

学位論文 博士（理学）

棘皮動物イトマキヒトデ幼生に着目した原始的な  
生体防御システム及びその制御メカニズムの解析

2012年9月

慶應義塾大学大学院理工学研究科

古川 亮平

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	古川 亮平
主論文題目： 棘皮動物イトマキヒトデ幼生に着目した原始的な生体防御システム及びその制御メカニズムの解析				
(内容の要旨)				
<p>自然免疫は、全ての多細胞動物に備わった生体防御システムである。「系統進化における生体防御システムの共通性と多様性はどのようなものか？」という問いは、自然免疫を深く理解するために重要な命題である。本論文では、系統進化的に原始的な棘皮動物であるイトマキヒトデに焦点を当て、幼生の間充織細胞が示す防御行動及びその制御メカニズムを解析した。</p> <p>第1章では、細胞性免疫研究の祖であるメチニコフによる貪食作用発見の科学史を紐解きながら、棘皮動物ヒトデの系統進化的位置と、<i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> における個体発生を通じた比較免疫学の研究材料としての有用性を述べる。</p> <p>第2章では、幼生の生防御機能が発動する生理学的あるいは病的状況に鑑み、間充織細胞が効率の良い空間的配置を取ること示す。また、注射された種々の異物に対し、間充織細胞が、異物への移動、凝集塊形成、細胞融合、包囲化作用、貪食作用といった多様な防御行動を示すことを述べる。さらに、間充織細胞は、同種細胞を特異的に認識し、同種と認識できないあらゆる対象を異物と見なすことにも言及する。</p> <p>第3章では、間充織細胞の防御行動を細胞質側で制御する候補分子として、DOCK180 superfamily に属するタンパク質 (ApDOCK タンパク質) の機能解析を行った。無機的及び有機的異物の注射実験から、ApDOCK タンパク質は、細胞融合と貪食作用には関与しないが、異物への移動、ならびに包囲化の維持に必須であることを見出した。さらに、培養下での解析から、間充織細胞が伸展させる葉状仮足先端において、ApDOCK タンパク質がアクチン重合を正に制御している事実を指摘する。</p> <p>第4章では、防御行動の細胞外における制御分子として、Scavenger Receptor Cysteine-Rich ドメイン (SRCR ドメイン) を有するタンパク質 (ApSRCR1 タンパク質) の発現及び機能解析を行った。ApSRCR1 タンパク質は、間充織細胞の小胞膜に局在するが、バクテリア感作により細胞外に分泌され、バクテリアとの結合を介して間充織細胞の貪食作用を促進するオプソニン作用を有する可能性を示唆した。</p> <p>以上の研究成果及び予備的データに基づき、第5章では、ヒトデ幼生の間充織細胞と哺乳類のマクロファージの機能類似性について述べる。これを受け、進化の過程における、免疫細胞の防御行動を支える細胞内外の制御メカニズムに関して考察する。さらに、変態を介した異物認識戦略の変化も含め、成体の生体防御システムの制御メカニズム解明に向けた今後の展望を述べる。これらを通して、イトマキヒトデが自然免疫メカニズムをより深く理解するために有用な実験モデルとなり得ることを提唱する。</p>				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 81045233	SURNAME, First name FURUKAWA, Ryohei
<b>Title</b> Analysis of the primitive defense system and its regulatory mechanisms in the larva of the starfish, <i>Asterina pectinifera</i>		
<b>Abstract</b> <p>All multicellular organisms have an innate immune mechanism that represents a phylogenetically ancient defense mechanism. From an evolutionary viewpoint, the functional commonalities and diversities in the defense system provide deep insight into the innate immune mechanism. In this thesis, I focus on the starfish, <i>Asterina pectinifera</i>, which is a phylogenetically primitive animal, and analyze the larval mesenchyme cells for defensive behaviors and their regulatory mechanisms at the cellular and molecular level.</p> <p>In Chapter 1, I describe the phylogenetic position of the starfish and its availability as an <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> research model for developmental and comparative immunology, while introducing the history of the discovery of phagocytosis by Metchnikoff, which provided a platform for cellular immunology.</p> <p>In Chapter 2, I show that the spatial distribution of mesenchyme cells is effective for host defense under physiological and pathological situations. I describe how, when experimentally injected with various foreign bodies, the mesenchyme cells exhibit a wide variety of defense behaviors such as directional migration, aggregate formation, cell-to-cell fusion, encapsulation and phagocytosis. Furthermore, I demonstrate that mesenchyme cells both identify allogeneic cells and recognize non-allogeneic targets as foreign bodies.</p> <p>In Chapter 3, I characterize the function of a DOCK180 superfamily protein, termed <i>ApDOCK</i> protein, as a candidate protein that intracellularly regulates the defense behaviors of larval mesenchyme cells. In injection experiments using inorganic or organic foreign bodies, I show that <i>ApDOCK</i> protein is essential for the migratory congregation and persistence of encapsulation of mesenchyme cells, but not is associated with their cell-to-cell fusion or phagocytosis. In addition, in analyses using mesenchyme cells in culture, I demonstrate that <i>ApDOCK</i> protein promotes the organization of cytoskeletal actin at the leading edge of the lamellipodium of mesenchyme cells.</p> <p>In Chapter 4, I demonstrate the expression profile and function of a scavenger receptor cysteine-rich-domain-containing protein, termed <i>ApSRCR1</i> protein, as an extracellular regulator of mesenchyme cells. I show that <i>ApSRCR1</i> protein is specifically localized to cytoplasmic vesicles as a membrane-bound protein in naive mesenchyme cells. Furthermore, I raise the possibility that <i>ApSRCR1</i> protein is secreted from the mesenchyme cells by bacterial stimuli and acts as an opsonin to promote phagocytosis of the mesenchyme cells through the binding of bacteria.</p> <p>On the basis of these findings and other preliminary data, in Chapter 5 I describe the functional similarity between larval mesenchyme cells of the starfish and mammalian macrophages. Given this, I provide insight into features of the intracellular and extracellular regulatory mechanisms that underlie the defense behaviors of immune cells during the evolutionary process. In addition, I discuss the future prospects about the regulatory mechanisms of the adult defense system, including the self/nonself recognition strategies that change via metamorphosis. Taking all of the data together, I propose that <i>A. pectinifera</i> is a useful research model that will enable us to further understand the innate immune system.</p>		

## 目次

<b>第 1 章 序論</b>	<b>1</b>
1-1 自然免疫システムと貪食作用	2
1-2 棘皮動物ヒトデの系統進化的位置及び比較免疫学的材料としての有用性	4
1-3 本研究の目的	6
<b>第 2 章 幼生の間充織細胞が示す生体防御行動</b>	<b>7</b>
2-1 緒言	8
2-2 間充織細胞の分布と形態	8
2-3 注射された細菌に対する間充織細胞の貪食行動	12
2-4 種々の異物に対する間充織細胞の貪食作用	16
2-5 間充織細胞による生きた同種細胞に対する免疫不応答	20
2-6 病的及び生理的条件下での間充織細胞の生体防御機能	23
2-7 考察	27
材料と方法	30
<b>第 3 章 間充織細胞による免疫応答の細胞内調節因子: <i>ApDOCK</i> タンパク質</b>	<b>34</b>
3-1 緒言	35
3-2 <i>ApDOCK</i> タンパク質の分子構造	36
3-3 モルフォリノアンチセンスオリゴが間充織細胞の時空間的分布及び形態に及ぼす影響	39
3-4 <i>ApDOCK</i> タンパク質の機能阻害が間充織細胞による異物への移動に及ぼす影響	41

3-5	<i>ApDOCK</i> タンパク質の機能阻害が間充織細胞による包囲化作用に及ぼす影響	42
3-6	<i>ApDOCK</i> タンパク質の機能阻害が間充織細胞による細胞融合及び貪食作用に及ぼす影響	45
3-7	細菌に対する <i>ApDOCK</i> -MO 幼生の間充織細胞の免疫応答	47
3-8	間充織細胞による免疫応答に伴う <i>ApDOCK</i> mRNA の発現量変化	49
3-9	<i>ApDOCK</i> タンパク質の機能阻害による葉状仮足形成の不全及びラッフル膜の欠如	51
3-10	考察	54
	材料と方法	58
<b>第 4 章</b>	<b>間充織細胞による免疫応答の細胞外調節因子： <i>ApSRCR1</i> タンパク質</b>	<b>62</b>
4-1	緒言	63
4-2	<i>ApSRCR1</i> 遺伝子及びタンパク質の構造	64
4-3	発生過程における <i>ApSRCR1</i> 遺伝子及びタンパク質の発現	66
4-4	間充織細胞及び体腔細胞における <i>ApSRCR1</i> タンパク質の細胞内局在性とその生化学的特性	69
4-5	幼生における <i>ApSRCR1</i> タンパク質の機能阻害	71
4-6	成体における <i>ApSRCR1</i> タンパク質の機能阻害	74
4-7	免疫応答時における <i>ApSRCR1</i> タンパク質の機能特性	76
4-8	考察	78
	材料と方法	83
<b>第 5 章</b>	<b>総括及び考察、ならびに今後の展望</b>	<b>88</b>
5-1	総括	89
5-2	ヒトデ幼生間充織細胞と哺乳類マクロファージの機能類似性	92

5-3	免疫細胞の防御行動を細胞内外で制御するタンパク質の進化的共通性と多様性	93
5-4	ヒトデ幼生及び成体における異物認識戦略の変化と今後の展望	95
	参考文献	99
	謝辞	

# 第 1 章

## 序論

## 1-1 自然免疫システムと食食作用

地球に現存する多細胞動物は、個体の恒常性を維持するために、細菌や微生物から自分自身の身を守る生体防御システムを有している。約 10 億年前に多細胞動物が誕生して以来、生体防御システムはより高度で複雑なものに進化してきた。現在、生体防御システムは、2つのカテゴリーに属する反応群に分けられる。「自然免疫システム」と「獲得免疫システム」である。一部の脊椎動物に存在する獲得免疫システムが抗体等を用いた抗原特異的な応答であるのに対し、全ての多細胞動物に共通して存在する自然免疫システムは、生物体内に侵入してきた異物表面のある一定の分子パターンを認識することにより、「非特異的に」反応する特徴を持つ。

自然免疫システムの最前線を支える最も重要な細胞行動は、原始の動物から受け継がれてきた自己と非自己を識別し、非自己を細胞内に取り込んで消化する「食食作用」と名付けられた細胞行動である。同時に、食食作用は、獲得免疫システムのトリガーでもある。マクロファージに代表されるような食食細胞が、食食した異物の一部を抗原として提示することにより獲得免疫システムを作動させることは広く知られている。食食作用は、ロシアの動物学者 Metchnikoff により 19 世紀末に発見された。Metchnikoff は、棘皮動物ヒトデのビピンナリア幼生の体に刺さったバラの刺を間充織細胞と呼ばれる遊走性の細胞が取り囲んでいる様子を顕微鏡で観察し、細胞には食食能力があることを洞察した(Metchnikoff, 1891)。この観察をもとに、Metchnikoff は、カイメン、刺胞動物(ヒドラ、クラゲ)、環形動物(ミミズ)、節足動物(ミジンコ、ゾウムシ)、原索動物(ホヤ)、半索動物(ナメクジウオ)などの無脊椎動物から脊椎動物(サンショウウオ、マウス)に至るまで、数多くの動物でも同様に異物排除行動を観察し、生体防御システムにおける食食細胞の重要性を指摘した(食食細胞説)(Metchnikoff, 1891)。これらの Metchnikoff による一連の比較免疫学的研究はノーベル賞の受賞に繋がっただけでなく、細胞性免疫研究の扉を開いたとして現在でも高く評価されている(古川, 2009a, b)。Metchnikoff による食食作用の発見に端を発した細胞性免疫研究の発展により、現在では「はじめにマクロファージありき」とまで言われるほど、自然免疫システムを成立させる食食細胞が、獲得免疫システムも含んだ生体防御システムの中心を担うことはよく知られている。



近年、Toll 及び Toll-like receptor の発見が契機となり、自然免疫システムの研究は飛躍的に進んでいる(Abdelsadik and Trad, 2011; Akira et al., 2001)。また、多様な動物種におけるゲノム解析の進行に伴い、動物進化と生体防御システムの関わりについての研究も盛んに行われている。特に、獲得免疫システムを有さないとされる動物種において、我々が有する抗体及び抗原受容体に匹敵する多様性が示唆される新たな因子が相次いで発見され(Cannon et al., 2002; Pancer et al., 2004; Terwilliger et al., 2006; Watson et al., 2005)、比較免疫学的視点に立脚した自然免疫システムに関する研究の重要性は増してきた(Du Pasquier, 2005; Litman et al., 2005)。しかしながら、無脊椎動物において、貪食細胞による異物認識も含めた生体防御行動の制御メカニズムを解析するための研究基盤は、ショウジョウバエや線虫などのモデル生物に限られている。

## 1-2 棘皮動物ヒトデの系統進化的位置及び比較免疫学的材料としての有用性

棘皮動物ヒトデは、系統進化的に我々脊椎動物に繋がる新口動物の基部に位置する原始的な無脊椎動物である。その幼生は、比較的透明な3種の単層上皮シート(外胚葉壁、内胚葉性消化管、中胚葉性体腔囊)及び1種類の間充織細胞によって構成される最もシンプルな三胚葉性の構造を示す。ヒトデの原腸形成期において、間充織細胞は原腸先端から出現し、広く胞胚腔中に分布する(Chia, 1977; Dan-Sohkawa et al., 1980)。発生が初期ビピンナリア幼生期まで進行すると、間充織細胞の数は1個体当たり110個に達している(Kominami, 1985)。この時期、間充織細胞の形態は、球状から細胞突起を発達させた形態へと変化する。形態形成における間充織細胞の機能として、口や体腔囊形成への関与が考えられている(Crawford and Abed, 1983; Crawford and Chia, 1978)。さらに、間充織細胞は、細胞外マトリックスの繊維状成分に対して機械的張力を発揮することにより、胚体の形を維持していることも明らかにされている(Crawford, 1990; Crawford et al., 1997; Kaneko et al., 2005)。このように、形態形成における間充織細胞の機能に関する知見は蓄積されてきているが、Metchnikoffによる貪食作用の発見以降、間充織細胞の生体防御機能の詳細に関する研究は非常に乏しかった。

現在、ヒトデ胚及び幼生において報告されている間充織細胞が関与する生体防御現象は以下の3点である。(1) 後期原腸胚において、間充織細胞は培養皿に播種した際に、細胞膜を薄く広く伸展する「不成功の貪食作用 (frustrated phagocytosis)」と呼ばれる行動を示す。この過程で、極めて高い細胞融合活性が生じ、多核体となる(Kaneko et al., 1990)。このような「不成功の貪食作用」及び多核体形成は、*in vitro*に移した脊椎動物のマクロファージにおいても報告されている(Couso et al., 2002; Suzuki et al., 2001)。(2) 間充織細胞は、原腸胚の解離細胞が個体を再構築する過程で胞胚腔中に取り残された細胞残渣を貪食する(Tamura et al., 1998)。同様に、(3) 幼生の体壁から胞胚腔中に導入したイムノグロブリンを取り込む(Dan-Sohkawa et al., 1995)。これらの観察結果は、間充織細胞がヒトデ幼生の生体防御システムにおいて重要な役割を担っていることを示唆している。

一般的に、幼生は成体と比較してより直接的に系統進化を反映していると考

えられている。棘皮動物ヒトデの系統進化的位置ならびにその幼生が有する身体の構造のシンプルさから、ヒトデ幼生は、「1種類の免疫細胞によって構築される原始的な生体防御システムはどのようなものか？」という問いに対して、我々脊椎動物を含む新口動物における生体防御システムの根幹的なメカニズムを提示しうるポテンシャルを秘めた材料であると期待される。

一方、ヒトデ成体の免疫細胞である体腔細胞の免疫応答に関しても、いくつか報告がある。体腔細胞は、成体の体腔に充満している体腔液中に存在する浮遊性の細胞であり、成体の自然免疫システムを担っている。イトマキヒトデ *Asterina pectinifera* 成体には1種類の体腔細胞が存在し、培養下に単離すると基質に対して多核体形成を伴った「不成功の貪食作用」を示すことが報告されている(Dan-Sohkawa et al., 1993)。また別種のヒトデにおいても、体腔細胞は細菌や様々な異物に対して高い貪食活性を示すことが報告されている(Gross et al., 1999; Kaneshiro and Karp, 1980; Reinisch and Bank, 1971; Silva and Peck, 2000)。しかし、成体の体腔細胞と幼生の間充織細胞による生体防御システムが共通のメカニズムによって構築されているか否かという問題は全く明らかになっていない。

### 1-3 本研究の目的

前項で述べたように、ヒトデ幼生は、新口動物における生体防御システムの根幹的なメカニズムを提示しうる有用な材料である。しかしながら、現在、幼生の間充織細胞による生体防御現象に関する知見は限定的である。本研究では、イトマキヒトデ幼生の間充織細胞が有する生体防御機能及びその制御メカニズムを解析する。このアプローチにより、イトマキヒトデを材料とした比較免疫学的研究基盤の確立を目指す。

第2章では、未感作状態の幼生における間充織細胞の空間的配置、続いて異物感作時における間充織細胞の細胞行動とその機能特性を詳細に記述し、イトマキヒトデ幼生の生体防御システムにおける細胞レベルでの解析系を確立する。

これを基盤に、第3章及び第4章では、間充織細胞の生体防御行動を細胞内及び細胞外で制御するタンパク質を探索し、その制御メカニズムを解析する。具体的には、第3章では、幅広い動物種において進化的に保存され、種々の細胞行動におけるアクチン細胞骨格の構築を制御する細胞内因子 **DOCK180** タンパク質スーパーファミリーに着目し、間充織細胞の防御行動における機能とその制御メカニズムを解析する。第4章では、後生動物の自然免疫システムにおいて重要な役割を担っていると考えられている **Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR)** ドメインを有するタンパク質ファミリーの発現と機能を解析する。

第5章では、以上の研究成果に基づき、ヒトデ幼生の間充織細胞と哺乳類のマクロファージの機能類似性について述べる。これを受け、動物進化の過程における、免疫細胞の防御行動を裏打ちする細胞内外の制御メカニズムに関して考察する。さらに、変態を介した異物認識戦略の変化も含め、イトマキヒトデの個体発生を通じた生体防御システムの解明に向けた今後の展望を述べる。これらを通して、イトマキヒトデが自然免疫システムの根幹的なメカニズムをより深く理解するために有用な実験モデルとなり得ることを提唱する。

## 第 2 章

### 幼生の間充織細胞が示す生体防御行動

## 2-1 緒言

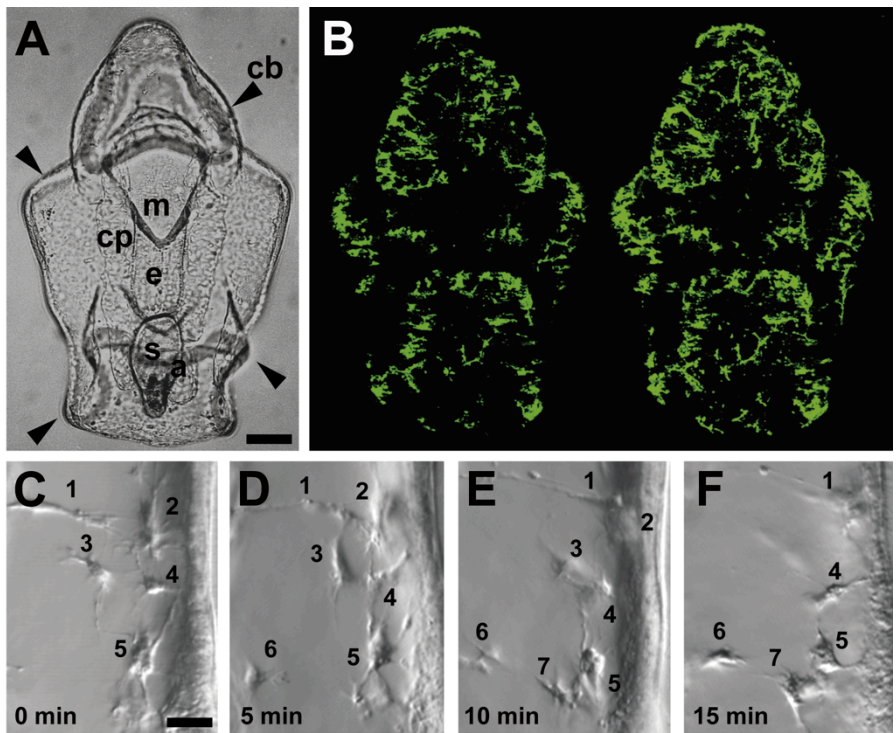
本章では、イトマキヒトデ幼生の防御システムにおいて、間充織細胞が免疫的に未感作状態で待機している構造的特性、すなわち、間充織細胞は異物が外界から侵入する前にどのような空間的な配置を取っているのかを示す。続いて、幼生に異物を注射又は幼生を異物とインキュベーションし、異物の感作に伴う間充織細胞の行動及び機能特性の詳細を、種々の顕微鏡を用いた詳細な観察により明らかにする。観察の焦点は、(1) 間充織細胞は、異物に対してどのような貪食応答を示すのか、(2) 間充織細胞は、どのようにして様々な異物を識別しているのか、(3) 自然の海において、防御行動が発動する病的条件及び生理的条件とはどのようなものか、という 3 点である。これらを通して、ヒトデ幼生の生体防御システムを制御する分子メカニズムを実験的に解析するための研究基盤を確立する。

