

## 論文の内容の要旨

水圏生物学専攻

平成15年度博士課程 進学

氏名：羽室浩爾

所属教員名：鈴木讓

論文題目：トラフグの粘膜免疫機構

魚類の防疫法としてワクチン、免疫賦活剤、高耐病性品種の育種などの対策を有効に進めるためには、魚類の生体防御機構についての深い理解が必須である。脊椎動物が持つ生体防御機構の中で最も重要なものとして、抗体とリンパ球により特徴づけられる獲得免疫系があげられる。魚類は進化過程で最初に抗体を獲得した脊椎動物であるが、哺乳類での極めて詳細な研究に比べて、分子細胞レベルでの研究はようやく緒についた段階である。その中で粘膜組織は、感染経路、防御の場として注目されているが、魚類では腸管と共に体表も角質化していない上皮細胞が粘液で覆われていることから、腸管と同様、全身系とは独立した局所的な粘膜免疫機構の存在が考えられる。魚類に対する浸漬免疫において、抗原は体表から吸収されるとの報告もあり、体表粘膜の免疫応答の解明は、理想的なワクチン技術の開発にもつながる重要な研究テーマである。本研究はその第1歩として、ゲノムデータベースが充実するとともにある程度の大きさを持ち *in vivo* の実験を行いやすいトラフグを材料に、魚類の粘膜免疫機構における抗体およびB細胞の免疫反応の解明を目指したものである。

### 第一章：魚類粘膜における IgM 輸送機構

多くの魚種で、体表粘液や腸管粘液における免疫グロブリン M (IgM) の存在が報告されている。しかし、その IgM がどこで産生され、どのように輸送されているかは明らかではない。本研究ではまず、実験材料としてのトラフグ体表粘液中にも IgM が存在することを、トラフグ IgM H 鎖に対するモノクローナル抗体を用いた Western blot で確認した。還元条件下の Western blot 解析の結果、血清 IgM と同じ分子量約 75 kDa の位置に IgM H 鎖が認められた。一方、

非還元条件下では、血清 IgM と同様、移動度の小さいバンドとして認められ、粘液中にも、血中と同様にジスルフィド結合による 4 量体として存在することが明らかとなった。さらに粘液中 IgM の起源を調べるためにトラフグ IgM H 鎖 cDNA をもとに作製したプローブを用いて、*in situ* hybridization を行ったところ、皮膚では上皮細胞間および上皮細胞層下部のリンパ球群内に、腸管では上皮細胞間に IgM 遺伝子発現細胞が確認され、トラフグ粘膜でも、哺乳類同様、局在 B 細胞が IgM を産生し、それが粘液中へ分泌されるのではないかと推察された。

哺乳類腸管では、局所で産生された多量体 Ig (polymeric Ig ; pIg) は上皮細胞が発現する polymeric Ig receptor (pIgR) と結合して粘液中に輸送される。そこで魚類でも同様の機構があると考え、トラフグゲノムデータベースを利用して哺乳類 pIgR のアミノ酸配列と相同性を示す配列を見いだした。次にトラフグ皮膚 mRNA を材料として RACE 法による cDNA クローニングを行い、トラフグ pIgR の塩基配列を決定した。トラフグ pIgR の cDNA は 1392 塩基からなり、327 残基のアミノ酸をコードしていた。トラフグ pIgR は 2 つの Ig 様ドメイン、膜貫通領域と短い細胞内領域からなり、5 つの Ig 様ドメインをもつ哺乳類、4 つのニワトリとは大きく異なる構造をとっていた。トラフグ pIgR の演繹アミノ酸配列を哺乳類やニワトリの pIgR のアミノ酸配列と多重整列解析を行ったところ、最初の Ig 様ドメインは哺乳類 pIgR のドメイン 1 (D1) に整列され、最も高いアミノ酸配列の同一性を示した。また、立体構造に関わるシステインの数と位置に関してもよく保存されていた。トラフグ pIgR の 2 番目のドメインは多重整列解析では哺乳類やニワトリの D5 と整列されたものの、システインの数は 4 個であり、6 個のシステインを持つ D5 とは異なっていた。しかし、このドメインは KXWC というアミノ酸配列と共に、D5 に特異的である DXGWYWC という配列を保存していた。これらのことからトラフグ pIgR の 2 つのドメインはそれぞれ D1 と D5 という、直接 Ig との結合にかかわるドメインに相当するものと考えられる。

