

JADCI

News



No.52 2020.6.22

Contents

- 2 ご挨拶
日本比較免疫学会会長 中西 照幸
- 2 第32回学術集会延期のお知らせ
水産大学校 近藤 昌和・安本 信哉
- 3 特別寄稿 I
魚類免疫の研究を振り返って
元東京歯科大学生物学教室 中村 弘明
- 6 特別寄稿 II
忘れ残りの研究と比較免疫学会
北里大学 海洋生命科学部 丸山 正
- 11 私の実験動物 #8
ギンブナ 九州大学大学院 農学研究院 柚本 智軌
- 14 留学体験(後)記 -ドイツにおけるポスドク生活-
-第7回 研究の話(2)- 実験動物中央研究所 山口 卓哉
- 15 事務局からのお知らせとお願い

Collection #8

ギンブナ





ご挨拶

日本比較免疫学会会長
中西 照幸

新型コロナウイルス感染症の蔓延に伴う緊急事態宣言も全国的に解除されましたが、第2波が懸念され予断を許さない状況が続いています。大学関係者の方はオンライン授業や大学閉鎖により実施が遅れている実験・実習の準備でお忙しい日々をお過ごしのこととお察しいたします。

今回のウイルスの流行は社会的、経済的に甚大な被害をもたらしましたが、教育・研究分野においても全ての活動が3、4か月間ストップしてしまいました。未だに本格的な研究の開始が難しい研究室が多いようです。このため発表するデータが準備できないことによる発表者の減少、並びに講義や実験・実習の遅れを取り戻すために夏季休暇が短縮されることが予想されます。また、県をまたいだ移動については依然として制限があり、緊急事態宣言解除もしばらくの間出張が禁止されている機関もあると聞いております。このような事情から、8月下旬頃には終息には至らずとも下火になると思いますが、本年度の学術集会の開催を中止し来年度に延期させていただ

くことになりました。ご理解の程よろしく申し上げます。幸い本年度の学術集会長の近藤先生が来年度も引き続き開催を引き受けてくださることになっています。

懸念されることは、学術集会の中止により学生の発表の機会を奪うことになるという点です。大学院生にとっては学術振興会のDC1/DC2への応募あるいは奨学金返還免除者推薦において学会発表の実績が重要です。この点については、来春に開催される当学会と近い分野の学会で発表していただくことになると思いますが、これに伴う当学会の存在意義の低下や会員の減少が気がかりです。会員からの要望があれば、オンライン形式でのポスター発表についても検討する価値があると考えています。

本年度は各種学会賞の募集を行いませんが、古田優秀論文賞については来年度に今年度分を加えた2年度分として募集することに致しました。是非皆様の積極的な応募をお待ちしております。

懸案の生体防御学会との協力・連携の強化については、相互の学会への参加と発表の条件を含めた連携の強化に関する当学会での検討結果をまとめ、本年2月中旬に生体防御学会理事長の赤池先生に送付いたしました。生体防御学会の方で検討していただくことになっており、これを踏まえて両学会の間で継続して協議することになっています。また、比較内分泌学会との連携については、双方の学会より数名集まり東京近郊で懇親を深めながら先ずニーズを探ることから始めることになっていますが、“3密”を伴う懇親会の自粛が叫ばれている折、今回のウイルスの流行がある程度収まってから開催することになっています。

当学会は会員数の伸び悩みや関係学会との連携など幾つかの課題を抱えております。私の任期もあと3か月ほどになり未だ解決に至っておりませんが、次期会長の下で少しでも前進させていただければと願っております。いずれにしても、来年度は今年度参加できなかった方も含めて、より多くの方が下関に集まってくれることを期待しています。

第32回学術集会延期のお知らせ



水産大学校
生物生産学科

近藤昌和(集会長)・安本信哉(事務局長)

令和2年8月26日から開催を予定しておりました日本比較免疫学会第32回学術集会は、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の拡大防止のため、大変残念ではございますが延期することといたしました。事務局としましては、開催に向け準備を進めて参りましたが、シンポジストを含めた参加者の多くが県をまたぐ移動をしなければならないこと、多くの大学が休校・封鎖等の処置により研究活動が停止していることなどの状況を鑑み、開催は困難と判断いたしました。つきましては、来年度下関にて万全の状態で開催できるよう準備を進めていく所存でございます。

今後開催の日程が決定いたしました際には、あらためてご案内申し上げます(8月下旬を予定しております)。大変ご迷惑をお掛けいたしますが、何卒ご理解賜りますようお願い申し上げます。

特別寄稿 I



魚類免疫の研究を振り返って

元東京歯科大学 生物学研究室
中村 弘明

JADCI 会員の皆様。現在（2020年6月）、コロナ禍で国内外が深刻な状況となっていますが、いかがお過ごしでしょうか。私は、2017年3月末まで勤務していた東京歯科大学生物学研究室を退職して3年と2カ月、静かな毎日を過ごしております。そんな折、古川亮平先生からJADCI Newsへの執筆依頼のメールがありました。本学会役員の先生方から、「長年研究をされてきた先生の話には、若手研究者が発展できそうな研究の種がたくさんある」という意見があり、中西先生と末武先生が私を推薦してくださったとのこと。このような機会をいただきましたことに、まず初めに心から御礼を申し上げます。ご期待に応えられるかどうかわかりませんが、「依頼された仕事は断るな」という故古田恵美子名誉会長の言葉を思い出し、PCのキーボードに向かってる次第です。

私は、1980年3月に千葉大学大学院理学研究科修士課程を修了、同年4月に獨協医科大学第2解剖学教室の助手に採用され、「魚類免疫」の研究をスタートさせました。所属した第2解剖学教室は組織学の講義・実習担当の講座でしたので、実習標本の作製と同様に、研究でももっぱら光顕と電顕による組織学的手法を用いました。深夜まで電顕室に入り浸り、ウルトラミクロトームで超薄切片を作製したり電子顕微鏡を覗き込んだりしていた日々が懐かしく思い出されます。試料の調整だけでなく、ガラスナイフの作製から撮影した電顕フィルムの現像・焼き付けまで、すべて一人で行っていた時代です。電顕室では、JADCI発足当時から苦楽を共にしてきた山口恵一郎先生に大変お世話になりました。ちなみに山口先生は故古田名誉会長

の共同研究者で、お二人の共著論文には山口先生の手によるナメクジ血球の素晴らしい電顕写真が数多く掲載されています。

研究材料として用いたd-rR系メダカは、当時、東大の江上信雄研究室の内地研究員であった菊池慎一先生（元千葉大学海洋バイオシステム研究センター）から分与していただきました。飼育繁殖もすべて一人で行い、退職するまで大切に維持して研究に使ってきました。そのメダカたちの子孫は、40年経った今でも我家の睡蓮鉢で元気に泳いでいます。金魚、カラシン科やコイ科の熱帯魚、ドロメ、ヒラメ、アナゴなどの海産魚も材料に用いていますが、それには菊池慎一先生や渡辺翼先生（元北里大学水産学部）と共同研究をさせていただきましたことが大きな支えとなりました。いまだに感謝の念に堪えません。

心内膜内皮細胞の異物取込み

「魚類免疫」の研究にあたり、まず初めに行ったのは白血球の同定と分類で、第56回日本動物学会（1985）で「メダカの腹腔浸出白血球の組織化学的および電顕的観察」と題して発表しました。

メダカの細胞や器官への異物の取込みは、墨汁を腹腔内(intra-peritoneal: ip)注射し、経時的に光顕と電顕で観察しました。腹腔浸出白血球の採取は魚を開腹して行っていました。その際、心臓の黒変に気がつきました（図1）。早速、組織標本を作製し観察すると、黒変していたのは心内膜内皮細胞(EEC: Endocardial Endothelial Cell)と判りました。取込んだ墨粒で真っ黒に



図1：墨汁を腹腔内注射したメダカの内臓

心臓が顕著に黒変している。動脈球、肝臓に変色は認められない。

なっていたのです。EECによる墨粒の取込み現象は新規の発見か？と喜びましたが、文献検索により既にいくつかの報告が見つかりました。しかし、研究例が少なく不明な点も多くありましたので、材料を増やし投与条件を変えるなどして研究を進めたところ、魚種によるEEC取込み能の差異が明らかになりました。メダカやドロメ（ハゼ科海産魚）では、墨粒のほかにフェリチンの顕著な取込みが観察され、フェロシアン化カリ（鉄染色）によって綺麗なベルリン青が染めだされました（図2）。メダカのEECには、アルブミンやデキストランといった分子状成分の他、直径2μm程度のラテックス粒