## 2-2 間充織細胞の分布と形態

受精後 4 日のビピンナリア幼生 (Fig. 2-1A) に対して間充織細胞マーカーである MC5 モノクローナル抗体 (MC5 mAb) を用いて間接蛍光抗体法を施し、間充織細胞の空間的分布をステレオビューで解析した (Fig. 2-1B)。その結果、大部分の間充織細胞は内胚葉、外胚葉壁に沿って分布していた。特に、間充織細胞は外胚葉壁に存在する繊毛帯 (Fig. 2-1A: 矢尻) に沿って不均一に分布する傾向が認められた。一方、それぞれの間充織細胞は細胞体から高度に突起を発達させており、突起を介して互いに接着しあっている様子も体の至る領域で観察された (Fig. 2-2)。その結果、各間充織細胞の細胞体間が突起によって繋がったネットワーク構造が幼生体内の随所に存在していることが認められた (Fig. 2-1B)。また、受精後 4 日のビピンナリア幼生において、その体を構成する細胞数は、 $18500 \pm 1050$  (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 3$ ) であったが、間充織細胞の数は  $162 \pm 13$  (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 15$ ) であり、全細胞数の約 1% を占めていることが明らかとなった。

Fig. 2-1C から F に、間充織細胞によるネットワーク構造のダイナミクスを示した。幼生体内の一領域を連続観察したところ、ある間充織細胞 (Fig 2-1C: #1) は細胞突起を発達させながら外胚葉壁に向かって移動し、5 分後には他の間充織

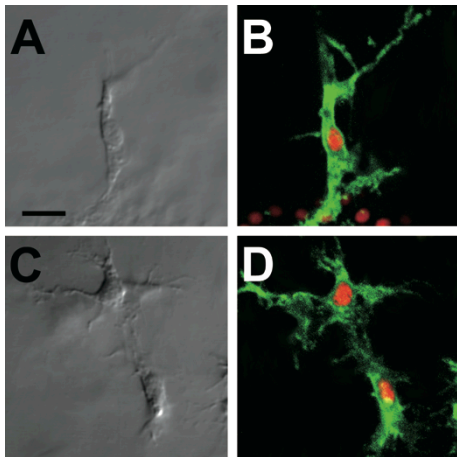
細胞 (Fig. 2-1D: #2、#3) と接触するようになった。10 分後には、#3 の間充織細胞は#1 の間充織細胞から分離したが、#1 と#2 は接触したままであった (Fig. 2-1E)。15 分後になると、#3 の間充織細胞は視野から消失した (Fig. 2-1F)。また、#6 の間充織細胞は、左から右に緩やかに移動した (Fig. 2-1C から F)。このように、ネットワーク構造を形成する間充織細胞は非常に動的であり、その形態や他の間充織細胞との位置を変化させ続けていることが明らかとなった。



**Fig. 2-1** ヒトデ幼生間充織細胞が形成するネットワーク構造及びそのダイナミクス

(A) イトマキヒトデのビピンナリア幼生(受精後4日)。m, 口; e, 食道; s, 胃; a, 肛門; cp, 体腔囊; cb, 繊毛帯(矢尻)。(B) ビピンナリア幼生における間充織細胞の分布様式(ステレオビュー)。ほとんど全ての間充織細胞(緑)は体壁、特に繊毛帯に沿って分布している。(C-F) 間充織細胞によるネットワーク構造のリアルタイム観察。1つの光学的切片上で7個の間充織細胞を経時的に追跡した。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$  (A, B); 20  $\mu\text{m}$  (C-F)。





**Fig. 2-2** 間充織細胞の形態及び局所的ネットワーク

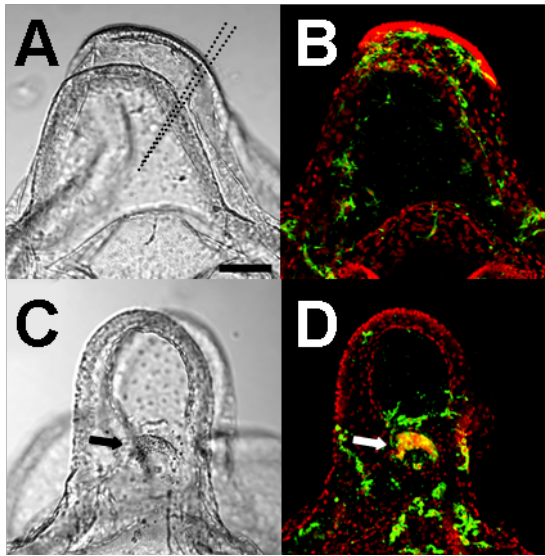
(A, B) 1 個の間充織細胞の形態。間充織細胞は高度に突起を発達させている。(C, D) 間充織細胞によるネットワークの拡大図。2 個の間充織細胞が発達させた細胞突起で互いに接触し合っている。緑, MC5 mAb で染色した間充織細胞; 赤, propidium iodide (PI) で染色した核。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### 2-3 注射された細菌に対する間充織細胞の食食行動

最初に、マイクロニードルの挿入によって生じた傷に対して間充織細胞が応答するか否かを確認するために、シャム実験を行った。異物を注射しない場合、2~5個の間充織細胞がマイクロニードルを刺した領域に集まってきたものの、30分以内に外胚葉壁に向けて引き返し、2時間後には外胚葉壁の近傍に再配置した (Fig. 2-3A, B)。一方、グラム陽性菌の納豆菌を比較的多量に注射した場合、2時間後における間充織細胞の分布は明らかに異なっており、約15~20個の間充織細胞が注射部位に集積して凝集塊を形成していた (Fig. 2-3C, D)。幼生体内のどの領域でシャム実験及び納豆菌の注射を行っても、間充織細胞による同様の行動が観察された。

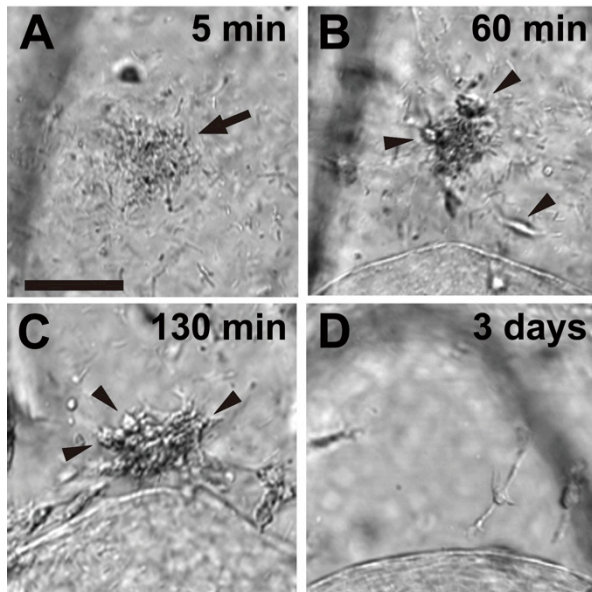
注射された納豆菌に対する間充織細胞の行動を Fig. 2-4 に示した。注射直後、納豆菌は胞胚腔中に緩やかに拡散した (Fig. 2-4A: 矢印)。その後60分以内に、複数の間充織細胞が、納豆菌が注射された領域の中心部に向かって移動した (Fig. 2-4B: 矢尻)。2時間後、間充織細胞は凝集塊を形成し、大部分の納豆菌は胞胚腔中で観察されなくなった (Fig. 2-4C: 矢尻)。注射した納豆菌は、3日後には胞胚腔中から完全に消失し、胞胚腔は注射前の状態に戻った (Fig. 2-4D)。グラム陰性菌である大腸菌の注射実験においても、間充織細胞は同様の行動を示した (Fig. 3-5, 4-6 参照)。

続いて、間充織細胞の凝集塊を透過型電子顕微鏡で観察した (Fig. 2-5)。その結果、凝集塊の中心部に納豆菌が包囲化されていた (Fig. 2-5: 紫)。包囲化されている納豆菌の中には、まさに食食されようとしているものだけでなく (Fig. 2-5: 黒矢印)、既に食食されたものも存在していた (Fig. 2-5: 白矢印) さらに、この凝集塊中には間充織細胞の核 (Fig. 2-5: n) が複数観察されるが、これらの間には細胞境界が存在せず、融合して多核体となっていた。



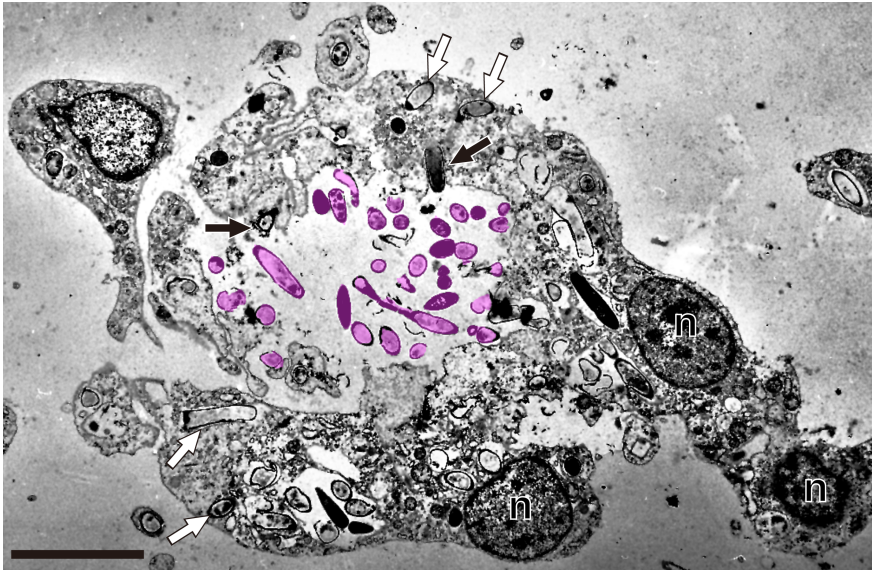
**Fig. 2-3** シヤム実験及び納豆菌の注射実験

シヤム実験(A, B)では、マイクロニードル (点線)を挿入して引き抜いた領域への間充織細胞の凝集は認められない。これに対して、納豆菌を注射した場合は、間充織細胞による凝集塊形成が観察される (C, D; 矢印)。写真は注射2時間後の様子を示している。緑, MC5 mAb で染色した間充織細胞; 赤, PI で染色した核。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 2-4** 胞胚腔に注射した納豆菌に対する間充織細胞の防御行動のタイムコース

(A-C) 間充織細胞が納豆菌を注射した領域に集積し、凝集塊を形成している。(A)の矢印は注射した納豆菌を示している。(B) 及び (C) の矢尻は間充織細胞を示す。(D)において、納豆菌注射領域に間充織細胞及び納豆菌は観察されない。写真は同一個体の同一領域を撮影したものである。時間は注射後の時間を示している。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 2-5** 間充織細胞による凝集塊の透過型電子顕微鏡像

納豆菌を注射した2時間後。凝集塊内部に包囲化された納豆菌(紫)に加え、貪食され始めた納豆菌(黒矢印)や既に貪食された納豆菌(白矢印)が観察される。凝集塊を形成している間充織細胞の核(n)の間に細胞境界は観察されない。スケールバーは5  $\mu\text{m}$ 。

## 2-4 種々の異物に対する間充織細胞の貪食作用

種々の異物を幼生体内に注射した場合の貪食作用の有無を Table 1 にまとめた。イトマキヒトデの精子及び胚から単離した間充織細胞を注射した場合を除き (Fig. 2-7A, 2-8 及び 2-9 参照)、間充織細胞はあらゆる異物に対して 2 時間以内に貪食作用を示した。また、貪食作用のタイムコースに明確な違いは認められなかった。しかし、以下に示すいくつかの点に関して、間充織細胞による貪食作用には違いが認められた。

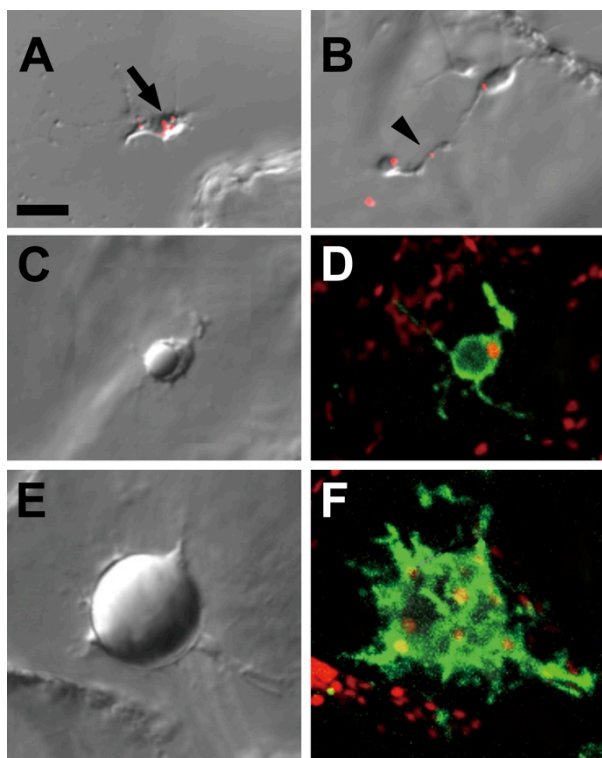
Fig. 2-6 は、サイズの異なる非細胞性異物を比較的少量注射した 2 時間後に、間充織細胞が示した貪食作用の観察結果である。直径  $0.2\ \mu\text{m}$  のビーズを注射すると、間充織細胞は典型的な貪食作用を示し、ビーズを細胞質に取り込んだ (Fig. 2-6A, B: 矢印)。次に、注射する際にサイズを自在に調整可能な油滴を用いて実験を行った。間充織細胞より小さいサイズの油滴 (直径約  $10\ \mu\text{m}$ ) を注射した場合、単一の間充織細胞が表面積を拡張させることにより油滴を包囲化した (Fig. 2-6C, D)。一方、間充織細胞よりも大きなサイズの油滴 (直径  $20\sim 30\ \mu\text{m}$ ) を注射すると、複数の間充織細胞が油滴表面に接着して包囲化した (Fig. 2-6E, F)。

顕微注射が容易な小サイズの細胞性異物として、ヒトデとウニの精子を用いた。Fig. 2-7 は、同種のイトマキヒトデ精子又は異種のムラサキウニ精子 (*Strongylocentrotus nudus*) を、生きた状態又は 4% paraformaldehyde (PFA) で固定した状態で注射した 2 時間後の様子を示している。これら 2 種の精子を生きた状態で注射したところ、間充織細胞は異なる応答を示した。同種精子に対しては、間充織細胞が注射部位に集積したものの、凝集塊形成は生じなかった (Fig. 2-7A)。一方、異種の精子を注射した場合、間充織細胞は比較的小さな複数の凝集塊を形成し、貪食されていない精子も散見された (Fig. 2-7B)。注射する精子を PFA で固定した場合、間充織細胞は同種及び異種精子に対してさらに異なる応答を示した。PFA で固定した同種精子に対しては、間充織細胞は複数の粒状の凝集塊を形成した (Fig. 2-7C)。この際、貪食されていない精子の量は、生きた異種精子を注射した場合 (Fig. 2-7B) と同程度であった。これに対し、PFA で固定した異種精子に対しては、間充織細胞は単一の凝集塊を形成し、注射した精子は完全に貪食された (Fig. 2-7D)。

**Table 1. 異なる異物に対する食食作用の有無**

異物	食食作用 <sup>1)</sup>
<b>非細胞性異物</b>	
ポリスチレンビーズ(0.2 μm)	Yes (Fig. 2-6A, B)
油滴(10 μm)	Yes (Fig. 2-6C, D)
(20 μm)	Yes (Fig. 2-6E, F)
<b>細胞性異物</b>	
納豆菌 (グラム陽性菌)	Yes (Fig. 2-3 から 2-5)
大腸菌 (グラム陰性菌)	Yes (Fig. 3-6, 4-5 参照)
<i>S. nudus</i> (ムラサキウニ)	
生きた精子	Yes (Fig. 2-7B, 2-8)
PFA で固定した精子	Yes (Fig. 2-7D)
<i>A. pectinifera</i> (イトマキヒトデ)	
生きた精子	No (Figs. 2-7A, 2-8)
PFA で固定した精子	Yes (Fig. 2-7C)
生きた間充織細胞	No (Fig. 2-9B)
PFA で固定した間充織細胞	Yes (Fig. 2-9C, D)

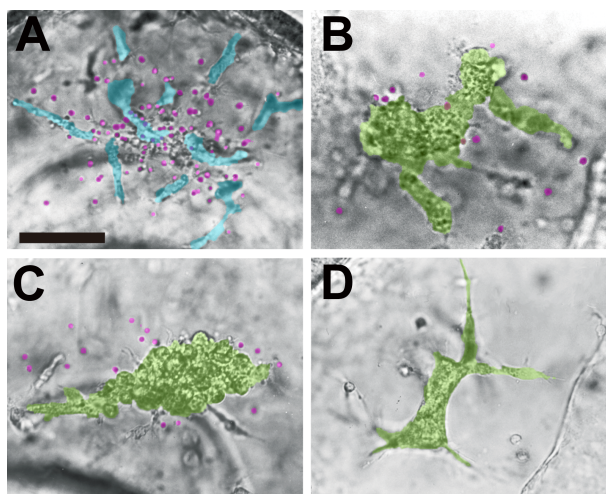
1) 食食作用の有無は注射 2 時間後に判別した。実験は、それぞれ 15~20 個体の幼生を用いて 2 回、または 3 回行い、すべての個体で同じ結果が得られた。



**Fig. 2-6 間充織細胞による非細胞性異物に対する食食性の応答**

(A, B) 少量の  $0.2\ \mu\text{m}$  のビーズ (赤、矢印及び矢尻) を食食する間充織細胞の 2 つの例。写真は間充織細胞の細胞質領域の光学的切片像。(B) では、間充織細胞の細胞突起内でビーズが観察される (矢尻)。(C, D) 単一の間充織細胞による直径  $7\ \mu\text{m}$  の油滴に対する包囲化作用。(E, F) 複数の間充織細胞による直径  $20\ \mu\text{m}$  の油滴に対する包囲化作用。(D) 及び (F) は、それぞれ (C) 及び (E) に対応した光学的切片のスタック像。緑, MC5 mAb で染色した間充織細胞; 赤, 核。スケールバーは  $10\ \mu\text{m}$ 。





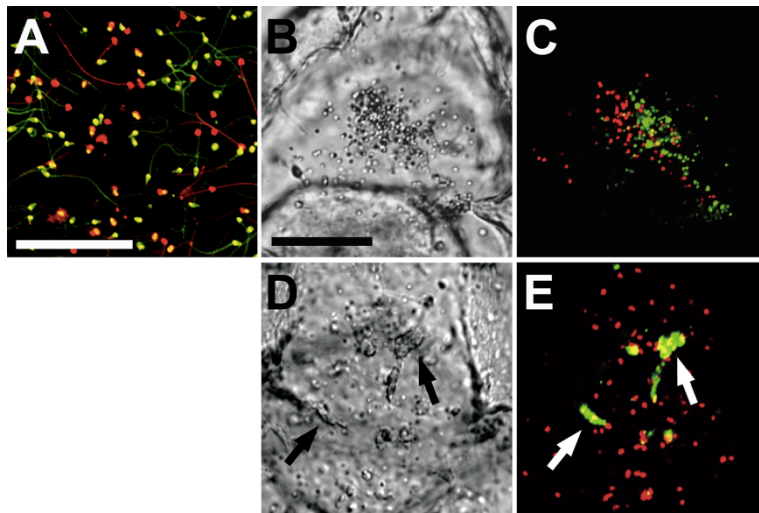
**Fig. 2-7** 生きた又は PFA で固定した同種又は異種精子に対する間充織細胞による凝集塊の形態

(A) 生きたイトマキヒトデ (同種) の精子、(B) 生きたムラサキウニの精子、(C) PFA で固定したイトマキヒトデの精子、(D) PFA で固定したムラサキウニの精子を注射して2時間後の様子。青、凝集塊を形成していない間充織細胞；緑、間充織細胞による凝集塊；マゼンタ、貪食されていない精子。間充織細胞による凝集塊の形態及び貪食され残した精子の量に明らかな差が認められる。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

## 2-5 間充織細胞による生きた同種細胞に対する免疫不応答

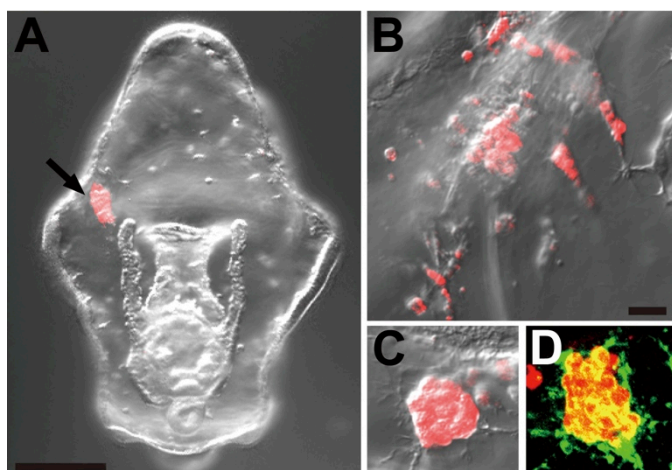
細胞性異物に対する間充織細胞の認識能力を明らかにするために、2種類の実験を行った。まず、生きた同種精子及び異種精子(*S. nudus*)をそれぞれ rhodamine B isothiocyanate (RITC) 及び fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いてラベルし (Fig. 2-8A)、等量混合した状態で胞胚腔中に注射した (Fig. 2-8B, C)。2時間後、精子注射領域の近傍で、間充織細胞による小さな複数の凝集塊が観察された (Fig. 2-8D: 矢印)。異種精子に由来する FITC シグナルの大部分はこれらの凝集塊中で検出されたが、同種精子の RITC シグナルは凝集塊周辺に散在した状態で検出された (Fig. 2-8E: 矢印)。このように、間充織細胞は、同種、異種精子が高密度で共存する環境下においても、異種精子のみを選択的に貪食することが明らかとなった。

