からの有用酵素の探索 p41-52（著者：秦田勇二、大田ゆかり、日高祐子、能木裕一）をご参照下さい。

【製造元】
株式会社ニッポンジーン 〒930-0834
 富山市間屋町一丁目8番7号
 Tel: 076-451-6548
 Fax: 076-451-6547
 E-mail: info@nippongene.com
 URL: http://www.nippongene.com

【販売元】
和光純薬工業株式会社 本社 〒540-8605
 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 支店 〒103-0023
 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
 Tel: 0120-052-099 Fax: 0120-052-806
 E-mail: labchem-tec@wako-chem.co.jp
 URL: http://www.wako-chem.co.jp

腸内フローラ解析 (T-RFLP法) 受託サービス

例 食生活改善による腸内フローラ変化

被験者: 30代女性



各菌種別の変化

由来する細菌	改善前	改善後
<i>Bifidobacterium</i>	-	7.7%
<i>Lactobacillales</i>	1.5%	1.4%
<i>Bacteroides</i>	12.6%	36.0%
<i>Prevotella</i>	-	-
<i>Clostridium</i> cluster IV	7.9%	17.3%
<i>Clostridium</i> subcluster XIV a	57.5%	27.0%
<i>Clostridium</i> cluster XI	-	-
<i>Clostridium</i> cluster XV III	-	-
others	20.5%	10.6%
	100%	100%

テクノスルガ・ラボが実施するT-RFLP解析 (Nagashima法) の特徴

腸内フローラを解析し、腸内環境 (便秘、下痢、疾患など) や宿主の健康状態を、飲料や食品の飲食前後と関連付けることで、飲料や食品の効果を評価することが可能となります。

- ・科~属レベルでサンプル間の菌叢比較が可能。
- ・簡便で高感度。(プライマーと制限酵素条件の最適化済)
- ・培養不要。(DNAを対象)
- ・凍結で保存した糞便サンプルでも解析が可能。

詳細な菌種対応表をテクノスルガ・ラボWebで公開
<http://www.tecslab.jp>

採便キットの販売

腸内細菌叢 (DNA) を「常温で1ヶ月以上」安定維持したまま、保管ができるキットです。固形使用と水様便・動物使用の2種類を用意しています。

微生物同定用 DNAデータベース&系統解析システム

新版 2010年8月現在

アポロン

収録データ菌種数

細菌・放線菌：約7,600種 (16S rDNA)

カビ・酵母：約3,900種 (18S rDNA, 28S rDNA-D1/D2, ITS領域)

系統解析ソフトウェア“アポロン”は、微生物同定専用構築されたデータベース (独立行政法人国立遺伝学研究所 DDBJ研究センターとの共同開発) と組み合わせることにより、衛生管理などで必要とされる迅速な菌種の推定に威力を発揮します。どなたでも簡単・迅速に解析可能なシステムです。

データベースとの照合は、オフラインで行うため、迅速に相同性検索・解析が可能です。また、テクノスルガ・ラボの報告諸形式と同様、Accession No.、相同率、バイオセーフティーレベルが表示されます。

自動解析機能「Outgroupデータを自動選択」、「塩基配列アライメント自動編集」を選択することにより、専門の知識がない方でも、類縁菌種との簡易分子系統樹を作成可能です。

アポロン Ver 2.0

Ver 3.0 (2009年3月現在) 検索日 2010年1月11日

アポロン/DB-BA BLAST 検索結果 検出された上位 10 種

Sequence number	Accession No.	Score	E
1	Pseudomonas aeruginosa ATCC10145 T (AF010131) BSL2	2532	0.0
2	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2489	0.0
3	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2313	0.0
4	Pseudomonas aeruginosa ATCC10145 T (AF010131) BSL2	2312	0.0
5	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2287	0.0
6	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2286	0.0
7	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2285	0.0
8	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2284	0.0
9	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2283	0.0
10	Pseudomonas aeruginosa DSM16219 T (AF010131) BSL2	2282	0.0

Sample の塩基配列と上位 10 種との相同率

菌種名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC10145	1439/1439 (100.0%)	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM16219	1437/1438 (99.8%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMQ1224	1425/1470 (97.0%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC14225	1384/1403 (98.6%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC17989	1417/1439 (97.8%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC25411	1411/1437 (98.2%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 4359	1429/1436 (99.5%)	

アポロン Ver 2.0 (2009年3月現在) 検索日 2010年1月11日

自動解析機能「Outgroupデータを自動選択」、「塩基配列アライメント自動編集」を選択することにより、専門の知識がない方でも、類縁菌種との簡易分子系統樹を作成可能です。

- ・収録データは、すべてテクノスルガ・ラボ技術スタッフにより検証されたものです。“Unidentification...”や“××× sp.”などの菌種名が不明のデータは含んでいません。
- ・国際塩基配列データベースに存在しない、一部の菌種データはテクノスルガ・ラボで独自に解析されたものです。

日本比較免疫学会

第23回学術集会 講演要旨

原稿受付：2011年7月6日

発行日：2011年7月20日

発行者：日本比較免疫学会

編集者：学術集会プログラム委員会

委員：中村弘明、橋本香保子、丸山正、大石和恵

印刷所：(株)国際文献印刷社

東京都新宿区高田馬場3-8-8