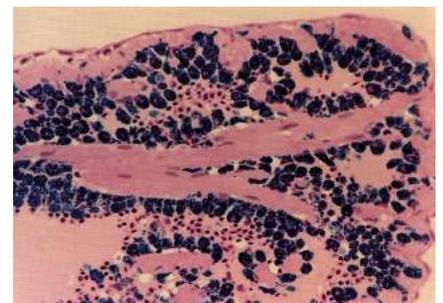


図2：フェリチンを腹腔内注射したドロメの心臓

心内膜内皮細胞に取込まれたフェリチンは青色に染色されている。（フェロシアン化カリウム+HE染色）

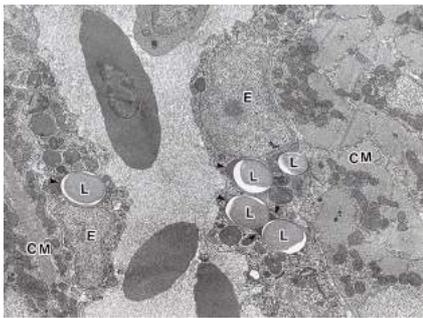


図3：ラテックス粒子(L)を腹腔内注射したメダカの心臓
心内膜内皮細胞(E)に取込みが観察される。CM：心筋

子(Latex Particle：LP)に対する取込み能も観察されました(図3)。

活発な取込み能を示すメダカのEECは、かつて清野-Aschoffが細網内皮系(RES：Reticulo-Endothelial System)として記載し、近年、ノルウェイ・トロムソ大学のSmedsrød教授が提唱したスカベンジャー内皮細胞(SEC：Scavenger Endothelial Cell)と同類の細胞であろうと思われます。欧州では、タラやオヒョウなどの大型魚種での研究が盛んですが、メダカはSEC研究の好材料になるのではないかと期待しているところです。

心常在性マクロファージ

光顕や電顕で観察を行っているとき、魚類のEEC表面には、しばしば奇妙な細胞が接着していることに気付かされます。血流によって偶然付着した単球とは明らかに異なり、複雑な細胞突起でEECに取付いていることも多く(図4)、メダカでは

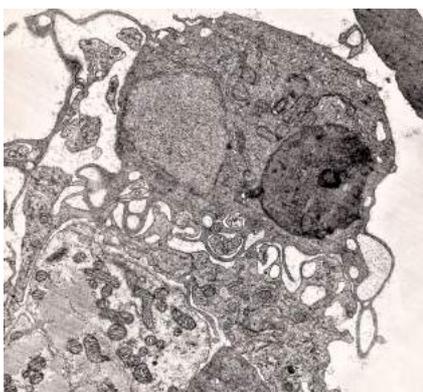


図4：メダカの心常在性マクロファージ複雑な細胞突起で心内膜内皮細胞に接着している。

EECの下に潜り込んで心筋との間でメラノマクロファージセンター(MMC：Melano-Macrophage Center)様の結節を形成していることもあります。この細胞は活発な異物取込み能を示しますので、魚類の心常在性マクロファージ(CRM:Cardiac Resident Macrophage)ではないかと考えました。魚類では肝クッパー細胞をもたない種が多いことから、このCRMがクッパー細胞の代役を担っている可能性があります。未だほとんど調べられていないと思われるので、今後、面白い機能が見つかる細胞ではないかと期待しています。何かを観察する際には、その周囲にも気を付けて目を向けていると、思わぬ発見があるかもしれません。

横中隔の腹膜孔

腹腔内(ip)注射した異物が心臓で捕捉されたことから、腹腔と血管を連絡する何らかの経路の存在が推測されました。哺乳類では横隔膜を裏打ちする腹膜に小孔(腹膜孔:peritoneal stomata)があり、腹腔液や浸出白血球の吸収路あるいは排出路となっていることが知られています。この小孔の存在を初めて記載したのはvon Recklinghausenで1863年のことです。現在では、多くの動物種において同様な小孔の存在が確認されていますが、当時、魚類での報告は見当たりませんでした。そこで、走査型電子顕微鏡を用いてメダカの腹膜を調べたところ、横中隔に哺乳類の腹膜孔に準ずる構造が見つかり、注射した異物はこの孔を通して血流に入っていくものと推測されました(図5)。未発表の観察ですが、メダカにLPをip注射して、直ちに採取した血液(塗抹標本)にもLPが点々と見つかることから、腹膜孔による排出はかなり迅速に行われていると推測されました。

メダカの腹膜孔については紀要論文として報告しましたが、もう少し丁寧な実験をして、良い論文にして発表できれば良かったと思っています。

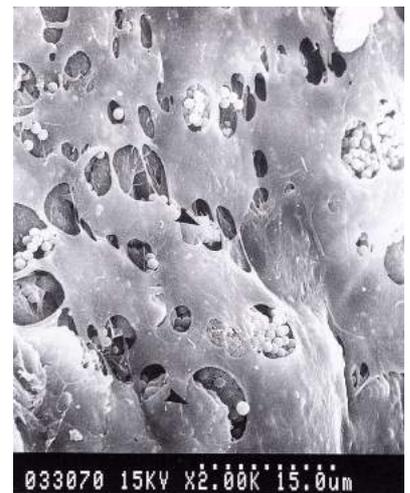


図5：メダカ横中隔の腹膜孔
腹膜上皮細胞間に多数の円形の孔(腹膜孔)が形成されている。腹腔内注射されたラテックス粒子は腹膜孔内に吸収されている。

皮膚からの異物排除

墨汁のip注射では、注射部位の体壁にも墨汁による着色(入れ墨に類似)が生じます。この着色は数日後には目立たなくなりますので、皮膚内の墨汁は除去されたものと考えられました。そこで、皮下(あるいは皮内)に墨汁などの異物を注射し、その行方を観察したところ、異物はマクロファージに取込まれ、皮膚表面から排除されてゆくことが判りました(図6)。

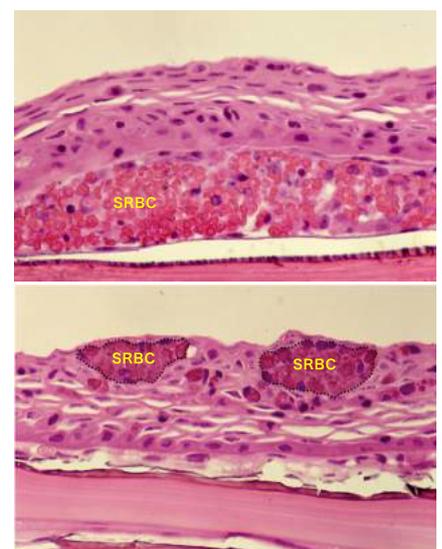


図6：ヒツジ赤血球(SRBC)を皮下注射されたメダカ
注射後1日(上)、SRBCは表皮下に集積している。注射後5日(下)、SRBCはマクロファージに取込まれ、大きな塊集(破線枠内)となって体表から排除される。



図7：ドロメの腹壁に存在する1対の謎の孔（注：吸盤状の腹鰭は切除）

腹腔内注射された蛍光ラテックス粒子（赤色）は孔から速やかに排出される。

キングヨの墨汁 ip 注射実験では、注射部位の着色とは別に、腹部の体表からマクロファージによって墨汁が排除されるという興味深い現象も観察されました（恒星社厚生閣・水産学シリーズ135, p111）。

ドロメ（海産のハゼ科魚類）では、腹鰭付近の腹壁に1対の“謎の孔”が見つかりました。ラテックス粒子(LP)をip注射すると、程なくその孔を通して体表に漏れ出てくることから（図7）、異物排出孔の可能性を推測しましたが、明確な答えが出せぬまま研究を終えてしまいました。心残りの事象です。

養殖魚での浸漬ワクチンのことなどを考え合わせますと、魚類の皮膚は、異物の取込みや排除などの機能において、興味深い体表免疫の問題を提供してくれるものと思います。

先輩方の言葉

執筆依頼のメールに“若手へのメッセージを”とありましたので、自身の研究とは離れた内容になりますが、JADCIを通して心に残っている言葉をいくつか紹介します。

「二つの分野に精通していると良い仕事ができる」（利根川進）

この言葉は黒澤良和先生（元藤田学園保健衛生大学）を通して知りました。研究分野が細分化し専門性が高くなっている昨今ですが、若い研究者の方々には、一つの分野に閉じこもるのではなく、他の分野にも目

を向けて、広い視野を持っていただきたいと思います。幸いJADCIには多彩な分野の研究者が揃っていますので、学術集会は恰好の交流の場になっています。そういえば黒澤先生は「いつの間にか大きな学会に出席しなくなっていた私は、10年以上にわたって比較免疫学会にだけは出席」していたと書かれています（記念誌「飛翔」p15）。