次に、間充織細胞が、同種異個体由来の間充織細胞に対して貪食作用を示すか否か検証した。約 20~30 個の生きた間充織細胞を注射すると (Fig. 2-9A)、注射した間充織細胞は宿主個体の間充織細胞と共存し、24 時間後においても貪食されることなく胞胚腔中に散在して分布した (Fig. 2-9B)。一方、PFA で固定した間充織細胞に対しては、大きな油滴を注射した場合と同様、2 時間以内に包囲化した (Fig. 2-9C, D: Fig. 2-6E, F も参照)。



**Fig. 2-8** 同種、異種精子が混在する状態での選択的な食食作用

(A) イトマキヒトデ精子(同種)及びキタムラサキウニの精子をそれぞれ RITC 及び FITC で標識し、等量ずつ混ぜあわせた様子。(B-E)は、両精子の混合液を注射した直後 (B, C) 及び2時間後(D, E) を示している。(D, E) において、間充織細胞による小さな凝集塊に対応した FITC シグナルの集積が認められる(矢印)。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。



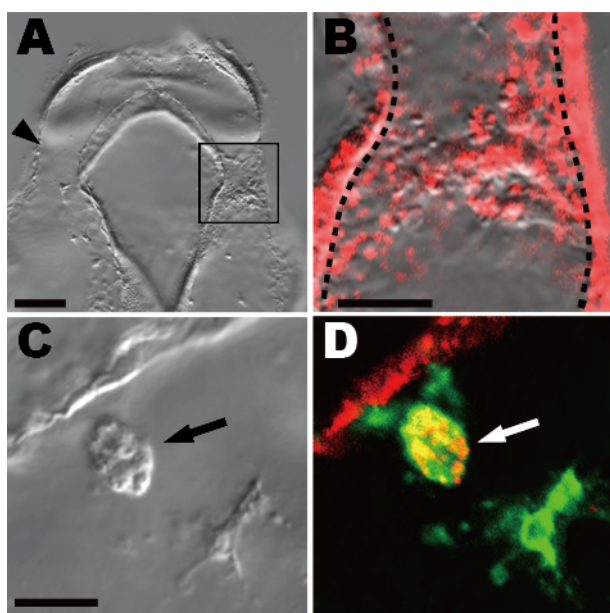
**Fig. 2-9** 生きた同種異個体由来の間充織細胞に対する免疫不応答

(A) RITC 標識した培養間充織細胞を注射した直後の様子。注射された間充織細胞は、凝集した状態で胞胚腔内に存在する(矢印)。(B) 生きた間充織細胞を注射した 24 時間後。注射された間充織細胞(赤)は胞胚腔中を分散している。(C, D) PFA で固定した間充織細胞を注射した 2 時間後。サンプルは MC5 mAb で染色した。注射された間充織細胞(赤)が宿主個体の間充織細胞(緑)に包囲化されている。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  (A); 20  $\mu\text{m}$  (B-D)。

## 2-6 病的及び生理的条件下での間充織細胞の生体防御機能

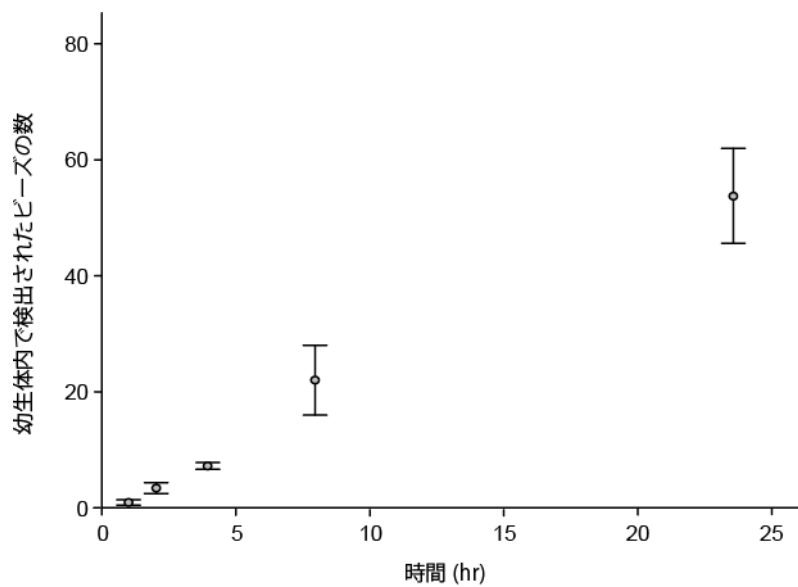
外胚葉上皮細胞マーカーである 8F7 mAb 及び間充織細胞マーカーである MC5 mAb を用いて、ビピンナリア幼生を二重染色した。その結果、いくつかの幼生において、8F7 抗原が胞胚腔中で検出され (Fig. 2-10B)、それらを間充織細胞が貪食している様子が観察された (Fig. 2-10C, D: 矢印)。このような幼生は、一部の外胚葉上皮シートが形態的に萎縮しており、不健康な状態に見える (Fig. 2-10A: 黒枠)。

生理的条件下において、間充織細胞がスカベンジャーとしての役割を担っているか否かを検証するため、直径 2  $\mu\text{m}$  のビーズを含んだ海水中で幼生を飼育した。すなわち、ビーズが体壁を通過し幼生体内に侵入するか、もし侵入するならばそれらを間充織細胞が貪食するか、という問題を調べた。ビーズを含んだ海水中で、幼生を 30 分から 24 時間インキュベートしたところ、胞胚腔中及び体壁で検出されたビーズの数は時間依存的に増加した (Fig. 2-11)。24 時間後、90%以上の幼生において、約 50 個以上のビーズが検出されただけでなく、それらは外胚葉壁直下で間充織細胞によって貪食され (Fig. 2-12B, C: 黒矢印)、胞胚腔中に貪食されていないビーズは存在しなかった。さらに、間充織細胞以外でビーズが観察された領域は、幼生全体の形態が完全或いは不完全な状態に関わらず、健康な様相を示す外胚葉壁であり (Fig. 2-12A 及び C の枠内: Fig. 2-12B, D: 黒矢尻)、不健康な様相を示す外胚葉壁では観察されなかった (Fig. 2-12C: 白矢印)。なお、幼生が餌と同様ビーズを摂食しているため (Fig. 2-12A: 白矢尻)、食道、胃、腸を構成する内胚葉壁での観察は困難であった。



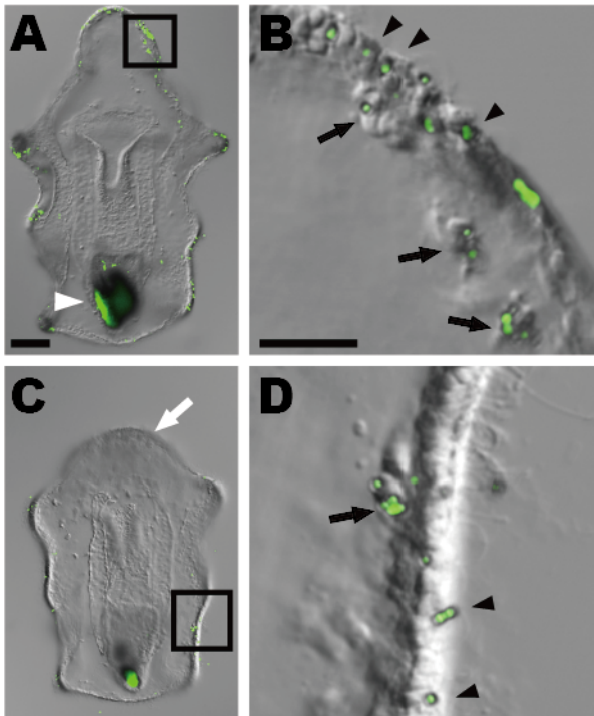
**Fig. 2-10** 不健康な様相を示す外胚葉上皮と間充織細胞の貪食作用

(A) 黒枠で示した領域の外胚葉上皮は、反対側の上皮（矢尻）と比較して萎縮した形態を示している。(B) (A)の黒枠内の拡大図。点線は胞胚腔と外胚葉壁の境界を示している。外胚葉上皮から胞胚腔中に流出した 8F7 抗原が観察される。(C, D) 8F7 抗原を取り込んでいる間充織細胞(矢印)。緑, MC5 mAb で染色した間充織細胞; 赤, 8F7 mAb で染色した外胚葉由来の上皮細胞。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (A); 20  $\mu\text{m}$  (B-D)。



**Fig. 2-11** 幼生体内に侵入したビーズの数の経時的変化

独立した2回の実験において、30個体の幼生体内で検出されたビーズの数(平均値±標準誤差)を表している。



**Fig. 2-12** 外胚葉壁を通過して体内に侵入したビーズに対する食食作用

(A) ビーズを含んだ海水中で 24 時間インキュベートした完全な形態の幼生。外胚葉壁にビーズが点在しているのが分かる。白矢尻は胃の中に含まれているビーズを示す。(B) (A)の枠内の拡大像。黒矢印で示した外胚葉直下の間充織細胞内にビーズが観察される。(C) ビーズを含んだ海水中で 24 時間インキュベートした不完全な形態の幼生。白矢印で示した異常な頭部領域ではビーズの侵入が認められない。(D) (C)の枠内の拡大像。(B)と同様、間充織細胞内(黒矢印)でビーズが観察される。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (A, C); 20  $\mu\text{m}$  (B, D)。



## 2-7 考察

第2章では、イトマキヒトデの幼生において、間充織細胞が生体防御システムを担っていることを示した。本研究で行った様々な異物の注射実験から、間充織細胞が多様な貪食行動を通して生体防御機能を示すことが明らかとなった (Fig. 2-4 から 2-9)。さらに、大部分の間充織細胞は、実際に生体防御システムが必要とされる体壁直下において動的なネットワーク構造を構築しながら機能していることを示唆した (Fig. 2-1, 2-10, 2-12)。本研究で得られた4つの重要な発見に関して、以下に述べる。

### 間充織細胞細胞とマクロファージの生体防御行動における類似性

まず一つは、幼生の胞胚腔中に注射した種々のサイズの異物に対する間充織細胞の行動である。単一の間充織細胞は、非細胞性の異物に対して2つの異なる応答を示した。間充織細胞より小さなビーズに対しては、間充織細胞は貪食作用によりビーズを細胞質に取り込んだ (Fig. 2-6A, B)。一方、間充織細胞と同程度の大きさの油滴に対する応答は、小さなビーズに対する応答とは明らかに異なり、間充織細胞は細胞表面を拡張して油滴を包囲化した (Fig. 2-6C, D)。この行動は、「不成功の貪食作用」(frustrated phagocytosis) と呼ばれる行動と一致している。「不成功の貪食作用」は、*in vitro* において抗体によってオプソニン化された大きな異物の平らな表面に対し、マクロファージがまるでそれを取り込もうとするかのように最大限伸展する様子から特徴付けられた行動である (Cannon and Swanson, 1992; Heiple et al., 1990; Takemura et al., 1986)。マクロファージは、細胞内膜を細胞表面に動員することにより、異物の形に関係なく、自身の 2.5 倍もの表面積の異物を覆うことができると報告されている (Cannon and Swanson, 1992)。間充織細胞による通常の貪食作用及び「不成功の貪食作用」という2つの細胞行動は、幼生の生体防御機能において哺乳類マクロファージと等価であり、間充織細胞が胞胚腔中の異物を隠すことによってスカベンジャーとして機能していることを示唆している。

間充織細胞による生体防御行動において最も興味深い点は、比較的多量な異物に対して多核体を形成するという点である (Fig. 2-5)。この多核体形成は、大きな油滴を包囲化する際にも生じていると考えられる (Fig. 2-6E, F)。多核化は、

異物に対して間充織細胞が集積した後、細胞融合によって生じている。間充織細胞による細胞融合能力は、*in vitro*において過去に報告されている(Kaneko et al., 1990)。また、炎症反応の際、マクロファージは融合能を介して多核体を形成することが知られている(Anderson, 2000; Chambers and Spector, 1982; Papadimitriou and Walters, 1979)。この多核体形成の生理学的意義は、2つの観点から説明されている。すなわち、大量の異物や自分よりはるかに大きな異物を胞胚腔中で隔離できる。また、細胞融合により多核体自体が1個の細胞として内外の極性を有するため、外側の胞胚腔中でなく内部の異物にのみ消化酵素を分泌することができる(Chen et al., 2007; Vignery, 2000)。

### 細胞性異物の認識における間充織細胞の特性

2つ目の重要な結果として、細胞性異物に対する間充織細胞の認識能力を明らかにした。その結果は以下のようにまとめることができる: (1) 間充織細胞は、同種精子が高密度で存在している環境下においても、異種精子を選択的に貪食する(Fig. 2-8); (2) 間充織細胞は、生きた間充織細胞は貪食せず、共存する(Fig. 2-9); (3) 間充織細胞は、PFA処理又は未処理の同種または異種精子に対し、程度の異なった凝集塊形成を示す(Fig. 2-7)。これらの結果は、間充織細胞が、同種細胞を識別することにより、異物を認識していることを示唆している。同時に、間充織細胞が、多様な貪食応答を可能にする鋭敏な認識メカニズムを備えていることも示唆される。

### 病的ならびに生理的状況下における間充織細胞の機能実体

3つ目は、病的及び生理的条件下において、間充織細胞が、外胚葉壁から胞胚腔中に落ち込んだ上皮細胞の残渣や外胚葉壁を通過して体内に侵入したビーズを貪食することを明らかにした点である(Fig. 2-10, 2-12)。これらの結果は、間充織細胞が、胞胚腔中を健康な状態として維持するためにスカベンジャーとして機能していることを示唆している。しかし、ビーズのインキュベート実験の結果は、慎重に考察する必要がある。上皮細胞間の結合は、ある条件下において上皮シート構造を維持したまま一過的に解消され、その結果、イムノグロブリンや分解酵素などの巨大分子が体外環境から胞胚腔中に通過することができ

るという報告がある(Kaneko et al., 1995)。現在、ビーズが細胞間隙を通過しているのか、細胞内を通過しているのかは明らかになっていない。また、これまで、海産無脊椎動物の幼生においてこのような異物の通過現象が実際に自然の海で生じているのかは検討されていない。もし生じているのであれば、ヒトデ幼生の生体防御システムにおいて、間充織細胞のターゲットは海産バクテリアであろう。

### 間充織細胞のネットワーク構造

4つ目の重要な発見は、幼生体内における間充織細胞の空間的な配置及びその動態である。大部分の間充織細胞によって体壁直下で構築されるネットワーク構造(Fig. 2-1B)は、上述した病的及び生理的条件下における生体防御システムにとって非常に効果的だと考えられる。興味深いことに、ネットワークを構成する各間充織細胞は、互いに接触したり分離したりしながらその位置を変化させ続けている(Fig. 2-1C-F)。おそらく、間充織細胞は、他の間充織細胞と協調して異常事態に素早く応答するために、お互いに情報を共有しながら、病的な状態や異物の侵入を監視しているのであろう。実際、*in vitro*において、間充織細胞がお互いにコミュニケーションしているという報告がなされている(Kaneko et al., 1990)。一方、幼生体内において、貪食作用は局所的に生じているという事実には注意する必要がある。すなわち、間充織細胞によるネットワーク構造は幼生の全身をカバーしているものの、間充織細胞がコミュニケーションする領域は非常に限定されていると考えられる。

以上、本研究における解析を通して、ヒトデ類の幼生の生体防御現象に関する Metchnikoff 以来のデータだけでなく、ヒトデ幼生の間充織細胞が示す生体防御システムに細胞レベルでの新たな知見を提示することができた。

## 材料と方法

### 実験動物

イトマキヒトデ *A. pectinifera* を、5月上旬に東京湾、6月上旬に英虞湾、9月上旬に陸奥湾で採集した。これらは 15°C の恒温循環水槽内において pH 8.0 の人工海水 (Artificial seawater, ASW: MARINE ART SF-1, Tomita Pharmaceutical) で飼育した。

### 受精ならびに幼生の飼育

雌個体より摘出した卵巣を  $1 \times 10^{-6}$  M 1-methyladenine (SIGMA) / ASW 中で 15 分間、20°C で処理することにより、卵成熟、放卵を誘発し、成熟卵を得た (Kanatani, 1969)。続いて雄個体より精巣を摘出し、ASW に懸濁して精子懸濁液を得た。これを成熟卵の入った海水に滴下し受精させた。受精卵体積 1 ml 当たり 300 ml 程度の ASW を加え、20°C で穏やかに攪拌し続けながら受精卵からビピンナリア幼生まで発生を進行させた。

### モノクローナル抗体

免疫組織化学において、MC5 及び 8F7 モノクローナル抗体 (mAb) を、それぞれ間充織細胞及び外胚葉上皮細胞マーカーとして用いた。両抗体は、Kaneko らによって作製されたものである (Kaneko et al., 1990)。MC5 mAb は、ヒトデ胚から得られた純粋な間充織細胞集団を抗原として作製され、間充織細胞の膜表面に存在する 73 kDa の分子に強く反応する (Kadota et al., 2001)。8F7 mAb は解離したヒトデ胚の上皮細胞を抗原として作製され、詳しい抗原性は決定されていないが、外胚葉上皮細胞の細胞質領域の頂端側に分布する顆粒状の物質を認識する。Monoclonal Typing Kit (Birmingham res.) を用いて、MC5 及び 8F7 mAb のサブクラスはそれぞれ IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> であることを同定した。

## 免疫組織化学染色

ビピンナリア幼生は、4% PFA (Sigma) / ASW を用いて、室温で 1 時間固定した。これらを、生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で 3 回洗浄後、冷アセトン (Wako) を用いて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 10 分間、後固定を施し、PBS で 3 回洗浄した。その後、一次抗体として MC5 mAb を加え、室温で 20 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体として Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L) (Molecular Probes: PBS で 2000 倍希釈) を加え、室温で 20 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。核染色を行う際には、二次抗体と共に、PI ( $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ : Wako) を加えた。MC5 及び 8F7 mAb による二重染色を施す場合、MC5 mAb によって染色したサンプルに対し、一次抗体として 8F7 mAb、二次抗体として Texas Red-conjugated goat anti-mouse IgG<sub>2a</sub>( $\gamma$ 2a) (Molecular Probes: PBS で 2000 倍希釈) を用いた。

## 顕微注射実験のための異物

細胞性異物は以下のように準備した。納豆菌 *Bacillus natto* (グラム陽性菌) 及び大腸菌 *Escherichia coli* (グラム陰性菌) は LB medium (Qbiogene Inc) 中で 24 時間培養した後、 $1700\times\text{g}$  で 5 分間遠心し、ペレットを ASW で洗浄した。イトマキヒトデ *A. pectinifera* 及びキタムラサキウニ *S. nudus* の精子は、精巢を細断した後 ASW 中で懸濁して得た。 $200\times\text{g}$  で 5 分間遠心して結合性組織細胞を除去した精子懸濁液を用いて、精子の蛍光標識を行った。イトマキヒトデ及びキタムラサキウニの精子懸濁液に、ASW で溶解した rhodamine B isothiocyanate (RITC, Sigma) 又は fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma) を終濃度  $0.6\ \text{mM}$  となるように加え、室温で 1 時間インキュベートし、 $1700\times\text{g}$  で 5 分間の遠心により ASW で 3 回洗浄した。

間充織細胞は、過去の報告をもとに準備した (Kaneko et al., 1995)。中期原腸胚の解離細胞を長期間互いに接触できないように維持し、その後プラスチックシャーレ上でインキュベートした。この操作により、プラスチックシャーレ上には、間充織細胞のみで構成される細胞集団となった。この間充織細胞を、trypsin ( $1\ \text{mg}/\text{ml}$ ) を含んだ ASW で、室温で 5 分間処理することによりシャーレから回収した (Kaneko et al., 2005)。上皮細胞及び間充織細胞は、終濃度  $0.6\ \text{mM}$

の RITC を含んだ ASW で、室温で 30 分間処理することにより標識し、その後 ASW で 3 回洗浄した。いくつかの実験では、精子、間充織細胞及び上皮細胞を 4% PFA を含んだ ASW で固定した。間充織細胞以外の細胞性異物は、ASW で懸濁後、OD<sub>600</sub> を 1.0 に調製した。

非細胞性異物としては、蛍光標識ポリスチレンビーズ(Fluoresbrite carboxy YG microsphere, Polysciences Inc.; 直径 0.2 及び 2.0  $\mu\text{m}$ )及びシリコンオイル (Shin-Etsu Chemical)を用いた。

## 顕微注射

Kiehart によって開発された顕微注射用チャンバー中に幼生を保持した (Kiehart, 1982)。全ての細胞性異物は、マイクロニードル(針先の直径約 10  $\mu\text{m}$ ) に注入後、FemtoJet(Eppendorf)を用いて、光学顕微鏡(Olympus BH)下で幼生の胞胚腔中に顕微注射した。蛍光ビーズ及びシリコンオイルは、マイクロニードル(針先の直径 2 又は 10  $\mu\text{m}$ )に注入し、マニピレーター(Narishige, 1M-188)を用いて比較的少量を顕微注射した。

## 蛍光ビーズ存在下での幼生のインキュベーション

約 800 個体の幼生を、40  $\mu\text{l}$  の蛍光ビーズを含んだ 6 ml の ASW 中で、20°C において種々の時間インキュベートした。ASW で 4 回洗浄後、4% PFA を含んだ ASW で幼生を固定した。

## 蛍光及び光学顕微鏡観察

生きた又は固定したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview, Olympus)又は光学顕微鏡(Olympus BH)で観察した。各種の染色を施したサンプルは、アルゴンレーザー(487 nm)あるいはヘリウムネオンレーザー(543 nm)を照射して観察した。

## 透過型電子顕微鏡観察

顕微注射実験によって得られた幼生を、2.5% glutaraldehyde (Polyscience) を含んだ ASW 中で、室温で 2 時間固定した。その後、0.1% OsO<sub>4</sub> (Polyscience) を含んだ ASW 中で 4 時間、後固定を施し、epoxy resin (Nissin EM) 中に包埋した。超薄切片は、Porter-Blum MT2 ultramicrotome によって作製した。その後、4% uranium acetate で 20 分間、その後 0.4% lead citrate で 10 分間染色した。観察は、JEOL 1001 electron microscope (Hitachi) において、80 kV で行った。