トラフグ pIgR 遺伝子は皮膚、腸をはじめとする様々な組織でその発現が認められた。さらに *in situ* hybridization の結果、皮膚と腸で上皮細胞において pIgR が発現していた。上皮細胞間には IgM 遺伝子発現細胞も認められることから、pIgR を介して IgM が粘液中へ輸送されることが示唆された。

pIgR が 4 量体 IgM を運搬するならば、粘液中にその複合体が存在することが

予想される。そこで DNA 免疫法により作製した抗トラフグ pIgR 抗血清を用いて免疫沈降を行ったところ、pIgR の断片である secretory component と IgM の結合が確認された。このことから 2 つの Ig 様ドメインからなる構造が 4 量体 IgM との結合に必要十分であり、pIgR が粘液中への IgM 輸送に関わっているものと推察された。

## 第二章：魚類における粘膜免疫応答

第一章ではトラフグの粘液中に IgM が存在すること、そして皮膚や腸管の上皮細胞層に IgM 産生細胞が存在すること、さらにその IgM は pIgR により粘液中へ輸送されていることを示した。哺乳類では上皮細胞間に存在する上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte ; IEL) が粘膜免疫機構を担っていることが知られている。トラフグの皮膚や腸管の上皮細胞層に存在する IEL も哺乳類と同様に粘膜免疫機構に関与することが考えられる。そこでまず、皮膚と腸管の IEL の免疫応答における役割を明らかにすることを目指し、Dithiothreitol および EDTA を利用した上皮細胞間の遊離細胞の単離法を確立した。その主成分はリンパ球であったことからこれを IEL として以下の解析に用いた。

Keyhole Lymphet Haemocyanin (KLH) を抗原として筋肉注射および肛門からの腸管内注入によりトラフグに投与して、体表粘液、腸粘液、血清中の抗体価および IgM 量の変動を調べた。

筋肉注射の結果、抗体価は血清中、各粘液中においてほぼ同時期に上昇した。IgM 量については腸管粘液においてのみ増加した。また、皮膚 IEL (Sk-IEL)、腸 IEL (I-IEL)、末梢血白血球 (PBL)、頭腎白血球 (HKL)、脾臓白血球 (SpL) について解析した結果、全てのサンプルの IgM<sup>+</sup>細胞の比率が抗体価上昇と同時期に増加したが、抗 KLH 抗体産生細胞数については PBL、SpL においてのみ抗体価上昇と同時期の増加が見られ、粘膜での変動は検出されなかった。これらの結果、異物の侵入に対する全身性の免疫応答においては、リンパ器官における明確な応答とともに、粘膜組織における IgM<sup>+</sup>細胞比率の増加、粘液中 IgM 量や抗体価の上昇という粘膜免疫系への影響も伴うことが明らかになった。

腸管投与群では、粘液中の抗体価の上昇、IgM 量の増加が観察された。一方、血清中では抗体価の上昇のみが観察されたが、その上昇は粘液中より遅れた。抗 KLH 抗体産生細胞数は、筋肉注射の場合と異なり PBL、SpL だけでなく、Sk-IEL

や I-IEL においてもすみやかに増加した。また、IgM<sup>+</sup>細胞比率も Sk-IEL、I-IEL、HKL において増加した。このように腸管粘膜への異物の侵入に際しては、粘膜での免疫応答、それも異物に侵入された局所に加え、他の粘膜組織での応答も誘導されることが明らかとなった。このことは粘膜の免疫系が全身系のものとは独立していて、粘膜組織間にはネットワークが形成されていることを示すものである。粘膜以外に体内での応答も観察されたが、頭腎に関しては、非免疫魚でも抗 KLH 抗体産生細胞が多数存在すること、さらに免疫後の HKL での IgM<sup>+</sup>細胞比率が上昇したことから、頭腎が一次リンパ器官であり、抗原刺激により頭腎において B 細胞分化が活発化されたものと推察される。PBL、SpL での抗 KLH 抗体産生細胞数が IEL と同時期に増加したことから、パイエル板やリンパ節などの局所リンパ器官が知られていない魚類において、粘膜組織における抗原刺激により脾臓が二次リンパ器官として抗原特異的な抗体産生細胞を選択的に増殖させ、それらが血液を通して粘膜組織にホーミングするという図式が描けるのかもしれない。

以上、本研究により、変温動物で初めて pIgR が発見され、pIgR を介した IgM の粘液中への輸送機構が明らかになった。さらに粘液中の抗体価や IgM 量、細胞数の変化からも魚類にも全身系と独立した粘膜免疫機構が存在することが明らかとなり、腸管や体表といった粘膜組織間にはネットワークが形成されているものと推察された。水中で生活する魚類は脆弱な上皮で覆われる体表や腸管が異物との侵入口になっており、魚類の粘膜免疫機構に関するより詳細な解析が進めることが、新たな魚類防疫法確立に貢献していくことが期待される。