私の場合は研究ではなく教育においてのことですが、医学部で解剖学と組織学の研鑽を積んだことが、歯学部での生物学や発生学を担当するうえで大変助けとなりました。若い方々には、ご自分の専門分野を超えて、少し異なった分野に挑戦するのも良いことだと思います。

「Study nature, not books」（ルイ・アガシー：Jean Louis Rodolphe Agassiz アメリカの博物学者）

この言葉は渡邊浩先生（JADCI 名誉会員）から伺いました。本学会の懇親会でも話されていたことがありますし、記念誌「飛翔」p8にも書かれています。

私は、JADCI の会員の方には博物学志向というカナチュラリスト的な方が多いように感じていました。研究対象が一般的な実験動物でない場合も多く、また、さまざまな種の比較研究から進化を考えるとといった研究姿勢から、広く自然を見渡すような視点が生まれるのではないかと思います。スマホやPCなどのバーチャルな世界に接することの多い昨今ですが、出来る限り自然に親しむこと、そして研究に際しては、先入観を捨て、まずは自分の目でしっかりと自然を観察するという姿勢が肝要だと思います。

「仕事を頼むときは忙しい人に頼みなさい」

出典は不明ですが、獨協医大でJADCIの事務局を受け持っていた際に（原稿依頼の時だったかもしれま

せんが）、古田先生がおっしゃっていた言葉です。忙しくしている人はテキパキと仕事を片付けることに長けているので、依頼した仕事をきちんとこなしてくれるけれど、暇にしている人はダラダラと取り組み、仕上がりも期待できない、といったことでしょうか。行列のできるお店は、確かに期待値が高いですね。本原稿を書くにあたって、締め切りを1週間延ばしてもらった身としては、今更ながら耳の痛い言葉です。

「挨拶と御礼は先手必勝！」

和合治久先生（元埼玉医科大学保健医療学部）から伺いました。先生ご自身が実践されていることでしたので、仕事等でご一緒する際は、いつも楽しく気持ちの良い時間が過ごせました。この言葉の精神は、JADCIの和やかな雰囲気醸成にも、大いに寄与してきたのではないかと考えています。

これからはSocial Distanceを維持して、マスク越しでの声掛けが一般化するのかもしれませんが、気持ちだけはきちんと伝えられるようにしたいものです。

追記

コロナ禍の第2波が心配される中、教育・研究のままならない現役会員の皆様のご苦勞に思いを致しています。先日6月2日には、今年（2020年）の学術集会を中止するとの知らせが届きました。しばらくは先の見えない状況が続くと思われませんが、何とか良い形で終息に向かい、来年の学術集会が無事開催されることを祈っております。異例の状況下で学術集会開催に向けて尽力くださっている近藤昌和先生はじめ関係の皆様、心から感謝を申し上げます。そして、役員・会員の皆様が元気に活躍され、本学会の火を絶やさず燃やし続けてくださることを願っています。

最後までお読みいただき、ありがとうございました。

特別寄稿Ⅱ



忘れ残りの研究と比較免疫学会

北里大学 海洋生命科学部 客員教授
丸山 正

私が比較免疫学会に初めて参加したのは、1996年に海洋バイオテクノロジー研究所(MBI)に勤めていた時に、研究室の中山光二さんが微細藻類と共生するシャコガイの血球細胞の研究で発表したのが初めてであった。彼はその前から参加していたと思う。MBIは通産省(現在の経済産業省)のプロジェクトとして民間の24社が出資して1990年に出資会社の(株)新日鉄が岩手県の釜石市に、(株)東燃が静岡県の清水市(現在の静岡市清水区)の2ヶ所に建物を建てた研究所で、今は組織も建物も無くなってしまった。2003年に私が国立研究法人海洋研究開発機構(JAMSTEC)に移ってからは深海の化学合成共生二枚貝の研究を始めた。また、この学会では私のパートナーである大石和恵も海洋哺乳類の感染症の研究も発表させていただいた。ここでは、必ずしも研究室の中心的研究ではないが、私がMBIで行った忘れがたい幾つかの研究を紹介し、本学会の大会を開催したことについても書いてみたい。

MBIは東大海洋研究所(現在の東大大気海洋研究所)の古い白鵬丸を研究船として譲り受け、蒼玄丸(図1:1996年に廃船)と命名してオーストラリア、小笠原、パラオなどへ



図1:(株)海洋バイオテクノロジー研究所研究船「蒼玄丸」

の調査航海を行った。この船を使ってピコプランクトンの研究や超好熱菌などの研究を行ったが、パラオでシャコガイの養殖が行われていたことから二枚貝と渦鞭毛藻の共生の研究を始めた。

共生二枚貝の血球とその進化

シャコガイ類の血球を研究したのは出光興産(株)から出向していた中山光二さん(現在、日本化学物質安全情報センター)であった。材料には沖縄で養殖されていた主に小型のヒメジャコ、その他にヒレジャコや、ザルガイ科の共生二枚貝も用いて実験した。その結果、これらの光合成共生二枚貝は3種類の形態学的に識別される血球を有しており、それぞれ顆粒の無い無顆粒球、好酸性顆粒球と、ちょっとユニークで大きな顆粒を有するため桑実様血球と名付けた血球の3種類が見いだされた(図2)。プラスチック粒子の取り込みで調べたところ好酸性顆粒球のみが貪食能を有していた。この桑実様球は

微細藻類と共生するシャコガイ類(ハマグリ目)や共生ザルガイ類(ハマグリ目)に特有で、非共生のザルガイでは大きな顆粒を一つだけ有するコンパートメント球と名付けた細胞になっていた(Nakayama *et al.* 1997)。桑実様球の有する顆粒のタンパク質配列なども調べたが類似の配列は見つからず、その機能は未だに分かっていない。この研究の中で血球による活性酸素発生も調べたが、カキなどに比して低く、それと共生の関係は分からないままになっている。

この研究からほぼ20年後に、JAMSTECで、北里大学の大学院生であった多米晃裕さん(現在(株)マリンワークス所属でJAMSTECの電頭室勤務)が深海の化学合成共生二枚貝であるシロウリガイ類(イガイ目)とシマイシロウリガイ(ハマグリ目)の血球を研究した。シロウリガイでは血球は形態学的に無顆粒球、好酸性球、好塩基

	赤血球	二枚貝の基本的な血球			桑実様球
		無顆粒球	好酸性顆粒球	好塩基性顆粒球	
シロウリガイ類	無し				無し
シャコガイ類	無し			無し	
シロウリガイ類	無し	無し			無し
貪食能	貪食能無し	貪食能無し	貪食能強い	貪食能弱い	貪食能無し
機能	酸素運搬	機能未知	貪食-生体防御	貪食-生体防御	機能未知

図2:共生二枚貝の血球

シロウリガイ類、シャコガイ類そしてシロウリガイ類の血球を Tame *et al.* 2015, 2018 および Nakayama *et al.* 1997 に基づいて整理した図。矢印は推定される血球の進化的な関係を示す。

性球の3種類あり、大腸菌に対する貪食能は無顆粒球には無く、好酸性顆粒球は最も強く、好塩基性顆粒球には有るが弱いという結果であった(図2)。貪食後の消化過程にも差があり、好酸性球では好塩基性球よりも速やかにリゾソームとの融合が生じた(Tame *et al.* 2015)。これに対し、シロウリガイでは無顆粒球は見られず、代わりに大量の赤血球があり、顆粒球としては好酸性顆粒球と好塩基性顆粒球が認められ、シロウリガイと同様に、好酸性顆粒球の方が好塩基性顆粒球よりも大腸菌に対する高い貪食能を有し、やはりリゾソームとの融合も前者の方が早かった(Tame *et al.* 2018)。

この研究で困ったのは、二枚貝の血球の名前が論文ごとに異なり、混乱していたことであった。そこで、今までの名称も整理して分かりやすくした。その結果、二枚貝の血球の基本形は無顆粒球、好酸性顆粒球および好塩基性顆粒球の3種類と考えられた。それに基づいて、共生二枚貝の血球を考えると図2のようになり、シャコガイで見られた桑実様球は好塩基性顆粒球から由来したと推定できる。また、シロウリガイでは無顆粒球が変化してヘモグロビンを有する赤血球に進化したと考えられる。多分、共生硫黄酸化細菌に硫化水素を供給するために体を半分還元的な底泥に埋めるといった生活スタイルに適応する過程で無顆粒球が赤血球に進化したのであろう。これら血球の一つの重要な機能は免疫学的に侵入してきた外来の微生物の排除だと思われるが、共生(シャコガイは細胞外共生で消化管が変形した共生器官内に共生し、深海のシロウリガイ類やシロウリガイ類は鰓上皮細胞に細胞内共生している)との関係は明らかでは無く、今後の課題である。