## 細胞数測定

幼生 40 個体を、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid を含んだ 2 ml の 1.2 M glycine 溶液(washing medium; WM)で簡単に洗浄した。その後、0.1 mg/ml trypsin を含んだ 0.2 ml の WM 中で単一の細胞に解離し、Thoma 型血球計算盤(Merk)を用いて細胞数を測定した。間充織細胞の数は、MC5 mAb 及び PI で二重染色を施したサンプルに対して、共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview, Olympus)による重ね合わせ像を得た後、MC5 陽性シグナル中の PI シグナルの数により測定した。

## 第 3 章

間充織細胞による免疫応答の細胞内調節因子:

*ApDOCK* タンパク質



### 3-1 緒言

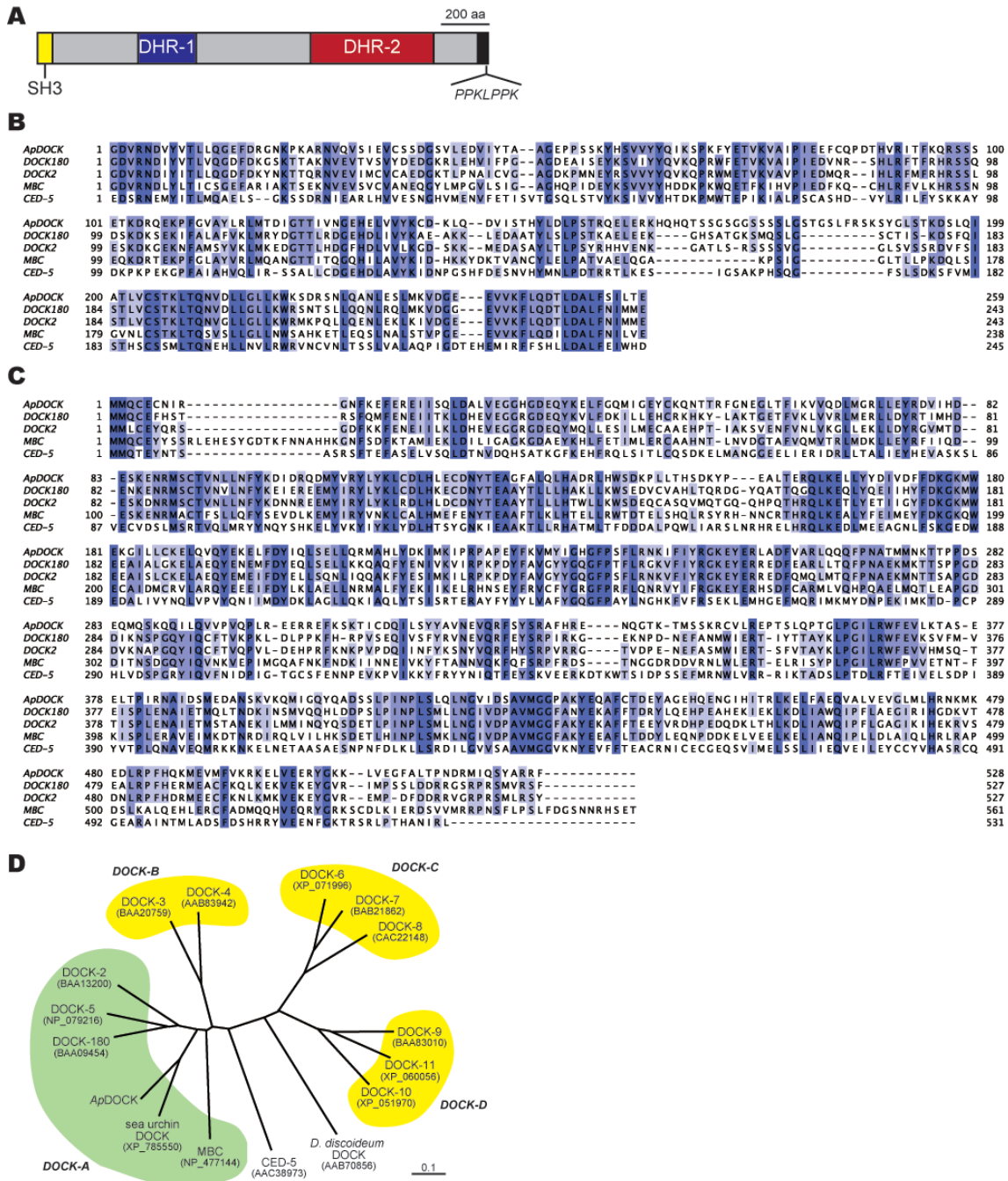
イトマキヒトデ幼生の生体防御システムを深く理解するためには、異物に対する免疫応答の過程で間充織細胞のダイナミクスを制御する分子メカニズムを明らかにする必要がある。第3章では、間充織細胞の防御行動に対する細胞内制御因子の候補として DOCK180 スーパーファミリータンパク質に着目する。DOCK180 関連タンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子としてよく知られており、DOCK homology region-1 (DHR-1)及び DHR-2 ドメインと呼ばれる2つのドメインを共通して有している(Cote and Vuori, 2007)。これらのドメインは、DOCK180 スーパーファミリータンパク質の細胞膜へのリクルートに関与しており、細胞膜へリクルートされたこれらのタンパク質は ELMO や Crk、Rac タンパク質等と協調してアクチン細胞骨格を再配置する(Cote and Vuori, 2007; Reif and Cyster, 2002)。また、DOCK180 スーパーファミリータンパク質は、哺乳類上皮細胞の伸展や移動(Sanders et al., 2009)、線虫 *Caenorhabditis elegans* におけるアポトーシス細胞に対する貪食作用や distal tip cell の移動(Wu and Horvitz, 1998)、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* における上皮細胞の移動や筋芽細胞の融合(Erickson et al., 1997; Rushton et al., 1995)、ゼブラフィッシュにおける筋芽細胞の融合(Moore et al., 2007)、ラット海馬ニューロンの軸索成長(Watabe-Uchida et al., 2006)等、いくつかの重要な細胞行動を制御していることが明らかとなっている。このように、DOCK180 関連タンパク質は、その構造が数多くの動物種において進化的に保存されており、多様な細胞種のダイナミックな細胞行動を細胞内で制御している。興味深いことに、DOCK180 スーパーファミリータンパク質の一種である DOCK2 は、B細胞及びT細胞(Nishihara et al., 1999)、好中球(Kunisaki et al., 2006a)、ナチュラルキラー細胞(Kunisaki et al., 2006b)、マクロファージ(Nishihara et al., 1999)等の造血系細胞において特異的に発現している。これらの造血系細胞における DOCK2 の制御メカニズムは、走化性移動の観点から精力的に研究が進められている(Fukui et al., 2001; Kunisaki et al., 2006a; Reif and Cyster, 2002)。

本研究では、イトマキヒトデ胚の間充織細胞を材料に作製した cDNA ライブラリーから DOCK180 遺伝子のオーソログを探索し、得られた遺伝子に関して、幼生の自然免疫システムにおける間充織細胞のダイナミクスの制御能を明らかにすることを目的とする。

### 3-2 *ApDOCK* タンパク質の分子構造

イトマキヒトデ胚の培養間充織細胞の cDNA ライブラリーから、ヒト DOCK180 遺伝子のオーソログ、*ApDOCK* (GenBank accession no. AB669902) を同定した。*ApDOCK* 遺伝子の全長は約 5800 bp であり、1866 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。*ApDOCK* タンパク質の構造の模式図を Fig. 3-1A に示す。*ApDOCK* タンパク質は、DOCK180 タンパク質スーパーファミリーの機能上重要とされる進化的に保存された 2 つのドメイン、DHR-1 及び 2 ドメインを有していた (Fig. 3-1B, C)。さらに、N 末端側に Src Homology 3 (SH3) ドメイン、C 末端側に Crk 結合モチーフ (PPxLPxK) を含むプロリンリッチ領域をも有していた。これらのドメイン構造は、哺乳類 DOCK180 タンパク質と相同であった (Cote and Vuori, 2002)。

Fig. 3-1D に DOCK180 スーパーファミリーの分子系統樹を示した。この中で、*ApDOCK* タンパク質は DOCK-A サブファミリーに分類され、ヒトの DOCK180 (70%)、DOCK2 (67%)、DOCK5 (66%) のみならず、ウニ DOCK (84%)、ショウジョウバエ Myoblast City (MBC; 55%) とも高い類似性を示した。また、*ApDOCK* タンパク質を特徴付ける SH3、DHR-1、DHR-2 ドメインは、ヒト DOCK180 とそれぞれ 55%、59%、49% と高い類似性を示した。



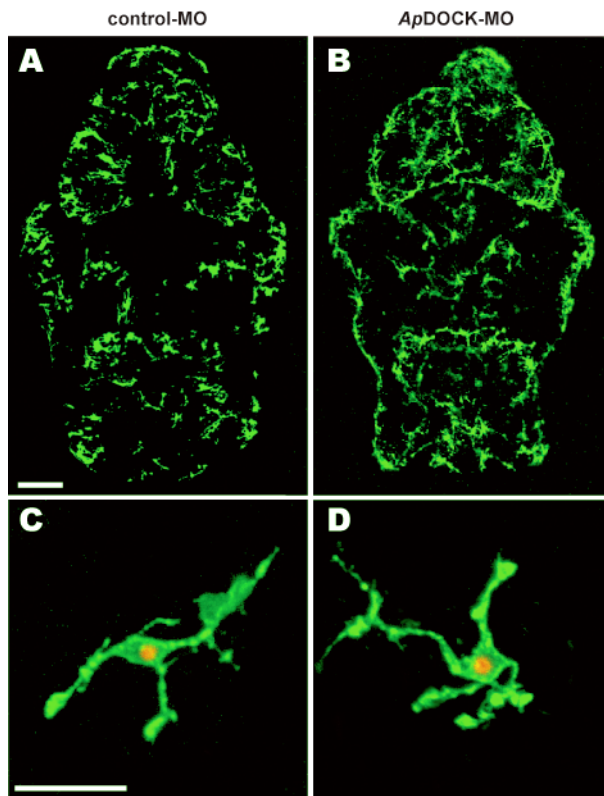
**Fig. 3-1 ApDOCK タンパク質の配列解析**

(A) ApDOCK タンパク質の構造の模式図。DHR-1(青色)、DHR-2(赤色)ドメインに加えて、N 末端側に SH3 ドメイン(黄色)、C 末端側にプロリンリッチ領域(黒色)を有している。このプロリンリッチ領域には、Crk 結合モチーフ(PPxLPxK)が含まれている。(B, C) DHR-1(B)及び DHR-2(C)ドメインのマルチプルアラインメント。ApDOCK タンパク質、DOCK180(BAA09454)、DOCK2(BAA13200)、MBC(NP\_477144)、Cell Death

abnormal-5 (CED-5; AAC38973)の各ドメインを ClustalW でアラインメントした。各配列で 50%以上が一致したアミノ酸残基を青色のグラデーションで示した。(D) DOCK180 タンパク質スーパーファミリーの分子系統樹。スケールバーは、アミノ酸残基 0.1 個の置換を示している。4つのサブファミリーは、Cote and Vuori の定義に従っている(Cote and Vuori, 2002)。ApDOCK タンパク質以外のタンパク質に関しては、National Center for Biotechnology Information のアクセッション番号を記載している。

### 3-3 モルフォリノアンチセンスオリゴが間充織細胞の時空間的分布及び形態に及ぼす影響

*ApDOCK* タンパク質の機能阻害に先立ち、3 つの異なる濃度 (1.2, 12, 120  $\mu\text{M}$ ) のモルフォリノアンチセンスオリゴ (*ApDOCK*-MO) またはコントロールモルフォリノオリゴ (control-MO) を未受精卵に注射し、受精後発生させた。全ての濃度において、両 MO で処理したサンプルは正常な発生スケジュールを示し、中期原腸胚期における原腸先端からの間充織細胞の出現、その後の上皮シート直下での分布のタイミングに違いは認められなかった (それぞれ  $n > 100$ )。MC5 mAb を用いて、120  $\mu\text{M}$  の MO で処理した受精後 4 日の *ApDOCK*-MO 幼生及び control-MO 幼生における間充織細胞の時空間的分布を調べたところ、両サンプルにおいて MC5 抗原の産生は正常であった (Fig. 3-2A, B)。大半の間充織細胞は外胚葉繊毛帯及び体腔嚢、消化管壁に沿って分布していた。さらに、両サンプルの個々の間充織細胞の形態にも差は認められず、どちらの間充織細胞も高度に細胞突起を発達させている様子が観察された (Fig. 3-2C, D)。このように、両 MO 幼生において間充織細胞の時空間的分布及び形態に差は認められず、これらの特徴は、第 2 章で示した正常発生における分布及び形態と同様であった (Fig. 2-1B 及び 2-2 を参照)。



**Fig. 3-2** 120  $\mu\text{M}$  の control-又は *ApDOCK*-MO を注射した卵から得られたピピンナリア幼生(受精後 4 日)における間充織細胞の空間的分布及び形態  
 (A, B) control-MO(A)及び *ApDOCK*-MO 幼生(B)における間充織細胞の空間的分布。  
 (C, D) control-MO(A)及び *ApDOCK*-MO 幼生(B)における間充織細胞。MC5 mAb で染色した幼生の光学的切片のスタック像。(C, D)では、PI 染色により核を赤で示している。  
 スケールバーは、50  $\mu\text{m}$ (A, B); 5  $\mu\text{m}$ (C, D)。

### 3-4 *ApDOCK* タンパク質の機能障害が間充織細胞による異物への移動に及ぼす影響

間充織細胞は、注射された異物に対して活発に移動、集積する（第2章参照）。これらの間充織細胞のダイナミクスに対する *ApDOCK* タンパク質の制御機能を調べるために、120  $\mu\text{M}$  の MO で処理した受精後4日の control-MO 幼生及び *ApDOCK*-MO 幼生に大きな油滴（直径 20  $\mu\text{m}$ ）を注射した。油滴は、間充織細胞がほとんど分布していない幼生の頭部領域の胞胚腔中心部に注射した（Fig. 3-3A: 赤丸）。control-MO 幼生では、間充織細胞は注射後2時間において典型的な防御行動を示し、6~8個の間充織細胞が油滴に向かって集積した後、葉状仮足を油滴表面に伸展させた（“包囲化作用”： Fig. 3-3B, control-MO）。この際、間充織細胞による移動、集積は、注射後30分を超えた頃に活発になった。続いて60分後には包囲化行動が顕著になり、その後包囲化は持続した。一方、*ApDOCK*-MO 幼生では、油滴を注射して2時間後の胞胚腔領域は注射直後と違いがなかった（Fig. 3-3B, *ApDOCK*-MO）。一部の間充織細胞が一過的に油滴に対して応答する様子が観察される場合もあったが、多くの場合で、間充織細胞による異物への移動は観察されなかった。

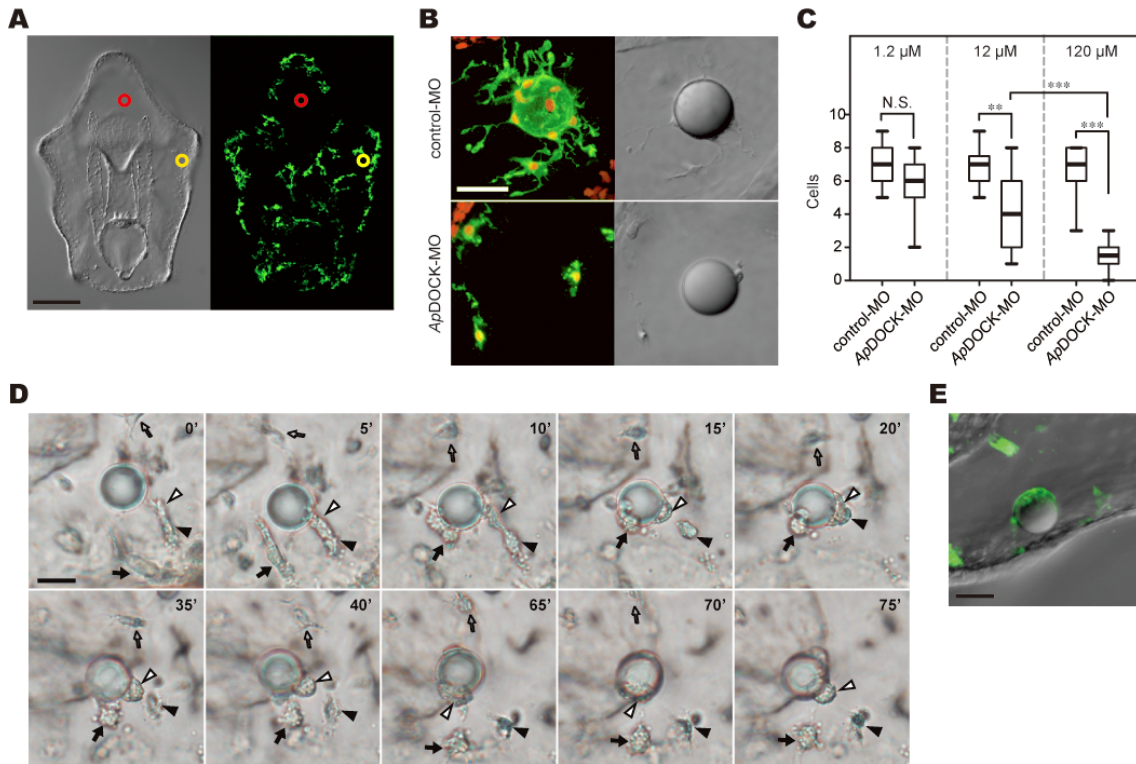
このような間充織細胞における免疫行動の抑制が、*ApDOCK*-MO による特異的な翻訳阻害によるものかという問題を明らかにするために、注射2時間後において油滴に接触している間充織細胞数の *ApDOCK*-MO に対する濃度依存性を調べた（Fig. 3-3C）。その結果、*ApDOCK*-MO 濃度の増加に伴い、油滴に接触している間充織細胞数は有意に減少していった（Fig. 3-3C）。一方、control-MO 幼生では、MO 濃度が増加しても油滴を包囲化する間充織細胞数に変化は認められず、常に6~8個で一定であった（Fig. 3-3C）。これらの結果は、独立した2回の実験において、各 MO 濃度で油滴を注射された35個体から得られたものである。120  $\mu\text{M}$  以上の MO 濃度は調べていない。

### 3-5 ApDOCK タンパク質の機能障害が間充織細胞による包囲化作用に及ぼす影響

次に、受精後 4 日の ApDOCK-MO 幼生において、間充織細胞が密に分布している外胚葉上皮直下 (Fig. 3-3A; 黄丸) に Fig. 3-3B の場合と同じサイズの油滴を注射した。Fig. 3-3D は、注射した油滴に対する 4 個の間充織細胞の行動を示している。注射直後から 10 分の間に、2 個の間充織細胞 (黒矢印及び白矢尻) が油滴に接近した後、接触した。その後の 10 分間で、3 番目の間充織細胞 (黒矢尻) が先の 2 個の間充織細胞に加わった。しかし 75 分後、2 個の間充織細胞 (黒矢印及び黒矢尻) は油滴から離れ、残った 1 個の間充織細胞 (白矢尻) のみが油滴に接触し続けた。一方、白矢印で示した間充織細胞は、油滴までの距離が油滴に接触した他の 3 個の間充織細胞と同様であるにもかかわらず、油滴に近づくことなく遠ざかっていった。さらに、指摘すべき重要な行動として、control-MO 幼生の場合と比較して ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞は油滴上で一旦葉状仮足を伸展させても、この伸展を維持できず収縮させる傾向が認められた。このように、ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞は油滴を十分に包囲化することが出来なかった (Fig. 3-3E)。この包囲化作用の不全は、調べた 35 個体全ての ApDOCK-MO 幼生で観察された。これに対し、control-MO 幼生では、調べた 20 個体全てにおいて完全に油滴を包囲化した。

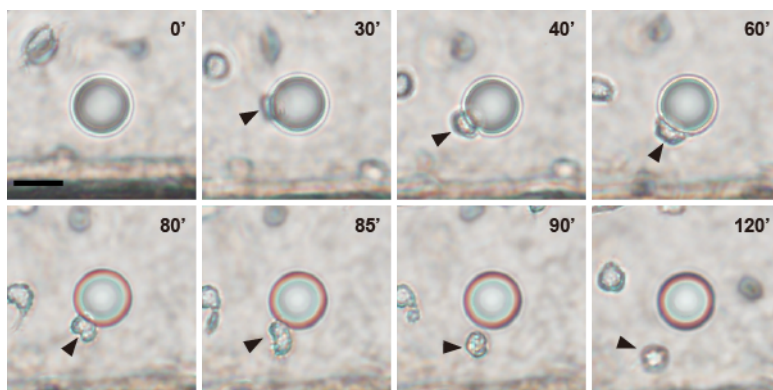
間充織細胞の免疫行動に対する ApDOCK タンパク質の関与が、間充織細胞の上皮シート直下への移動が進行している発生初期においても認められるか否かを調べるために、Fig. 3-3 と同様の油滴を受精後 30 時間の control-MO 原腸胚に注射した。その結果、この原腸胚の間充織細胞は、油滴に接触しても包囲化せずに上皮シート直下への移動を続けた (Fig. 3-4)。これらの行動は、Fig. 3-3D で観察された ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞の行動とよく似ていた。





