

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成17年度博士課程 進学

氏名 河辺 元子

指導教官 鈴木 謙

論文題目 ニホンウナギ仔稚魚期の T 細胞および胸腺に関する研究

ニホンウナギは食材としての需要が非常に高い養殖対象魚種であるが、増加するウナギ需要に対して、天然シラスウナギの資源量の減少と変動は年々深刻化している。このような背景から、種苗生産技術の開発が進められ、実験条件下では全生活史の管理もできるようになった。しかし、ウナギ人工種苗生産では仔魚期の生残率が低く、ウナギの量産化実現に向けての主要な課題となっている。ウナギ仔魚期の生残率を上げるために、健苗性、すなわち成長や体の器官の発達が順調で、天然仔魚（プレプトセファルス、レプトセファルス）で見られる形態的または生理的な特徴を備えているという視点から仔魚個体の発育を評価して行くことが必要である。中でも耐病性は、仔魚の生残に直接関係する重要な評価指標である。

ウナギ仔魚の免疫器官に関しては、天然レプトセファルスでは胸腺がよく発達している一方で、腎臓や脾臓といったリンパ器官が未発達な状態であることが報告されている。胸腺は骨髄由来の未分化な T 細胞が、自己／非自己の識別能力を獲得した成熟 T 細胞へと分化する一次リンパ器官である。胸腺は成長とともに退縮することが知られているが、他の免疫器官が未発達なウナギ仔魚期では特に T 細胞を介した免疫・生体防御機能が初期生残に関わる重要な役割を果たしている生理的な要因であると考えられる。

本研究では免疫システムの発達からウナギ仔魚の健苗性を評価するために、胸腺分化や T 細胞の機能発現に関わる 2 つの分子、Src ファミリーチロシンキナーゼである *Lck* と、リンパ球の抗原受容体の遺伝子再編成に関わる *Rag1* に着目し、まずこれらの配列を同定し、ウナギ仔稚魚期および成魚での遺伝子の発現解析を行った。本研究の結果、ウナギ *lck* と *rag1* は孵化後の仔魚から発現しており、T 細胞の関わる免疫システムが仔稚魚期から機能し、T 細胞の分化・成熟を誘導する機能的な胸腺をもつことが示唆された。

第一章 ニホンウナギ免疫関連遺伝子の cDNA クローニングと一次構造解析

胸腺は T 細胞が分化・成熟する免疫器官である。成熟した T 細胞は CD4 や CD8 といった T 細胞受容体の補助レセプターの発現によって最終的にヘルパー T 細胞(CD4 陽性 T 細胞)や細胞傷害性 T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞) となる。この T 細胞の初期の分化段階に関与する主要な分子として、チロシンキナーゼである *Lck* があげられる。T 細胞が抗原刺激を受けると、T 細胞の細胞内領域において *Lck* が CD4/CD8 と結合し、T 細胞を活性化する。

また T 細胞の分化の過程で、V(D)J リコンビネーションといわれる遺伝子再編成を受け、T 細胞受容体の多様性が形成される。*Rag1* はこの遺伝子再編成を担う分子であり、哺乳類ではリンパ球特異的に働き、分化中の T 細胞や B 細胞に発現する。免疫応答においてリンパ球の抗原受容体の多様性は、環境中の外来抗原の認識に関わり、*Rag1* は獲得免疫応答の形成において必須の分子である。

本章では、ウナギ成魚のナイロンファイバーカラムで分離した末梢血 T 細胞の cDNA プールから *lck* cDNA を、胸腺の cDNA プールから *rag1* cDNA を RACE 法による cDNA クローニングにより塩基配列を決定した。

その結果、ウナギ *Lck* は Src ファミリーチロシンキナーゼに特徴的な SH4、Unique domain、SH3、SH2、SH1 (キナーゼ領域) で構成されていた。Unique domain には CD4/CD8 との相互作用に必要な CXXC モチーフ(ウナギ *Lck*; CXXCXC)を、SH1 ドメインと C 末端側には *Lck* のキナーゼ活性の制御に関わる 2 つのチロシン残基を有していた。他生物種の既知 *Lck* との一次構造のアライメント解析の結果、71.2-80.2%と高い同一性を示した。魚類の CD4 や CD8 は *Lck* との結合に関わる CXC や CXH といった *Lck* 結合モチーフを持つことから、ウナギにおいても *Lck* と CD4/CD8 の相互作用による T 細胞活性化経路が保存されていると予測される。

Rag1 は *Rag2* とともに酵素複合体を形成して DNA 上の組み換えシグナル(RSS)を認識し、T 細胞受容体や B 細胞受容体を構成する遺伝子断片を形成する。同定したウナギ *rag1* の一次構造解析の結果、DNA 結合モチーフである Zinc finger domain、RSS を認識する Rag Nonamer binding domain、さらに活性中心と考えられる DDEモチーフが保存されており、遺伝子再編成機構に関与する特徴的なドメイン構造が保存されていた。アライメント解析の結果、哺乳類や他魚種の *Rag1* と 62.9-77.8%の同一性を示し、ウナギにおいても抗原受容体遺伝子に多様性をもたらす V(D)J 組換えがリンパ球の分化過程で機能していることが推察された。