血球の機能を考えようとすると、形態的に見える3種類の血球の分類では物足りない。そこで、蛍光レクチンで染色するとシロウリガイ類ではWGA(小麦胚芽凝集素)は両顆粒球には結合するが、無顆粒球は認識しないことが明らかとなった。しかし、それ以上の細かい分別

は難しかった。そこで、大石とシロウリガイの血球に対するモノクローナル抗体を作ろうと考えた。結局定年で時間切れになったが、それでも顆粒球のみを認識する抗体、無顆粒球を認識する抗体などは取れた。抗体産生細胞の保存の問題もあったので、それらの抗体についてはJAMSTEC-R という JAMSTEC が出していた雑誌に出版した(Sekine *et al.* 2016)。この雑誌は、JAMSTEC のデータベースや、サンプルとのリンクがあるので、もし誰かが将来、この細胞を使いたいと思えば、そのリンクから細胞を利用することが出来る。残念ながら、この雑誌は廃刊になってしまったが、今でも(将来も)J-Stage からダウンロードが可能である。

シャコガイの血球細胞に寄生する原生動物

シャコガイの血球細胞を追いかけた時、ヒメジャコの血液中に寄生原生動物がいるようであった。顕微鏡でみると好酸性顆粒球に感染したアピコンプレクサ様の寄生原生動物であった。分子系統解析でみると、マラリアなどの属するアピコンプレクサ類の系統の根元付近に位置しているようであった(Nakayama *et al.* 1998)。そのころ、二枚貝の寄生原生動物で問題になっていた *Perkinsus* は、アピコンプレクサ類からは少し離れており、むしろ渦鞭毛藻であるシャコガイの共生藻により近縁であったので、これとは異なるものであった。アピコンプレクサ類が痕跡的葉緑体を有することが知られ、また、渦鞭毛藻-繊毛虫-アピコンプレクサ類が大きな分類群を作ることが知られて来たことから、共生渦鞭毛藻のようなものからアピコンプレクサのような寄生原生動物が進化したのでは、と想像力が刺激された。そのころ、我々は共生藻の研究を行っており、野外のシャコガイなどから共生藻を単離して培養していたが、野外のシャコガイの中に上の寄生原生動物とは異なるがアピコンプレクサ様の配列が検出されることがあった。アメリカのグループがサンゴにアピコンプレクサに近い配列があると報告してい

たので、もしかしたら、アピコンプレクサの起源に近づけるのではないかと思われた。当時オーストラリアから来ていたブレット・ベイリーさん(現在オーストラリア海洋研究所AIMS)がオーストラリアに帰国する寸前に、単離した共生藻の中にもその遺伝子配列が検出されたと言い出した。本当なら大変だということで彼が残っていた培養を調べてみたが、残念ながらそのような配列は検出されなかった。JAMSTEC では共生藻はほとんど扱わなかったが、当時鹿児島大の大学院生であったジェームス・ライマーさん(現在琉球大)が研究していた光合成共生スナギンチャクにもその配列が出てくるというので、スナギンチャクのパラフィン切片中に共生藻以外のものが居るかどうかが顕微鏡で見たが結局、分からなかった。そうこうしているうちに、海外のグループがアピコンプレクサに非常に近縁の微細藻類 *Chromera velia* をサンゴから単離培養して報告し大ニュースとなった。このような進化の中間を結びつける生物はこれからも見つかるかもしれない。

カロチノイドによる一重項酸素の消去と好中球の殺菌作用

シャコガイの血球細胞の活性酸素を調べたときには、活性酸素の中身までは考えていなかった。活性酸素の中の一重項酸素は強力な酸化剤で寿命が短く消去物質での消去が考えられている。そのような物質としてカロチノイドがあり、それによる一重項酸素の消去に取り組んだのは(株)荏原研究所から出向の立沢秀高さんで、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)などによる一重項酸素の発生系や蛍光発生による検出系を研究されていた(株)大塚製薬の研究所の中野稔先生に協力していただいた。MBIの出資会社の(株)キリンで三沢典彦さんがカロチノイド合成遺伝子を植物から得ていたことから、大腸菌でカロチノイドを生産させてそれによる活性酸素の一重項酸素の消去作用を見ようとした。その結果、野生型の大腸菌は好中球の細胞を模倣した条件下(pH4.5)で Myeloperoxidase-H₂O₂-Br の系で



図3：1995年にMBI清水研究所で古田先生の講演の後、カラオケをする立沢さんと古田先生
二人とも故人となられた。

生じさせた一重項酸素で殺菌されたが、リコペンやゼアザンチンなどのカロチノイドを生産する形質転換大腸菌は殺菌が抑制されることが明らかとなった(Tatsuzawa *et al.* 1998, 2000)。この時、やはり好中球で殺菌にかかわると言われていた次亜塩素酸や次亜臭素酸による殺菌は抑制されなかった。それならば、ヒトの好中球が一重項酸素で殺菌をしていることを示せるはずである。そこで、立沢さんが兵庫医科大学の堀和敏先生に来ていただいて自身の血球を用いて実験した。この時にはリコペンを発現する大腸菌を彼自身の好中球に貪食させてその生存を見たのだが、大腸菌の生存率は野生型よりリコペン発現型の方が有意に(1.5倍)高くなり、好中球では一重項酸素が殺菌に確かに働いているらしいとなった(Tatsuzawa *et al.* 1999)。立沢さんと中野先生はこの仕事をとても気に入って、とても仲良くなった。立沢さんは古田恵美子先生にも気に入られて、仲良くカラオケをしているのが図3である。しかし、立沢さんはその数年後に若くして小学生の息子さんを残して脳腫瘍で亡くなり、その数か月後には中野先生も癌で亡くなられた。お二人がこの研究を大変楽しんでいたので私の慰めである。

育毛と免疫抑制剤

私の出向元である(株)東燃では、高橋信弘さん(後に、東京農工大)がタンパク質折り畳み酵素のPPlase (peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase)が免疫抑制剤のサイクロスポリン A(CsA)結合タンパクであることを発見していた。その後、日本で発見された免疫抑制剤であるFK506の結合タンパク

(FKBP)もPPlaseだが全く別のタンパク質であることも明らかとなった。免疫抑制物質の探索として、PPlaseの阻害物質もカイメンで探したが、特異的な阻害は見つからなかったので、物質探索から超好熱古細菌のタンパク質折り畳みを行うシャペロニンやPPlaseの研究にシフトした。しかし、これらの免疫抑制剤には面白い活性があり、ある時、(株)資生堂から出向していた岩淵徳郎さん(現東京工科大学)がヌードマウスにCsAを投与すると毛が生えるという論文を持ってきた。CsAは臓器移植で使われていたが、その副作用として多毛症も知られていた。そこで、免疫抑制剤の育毛活性を見ることになった。MBIではマウスの実験は出来ないので資生堂での実験を検討したが、いろいろな事情で難しいとなった。そこで、資生堂の研究所長であった安達健二先生が客員教授をされていた昭和大学医学部で実験した。用いた免疫抑制物質はPPlaseのシロフィリンに結合するCsAと、FKBPに結合するFK506、アスコマイシン(Asc)そしてラパマイシン(Rap)であった。まずマウスの毛を刈り免疫抑制剤をエタノールに溶かして塗布するという実験であった(図4)。その結果、CsAとFK506はマウスで育毛を促進するが、AscとRapは促進しないことが判明した(Iwabuchi *et al.* 1995)。さらに、それらを組み合わせると、CsAとFK506の組み合わせでは特に影響が無いが、AscはFK506による育毛を抑制し、RapはFK506による育毛だけでなく、CsAによる育毛も抑制した。そのメカニズムはまだよく分かっておらず、岩淵さんは今もこの問



図4：マウスでの育毛実験
背中を毛を刈り、左右にサンプルと塗布して育毛の効果を見た。左個体はコントロールで溶剤のエタノールのみを背中の左右に塗布してある、右の個体ではCsAとFK506の混合物を左右に塗布してあるが、右側は1/100濃度で左側は育毛が認められる。



図5：チドリミドリガイ(左)と川口四郎先生と丸山(右)
チドリミドリガイは背面が洋服の前の合わせのようになっており、その内側に消化管がありその内の盗葉緑体で緑色になっている。右は盗葉緑体を発見した川口四郎先生。先生はこの翌年に亡くなられた。