**Fig. 3-3** 大きな油滴に対する間充織細胞の免疫応答における *ApDOCK-MO* の影響

(A) 油滴を注射した 2 つの胞胚腔領域。MC5 mAb で染色した受精後 4 日のビピンナリア幼生のノマルスキー明視野像ならびに 1  $\mu\text{m}$  間隔で撮影した光学的切片のスタック像。赤丸は間充織細胞がほとんど分布していない頭部の胞胚腔領域、黄丸は間充織細胞が密に分布している外胚葉上皮シート近傍の胞胚腔領域を示している。(B) 120  $\mu\text{M}$  の MO を注射した卵から得たビピンナリア幼生(受精後 4 日)の間充織細胞による免疫応答。油滴は(A)の赤丸で示した胞胚腔領域に注射している。写真はノマルスキー明視野像ならびに対応する光学的切片のスタック像。間充織細胞及び核をそれぞれ MC5 mAb(緑)及び PI(赤)で染色している。(C) 間充織細胞による免疫応答に対する *ApDOCK-MO* 及び control-MO の濃度依存性。注射 2 時間後に油滴に接触している間充織細胞数を示している(各 35 個体)。間充織細胞数は、PI で染色された核の数で決定した。使用した MO の濃度は図に示した。\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; N.S., 有意差なし ( $t$  検定)。(D) (A) の黄枠領域に注射した油滴に対する間充織細胞の免疫応答。写真は、光学顕微鏡下で行ったタイムラプス動画から抜き出したものである。時間は注射後の時間を示す。黒矢印及び黒矢尻で示した 2 つの間充織細胞が、油滴に接触後離れていく。(E) *ApDOCK-MO* 幼生の間充織細胞による不完全な包囲化作用。油滴を完全に覆っていない。注射 2 時間後に MC5 mAb で染色した幼生。スケールバーは、100  $\mu\text{m}$ (A); 20  $\mu\text{m}$ (B, D, E)。

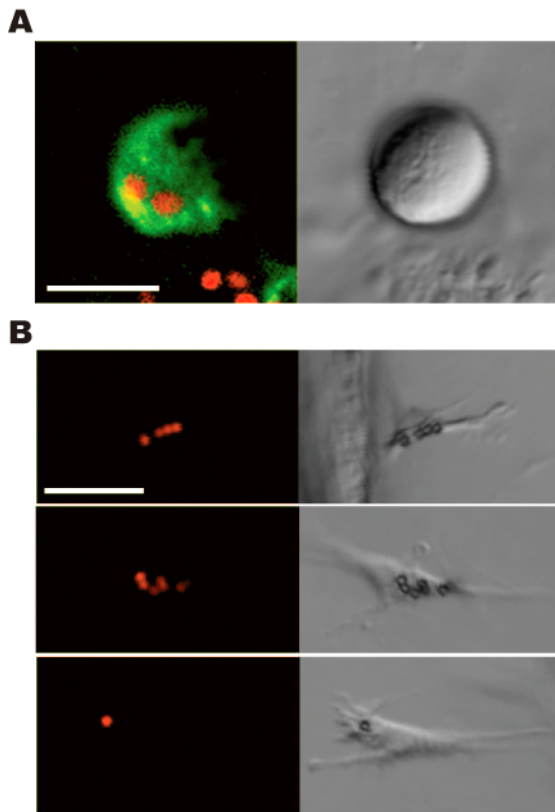


**Fig. 3-4 control-MO 原腸胚(受精後 30 時間)の間充織細胞による大きな油滴に対する応答**

写真は、光学顕微鏡下で行ったタイムラプス動画から抜き出したものである。時間は注射後の時間を示す。矢尻で示した間充織細胞は、一旦は油滴に接触するが、その後油滴から離れて遠ざかっていく。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

### 3-6 *ApDOCK* タンパク質の機能阻害が間充織細胞による細胞融合及び貪食作用に及ぼす影響

次に *ApDOCK*-MO 幼生(受精後 4 日)における間充織細胞の多核体形成及び貪食作用に関して調べた。これらのダイナミクスを調べるためには、間充織細胞と異物の接触が必要であるため、油滴またはマイクロビーズを外胚葉上皮シート直下(Fig. 3-3A, 黄丸で示した領域)に注射した。まず細胞融合に関しては、油滴表面で一過的に伸展している間充織細胞の核を可視化することにより判断した。MC5 mAb 及び PI で幼生を二重染色したところ、細胞融合が生じたことを示す、細胞質に 2 つの核を有する間充織細胞が観察された(Fig. 3-5A)。同様の結果が *ApDOCK*-MO 幼生 20 個体中 17 個体で観察された。同様のアプローチで、*ApDOCK*-MO 幼生において間充織細胞によるマイクロビーズの活発な取り込みも観察された (Fig. 3-5B)。*ApDOCK*-MO 幼生、control-MO 幼生の間で、マイクロビーズに対する貪食活性に差は認められなかった (各 n = 15)。



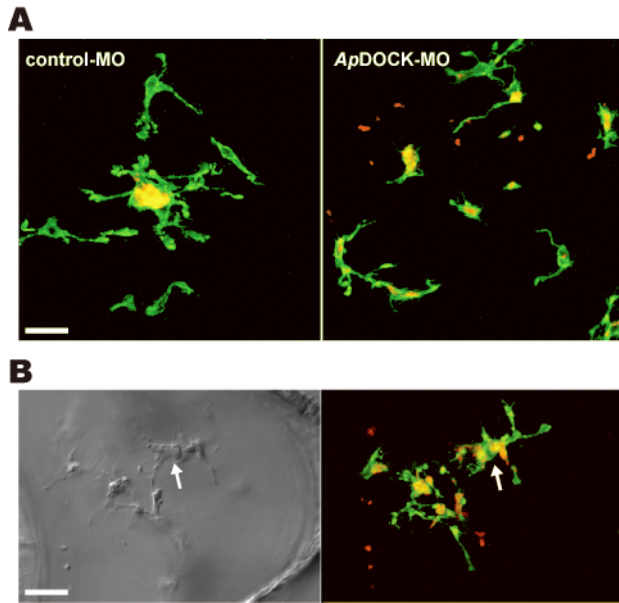
**Fig. 3-5** *ApDOCK-MO* 幼生における大きな油滴及びマイクロビーズに対する免疫応答

受精後4日の *ApDOCK-MO* 幼生の上皮シート近傍に油滴(A)又はマイクロビーズ(B)を注射した2時間後の様子。(A) MC5 mAb(緑)及びPI(赤)で染色した幼生の光学的切片のスタック像ならびに対応するノマルスキー明視野像。油滴上に伸展した間充織細胞で核(赤)が2つ観察される。(B) 光学的切片像ならびに対応するノマルスキー明視野像。これら3つの写真において、3個の間充織細胞がそれぞれ4、6、1個のマイクロビーズを取り込んでいる。スケールバーは、20  $\mu\text{m}$ 。

### 3-7 バクテリアに対する *ApDOCK-MO* 幼生の間充織細胞の免疫応答

より現実的な免疫応答を調べるために、細胞性異物として RITC 標識したバクテリア(大腸菌)の注射を試みた。受精後 4 日の幼生の胞胚腔の中心部にバクテリアを注射した 2 時間後、*control-MO* 幼生の間充織細胞は凝集塊を形成し、バクテリアを包囲化した (Fig. 3-6A, *control-MO*)。一方、*ApDOCK-MO* 幼生においては、間充織細胞は凝集塊を形成することなく、個々の細胞が独立してバクテリアを貪食した (Fig. 3-6A, *ApDOCK-MO*)。さらに、*ApDOCK-MO* 幼生ではバクテリアの食べ残しも胞胚腔の広い領域で観察された。これらの結果は、観察した *control-MO* 幼生 (30 個体)、*ApDOCK-MO* 幼生 (23 個体)の全てにおいて同様であった。

Fig. 3-6B は、RITC 標識したバクテリアを *ApDOCK-MO* 幼生の外胚葉上皮シート近傍に注射した場合の応答を示している。Fig. 3-3A で示したように、この領域では間充織細胞の数が比較的多い。この場合も、大半の間充織細胞はそれぞれ独立してバクテリアを貪食し、明らかな凝集塊形成を示さなかった。しかし稀に、2 個以上の間充織細胞が細胞体を密着させて融合している様子が観察された (Fig. 3-6B)。このような状態においても、貪食されていないバクテリアが散見された。同様の観察結果は、調べた *ApDOCK-MO* 幼生 7 個体全てにおいて得られた。

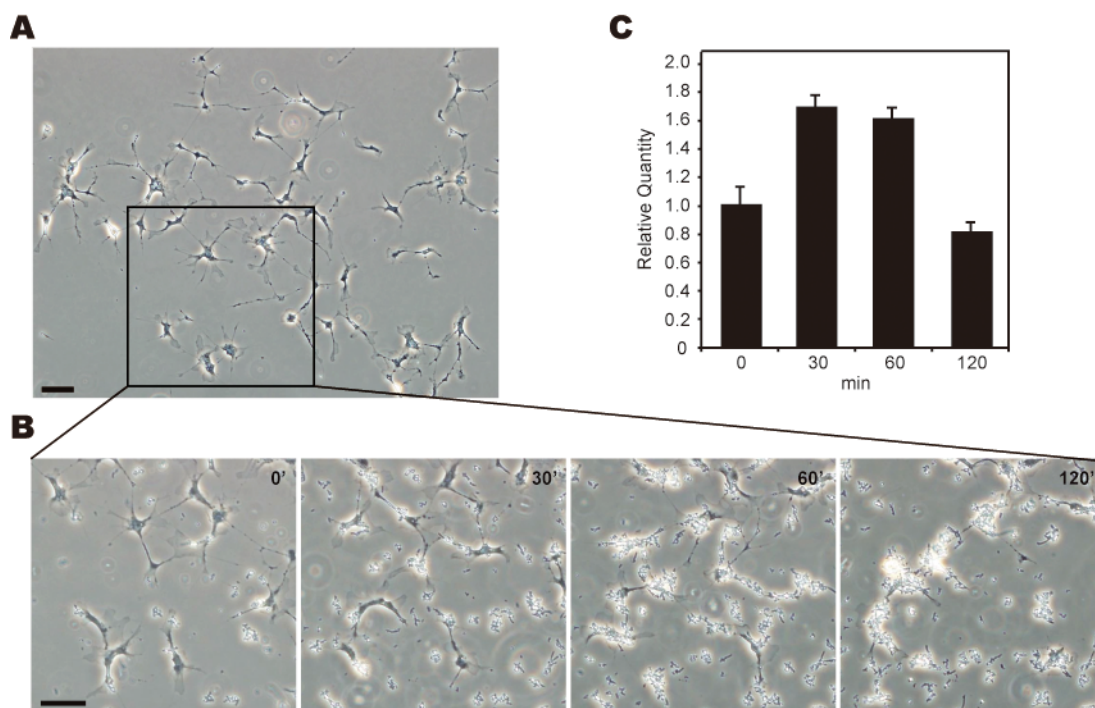


**Fig. 3-6** *ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞が示す細菌に対する免疫応答  
 受精後 4 日の *control*-MO または *ApDOCK*-MO 幼生の頭部胞胚腔領域に RITC 標識した細菌(赤)を注射し、2 時間後に MC5 mAb(緑)で染色した。(A) Fig. 3-3B と同様に、胞胚腔の中心部に細菌を注射した実験に見られる典型的な免疫応答。*control*-MO 幼生では 1 個の凝集塊が形成されているが、*ApDOCK*-MO 幼生では形成されていないことに注意。黄色は細菌が間充織細胞に貪食されていることを示している。(B) *ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞による免疫応答の別事例。細菌は、間充織細胞が多く分布している外胚葉上皮シート近傍に注射している。矢印は、2 個の間充織細胞による融合を示している。蛍光像は光学的切片のスタック像、ノマルスキー明視野像は光学的切片像で表している。スケールバーは、20  $\mu\text{m}$ 。

### 3-8 間充織細胞による免疫応答に伴う *ApDOCK* mRNA の発現量変化

免疫応答時の間充織細胞の防御行動において、*ApDOCK* mRNA の発現量がどのように変化するか調べた。この目的のために、受精後 4 日のビピンナリア幼生から間充織細胞を培養下に単離した。培養皿に播種して 4 時間後、間充織細胞は細胞突起で互いに接触し合い、ネットワークパターンを形成した (Fig. 3-7A)。未感作の間充織細胞は、ネットワークパターンを保持しながら常に位置を変え続けていた。Fig. 3-7B は、培養下でバクテリアを投与した際の間充織細胞の免疫応答の経時変化を示している。投与後 30 分を超えると、間充織細胞は速度を増加させながら基質上で動き続け、それ以前のネットワークパターンを著しく変化させた。なお、間充織細胞によるバクテリアの貪食は、添加直後から観察された。同様の結果は 2 回の実験から得られた。

次に、このバクテリア投与実験における *ApDOCK* mRNA の発現量変化を調べた (Fig. 3-7C)。投与 30 分後、*ApDOCK* mRNA の発現量は、未感作間充織細胞 (0 min) と比較して 1.7 倍に増加した。60 分を過ぎると発現量は減少し始め、2 時間後には投与前と同じレベルまで減少した。



**Fig. 3-7** バクテリアに対する培養間充織細胞の免疫応答と *ApDOCK* mRNA の発現量変化

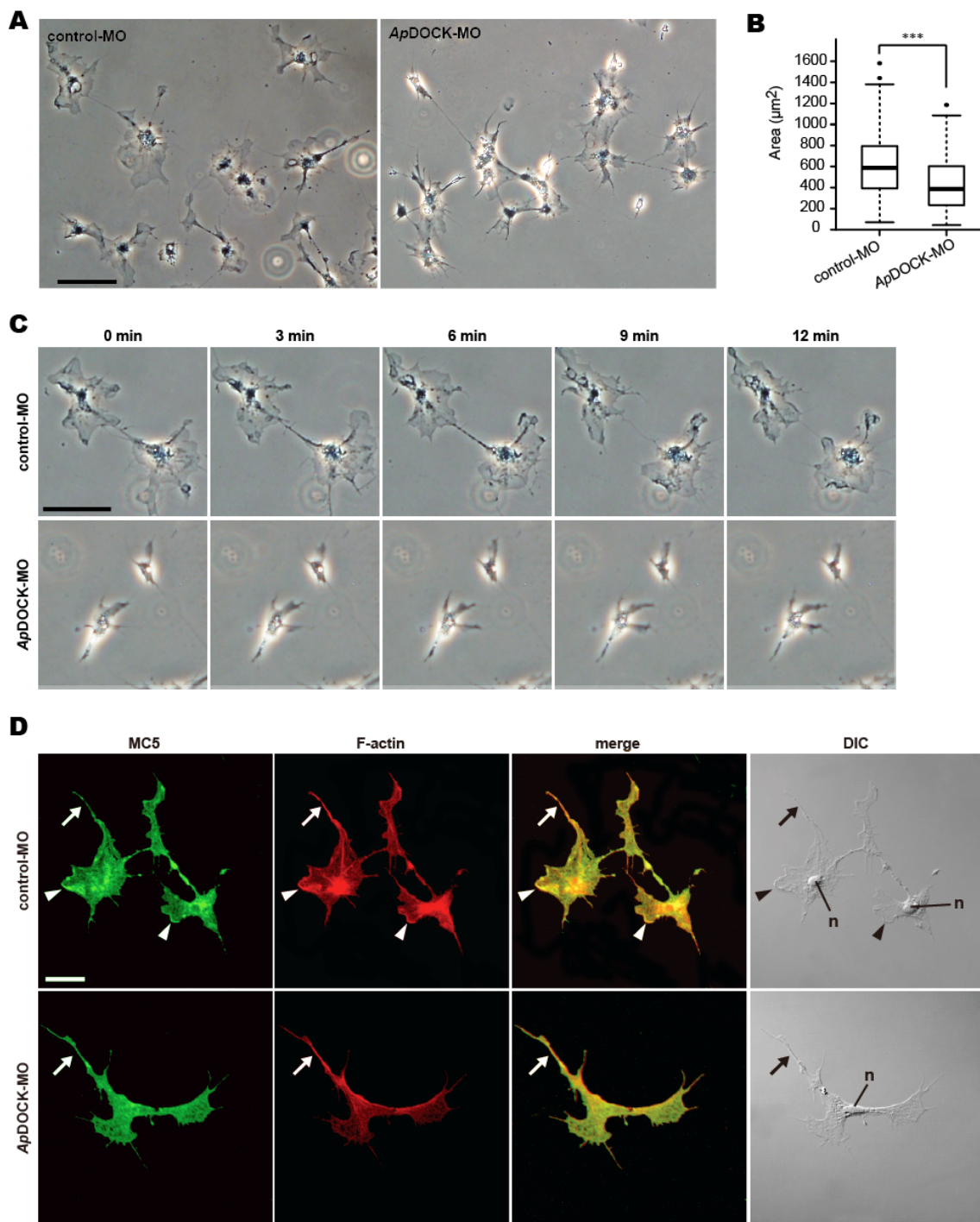
(A) 受精後 4 日のビピンナリア幼生から単離した間充織細胞。間充織細胞は、播種後 4 時間で、外胚葉を除去した幼生の細胞外マトリックスから基質上に這い出してくる。(B) バクテリア投与後の(A)の枠内の間充織細胞の様子。タイムラプス動画から抽出した画像を提示している。投与直後において比較的均一なネットワークパターンを形成している間充織細胞の一部が、120 分後では左側に集積している。(C) バクテリア投与実験における *ApDOCK* mRNA の real-time PCR。データは、未感作間充織細胞(0 min)における発現量に対する相対量として示した(平均値 ± 標準誤差, N = 3)。スケールバーは、20  $\mu\text{m}$ 。



### 3-9 ApDOCK タンパク質の機能阻害による葉状仮足形成の不全及びラッフル膜の欠如

Fig. 3-7A と同様の培養条件の下、間充織細胞の詳細な形態及びダイナミクスを調べた。control-MO 幼生の間充織細胞は、基質上で、ラッフル膜を有する葉状仮足を高度に発達させていた (Fig. 3-8A, control-MO)。一方、ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞は、明らかに葉状仮足を発達させていなかった (Fig. 3-8A, ApDOCK-MO)。個々の単一の間充織細胞が基質上に占める面積を比較すると、control-MO 幼生の間充織細胞が占める面積は、ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞に比べ 1.4 倍広かった ( $p < 0.001$ ,  $t$  検定,  $N = 3$ ) (Fig. 3-8B)。さらに、control-MO 幼生の間充織細胞における葉状仮足の形態はダイナミックに変化した。ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞の形態変化の速度は、control-MO 幼生の間充織細胞と比較して非常に遅かった (Fig. 3-8C)。

繊維状アクチン(F-actin)の集積は、ラッフル膜形成と密接に関連していることがよく知られている (Weed and Parsons, 2001)。そこで、rhodamine-phalloidin (F-actin マーカー)と MC5 mAb による二重染色により、Fig. 3-8A と同様の培養条件下における間充織細胞での F-actin の分布を観察した。control-MO 幼生の間充織細胞では、MC5 mAb のシグナルの集積が認められる葉状仮足先端で、rhodamine-phalloidin の蛍光シグナルの集積も観察された (Fig. 3-8D: 上段矢尻)。この F-actin 及び MC5 抗原の共局在は、2 回の実験において 28 個中 3 個の間充織細胞で観察された。これに対し、同数回の実験で調べた ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞では、32 個の細胞全てにおいて MC5 抗原が集積している領域が全く観察されなかった (Fig. 3-8D, 下段)。なお、rhodamine-phalloidin の蛍光シグナルは両者の間充織細胞の細胞質領域全体で観察され、間充織細胞の糸状突起における rhodamine-phalloidin の蛍光強度に差は認められなかった (Fig. 3-8D, 矢印)。しかしながら、control-MO 幼生と比べると、ApDOCK-MO 幼生の間充織細胞の細胞質領域で検出される rhodamine-phalloidin の蛍光シグナル強度は弱かった。



**Fig. 3-8** *ApDOCK*-MO 幼生から培養下に単離した間充織細胞の葉状仮足  
 (A) control-MO 幼生及び *ApDOCK*-MO 幼生から単離した間充織細胞(播種後 4 時間)。 *ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞は葉状仮足を伸展させている度合いが低い。(B) (A)において単一の間充織細胞が基質上に占める面積の定量的解析。 *ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞の基質上の専有面積が  $434.4 \pm 29.2 \mu\text{m}^2$  ( $n = 70$ )であるのに対し、

control-MO 幼生の間充織細胞では  $625.3 \pm 39.5 \mu\text{m}^2$  ( $n = 72$ )であった(平均  $\pm$  標準誤差)。ドットは外れ値を示す。\*\*\*,  $p < 0.001$ ( $t$  検定)。(C) control-MO 及び *ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞における葉状仮足の形態変化。写真は、光学顕微鏡下で行ったタイムラプス動画から抜き出したものである。control-MO 幼生の間充織細胞は、時間経過に伴い葉状仮足の形態が大きく変化しているが、*ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞ではほとんど変化が認められない。(D) *ApDOCK* タンパク質の機能阻害が *in vitro* における間充織細胞の F-actin の分布に及ぼす影響。MC5 mAb (MC5)及び rhodamine-phalloidin (F-actin)で二重染色した間充織細胞の光学的切片像ならびに対応するノマルスキー明視野像 (DIC)。間充織細胞は control-MO 幼生及び *ApDOCK*-MO 幼生から単離し、播種後 4 時間で固定した。control-MO 幼生の間充織細胞において、ラッフル膜で F-actin の集積が観察される(矢尻)。n は核を示す。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$ (A, C); 20  $\mu\text{m}$ (D)。