第二章 ニホンウナギ *lck*、*rag1* の発現解析

ウナギ仔稚魚期の免疫システムの形成過程を調べることを目的として、同定したウナギ *lck* と *rag1* の遺伝子発現を調べた。

まずウナギ T 細胞における *lck* の発現を調べるために、ナイロンファイバーカラム T を用い、成魚の末梢血から T 細胞集団を分離し、ウナギ *lck* の発現解析を行った。その結果、

分離した T 細胞集団で末梢血白血球(PBL)よりも強い *lck* の発現が認められ、ウナギ *lck* が T 細胞で発現していることが示された。さらに、RT-PCR により受精後 3 日目と 7 日目の人工孵化仔魚および天然レプトセファルス個体でウナギ *lck* の発現が確認された(図 1)。次にシラスウナギで *in situ* ハイブリダイゼーション法により胸腺を中心とした組織で *lck* の遺伝子発現細胞の分布を調べた結果、胸腺のリンパ球様細胞が陽性であった。ウナギ成魚の組織別 RT-PCR の結果、*lck* は胸腺、腎臓、脾臓といったリンパ系組織や消化管や皮膚といった粘膜系組織で発現していた。

Lck は T 細胞特異的に発現するチロシンキナーゼであり、胸腺内の T 細胞分化や末梢の T 細胞活性化に関与している。実際、シラスウナギでの解析の結果は、胸腺が T 細胞の分化・成熟器官であることを示していた。仔魚期における *lck* の発現解析の結果から、ウナギでは受精後 3 日という早い段階から T 細胞を介した免疫システムが機能していることが分かった。

次いで、ウナギ *rag1* の遺伝子発現解析を行った結果、RT-PCR により受精後 3 日目と 7 日目の人工孵化仔魚で発現が確認された(図 1)。さらにシラスウナギを用いてさまざまな組織で *rag1* の遺伝子発現細胞の分布を調べたところ、胸腺、消化管上皮、鰓、脊椎で陽性細胞が見られた。ウナギ成魚の組織別 RT-PCR では胸腺で *rag1* の発現が確認された。

T 細胞は分化・増殖時に、Rag (Rag1/Rag2)による抗原受容体遺伝子の組み換え過程を経て、最終的に成熟した T 細胞へと分化する。マウスでは Rag2 が欠損すると T 細胞が未成熟になることから、Rag による遺伝子再編成はリンパ球の正常な発達に不可欠である。ウナギ *rag1* の発現解析の結果から、Rag による遺伝子再編成機構はウナギ仔魚期から機能し、さらに胸腺で遺伝子再編成による T 細胞の分化・成熟が起こっていると考えられる。

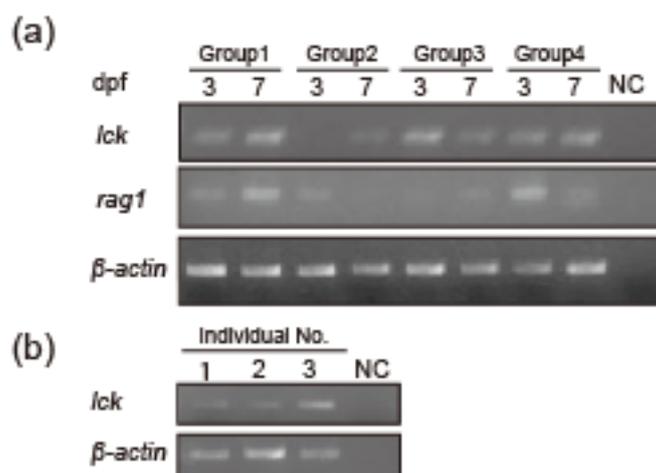


図 1. ウナギ仔魚におけるウナギ *lck* と *rag1* の発現解析

(a) 孵化仔魚(受精後3日目、7日目)における *lck*、*rag1* の発現を示し、グループNo. は同腹仔魚であることを示す。(b) 天然レプトセファルス個体における *lck* 遺伝子の発現を示す。 β -actin は内在性コントロール遺伝子、NC はネガティブコントロールを表す。

従来の研究により、天然レプトセファルスでは、腎臓や脾臓が未発達な一方、胸腺はよく発達していることが知られており、仔魚期の生体防御における胸腺、T細胞系の重要性が指摘されていた。この胸腺、T細胞系の初期発生を解析した本研究により、この系の指標となる *lck* や *rag1* がウナギ仔稚魚期の早い段階から発現していることを示すことができた。すなわち、ウナギの仔魚は、孵化直後からシラスウナギへ変態するまでの長い期間、主にT細胞を介した免疫システムが生体防御を担っているものと考えられる。本研究の結果は、*lck* や *rag1* といった免疫系の遺伝子がウナギ仔魚の健苗性を検討するための有用な指標となる可能性を示している。今後これらの生体防御関連遺伝子の解析が、ウナギ仔魚の生残の改善に繋がる種苗生産技術の開発へ発展することが期待される。