題を追及している。この問題が免疫抑制が絡んで生じているのか、別のシグナル系が関与しているのかに興味を持たれる。

オルガネラを盗む - 盗葉緑体

日本ではしばしば日本人の重要な仕事を日本人が知らないということが生じる。そのような例として弥益輝文先生と川口四郎先生(岡山大学)が1965年に発見した、葉緑体共生(今では盗葉緑体と呼ばれる)がある。軟体動物のチドリミドリガイ(図5)など嚢舌目ウミウシは餌藻類の細胞質を食べてその葉緑体だけを消化管の細胞に取り込み、その葉緑体をあたかも自分の細胞器官(オルガネラ)のように維持し光合成させるという現象である。葉緑体は進化的に藍藻(シアノバクテリア)に由来することが知られており、その多くの遺伝子は藻類の核に移動しているためと思われるが、動物細胞内では葉緑体は分裂増殖しない。それでもチドリミドリガイでは最長10ヶ月の間葉緑体が維持されると言われている。この論文は岡山大の紀要で報告されたためか日本ではほとんど研究する人も居なかったが、アメリカではよく読まれて盛んに研究されていた。川口先生(図5)はこの紀要を世界的な雑誌にするために論文をこの雑誌に出して、別刷りを世界の研究者に送っていたらしい。アメリカのWoods Holeの海洋研究所と海洋生物学研究所の共同図書館にはこの雑誌は初刊から全て揃っている。1984年に、この現象はウミウシだけでなく原生動物にもあることが報告され、生態学的

な意義も認められるようになった。それでも日本ではほとんど研究されていなかったのが、MBI で何とかこの現象を研究したいと考えたが、なかなか始められずいた。ある研究会議で、北里大の小池一彦さん（現在は広島大学）が下痢性貝毒の原因になる有毒渦鞭毛藻の *Dinophysis* は培養が出来ず、その葉緑体は蛍光が変わっているという話をした。それを聞いて、これは盗葉緑体に違いないと確信し、すぐ共同研究が始まった。MBI の瀧下清貴さん（現在福岡女子大学）が分子系統で見たら、この藻類の葉緑体は渦鞭毛藻に見られるものではなく、クリプト藻の *Geminigera* に近いものと判明した (Takishita *et al.* 2002)。つまり、*Dinophysis* は自分自身の葉緑体を持っておらず、餌のクリプト藻の葉緑体を盗んで使っているために、その餌の供給が無いと葉緑体が徐々に失われて培養出来ないということになる。その後、葉緑体源になる藻類はその遺伝子配列から *Teleaulax sp.* と判明し、それを餌にすれば、*Dinophysis* の培養も可能になるはずであった。ところが、小池さんがこの藻類を与えて培養しても *Dinophysis* は培養出来ず、首をひねる結果となった。この問題は数年後に、韓国のグループによって思わぬ方向から解決された。韓国のグループは海洋の繊毛虫を研究していて、*Teleaulax sp.* を食べる繊毛虫 *Myrionecta rubra* を与えることで *Dinophysis* が培養可能になると報告した。つまりクリプト藻の葉緑体を繊毛虫が中継し、*Dinophysis* がこの繊毛虫を食べて葉緑体を得ていたことになる。自然は我々の想像を超えた複雑さ、素晴らしさ、面白さ有していることを大いに感じた。

藻類や植物は、進化の過程で藍藻（シアノバクテリア）との共生により葉緑体を獲得したと考えられている。盗葉緑体はこの進化過程とは独立の現象と考えられるが、渦鞭毛藻では葉緑体が進化的に置き換わって、本来褐色の渦鞭毛藻が緑色の葉緑体を有している例などもある。そのような置き換わりのプロセスに盗葉緑体のような現象がかかわっている可能性はまだ残っている。免疫学の基本的な考え方である自己と非自己の認識は、盗葉緑体の場合にはどうなのか、また進化的に葉緑体が置き換わる時にはどうなるのか、大変興味深い。ちなみに、盗ミトコンドリアは知られておらず、盗葉緑体の場合にも、葉緑体のみが宿主の細胞に取り込まれる。

チドリミドリガイの盗葉緑体については、JAMSTEC に移ってから前田太郎さん（その後基礎生物学研究所を経て龍谷大学）が東京海洋大学との連携大学院生として来てくれて、取り組んだ。そして、チドリミドリガイの盗葉緑体となる餌藻類はそれまで1種類と考えられていたが、複数種あり、季節的にも変動することが明らかになった。前田君はその後もチドリミドリガイの盗葉緑体の研究を続けている。

東日本大震災-大津波による MBI の被害そしてカルチャーコレクションのレスキュー

2011年10月11日の東日本大震災の時には私は JAMSTEC に居た。横須賀でも震度4であったが、私の部屋では物が落ちることもなかった。しかし直後に、大津波で釜石市の地上10メートルはあったと思う高架の道路の上まで津波が到達した

映像をテレビで見て、MBI の建物はどうなったか、と心が折れる思いであった。2012年に釜石に行き解体工事の始まっていた研究所の様子を見た。図6のように、1階は津波が天井の高さを越えて悲惨な状態であったが、2階は津波が届いておらず、窓ガラスも残っており、実験室内は昔のままであった。本館から離れたプレハブの実験室には NMR があり、その液体窒素タンクは津波でガスが噴出し研究所屋上に飛んでいたと聞いた。

当時は既に研究プログラムは終了し、北里大学の寄付講座として10名以下の人たちが働いていたそうである。その中の一人はチリ地震津波（1960年にチリの大津波が東北地方にまで到達した）を経験しており、それを思い出して、直ぐに自動車ですべての人が逃げた無事であった。

MBI は、微細藻類とバクテリアのカルチャーコレクションを有していた。微細藻のものは独立行政法人製品評価技術基盤機構 NITE のカルチャーコレクション NBRC に移管されていたが、バクテリアのものは MBI の2階の保存室の液体窒素タンク内に保存されていた。

私などは、津波のニュースに驚くばかりで、このコレクションのことでまで考えが及ばなかったが、釜石の MBI の所長をしていて、津波の時には中央大学教授であった原山重明さんはこの状況でもカルチャーコレクションのことを考え、2階の液体窒素タンクの中の微生物の状態は維持されているという情報を得ていたらしい。彼を中心に、MBI の OB や北里大学の方々が協力して、レスキュー部隊が編成された。そして、交通も難しかった東北に入り、液体窒素が残っている間に、バクテリアを回収し、東京に持ち帰ることで、カルチャーコレクションは救われた。危機に際しこのような行動がとれる人達は尊敬に値する。危機の際には、必要な情報を早く得て、全体の状況をしっかり捉えた上で、目標を立てて必要な行動を可能な手段の中から



図6：東日本大震災の津波で被害を受けた MBI 釜石研究所

左：外観上建物の基本的な構造は残っており、あの地震にも津波にも耐えたことが分かるが、1階は全ての窓ガラスが失われている。2階の窓ガラスは残っていた。中央：1回の実験室内。既に片付けられているが天井の構造物もかなり変形していることが分かる。右：2階の実験室。片付けが済んでいるために綺麗になっている。津波の水は2階まで来なかったために、ほとんど影響を受けていないことが分かる。

選んで実行する能力が求められるの
だろう。

学会で行ったオークション、人との つながり

2011年8月には比較免疫学会大会をJAMSTECで行う予定になっていた。東日本大震災後、冷房など電力供給も問題になったが結局行うことになった。この時に、以前からやりたいと思っていた学会でオークションを行った。私が学会でのオークションを見たのは大石と何度か参加したWildlife Disease Association (WDA)の大会であった。WDAでは懇親会の他にオークションのパーティがあった。持ち寄るのは、自分の著書、T-シャツ、若いころ読んだ本、絵画、写真、お土産、など何でも良い。変わったものでは若者のグループがこれから歌を歌うので買って下さいというのもあった。どの学会でも懇親会では既に知っている者同士が集まるので、初めての参加者は話の輪に入りにくいことがあるのだが、このオークションでは出品物を買った人と売った人との間で新しい話の輪が広がるのである。この点がとても面白いと思っていた。この学会では、オークションは大変な盛り上がりを見せて賑やかなパーティになり、集まったお金は、若手の旅費の補助として利用するとのことであった。

比較免疫学会は人との距離が短く人間関係を作りやすい話しやすい学

会であるが、この時がチャンスと思って学会でのオークションを企画した(図7)。オークションは懇親会の前に大会会場で行ったが、オークションの前に廊下で出品物を見てもらい(図7左)、希望者は名前を書いてもらった。皆リラックスして参加してくれた。図7右で大石が持っている大きな本は大会には参加されなかったが丹羽充先生が出品された昭和19年(第二次大戦中)に出版のラド著のルイ・パスツール伝で私の手元にある。丹羽先生のメモがあり、先生が専門分野を変えたり、独創的研究を深く考えたりするときに、この本の影響が大きかったと書かれている。私は、この本の翻訳をしたのが機械工学の桶谷繁雄先生であることや戦争中に出版されたことにも興味があった。この本は読んだが、素晴らしく、丹羽先生が書かれていたようにパスツールの独創性に大きな刺激を受けた。このオークションでは古田先生が出されていた木製の眼鏡立ても、私の家でテレビやラジオのコントローラー立てとして使っていて、テレビを見るたびに古田先生に見られているような気がしている。