### 3-10 考察

第3章では、イトマキヒトデの培養間充織細胞から DOCK180 タンパク質スーパーファミリーに属するタンパク質をコードする cDNA を単離、同定し、*ApDOCK* と名付けた。受精後4日の *ApDOCK*-MO 幼生及び control-MO 幼生を材料として、幼生の防御システムにおける間充織細胞のダイナミクスに対する機能阻害の効果を解析した。*ApDOCK* タンパク質に対する *ApDOCK*-MO の特異性は、注射された油滴へ移動、集積する間充織細胞数の MO 濃度依存性(Fig. 3-3C) から確認された。さらに、培養系を用いた real-time PCR によって、異物添加に伴う間充織細胞の行動に対応した *ApDOCK* mRNA の発現量変化が認められ、*ApDOCK* タンパク質がヒトデ幼生の自然免疫システムに実際に関与していることが支持された。本研究で得られた結果をもとに、*ApDOCK* タンパク質の構造的な特徴、生体防御プロセスにおける免疫機能及び予想される間充織細胞のダイナミクスの制御メカズムに関して以下に考察する。

分子系統解析の結果、*ApDOCK* タンパク質は、後生動物 DOCK-A サブファミリーの祖先型タンパク質であることが明らかとなった (Fig. 3-1D)。DOCK-A サブファミリーに属するタンパク質が SH3、DHR-1、DHR-2 ドメインを有していることはよく知られているが、これらは DOCK-A サブファミリータンパク質の細胞膜へのリクルート(Cote and Vuori, 2007)及びアクチン細胞骨格の組織化(Meller et al., 2005)を直接制御していると考えられている。このような特性により、多くの細胞種において、DOCK-A サブファミリーに属するタンパク質は細胞移動、貪食作用、細胞融合及び細胞形態の決定等のダイナミクスに重要且つ共通の役割を担っている。しかし、これら DOCK-A サブファミリーの中で DOCK2 タンパク質が造血細胞系においてのみ発現していることは留意すべきである(Fukui et al., 2001; Nishihara et al., 1999; Reif and Cyster, 2002)。DOCK-2 タンパク質の造血系細胞特異的な発現及び *ApDOCK* タンパク質が免疫応答において必須の役割を担っているという点 (Fig. 3-2 から 3-7)において、両者の機能的な同一性が示唆される。一方、両タンパク質には構造上の違いがある。Crk 結合モチーフ(Fig. 3-1A, PPxLPxK)は DOCK2 には存在せず、*ApDOCK* タンパク質には存在している。Crk タンパク質は、細胞質タンパク質のチロシンキナーゼへのリクルートに関与し(Feller, 2001; Kiyokawa et al., 1998)、DOCK-A サブファミリータンパク質と相互作用することが知られている(Lee et al., 2007; Moore et al., 2007; Smith et al., 2008)。免疫応答における

*ApDOCK* タンパク質の機能は進化の過程で保存されているものの、*ApDOCK* タンパク質の Crk 結合モチーフは *DOCK2* においては別の配列に置き換わったのかもしれない。

本研究で得られた結果は、*ApDOCK* タンパク質が、発生の途中で生じている胞胚腔内での移動ではなく、幼生の生体防御システムにおいてのみ間充織細胞のダイナミクスを制御していることを示唆している(Fig. 3-2, 3-3, 3-5)。油滴やマイクロビーズを任意の胞胚腔領域に注射して間充織細胞のダイナミクスのオーバーラップを識別して可視化することにより、*ApDOCK* タンパク質による間充織細胞のダイナミクスの制御は、移動、集積及び包囲化作用の維持に必須であることを明らかにした。さらに、バクテリアの注射実験により、これらの非細胞性異物に加え細胞性異物に対する間充織細胞の防御行動も *ApDOCK* タンパク質に制御されており、制御される防御行動は貪食作用ではなく集積性の移動であることが確認された (Fig. 3-6A)。また、バクテリアの注射実験では、*ApDOCK-MO* 幼生のいくつかの間充織細胞が互いに密着している様子は観察されたものの、バクテリアに対する包囲化作用は生じていなかった(Fig. 3-6B)。これは、Fig. 3-3D での観察結果と同様である。さらに、*ApDOCK* タンパク質による間充織細胞のダイナミクスの制御は、培養下でのバクテリア投与によっても示された。Fig. 3-7 に示すように、免疫応答時の *ApDOCK* mRNA のアップレギュレーションは、貪食作用ではなく、移動活性の時間軸に沿って生じた。一方、包囲化作用や細胞融合、或いは *ApDOCK* mRNA のダウンレギュレーションと間充織細胞の移動活性の関連性に関する詳細は、現在のところこの培養系では明らかにすることができなかった。

アクチン細胞骨格を構築する *DOCK2* の解析から、いくつかの免疫細胞種における走化性移動の重要なメカニズムが明らかになってきている(Fukui et al., 2001; Kunisaki et al., 2006a; Sanui et al., 2003)。現在のところ、イトマキヒトデ幼生の防御システムにおいてケモカイン群は同定されていない。しかし、間充織細胞による移動と集積が、ランダムな移動が方向性を有する移動に転換するという点で走化性移動のプロセスに似ていることから、*ApDOCK* タンパク質も走化性移動に関与しているかもしれない。さらに、培養下において、*ApDOCK* タンパク質の機能を阻害した間充織細胞が、激しい波打ち動作（ラッフル運動）を示さず(Fig. 3-8C)、葉状仮足先端で十分なアクチン細胞骨格を構築できなかったこと(Fig. 3-8D)から、*ApDOCK* タンパク質で制御されるアクチン

細胞骨格の構築は包囲化作用の維持においても重要な役割を担っていると考えられる (Fig. 3-3D, E)。また、*ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞の葉状仮足形成が有意に阻害されたことにも留意すべきである (Fig. 3-8A, B)。*ApDOCK* タンパク質はアクチン細胞骨格の構築を介して葉状仮足形成を制御しており、この *ApDOCK* タンパク質によるアクチン骨格の構築が包囲化作用を維持させるために細胞膜を押し出す力を生み出していると考えられる。また、この可能性は、*ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞が一過的に包囲化作用を示す理由をも説明しうる (Fig. 3-3D, E)。同様に、間充織細胞の移動、集積においても、*ApDOCK* タンパク質が制御するアクチン骨格構築によって生み出される推進力が必要であろう (Fig. 3-3B)。

一方、移動、集積及び包囲化作用の維持以外の間充織細胞のダイナミクスに *ApDOCK* タンパク質が関与していないという事実は注意すべきである。明らかに、*ApDOCK*-MO 幼生の間充織細胞は油滴上で融合し、マイクロビーズを取り込んだ。多核凝集体を形成したと評価するには間充織細胞の数が少ないが、細胞融合は近接する 2 つの核によって示された (Fig. 3-5A)。マイクロビーズの取り込みに関しては、定量的な解析は行なっていないものの、取り込んだビーズの数は正常な受精後 4 日の幼生で得られた結果と一致している (第 2 章参照)。脊椎動物のマクロファージでは、細胞融合及び貪食作用に関わるタンパク質の多くが共通しているという報告がなされており (McNally and Anderson, 2005)、これら 2 つのダイナミクスは *DOCK2* ではなく *DOCK180* によって制御されている (Lee et al., 2007; Pajcini et al., 2008)。従って、間充織細胞においては、*ApDOCK* タンパク質以外の *DOCK180* 関連タンパク質が細胞融合を伴う多核凝集体形成や貪食作用に関与しているのかもしれない。

本研究は、*DOCK180* 関連タンパク質の新たなメンバーの機能を証明しただけでなく、海産無脊椎動物における *DOCK180* 関連タンパク質の免疫機能に関する初めての報告である。さらに、*ApDOCK* タンパク質は、棘皮動物において初めて同定された、細胞行動に関わるアクチン骨格構築の制御因子でもある。免疫細胞の行動制御メカニズムの進化を理解するために、今後、*DOCK180* スーパーファミリータンパク質の下流に位置することが良く知られている *Rho* GTPase ファミリーの *Rac* (Cote and Vuori, 2007) 等、*ApDOCK* タンパク質のターゲットの探索が必要である。現在のところ、ヒトデにおいて *Rho* GTPase ファミリーに属するタンパク質はまだ同定できていない。本研究によって、今

後の課題として 2 つの重要な問題が浮かび上がった。一つは、間充織細胞による免疫応答時における *ApDOCK* タンパク質のその他の機能である。*DOCK2* タンパク質は、造血細胞の走化性移動以外に、T 細胞における interleukin-2 (Pajcini et al., 2008)、樹状細胞における interferon type I (Gotoh et al., 2010)、樹状細胞やリンパ球における inflammasome adaptor ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) (Ippagunta et al., 2011)などの免疫調節因子の産生を制御している。これらの免疫調節因子の産生はマクロファージにおいても報告されている (Mariathasan et al., 2004; Nathan, 1987)。同様に、間充織細胞も *ApDOCK* タンパク質による制御を介して、これらの免疫調節因子を活用しているかもしれない。二つ目の問題は、*ApDOCK* タンパク質が発生過程のいつから発現するかという問題である。原腸胚期の間充織細胞が *ApDOCK-MO* 幼生の間充織細胞と同様、油滴に応答しなかったという事実 (Fig. 3-4) は、ビピンナリア幼生期になる前の胚では *ApDOCK* タンパク質が発現していない可能性を示唆する。*ApDOCK* タンパク質に対する特異的な抗体を作製することができれば、イトマキヒトデ幼生の生体防御システムの発生過程を明らかにすることができるかもしれない。

## 材料と方法

### 実験動物、受精ならびに発生

第2章のようにイトマキヒトデ *A. pectinifera* を採集、飼育し、受精卵を得た。受精卵は人工海水 (ASW) で発生させ、胞胚、中期原腸胚、後期原腸胚、ビビンナリア幼生を得た。

モルフォリノオリゴ (Morpholino Oligonucleotides ; MO) の顕微注射用の未成熟卵の調製は以下の様に行った。雌個体から取り出した卵巣にハサミで軽く切れ込みを入れ、未成熟卵を ASW 中に遊離させた。ASW で数回洗浄し、Ca<sup>2+</sup> 欠如海水 (Ca<sup>2+</sup> Free Sea Water ; CFSW, Jamarin Lab.) で1回洗浄後、新たな CFSW 中で軽く懸濁することにより、濾胞細胞を完全に除去した。その後 ASW に戻し、数回洗った。

### cDNA クローニング、シーケンシング及び配列解析

第2章に記述した方法によって受精後24時間の中期原腸胚から間充織細胞を培養下に単離し、ISOGEN (Nippon Gene)及び high-salt solution (1.2 M NaCl, 0.8 M sodium citrate)を用いて total RNA を抽出した。この total RNA を材料に、phage cloning vector λ ZAP (Stratagene)を用いて、説明書に従って cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーをテンプレートとして、degenerate PCR 法によって DOCK180 スーパーファミリーのオーソログ遺伝子の一部の増幅を試みた。用いた degenerate プライマー、DOCK1F プライマー (5'- GCGGGAGAAGATCTTCTTCgntngycarat)及び DOCK4R プライマー (5'- GGTCGGCGATCAGGccdatdatraa) は、iCODEHOP プログラム (<http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context>) によって以下に示す脊椎動物及び無脊椎動物の DOCK180 オーソログ配列をもとに設計した: *Homo sapiens*, BAA09454; *Mus musculus*, NP\_001028592; *Rattus norvegicus*, XP\_219424; *Canis lupus familiaris*, XP\_544064; *Equus caballus*, XP\_001489814; *Strongylocentrotus purpuratus*, XP\_785550。PCR は、AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)を用いて以下のプログラムで行った: 94°C-5分間の後 94°C-30秒間、49°C-60秒間、74°C-105秒間を35サイクル、74°C-5



分間。得られた増幅産物が DOCK180 オーソログであることをシーケンシングにより確認し、この cDNA クローンを *ApDOCK* と名付けた。*ApDOCK* の全長配列を得るために、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 及び RACE プライマー、DOCK-5'race プライマー (5'-GGGCAGCACGGGTAGCCTTTTCCGCAGC) 及び DOCK-3'race プライマー (5'-CTTCAGGCCACCCAGATCCCTTGGCCC) を用いてそれぞれ 5' 及び 3'-RACE 法を行った。全てのシーケンシング反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて Fluorescence DNA sequencer 3100 (ABI PRISM) によって行った。

*ApDOCK* cDNA 及びタンパク質配列の解析は、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)、InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) 及び MOTIF (<http://motif.genome.jp>) プログラムを用いて行った。DOCK180 タンパク質スーパーファミリーの分子系統解析は、過去の報告に従って行った (Cote and Vuori, 2002)。

## 顕微注射

モルフォリノオリゴ、*ApDOCK*-MO 及び control-MO は Gene Tools LLC. より得た。*ApDOCK*-MO の配列は、5'-ACCCAACCAGTCATGTTTCACAGTC であり、*ApDOCK* mRNA のスタートコドン (下線) を含んだ配列に対する相補的な配列とした。control-MO (5'-ACTCAACTAGTCACGTCTCACAATC) は、下線で示した 5 箇所が *ApDOCK*-MO 配列と異なるミスセンス配列として設計した。各 MO は、滅菌水に 1 mM となるように溶解し、注射前に適切な濃度に希釈した。濾胞細胞を取り除いた未成熟卵に注射後、第 2 章と同様の方法によって発生を進行させた。未成熟卵への注射方法は、過去の報告に従った (Hamanaka et al., 2010)。

第 2 章のように、シリコンオイル (Shin-Etsu Chemical co, Ltd)、蛍光ポリスチレンビーズ (直径 2  $\mu$ m: Fluoresbrite carboxy YG microsphere; Polysciences Inc.)、*E. coli* (DH5  $\alpha$  株) を *ApDOCK*-MO 幼生、control-MO 原腸胚 (受精後 30 時間) 及び control-MO 幼生 (受精後 4 日) に顕微注射した。*E. coli* は、第 2 章に

記述した精子の蛍光標識法を用いて rhodamine B isothiocyanate (RITC; Sigma)で標識した。

### 培養下への間充織細胞の単離とバクテリアチャレンジ

ApDOCK-MO 及び control-MO 幼生の間充織細胞を培養下に単離した。基本的な方法は、過去の報告に従った(Kaneko et al., 1990)。10 個体の各 MO 幼生(受精後 3 日)を 1 ml の解離液 (dissociate medium, DM: 1.2 M glycine, 1% ASW, 6% newborn calf serum)で処理した。5 分後、新たな DM に移し、ガラス製マウスピペット (直径約 150  $\mu\text{m}$ : Drummond Scientific Co.)でゆるやかにピペッティングし、外胚葉上皮細胞を除去した。これらの幼生を、4% newborn calf serum を含む ASW (culture medium, CM)で満たされたプラスチック培養皿 (直径 3.5 cm: Falcon 1007)に敷いたカバーガラス上に滴下した。20°C で 4 時間インキュベートし、間充織細胞が細胞外マトリックスから培養基質上に伸展した後、CM を交換した。バクテリアチャレンジでは、この培養間充織細胞に対して、ASW で OD<sub>600</sub> を 0.5 に調製した *E. coli* を 500  $\mu\text{l}$  を投与した。

### 蛍光顕微鏡観察及び培養間充織細胞の伸展面積の測定

ApDOCK-MO 及び control-MO 幼生 (受精後 4 日)における間充織細胞の分布、形態及び免疫応答は、第 2 章と同様の方法でサンプルを固定し、MC5 mAb を用いた間接蛍光抗体法によって解析した。核染色を行う場合は、PI (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : Wako)を用いた。F-actin の細胞内分布の解析は、培養間充織細胞を MC5 mAb で染色した後、rhodamine-phalloidin (Invitrogen: PBS で 1000 倍希釈)で処理して行った。全てのサンプルは、第 2 章と同様に、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview, Olympus)を用いて観察した。

培養間充織細胞の伸展面積は、MC5 mAb 及び PI で二重染色した単一の培養間充織細胞の基質上の面積を Image J software (National Institutes of Health)を用いて測定することにより決定した。

## Real-time PCR

ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO)を用いて、バクテリアチャレンジ実験の各時点における培養間充織細胞から cDNA を調製し、real-time PCR のテンプレートとした。127 bp の *ApDOCK* 遺伝子断片 (nucleotides: 415-541)を、DOCK-qPCR-F (5'-AGAATGGGGAGTGCTGTGGA)及び DOCK-qPCR-R (5'-TACAGGGAGGGTGCCTGAGA)で増幅した。リファレンス遺伝子として、114 bp のイトマキヒトデ 18S rRNA 遺伝子 (GenBank Accession no. AB084551)断片を、18S-3-f (5'-AGAGGTTCTGAAGGCGATCA)及び 18S-3-r (5'-ACTTTGGTTTCCCGCAGAC)で増幅した。Real-time PCR は、KAPA SYBR FAST qPCR master mix (KAPA BIOSYSTEMS)を用いて、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で行った。各サンプル 3 ウェルで解析を行い、PCR 後に電気泳動により増幅サイズを確認した。

## タイムラプス観察

間充織細胞による免疫応答を *in vivo* でタイムラプス観察するために、チャンバーシステムを開発した。シリコンオイルを注射した原腸胚及び幼生を、ガラスボトムシャーレ (Matsunami: 35 mm dish, D110400)に貼りつけた 2 枚の両面テープ (Nichiban, NM-10)の間に滴下した。その上にナイロンメッシュ (ポアサイズ: 200  $\mu\text{m}$ )を被せ、さらにカバーガラスを乗せて両面テープで固定することにより、幼生の遊泳を停止させた。最後にシャーレを ASW で満たした。間充織細胞の行動のタイムラプス観察は、DP controller software (Olympus)を用いて光学顕微鏡 (IX71, Olympus)で行った。画像は 5 分間隔で 2 時間撮影した。培養間充織細胞による葉状仮足形成及び貪食作用のタイムラプス観察は、3 分間隔で撮影した。

## 第 4 章

間充織細胞による免疫応答の細胞外調節因子:

*ApSRCR1* タンパク質

## 4-1 緒言

第 4 章では、間充織細胞の防御行動を細胞外で制御する候補因子として Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) ドメインを有するタンパク質ファミリーに着目する。SRCR ドメインは約 100~110 アミノ酸残基からなるモチーフであり、6 又は 8 個のシステイン残基の配列パターンによって特徴付けられている: グループ A, Cys-X12-Cys-X30-Cys-X9-Cys-X9-Cys-X9-Cys-X1; グループ B, Cys-X15-Cys-X12-Cys-X4-Cys-X25-Cys-X9-Cys-X9-Cys-X9-Cys-X1 (Resnick et al., 1994)。これらの SRCR ドメインのコンセンサス配列は、後生動物における多くの SRCR タンパク質の間で高度に保存されている (Resnick et al., 1994)。

SRCR ドメインを有する多くのタンパク質 (SRCR タンパク質) 群は、後生動物の自然免疫システムにおいて重要な役割を担っている (Sarrias et al., 2004)。具体的には、脊椎動物においては、単球やマクロファージによる炎症反応の制御 (Buechler et al., 2000)、エンドトキシンに対する防御機能 (Haworth et al., 1997)、バクテリアへの結合及び貪食作用 (Dunne et al., 1994; van der Laan et al., 1999)、肺のオプソニンとの結合 (Holmskov et al., 1999; Madsen et al., 2003) 等、細胞外での免疫機能が多数報告されている。ヒトデと同じ棘皮動物に属するウニでも、多数の SRCR 遺伝子の存在が報告されている (Pancer, 2000; Pancer et al., 1999; Rast et al., 2006) が、機能は同定されていない。現在、無脊椎動物における SRCR タンパク質の機能に関する知見は、ホタテの CfSR タンパク質のみに限られており、このタンパク質がリポポリサッカライドやペプチドグリカン、マンナン、 $\beta$  1,3-グルカン等の病原体関連分子パターンの認識及び結合に関与していることが示唆されている (Liu et al., 2011)。一方、脊椎動物、無脊椎動物の個体発生を通して、SRCR タンパク質がどのように発現し、どのように機能しているかという問題に迫る研究はなされていない。

本研究では、イトマキヒトデ胚の間充織細胞の cDNA ライブラリーから SRCR ドメインを有する遺伝子の探索を行い、イトマキヒトデの発生過程における SRCR タンパク質の発現様式に加え、幼生の自然免疫システムにおける機能を明らかにすることを目的とする。これに加え、幼生から成体に変態後、体腔中に出現して生体防御システムを司る体腔細胞にも焦点を当てる。なお、幼生の間充織細胞と同様に、成体の体腔細胞は、体内外で異物を貪食する際に、

細胞融合により多核凝集体を形成することが知られている(Kaneshiro and Karp, 1980; Reinisch and Bank, 1971; Silva and Peck, 2000)。

#### 4-2 *Ap*SRCCR1 遺伝子及びタンパク質の構造

Pancer らが *S. purpuratus* の SRCCR 遺伝子群をクローニングする際に用いた degenerate プライマーを用い(Pancer et al., 1999)、イトマキヒトデ胚の培養間充織細胞の cDNA ライブラリーから、SRCCR ドメインを有する 1 種類の cDNA を得た。その後、RACE 法により全長配列を決定し、*Ap*SRCCR1 と名付けた (GenBank accession no. AB621549)。*Ap*SRCCR1 遺伝子は、496 bp の 5'-UTR、2712 bp の非常に長い 3'-UTR を有しており、1128 アミノ酸残基からなる推定分子量 119.96 kDa のタンパク質をコードしていた。Fig. 4-1A は *Ap*SRCCR1 タンパク質の構造の模式図を示している。*Ap*SRCCR1 タンパク質は、9 個のタンデムに連なった SRCCR ドメインと、1 個の short consensus repeat (SCR) ドメインを有しており、これらのドメインに続いて膜貫通領域と細胞質領域が存在していた (Fig. 4-1A)。また、シグナルペプチドに加え、*N*-グリコシル化を受ける可能性がある 11 個のアスパラギン残基も見つかった (Fig. 4-1A)。

Fig. 4-1B に、*Ap*SRCCR1 タンパク質に含まれる各 SRCCR ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。各 SRCCR ドメインは、高度に保存された 6 個のシステイン残基を有しており、その配列パターンはグループ A に分類される SRCCR ドメインのコンセンサス配列パターンと一致した。一方、各 SRCCR ドメインの配列は多様であり、その類似性は 25-64%であった。また、*N*-グリコシル化を受ける可能性がある 11 個のアスパラギン残基の内 10 個が SRCCR ドメイン内に存在したが、その内の 7 個が、各ドメイン内にある 2 番目と 3 番目のシステイン残基の間に存在していた。