このオークションがその後、皆さんにどのように記憶されているのか分からないが、私の場合には丹羽先生や古田先生のような先輩から私、そしてもし機会があれば、次の世代へと何かが伝わる、という場になったと思っている。このオークション

で集まったお金は東日本大震災の義援金にさせていただいた。

この大震災から9年、今年は新型コロナウイルス感染症のパンデミックが世界を震撼させるという生物学的大災害が生じている。この大災害では今までの科学では考えられないほどの早いスピードで研究も進んでおり、その進展によりこの大災害が早く終息することを願っている。同時に、この大災害の影響がとても大きいので、社会がデジタル化などで大きく変化するだろうと予想している。しかし、自然災害の多い日本に住み、東日本大震災の爪痕を見た者として、1923年に起きた関東大震災からは100年近くが過ぎ、いつ起きても驚かない状況があることも心に留めておく必要があるだろう。新型コロナウイルス問題で外出しにくい今は、今後起こる大きな社会変革を考えたり、今後来るかもしれない災害に対する心構えをする良い機会かもしれない。

文献リスト

- Iwabuchi, T., et al. (1995) Effects of immunosuppressive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) inhibitors, cyclosporin A, FK506, ascomycin and rapamycin, on hair growth initiation in mouse: immunosuppression is not required for new hair growth. *J. Dermatol. Sci.* 9, 64-69.
- Nakayama, K., et al. (1997) Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J. Inv. Pathol.* 69, 105-111.
- Nakayama, K., et al. (1998) Parasitism by a protozoan in the hemolymph of the giant clam, *Tridacna crocea*. *J. Inv. Pathol.* 71, 193-198.
- Sekine, D., et al. (2016) Monoclonal antibodies to hemocytes of the deep-sea symbiotic mussel, *Bathymodiolus japonicus*. *JAM-STECC Rep. Res. Dev.*, 23, 27-33.
- Tame, A., et al. (2015) Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. Septemdierum*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 146-156.
- Tame, A., et al. (2018) Morphological and functional characterization of hemocytes from two deep-sea vesicomyid clams *Phreagena okutanii* and *Abyssogena phaseoliformis*. *Fish Shellfish Immunol.* 74, 281-294.
- Takishita, K., et al. (2002) Molecular evidence for plastid robbery (kleptoplasty) in *Dinophysis*, a dinoflagellate causing diarrhetic shellfish poisoning. *Protist* 153, 293-302.
- Tatsuzawa, H., et al. (1998) Inactivation of bacterial respiratory chain enzymes by singlet oxygen. *FEBS Lett.* 439, 329-333.
- Tatsuzawa, H., et al. (1999) Singlet oxygen ($^1\Delta_gO_2$) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262, 647-650.
- Tatsuzawa, H., et al. (2000) Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli* -- attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. *FEBS Lett.* 484, 280-284.



図7：オークションの様子

左：オークション開始前に廊下に展示した出品された品々。オークションの前に皆さんが見て出品者と話なども出来る。右：オークションの会場での様子。大石が手にしている大きな本は丹羽先生が出品されたラド著桶谷繁雄訳のルイ・パスツール伝。講義室ではあるが皆さんがリラックスした様子であることが分かる。

私の実験動物 #8

ギンブナ *Carassius auratus langsfordi*

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門

生物機能分子化学講座 水族生化学分野

杉本 智軌

私とギンブナ

私がギンブナと出会ったのは、東京水産大学（現東京海洋大）の学部4年生のときです。私は「水産動物の生体防御」という本の中西照幸先生が書いた「移植免疫からみた防御機構」を読み、魚類のT細胞に興味をもちました。そして、当時、博士課程の先輩が3系統のギンブナから鱗由来細胞株を樹立し細胞傷害T細胞の研究に従事しており、その先輩に弟子入りすることにしました。修士課程に進学しギンブナを使ったT細胞の研究していた1996年、Zinkernagel and Dohertyが「The specificity of the cell mediated immune defence: 細胞性免疫防御の特異性に関する研究」という題目でノーベル医学生理学賞を受賞しました。彼らは、MHCの遺伝子型が異なるいくつかの近交系マウスとそれら由来の標的細胞を用いることによって細胞傷害T細胞のウイルス抗原認識機構を解明し、それが評価されての受賞です。私は、ギンブナを使えば、同じような実験系が組める、魚でも同様のシステムが備わっているのかを確かめたいという思いから博士課程に進学しました。博士課程では、Zinkernagel and Dohertyの実験系と比べると不完全ですが、なんとか魚類のウイルス抗原認識機構を明らかにすることができ、最低限の目標は達成しました。

その後、三重県の水産総合研究センター養殖研で学振の博士研究員としてギンブナを用いた細胞性免疫の研究を継続することができました。中西先生は養殖研から日本大学にすでに移られていたので、中西先生のプロトコルに従い、私自身、初めてギンブナの採卵、繁殖を試みました。その後、九大でもギンブナを繁

殖させ、途切れることなく、東水大、養殖研と九大の3機関で、かれこれ25年ギンブナを飼育し続けています。

実験動物としてのギンブナ

ギンブナはコイ目コイ科フナ属に分類される日本の河川湖沼に生息する身近な魚です。そのギンブナの多くは3倍体のメスであり、自然界で雌性発生、クローン繁殖を行う不思議な魚です。第一減数分裂時に極体が放出されず、親と同じ遺伝子である3倍体の卵がつけられます。そのままでは発生は進まず、他魚種の精子の刺激を受けることで卵割が始まります。ただし、これら異種の精子は受精後、雌性核と融合せず、雄性核はやがて排除されます。このように3倍体ギンブナではメス由来のゲノムのみが子孫に伝えられるため、得られた子孫はすべて雌親と同じ遺伝子をもつクローンとなります。通常、生物は交配することで遺伝的多様性を獲得することで地球の環境変化に適応し種を残し続けていきます。しかし、それぞれのギンブナ系統は、誕生してからずっと同じ遺伝子そのまま継代され、絶滅しないで現代まで生き残っていることになりました。ということは、様々な環境の変化に対応できる最強の遺伝子を持っているのかもしれませんが。

現在、免疫の実験に用いられているギンブナ系統は奥尻島産のOB1系統と諏訪湖産のS3N系統の2系統です。不思議なことにS3N系統は、成長すると体色がオレンジや白に変化し、同じロット内で通常の濃灰色、オレンジ色、白色の個体が同じくらの割合で出現します（図1）。これらが本当にクローンなのかと疑い



図1：諏訪湖産S3N系統のギンブナ
成長すると体色がオレンジ色と白色に変わる個体がいる。これらをDNA鑑定すると確かにクローンであった。

DNA鑑定したところ、確かに同じ遺伝子でした。S3N系統は母系の起源がキンギョだと推測されており、キンギョの血が強く出ると考えていますが、その変色するメカニズムは分かっていません。また、S3Nは、キンギョなど近縁種の雄の精子と核融合することでキンギョとギンブナの4倍体のハイブリットS4Nを生産することができます（OB1系統ではハイブリットはできない）。

これまでに、ギンブナは、細胞性免疫、造血幹細胞、血球の寿命などの様々な研究に有用であることが示されています。ギンブナを免疫学的研究に用いる利点は次のとおりです。

① クローン魚が容易に作出できる。クローン間で拒絶が起こらないことから、細胞の移植実験が可能である。また、S4Nは3組のクローンギンブナ由来の染色体セットと1組のキンギョ由来染色体セットを持ち、S3Nの細胞を4Nに移植した場合、組織適合抗原が一致するため移植が

可能である。ドナー (S3N) とレシピエント (S4N) 由来の細胞内の DNA 量が異なるため、核内 DNA を蛍光染色することで両細胞を識別することができる。

② 飼育しやすく、約1年で細胞を採取できる大きさに育つ、ハンドリングや病気に強い。亜種のキンギョより明らかに強い。

③ クローン由来の細胞株が樹立されており、細胞性免疫の実験に利用できる。エフェクター細胞と MHC の遺伝型が一致したウイルス感染細胞を準備することができる (図 2)。

さらに、近年、キンギョ (ワキン、*Carassius auratus auratus*) の全ゲノムが解析されたことにより、他の免疫研究有用魚種と同じように *in silico* での遺伝子同定も可能になりました (多くの遺伝子においてギンブナとキンギョで98%以上の相同性)。CD8 や CD4 などの T 細胞マーカーを認識する特異性の高いモノクローナル抗体も作製されています。

ここまでは中西先生の総説で述べられていることも多いのですが、ここからは、(おそらく世の中での出版物では触れられていない?) ギンブナの欠点についても少し述べます。ひとつの細胞内の DNA 量が大きく血球が大きいため、一定の血液/組織あたりの細胞数が少なく、思ったより白血球の数が採れない。きっちりと比較したことはないですが、コイと比較して明らかに少なくがっかりするときもあります。また、3 倍体なので、染色体が 150 本もあり、ひとつの分子に沢山のアイソフォームがある。私が S3N 系統のギンブナから CD8 α 遺伝子をクローニングしたとき、6 種類の異なる配列がみつかりました。ですので、今流行りのゲノム編集によって、ある分子をノックアウトしようと思うと、アイソフォームのどれを潰すのがよいのか、すべて潰さなくてはいけないのか、と考えると他の魚種で試したほうがよいという考えに至り、ギンブナでゲノム編集しようと思ったことはありません。

ただ、これらの欠点を考慮しても、細胞・個体レベルの免疫研究

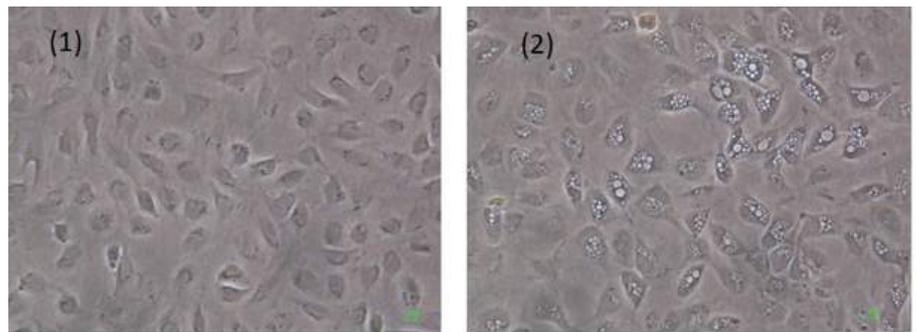


図2：S3N 系統ギンブナ鱒由来細胞株 (CFS 細胞)
(1)非感染 CFS 細胞、(2)コイヘルペスウイルス (KHV) 感染 CFS 細胞

モデルとして、世界でギンブナの右に出る魚種は無いと言い切ることができます。

ギンブナの繁殖・育成法

最後にギンブナの繁殖、育成法についてご紹介します。九州大学の他にも日本国内にギンブナの繁殖を行っている研究室はあり、それぞれで方法は異なるかと思えます。参考になるところがあれば是非真似してください。

採卵・受精法は、私が養殖研で行っていた方法に加え水産大学の近藤昌和先生がコイで行っている方法を参考にしています。お腹のはったギンブナを選び家畜動物用ゴナトロピン (絨毛性性腺刺激ホルモン) を注射します。以前、高純度の SIGMA のホルモンを使用したときに採卵できなかったことがあり、家

畜などに使用される他の物質が少々混ざった純度の低いものほうがよいのかもしれませんが。翌日、タモですくただけで、卵が出るようだと準備 OK です。お腹を軽く抑えただけで卵が出るので、スプーンで紙皿に集めます。精子は 3 倍体を作製するときはドジョウの精子を用います。ドジョウ以外の魚の精子でも刺激になるのですが、ニジマスなど遺伝的に遠い種の精子ですと刺激にならず、他のフナ属の魚やキンギョなど近すぎると万が一 DNA の断片が入ったとき機能してしまう恐れも考えられるため、同じコイ目で異なる科のドジョウを使用しています。念のため淡水魚用リングル液に浮遊させた精子を UV 照射します。コンテナに水を張り受精卵を付着させるためのネットを敷き、スプーンで少しずつ卵を水に落とし、手を魚の尾鰭のように動かして卵を水中で攪拌しネットに均等に撒きます。はじめはドジョウの精子でフナができるのか半

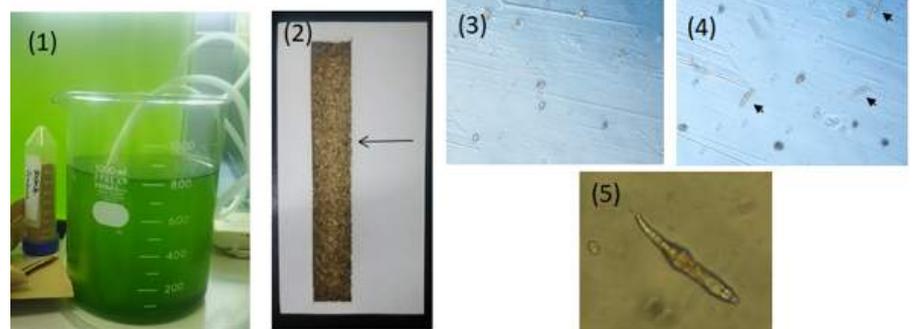


図3：ギンブナ仔魚の育成飼料
(1)淡水クロレラ
(2)インスタントワムシ。こげ茶色の部分に休眠卵が付着している (矢印)
(3) インスタントワムシを水に入れると休眠卵が水中に出る
(4) 休眠卵から発芽し始めたワムシ

信半疑だったのですが、本当にできます！水温によって異なりますが、5～7日で孵化し泳ぎ出します。

育成で一番重要なのが、卵黄が消失したばかりの仔魚の給餌です。ギンブナの卵黄は数日で消えてしまい、その直後には常に餌のある状態にしておかななくてはなりません。人工飼料だとすぐに水が汚れてしまい、ゼブラフィッシュのようにシャーレで育成できるなら水替えは簡単ですが、数千尾を一度に育てるので頻繁に水替えはできません。ですので、生餌を使用することで手間を省きます。まず、淡水クロレラを飼育水に入れます(図 3-(1))。クロレラは餌となるだけでなく、水質の悪化を防ぐ効果もあります。次に、秘密兵器の「インスタントワムシ」を投入します。インスタントワムシは私の大学時代の後輩が某観賞魚会社で開発した商品で、ワムシの休眠卵が貼り着いた紙を水にいれると、うじゃうじゃとワムシが発生し始めます(図 3-(2-5))。ワムシはクロレラを食べ飼育水の中で増え、それを仔魚

が食べるという循環になり、手間をかけることなくギンブナを成長させることができます。ワムシでは満足できない大きさになったときは、次はミジンコの出番です。しかし、私たちの研究室では小型水槽でミジンコを継代させることが難しく、今後の課題となっています。

先日、中国人の留学生からギンブナは食べられるの？と聞かれました。正直、私は食べたことはありません。

せん。毎年、生産し続け 25 年間飼育続けているので、一度くらいは食べてみなければ、、と思い始めたところです。福岡県のとある川魚料理屋に行ったとき「ギンブナのあらい」とメニューにあり、これは食べるべきだと一瞬思ったのですが、1尾千円と高価だったのでやめました。コイもキレイな水で飼育すれば美味しいので、近いうちに挑戦？してみようと思います。



著者プロフィール

杉本 智軌 (Somamoto Tomonori)

2001年東京水産大学・博士後期課程資源育成学修了。日本学術振興会特別研究員PD、九州大学大学院農学研究院助手・助教を経て、2008年より准教授。専門は魚類免疫学、特に細胞性免疫関する研究(本編参照)。抗体素材(鶏卵抗体、マウス抗体融合カイコ絹タンパク質)を利用した観賞魚の疾病予防。兵庫県尼崎市で生まれ、その後、大阪府、千葉県浦安市、三重県伊勢市、福岡市に住む。実家は浦安市舞浜で東京ディズニーランドまで徒歩15分。最近の楽しみは、娘と息子2人を連れて糸島半島に釣りに行くこと。

広報からのお願い

広報では、会員の皆様からの JADCI News へのご寄稿を募集しております！

実験動物の紹介や、実験手法のちょっとしたコツの紹介は、レギュラーコンテンツとして継続中です。皆さまのご寄稿をお待ちいたしております。

その他、エッセイ、JADCI へのご意見・ご提言をはじめ、書評や書籍の紹介、論文紹介なども歓迎いたします。また、会員のユニークな取組み(研究だけでなく教育も含め)についても紹介していきたいと考えています。自薦・他薦問いませんので、どうぞよろしくお願いいたします。

ご寄稿の際は、事務局(jadci2office@gmail.com)までお寄せ下さい。

留学体験（後）記 -ドイツにおけるポストドク生活-



第7回 研究の話(2)