**A**



**B**

SRCR_d1	1	VQLVGGASPAEGRVEVFYNGANGTVCDGEMQDAQIVCKQLGFASANSTRC-CASFGQ	58
SRCR_d2	1	VRLAGSPNPLQGRLEIFHE-GEWGTVCDDNDLKDASVVCRLGYPANSSSN-VSFGPA	58
SRCR_d3	1	IRLVGGNGPMQGRVEILHN-GEWGSVCDKGSFQNAVVCNQLGATQPRRPQG--VPVGG	57
SRCR_d4	1	VRLVGGNTHIEGRVEVFNN-GWNGSICPESWDAKDAEVACQLGNYPLEAGDC-CPQFPA	58
SRCR_d5	1	VQLVGGSHPLEGNVIVLRN-GRNGSICDDNDINDARVVCRLGNIEVAATC-CAKYGQ	58
SRCR_d6	1	ALDDSSSNLPGRVEIVYNGVNGRICGTDNDLNDANVLCRLYNSTAESVHS-FKNG-S	57
SRCR_d7	1	LRLAGGRTPLEGRVEVFHD-GWGTVCDDNDLLDAKVVCTQLGNIEALSAC-CANFGQ	58
SRCR_d8	1	ENGSVSTNTLTGRVEVLSSSGEWGAICGKYNDKKDAEVVCQLFNNTSAMDRK-FYLS-S	58
SRCR_d9	1	IRLVSGNQREFGAVELLVD-SQWNGSICADNNGPNEGAVACKQLGYCAAAGTQKGLQPARF	59
consensus		<-----25----->*-----12----->*-----30---	
SRCR_d1	59	GTGVIIIDDLACTGDETRIGDCPHR--GWEQHNCAHTEDAGVV-CN	101
SRCR_d2	59	STAQIILLDRVSCMGDEHGVEYCEHGDKWNVSADCTHSRDAGVI-CT	103
SRCR_d3	58	GVGPTHMSFVNCGTGTEATLEQCSNS--GWNGGECGHSNDAGVI-CT	100
SRCR_d4	59	DVG--VVDNVVCTGNE SriQDCAHQ--DWG--VCSGGQAAGAK-CQ	97
SRCR_d5	59	VPQEIILDDVACQGEGRIEDCYHA--TWGSHNCGGSESAGVV-CR	101
SRCR_d6	58	GP--ILLSNFKCTGSESNIFDCTHN--PWGDYTCDDADAA-VV-CR	97
SRCR_d7	59	GTGPIILDGLACNGNEDLIEDCRHE--GWGSHNCQHYEDAGVV-CT	101
SRCR_d8	59	PDQLINMGVEVQNGESLLLQCPRASKPFTAQTCPGGETAGVL-CK	103
SRCR_d9	60	TQGMHFSSMNCCTGSESRLRDCVHT--YGG-YTCNGLVFEAVVQCK	102
consensus		----->*-----9----->*-----9----->*-----9----->*	

**Fig. 4-1 ApSRCR1 の構造及び配列解析**

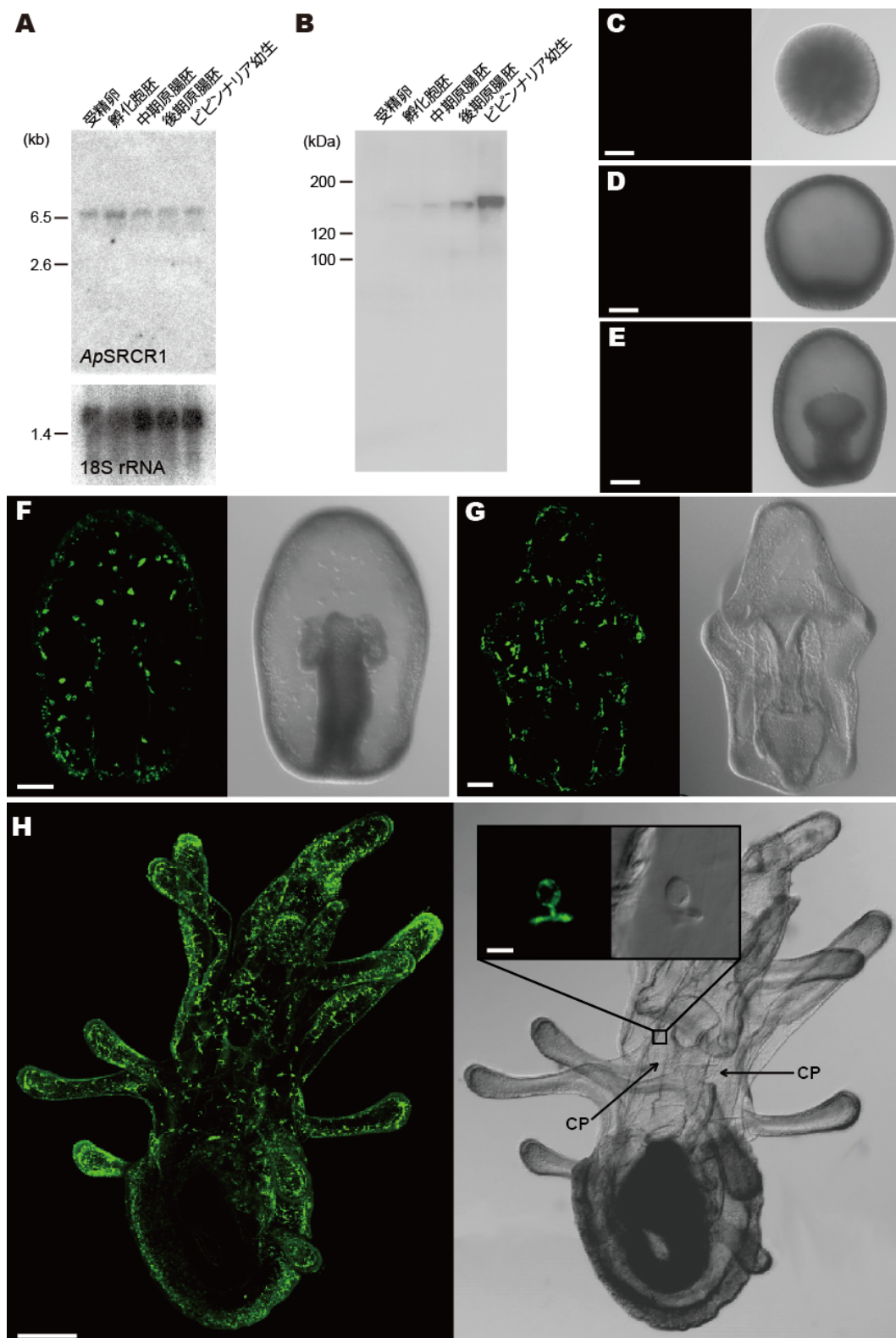
(A) ApSRCR1 タンパク質の模式図。黄色、シグナルペプチド；橙色、SRCR ドメイン；灰色、SCR ドメイン；黒色、膜貫通領域；白色、細胞質領域。予想される N-グリコシル化部位をピンで示した。(B) ApSRCR1 タンパク質に含まれる 9 個の SRCR ドメインのマルチプルアラインメント。アスタリスクは、6 個の高度に保存されたシステイン残基(マゼンタ)を示している。全てのドメインで同一のアミノ酸残基をシアン、50%以上で保存されたアミノ酸残基を緑で示した。点線は、システイン残基間のアミノ酸残基数を示す。N-グリコシル化を受ける可能性がある 10 個のアスパラギン酸残基を橙色で示した。

### 4-3 発生過程における *ApSRCR1* 遺伝子及びタンパク質の発現

*ApSRCR1* mRNA 及びタンパク質が発生過程においてどのように発現するかという問題を検討するため、ノーザンブロット及びウエスタンブロットを行った。SCR ドメインから細胞質領域をコードする領域 (nucleotides: 3412-3863) をプローブとしてノーザンブロットを行った結果、検討した全ての発生ステージで *ApSRCR1* mRNA の全長に相当する約 6.6 kb のバンドを 1 本検出した (Fig. 4-2A)。また、胞胚で検出されたバンドの強度は、他のステージと比較して若干強かった。一方、*ApSRCR1* タンパク質の N 末端側から 5-8 番目の SRCR 領域 (アミノ酸残基: 496-800) に対して作製された抗 rSRCR5-8 抗体を用いたウエスタンブロットでは、*ApSRCR1* タンパク質の発現時期は、*ApSRCR1* mRNA の発現パターンとは異なっていた (Fig. 4-2B)。抗体シグナルは、見かけ上の分子量 150 kDa の位置に 1 本のバンドとして検出されたが、このバンドは、中期原腸胚以降で初めて検出され、その後、発生の進行に伴って発現量が増加した。

*ApSRCR1* タンパク質の時空間的発現パターンを明らかにするため、抗 rSRCR5-8 抗体を用いてノーザンブロット及びウエスタンブロットと同様の発生ステージに対して免疫組織化学染色を行った。その結果、間充織細胞が原腸先端から胞胚腔中に移入し始めている中期原腸胚までは、陽性シグナルは検出されなかった (Fig. 4-2C, D, E)。その後発生が進行すると、体壁に向かって移動している間充織細胞において抗体の陽性シグナルが検出された (Fig. 4-2F, G)。ブラキオラリア幼生期になると、体腔囊中に、変態後に成体の免疫細胞となる予定体腔細胞が分化してくる。そこで、ブラキオラリア幼生においても間接蛍光抗体法を施したところ、間充織細胞に加えて、予定体腔細胞においても抗体の陽性シグナルが検出された (Fig. 4-2H)。





**Fig. 4-2** 発生過程における *ApSRCR1* mRNA 及びタンパク質の発現  
 (A) 様々な発生ステージにおけるノーザンブロット解析。上段は *ApSRCR1* mRNA の

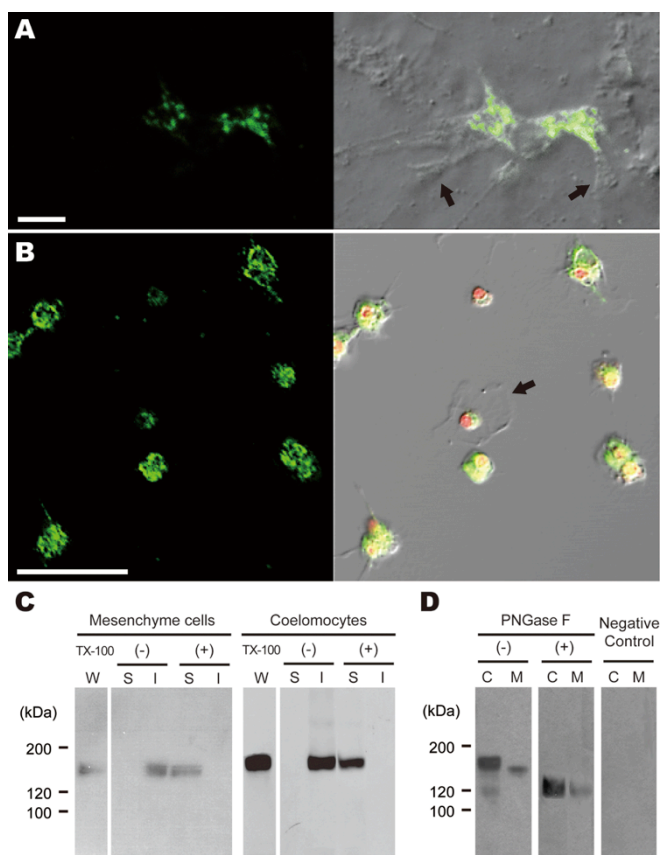
発現、下段は内在性コントロールとして 18S rRNA の発現を示している。解析に用いたステージは、受精卵 (40 min)、孵化胞胚 (16 h)、中期原腸胚 (25 h)、後期原腸胚 (40 h)、ビピンナリア幼生 (72 h)。時間は受精後の時間を表している。(B) (A)で用いた発生ステージにおけるウエスタンブロット解析。各発生ステージのライセートをそれぞれ 40  $\mu$ g 電気泳動した。(C-H) 発生過程における *ApSRCR1* タンパク質の時空間的発現。光学的切片のスタック像ならびに対応するノマルスキー明視野像。抗体染色に用いた発生ステージは、(C) 受精卵; (D) 胞胚(17 h); (E) 中期原腸胚(24 h); (F) 後期原腸胚(40 h); (G) ビピンナリア幼生(72 h); (H) ブラキオラリア幼生(60 days)。(H)の挿入図は、体腔囊(CP)中に存在する予定体腔細胞を示している。スケールバーは 50  $\mu$ m (C-G); 200  $\mu$ m (H); 5  $\mu$ m ((H)内の挿入図)。

#### 4-4 間充織細胞及び体腔細胞における *ApSRCR1* タンパク質の細胞内局在性とその生化学的特性

Fig. 4-3A は、ビピンナリア幼生(受精後 4 日)の胞胚腔中に分布している間充織細胞の光学切片像を示している。抗 *rSRCR5-8* 抗体の陽性シグナルが間充織細胞の細胞質領域にドット状に観察された。一方、同様のシグナルは間充織細胞の葉状仮足(Fig. 4-3A: 矢印)では検出されなかった。ブラキオラリア幼生において、*ApSRCR1* タンパク質が体腔囊中に存在する予定体腔細胞においても発現していたことから(Fig. 4-2H)、完全に分化した成体の体腔細胞においても *ApSRCR1* タンパク質が発現しているという予想のもと、抗 *rSRCR5-8* 抗体を用いた間接蛍光抗体法を施した。その結果、葉状仮足を形成しながら基質に接着した播種直後の成体の体腔細胞においても、抗体の陽性シグナルは細胞質領域でドット状に検出された(Fig. 4-3B)。

並行して、*ApSRCR1* タンパク質の局在状態を解析した。*ApSRCR1* タンパク質は、アミノ酸配列から膜タンパク質であることが推測される(Fig. 4-1 参照)。*ApSRCR1* タンパク質が膜タンパク質であるか否かを、培養間充織細胞及び成体の体腔細胞を用いてウエスタンブロットにより検討した。培養間充織細胞の *ApSRCR1* タンパク質は、見かけの分子量 150 kDa の位置に、界面活性剤 Triton X-100 非存在下では不溶性画分で検出された(Fig. 4-3C: 左パネル)。これに対し、1% Triton X-100 存在下では可溶性画分で検出された(Fig. 4-3C: 左パネル)。成体の体腔細胞においても、培養間充織細胞の場合と同様、1% Triton X-100 処理により、*ApSRCR1* タンパク質のバンドは不溶性画分から可溶性画分へシフトした。一方、そのバンドサイズは 180 kDa であり、培養間充織細胞と比較して約 30 kDa 大きかった(Fig. 4-3C: 右パネル)。

両細胞種において、*ApSRCR1* タンパク質の分子量が異なる理由を明らかにするため、これら 2 種の細胞から得た等量のタンパク質に対し、PNGase F 処理を施し、ウエスタンブロットを行った。その結果、両細胞種において、*ApSRCR1* タンパク質のサイズは減少し、見かけの分子量 120 kDa の位置で検出された(Fig. 4-3D)。このサイズは、*ApSRCR1* タンパク質のアミノ酸配列から予想される分子量とおおよそ一致している。また、体腔細胞における *ApSRCR1* タンパク質の発現量は、間充織細胞と比較して非常に多いことも明らかとなった。



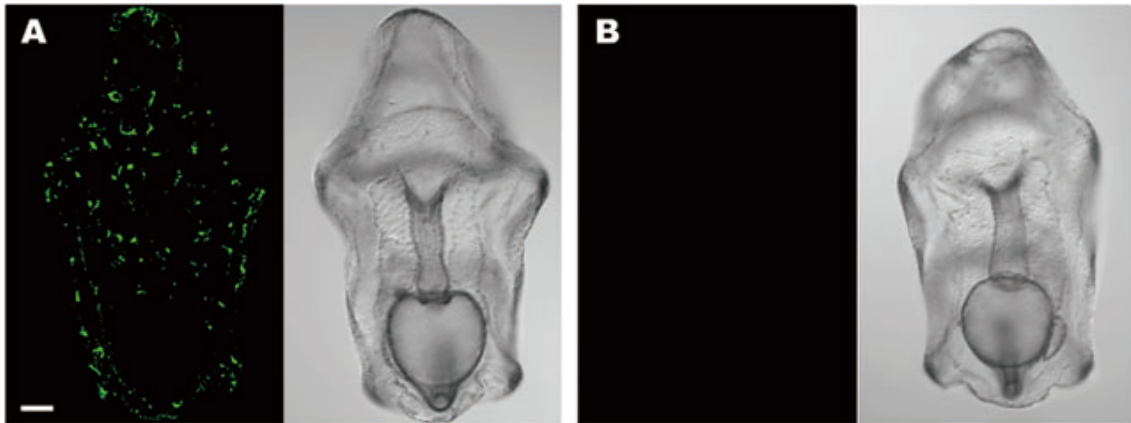
**Fig. 4-3 幼生の間充織細胞及び成体の体腔細胞における *ApSRCCR1* タンパク質の発現**

(A-B) ビピンナリア幼生(受精後4日)の間充織細胞(A)及びガラス基質に播種した5分後の成体の体腔細胞(B)における *ApSRCCR1* タンパク質の細胞内局在。光学的切片像ならびに対応するノマルスキー明視野像。*ApSRCCR1* タンパク質は両細胞種の細胞質領域でドット状のシグナルとして観察される。両細胞腫の葉状仮足では蛍光シグナルが検出されない。(B)では核を赤で示している。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  (A); 50  $\mu\text{m}$  (B)。(C) *ApSRCCR1* タンパク質の可溶性に対する 1% Triton X-100(TX-100)の影響。間充織細胞(Mesenchyme cells)及び体腔細胞(Coelomocytes)を材料にウエスタンブロット解析を行った。W, 全タンパク質; S, 可溶タンパク質; I, 不溶タンパク質。電気泳動の際、サンプル W では 2  $\mu\text{g}$ 、サンプル S 及び I は合計 2  $\mu\text{g}$  となるように調製した。(D) 体腔細胞(サンプル C)及び間充織細胞(サンプル M)における *ApSRCCR1* タンパク質の生化学的特性の比較。PNGase F 処理した両細胞腫のホモジェネートを用いてウエスタンブロットを行った。ネガティブコントロールでは normal IgG を用いた。各レーン 2  $\mu\text{g}$  のタンパク質を電気泳動した。

#### 4-5 幼生における *ApSRCR1* タンパク質の機能阻害

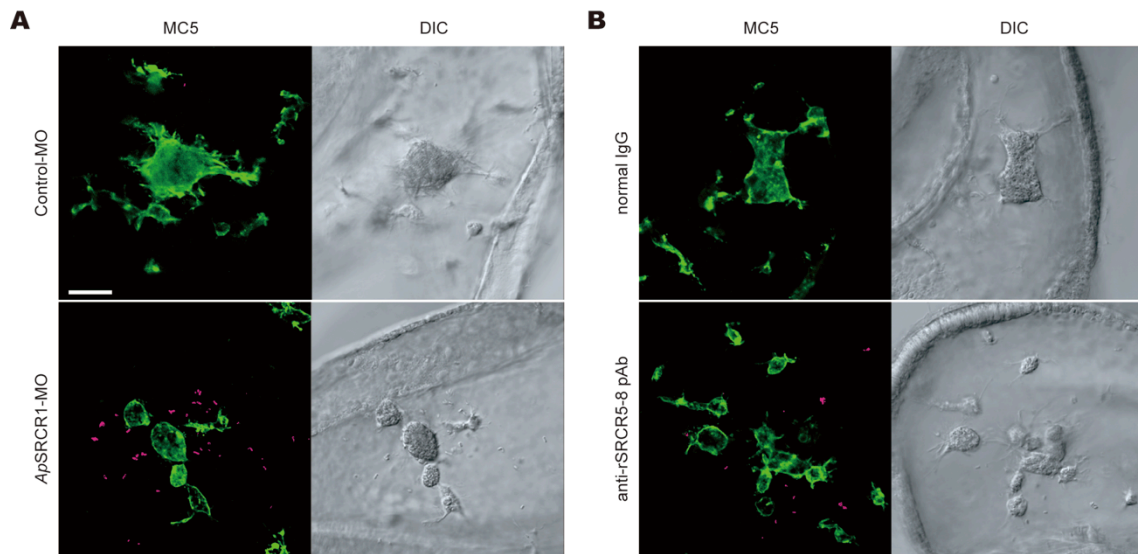
間充織細胞による免疫応答の際、*ApSRCR1* タンパク質が担う機能を明らかにするため、受精後4日のビピンナリア幼生を材料に、アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(*ApSRCR1-MO*)を用いたノックダウン及び抗 *rSRCR5-8* 抗体による中和実験を行った。まず、ノックダウン実験において、*ApSRCR1-MO* 幼生の間充織細胞で、*ApSRCR1* タンパク質の発現が阻害されていることを確認した(Fig. 4-4)。*ApSRCR1-MO* 幼生及び control-MO 幼生に対しバクテリア(大腸菌)を注射したところ、両者の間充織細胞は共に2時間以内に凝集塊を形成した(Fig. 4-5A)。しかし、形成された凝集塊の数及びサイズには明確な違いが観察された。control-MO 幼生では、約90%の個体(22個体中20個体)で大きな1個の凝集塊が形成されたのに対し、モルファント幼生では、約40%の個体(24個体中10個体)で5~10個の凝集塊が散在して観察され、それらのサイズは control-MO 幼生の凝集塊よりも小さかった。さらに、*ApSRCR1-MO* 幼生では、貪食されていないバクテリアが胞胚腔中に多く観察された(Fig. 4-5A: マゼンタ)。