実験動物中央研究所
(前職:Friedrich-Loeffler-Institut)
山口 卓哉

前回に引き続き、ドイツで行ったニジマス IL-2 ファミリーサイトカインに関する研究の紹介をさせていただきます。この研究で一番こだわった部分は、組換えサイトカインの作製とその精製でした。大学院時代に指導を受けながら一通りやったことがある程度でしたが、FLI では生化学が専門の Dr. Axel Karger や、先日お亡くなりになってしまいましたが Dr. Guenther Keil から助けていただいて系を立ち上げ、IL-2、IL-15、IL-15L の3つのサイトカインと、それらと IL-15Ra のヘテロダイマーやキメラタンパクを作ることとなりました。1年以上の時間を費やすことになってしまい、もう少しスピードアップできなかったかと反省している一方で、タンパク質実験の奥深さに触れることができるなど、個人的に大変思い入れがある部分でもあり、留学体験記という趣旨からは離れてしまうかもしれませんが、思い出として残しておきたいと思います。

ご存じの通り組換えタンパク質の“作り方”にはいろいろあり、それぞれに一長一短があります。その中から目的に応じて最適解を探すわけですが、本研究では IL-2 ファミリーサイトカインを対象としたため、白血球を刺激してしまう LPS の混入の可能性をなくす必要があります。また、タンパクに糖鎖が付加される方法を選ぶ必要がありました。というのも、サイトカインの生理活性には糖鎖修飾が重要であることはよく知られていますが、HEK293T の細胞上製を用いて行った解析結果より、ニジマス IL-15L ではそれが特に大切であることが示唆されていたからです。これらに加え、操作の簡便さやコストなどを合わせて検討した結果、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いることになりました。振とう培養系を用いることによって、(哺乳類細胞による修飾とは異なるが)糖鎖修飾されたタン

パクが、大量に、しかもトランスフェクション試薬等は不要なため安価に作製できます。基礎ベクターや、組換えバキュロウイルス作製のプロトコルは Guenther さんのラボで確立されており(ドイツ語のプロトコルは大切に持って帰ってきました、宝です)、各組換えサイトカインの発現はすんなりと完了させることができました。

次に、タンパクを発現させた昆虫細胞の培養上清から、FLAG タグアガロースを用いて精製しました。1-2 リットルほどの上清を限外濾過フィルターで濃縮し、いわゆるバッチ法によって精製・溶出し、さらに溶出液を限外濾過カラムによって濃縮するという、今考えると効率的でないやり方であり、えらく時間はかかったものの大きな問題なくできたかに思えました。しかし問題はここからでした。定量的な解析を可能にするため、アグリゲーションが少ないタンパク質を作らなくてはなりません。Axel さんに相談し、20年もの間眠っていたカラムを復活させて精製された組換えタンパクのゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、サイトカインのみを発現させた場合、強度にアグリゲーションしていることがわかりました。しかし一方で、IL-15 と IL-15L に関しては、それらと分泌型 IL-15Ra のヘテロダイマーや、リンカー配列で繋げたキメラタンパクでは、本当に嘘のようにアグリゲーションがなくなり、きれいなシングルピークが得られました。哺乳類の IL-15 は IL-15Ra と共に発現し分泌されることや、IL-15Ra が IL-15 の安定性に寄与していることがわかっていますが、ニジマスの IL-15Ra のパワーを実感した瞬間でした。

しかし最後まで問題だったのは IL-2 でした。ニジマスの IL-2 は IL-15Ra と結合する結果を得ていたため、IL-15 や

IL-15 のように、ヘテロダイマーが全てを解決するかと期待しましたが、結果はその逆で、さらにアグリゲーションがひどくなりました。ニジマスの IL-2 の組換え体はどうやらホモ 2 量体を形成しており、さらにべたべたとくっついて多量体やアグリゲーションを形成していることが示唆される結果でした。IL-2 に関してはヘテロダイマーではなく、IL-2 のみを作ることとしましたが、何度やってもうまくいきませんでした。そこで Axel さんと相談したところ、sticky な分子を精製した後に限外濾過カラムで濃縮すると、膜のあたりが凄く高濃度となってアグリゲーションが進むんじゃないか、という意見をもらい、2-3 分おきにカラムの遠心を止めてピペティングし、少しずつ均一に濃縮をかけるようにしたところ、原始的な方法だったのですが、アグリゲーションをかなり減らすことができました。

このように、特に Axel さんには本当にお世話になり、きちんとしたタンパクを作ることができました。それより何より大きかったと思うのは、なんでもいいからタンパク作って機能解析できればいいよ、などと最初は思っていたけれど自分ですが、タンパク実験と休暇の旅行が同じくらい好きな Axel さん(変わってるよねーと評すドイツ人同僚もいました笑)と仕事をしていくうちに、分子によって微妙に手法を変えないと上手くいかないところや、そもそも多くの時間と労力をかけてモノを作っている感など、タンパク質実験の奥深さと興味深さに目覚め、今では結構好きになったような気がしています。そんな日々を思い出しながら、現職でもマウス分子の組換えタンパクを作製しているところです。

事務局からのお知らせとお願い

● 学術集会の延期と学会賞の募集について

新型コロナウイルスの国内感染状況は依然として予断を許さない状況が続いており、ほとんどの大学のキャンパスは閉鎖され2月以降研究がストップし、いつ再開できるかも判らない状況です。このような状況に鑑み、学術集会事務局並びに役員の皆様との協議の結果、本年度の学術集会の開催中止、来年度への延期を決定いたしました。来年度は引き続き水産大学校の近藤昌和先生に集会長を引き受けていただくこととなっております。これに伴い、本年度は各種学会賞の募集を行わず、古田優秀論文賞については来年度に2019-2020年度の2年度分を募集することに致します。皆様にはご迷惑をおかけして誠に申し訳ございませんが、ご理解のほどよろしくお願い申し上げます。

● 総会について

上記のように本年度は学術集会が開催されませんので、役員会で協議し、総会をメール会議で行うこととしました。学術集会開催予定であった令和2年8月26日に会員宛に総会議事と資料を送ります。会期は基本的に当日のみとしますが、修正などが必要な場合は役員会で修正案を提案し、再度審議するため令和2年8月28日まで延長します。変則的な形になりますが、ご理解のほどよろしくお願い申し上げます。

● 年会費納入のお願い

令和2年度までの年会費を、先に次期会長選挙案内等とともに会員の皆様にお送りしました「**年会費振り込み用紙**」を用いてお振り込みください。「XX年度年会費」と明記してください。未納分が不明な場合は事務局までお問い合わせください。

✓ 一般会員：5,000円

✓ 学生会員：3,000円

◇ 博士課程以上の学生。学生証のコピーを郵送、あるいはスキャンイメージをメールで事務局までお送りください。指導教員のお名前と所属をご記入ください。

修士課程までの学生は年会費免除です。但し、入会手続きは行ってください。学生証のコピーを郵送、あるいはスキャンイメージをメールで事務局までお送りください。指導教員のお名前と所属をご記入ください。

本年度は学術集会開催中の会場での受付ができませんので、振り込み用紙での入金をお願い申し上げます。

● 次期会長選挙

本学会会則（V 役員、3、5）により、次期会長（任期：2020年9月1日～2022年8月31日）の選出を行うことになりました。会員各位のご協力をお願い申し上げます。投票用紙、小型封筒、返信用封筒を同封しますので、投票上の注意に従い投票をお願いします。投票の**締め切りは令和2年6月29日（必着）**です。なお、本学会役員会は、日本比較免疫学会会則の第V条-3項に基づき、次期会長候補者として中尾実樹氏を推薦いたします。

● 新会員の入会を歓迎いたします！

皆様のお近くに、比較免疫学にご興味の方がおられましたら、本学会への入会をぜひともお勧めいただけますようお願い申し上げます。メールで下記の情報を事務局までお知らせ下さい。

年会費(一般の個人会員：5,000円、博士後期課程院生：3,000円、入会金なし)の振替用紙を郵送いたします。

1. 氏名
2. 氏名(ローマ字)
3. 所属
4. 連絡先(所属先か自宅かを明記して下さい)
郵便番号・住所・電話/Fax番号
5. E-mailアドレス
6. 専門分野
7. 学生会員の場合は、指導教員の名前と学生証のコピー
あるいはスキャン画像

発行者

日本比較免疫学会長 中西 照幸



事務局

庶務担当 末武 弘章

住所 〒917-0003

福井県小浜市学園町1-1

福井県立大学 海洋生物資源学部

海洋生物工学研究室内

電話 0770-52-9600

Fax 0770-52-6003

E-mail jadci2office@gmail.com

Web <http://plaza.umin.ac.jp/~jadci>

編集

広報担当 古川 亮平