次に、正常な幼生に、バクテリアと抗 *rSRCR5-8* 抗体又は normal IgG を同時に注射した。その結果、間充織細胞による凝集塊形成のパターンは、*ApSRCR1-MO* によるノックダウン実験と同様であった。抗 *rSRCR5-8* 抗体を注射した場合、47%の個体(19個体中9個体)で複数の小さな凝集塊が形成され、バクテリアのクリアランスも不完全であった(Fig. 4-5B)。一方、normal IgG を注射した場合は、81%の個体(21個体中17個体)で大きな1個の凝集塊が形成され、貪食されていないバクテリアは観察されなかった。



**Fig. 4-4** *ApSRCR1*-MO によって *ApSRCR1* タンパク質の翻訳阻害を施した  
ビピンナリア幼生(受精後 4 日)

抗 rSRCR5-8 抗体で染色した control-MO 幼生(A)及び *ApSRCR1*-MO 幼生(B)の光学的  
切片のスタック像ならびに対応するノマルスキー明視野像。 *ApSRCR1*-MO 幼生では  
*ApSRCR1* タンパク質が発現していない。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 4-5** *ApSRCCR1* タンパク質の機能阻害がビピンナリア幼生(受精後 4 日)の間充織細胞による凝集塊形成及び貪食作用に及ぼす影響

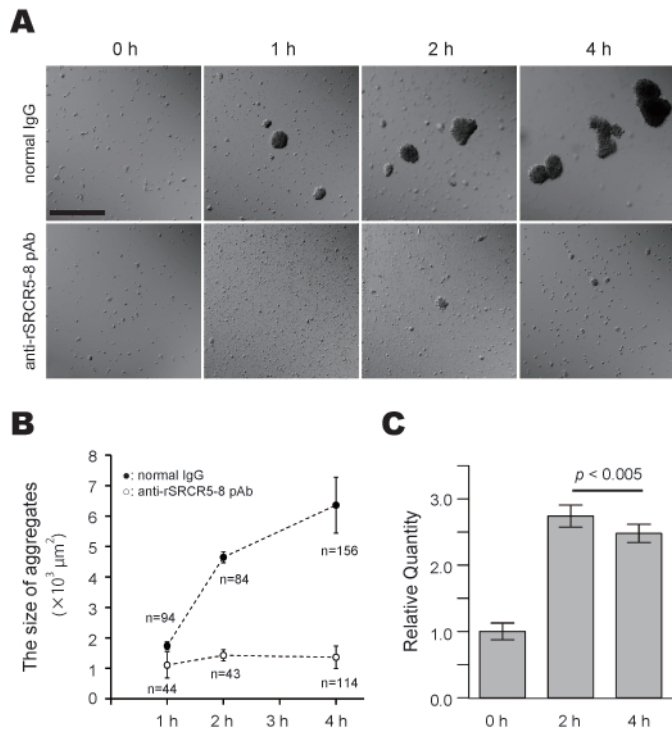
(A) *ApSRCCR1*-MO による翻訳阻害。バクテリアを注射して 2 時間後、間充織細胞マーカーである MC5 mAb で染色した幼生の光学的切片のスタック像ならびに対応するノマルスキー明視野像。マゼンタは貪食されていないバクテリアを示している。*ApSRCCR1*-MO 幼生では、大きな 1 個の凝集塊形成を形成できず、バクテリアの除去も不完全である。(B) 抗 rSRCCR5-8 抗体を用いた中和実験。バクテリアと normal IgG 又は抗 rSRCCR5-8 抗体(anti-rSRCCR5-8 pAb)を同時に注射した。結果は、(A)で得られた結果とよく似ている。スケールバーは 20  $\mu$ m。

#### 4-6 成体における *ApSRCR1* タンパク質の機能阻害

予備実験から、イトマキヒトデ成体において、体腔中に注入されたビーズや細菌などの異物に対し、幼生の間充織細胞と同様、体腔細胞が凝集塊を形成することが分かっていた。そこで、成体に対しても、前節でビピンナリア幼生に対して行ったように細菌と抗体の同時注入実験を行い、抗 *rSRCR5-8* 抗体が、体腔細胞による免疫応答に及ぼす影響を検討した。細菌と *normal IgG* を成体の腕内の体腔に同時に注入した場合、体腔細胞は活発に凝集塊を形成し、注射後 4 時間までの間に凝集塊のサイズは増大すると共に、体腔液中で観察される細菌は減少していった (Fig. 4-6A: 上段)。一方、抗 *rSRCR5-8* 抗体存在下では、観察したどの時点においても体腔細胞による凝集塊形成は認められず、細菌は体腔液中に多量に観察された (Fig. 4-6A: 下段)。なお、どの観察時点においても、細菌による個々の体腔細胞のダメージは認められなかった。また、この結果は、実験した全ての個体 (4 個体) で同様であった。凝集塊サイズの定量的な解析から、抗体による阻害効果は、細菌注射後 1 時間後には既に生じており、少なくとも 4 時間後まで持続した (Fig. 4-6B)。

体腔細胞による凝集塊形成のタイムコースに基づいて (Fig. 4-6A: 上段)、体腔細胞が細菌に対して免疫応答する際の *ApSRCR1* mRNA の発現量の変化を *real-time PCR* 法により調べた。抗 *rSRCR5-8* 抗体による阻害効果が顕著になる注入 2 時間後 (Fig. 4-6B 参照)、*ApSRCR1* mRNA の発現量は、注入前と比較して 2.7 倍に上昇した (Fig. 4-6C)。一方、注入 4 時間後になると、2 時間後と比較して 0.8 倍に減少した ( $p < 0.005$ , *t* 検定)。





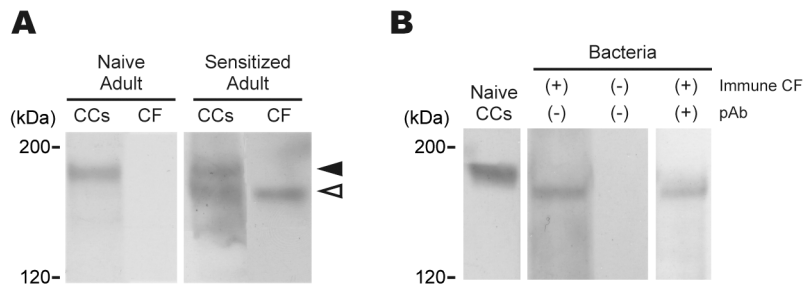
**Fig. 4-6** 成体の体腔細胞の凝集塊形成及び食食活性に対する抗 rSRCR5-8 抗体の影響

(A) バクテリア及び normal IgG(上段)又は抗 rSRCR5-8 抗体(下段, anti-rSRCR5-8 pAb)を成体の体腔に同時に注入した際の体腔細胞による免疫応答の経時変化。注入直後及び注入 1、2、4 時間後に体腔液を回収し体腔細胞の状態を観察した。スケールバーは 500 μm。(B) (A)で観察された凝集塊サイズの定量的解析。凝集塊のサイズは、Image J ソフトウェアを用いて、基質上に占める面積として算出した。データは平均値 ± 標準誤差を示している。(C) バクテリア投与後 2 及び 4 時間後における体腔細胞での *ApSRCR1* mRNA 発現量。データは投与前の未感作個体の体腔細胞(0 h)に対する相対量を表している。投与 4 時間後の *ApSRCR1* mRNA の発現量は、2 時間後よりも有意に減少している ( $p < 0.005$ , t 検定)。データは平均値 ± 標準誤差を示している(N = 4)。

#### 4-7 免疫応答時における *ApSRCR1* タンパク質の機能特性

抗 *rSRCR5-8* 抗体が、細菌に対する免疫応答において、幼生の間充細胞のみならず、成体の体腔細胞に対しても阻害効果を示したことから、生化学的解析が容易な成体を用いて、*ApSRCR1* タンパク質の機能特性の解析を行った。細菌を注入して 2 時間後の成体を材料にウェスタンブロットを行った結果、比較的多量の *ApSRCR1* タンパク質が、体腔細胞だけでなく、細胞を除去した体腔液からも検出された(Fig. 4-7A : 右パネル)。細菌注入後 2 時間の体腔液において、*ApSRCR1* タンパク質は 1 本のバンドとして検出されたが(Fig. 4-7 : 右パネルの CF)、このバンドサイズは、未感作な体腔細胞と比較して約 10 kDa 小さかった。さらに、この小さいサイズの *ApSRCR1* タンパク質は、細菌注入 2 時間後の体腔細胞においても検出された(Fig. 4-7A : 右パネルの CCs)。一方、未感作個体の体腔液では、バンドは検出されなかった(Fig. 4-7A : 左パネルの CF)。

*ApSRCR1* タンパク質が細菌に結合するか否かを明らかにするため、上述した細菌注入 2 時間後の体腔液中で細菌をインキュベートした。30 分間インキュベートした細菌を用いてウェスタンブロットを行ったところ、1 本の明確なバンドが検出された(Fig. 4-7B : 中央パネルの左レーン)。このバンドサイズは、未感作な体腔細胞の *ApSRCR1* タンパク質よりも約 10 kDa 小さく、細菌感作個体の体腔液で検出されたサイズと一致した(Fig. 4-7A 参照)。一方、このバンドは、抗 *rSRCR5-8* 抗体を加えた体腔液中でインキュベートした細菌においても検出された(Fig. 4-7B : 右パネル)。なお、体腔液中でインキュベートしていない細菌においては、抗 *rSRCR5-8* 抗体が反応するバンドは存在しなかった(Fig. 4-7B : 中央パネルの右レーン)。



**Fig. 4-7 成体の免疫応答における *ApSRCR1* タンパク質の機能特性の解析**

(A) 体腔細胞(CCs)及び細胞を含まない体腔液(CF)中における *ApSRCR1* タンパク質の存在。CCs 及び CF は、未感作(Naive Adult)または細菌による感作個体(Sensitized Adult)から回収した体腔液を分離したものである。感作個体の体腔液中で 170 kDa の位置にバンドが検出されていることに注意。黒矢尻, 180 kDa: 白矢尻, 170 kDa。CCs サンプルでは 2  $\mu$ g のタンパク質を電気泳動した。CF サンプルではタンパク量は測定していない。(B) *In vitro* における *ApSRCR1* タンパク質の細菌への結合特性。左パネル:未感作個体の体腔細胞(Naive CCs)を用いたポジティブコントロール。中央パネル: (A)の感作個体から得た体腔液(Immune CF)でインキュベートした(+)又はしていない(-)細菌。体腔液でインキュベートした細菌で 170 kDa のバンドが検出される。右パネル: 抗 rSRCR5-8 抗体(pAb)を含んだ体腔液でインキュベートした細菌。Naive CCs サンプルでは 2  $\mu$ g、細菌サンプルでは 1  $\mu$ g のタンパク質を電気泳動した。

## 4-8 考察

第4章では、棘皮動物ヒトデにおいて初めて、SRCR ドメインを有するタンパク質を単離、同定した。最初に、イトマキヒトデから SRCR タンパク質をコードする cDNA のクローニングを行い、*ApSRCR1* と名付けた。*ApSRCR1* タンパク質が、個体発生を通して自然免疫システムにどのように寄与しているのかを明らかにするために、イトマキヒトデの発生過程及び成体を用いて、*ApSRCR1* タンパク質の分子構造、発現、細胞内局在性、機能を解析した。これらの結果をもとに、以下の4項目について考察する。

### *ApSRCR1* タンパク質の構造的特徴

後生動物の自然免疫システムにおいて、多様なドメイン構造を有する多様な SRCR タンパク質が存在することが知られている(Sarrias et al., 2004)。アミノ酸配列の解析から、*ApSRCR1* タンパク質の構造は以下のように特徴付けられる(Fig. 4-1): (1) *ApSRCR1* タンパク質は、タンデムに連なった9個の SRCR ドメインを有しており、それらの SRCR ドメインはグループ A に分類される SRCR ドメインの特徴と一致している; (2) アミノ酸配列から予想される分子量は 120 kDa であるが、*ApSRCR1* タンパク質は *N*-グリコシル化部位の候補を 11 箇所所有している; (3) *ApSRCR1* タンパク質は、SRCR ドメインに加え、1個の SCR ドメインと1個の膜貫通領域を有している。*ApSRCR1* タンパク質と同様、SRCR ドメインと SCR ドメインを共通に有するタンパク質は、これまで、ウニ成体の *SpSRCR7*(Pancer, 2000)、カイメン成体の *SRCR-SCR-Car*(Blumbach et al., 1998)及び *MAP-GEOCY*(Pahler et al., 1998)の4種類が報告されている。但し、これら4種類の SRCR タンパク質に含まれる SRCR ドメイン及び SCR ドメインの数は、*ApSRCR1* タンパク質とは異なっている。

多くの SRCR タンパク質において、グループ A の SRCR ドメイン内における2番目と3番目のシステインに挟まれる領域は、相同性が低い、多様性を有する領域である(Claudianos et al., 2002)。さらに、この多様性を有する領域は、SRCR ドメインの表面に露出しているだけでなく(Hohenester et al., 1999)、SRCR ドメインとそのリガンドの相互作用に関与するという報告がなされている(Bowen et al., 2000)。興味深いことに、*ApSRCR1* タンパク質の SRCR ドメ

イン内に存在する 10 箇所の *N*-グリコシル化部位の候補の内、7 個がこの領域に集中している(Fig. 4-1B)。ApSRCR1 タンパク質を構成する SRCR ドメイン内のこの領域も、イトマキヒトデの自然免疫システムにおいて重要かもしれない。

## イトマキヒトデの個体発生を通じた自然免疫システムにおける ApSRCR1 タンパク質の関与

後生動物の個体発生を通じた SRCR タンパク質の発現プロフィールはこれまでほとんど注目されてこなかったが、本研究による ApSRCR1 タンパク質の解析によって初めて示された。その結果、イトマキヒトデの自然免疫システムにおいて、ApSRCR1 タンパク質の関与を示唆する 2 つの知見が得られた。一つは、ApSRCR1 タンパク質が、幼生の間充織細胞及び成体の体腔細胞という 2 種の免疫細胞のみにおいて、*de novo* 合成されているという事実である(Fig. 4-2, 4-3)。また、母性 ApSRCR1 mRNA の翻訳は、中期原腸胚期まで抑制されていることも明らかとなった。従って、ApSRCR1 タンパク質の *de novo* 合成は、精密な制御メカニズムによってコントロールされていると考えられる。現在のところ、母性 ApSRCR1 mRNA がどのようなメカニズムで翻訳抑制されているのかは明らかではないが、ApSRCR1 mRNA の非常に長い 3'-UTR が翻訳制御に関与しているのかもしれない。2 つ目は、ApSRCR1 タンパク質における *N*-グリコシル化を介した翻訳後修飾の程度が、幼生の間充織細胞と成体の体腔細胞間で異なっているという事実である(Fig. 4-3D)。N-グリコシル化は、免疫システムにおける分泌(Carra et al., 2000)、認識(Green et al., 2007)、受容体のターンオーバー(Rabinovich et al., 2007)などの制御において、重要な役割を担っていることが知られている。しかし、現在のところ、ApSRCR1 タンパク質の *N*-グリコシル化が、イトマキヒトデの自然免疫システムにどのように関与しているのかは不明である。

アミノ酸配列から、ApSRCR1 タンパク質は膜タンパク質であることが予想されたが、これは、間充織細胞、体腔細胞共に、1% Triton X-100 に対する可溶性から確かめられた(Fig. 4-3C)。一方、抗 rSRCR5-8 抗体による免疫染色の結果、ApSRCR1 タンパク質の発現は両細胞種の細胞質領域で、ドット状のパターンとして検出された(Fig. 4-3A, B)。これらの結果から、ApSRCR1 タンパク質は細胞質に存在する何らかの小胞膜上に局在していることが示唆される。これに対

し、免疫細胞で発現する多くの SRCR タンパク質は、細胞表面で発現していることが報告されている(Elomaa et al., 1995; Freeman et al., 1990; Kodama et al., 1990; Liu et al., 2011; Van den Heuvel et al., 1999)。ApSRCR1 タンパク質のように、細胞質の小胞のみに局在する SRCR タンパク質は報告されていない。

### イトマキヒトデ成体及び幼生の自然免疫システムにおいて ApSRCR1 タンパク質はオプソニンとして機能している

成体において、抗 rSRCR5-8 抗体又は normal IgG とバクテリアチャレンジを組み合わせた機能解析の結果から、ApSRCR1 タンパク質が、イトマキヒトデの自然免疫システムにおいて、オプソニンとして機能していることが示唆された(Fig. 4-6)。ApSRCR1 mRNA の発現量は、バクテリアに対する免疫応答と協調して上昇するだけでなく、凝集塊形成の進行過程においてダウンレギュレーションが始まっており(Fig. 4-6C)、免疫応答の初期過程で機能するオプソニンの特徴とよく一致している。ApSRCR1 タンパク質がオプソニンとして機能しているという考えは、成体におけるバクテリア感作個体の体腔液を用いた以下の 2 つの実験結果によって直接支持される: (1) ApSRCR1 タンパク質は、細胞を除去したバクテリア感作個体の体腔液中に存在している (Fig. 4-7A); (2) ApSRCR1 タンパク質は、体腔細胞非存在下においてもバクテリアと結合できる (Fig. 4-7B)。ムラサキウニの体腔液中には、ウサギ赤血球に対してオプソニン活性を有する物質(Bertheussen, 1983)や補体成分 C3 の相同タンパク質 SpC3 (Clow et al., 2004; Smith, 2002)が含まれていることが報告されている。一方、ヒトデ *Asterias rubens* においては、C3 の相同遺伝子断片がクローニングされているものの(Mogilenko et al., 2010)、ヒトデ類において ApSRCR1 タンパク質以外にオプソニン活性を示すタンパク質は同定されていない。

バクテリアチャレンジした成体の応答において、ApSRCR1 タンパク質のオプソニン機能を発動させるメカニズムは以下のように推測することができる。まず、機能型 ApSRCR1 タンパク質の前駆体は、未感作体腔細胞の細胞内小胞で、膜タンパク質として局在している(Fig. 4-3)。次に、体腔中にバクテリアが侵入すると、ApSRCR1 mRNA の発現が上昇する(Fig. 4-6C)。続いて、ApSRCR1 タンパク質が体腔細胞から体腔液中に分泌される(Fig. 4-7A)。この際、ApSRCR1 タンパク質の細胞外領域が体腔細胞から切断され、約 10 kDa に相当

する *ApSRCR1* タンパク質の膜貫通及び細胞内領域が体腔細胞に残される (Fig. 4-7A, 4-1A も参照)。また、体腔液中の体腔細胞は正常な形態を保った状態で観察されることから (Fig. 4-6A)、体腔細胞は細菌暴露による損傷を受けていないと考えられる。最後に、分泌型 *ApSRCR1* タンパク質が細菌に結合し (Fig. 4-7B)、その結果、体腔細胞による凝集塊形成を伴った貪食作用が引き起こされる (Fig. 4-6A)。

成体の体腔液を用いた解析から、抗 *rSRR5-8* 抗体が *ApSRCR1* タンパク質の細菌への結合を阻害しないことも明らかとなった (Fig. 4-7B)。この事実は、抗 *rSRR5-8* 抗体が、*ApSRCR1* タンパク質によってオプソニン化された細菌と体腔細胞の相互作用を阻害していることを示唆している。換言すれば、細菌に結合した *ApSRCR1* タンパク質を体腔細胞が認識することにより、その後の自然免疫システムが作動することが強く推測される。現時点では、*ApSRCR1* タンパク質がオプソニンとして機能する際、細菌以外の病原体を認識することができるか否かは明らかではない。

第2章で明らかにした幼生の間充織細胞のダイナミクスと同様に、成体の体腔細胞による凝集塊形成は、異物除去の指標である (第1章も参照)。実際、*normal IgG* を用いた対照実験において、体腔細胞は凝集塊を形成し、細菌を除去している (Fig. 4-6A)。凝集塊形成は、体腔中において異物を密封するという点で、非常に効果的な貪食戦略であると考えられており (Chen et al., 2007)、凝集塊形成と *ApSRCR1* タンパク質のオプソニン機能を介した貪食作用を関連させるメカニズムの解明が待たれる。近年、マクロファージが、アポトーシスを生じた好中球を貪食する際に、*galectin-3* をオプソニンとして用いていることが報告された (Karlsson et al., 2009)。興味深いことに、*galectin-3* は、メラノーマ細胞の凝集に関与する代表的な *SRCR* タンパク質 *MAC-2* 結合タンパク質と相互作用することが知られている (Inohara et al., 1996)。一方、マウスにおける分泌型 *SRCR* タンパク質である *CRP-ductin* は、細菌のみならず肺のオプソニンである *surfactant protein D* とも結合することが報告されている (Madsen et al., 2003)。*ApSRCR1* タンパク質も、*CRP-ductin* と同様細菌に結合することができるが、*ApSRCR1* タンパク質が、凝集塊形成において他のタンパク質を必要とするのかという問題については今後の課題である。

成体と同様、幼生においても、間充織細胞による細菌の除去及び凝集

塊形成が、*ApSRCR1*-MO 及び抗 *rSRCR5-8* 抗体で阻害された(Fig. 4-5)。これらの結果から、幼生期における間充織細胞による自然免疫システムにおいても、*ApSRCR1* タンパク質はオプソニンとして機能していると推測される。しかし、体腔細胞と比較して、間充織細胞に対するこれらの阻害効果が不完全であることに関しては言及する必要がある。つまり、*ApSRCR1* タンパク質を阻害しても、ある程度の間充織細胞がバクテリアに応答していたという事実である(Fig. 4-5)。この事実は、幼生の自然免疫システムの *ApSRCR1* タンパク質への依存度は、成体の自然免疫システムよりも低いことを示唆している。実際、間充織細胞及び体腔細胞において、*ApSRCR1* タンパク質に対する依存度と、*ApSRCR1* タンパク質の発現量には相関が認められる(Fig. 4-3D)。間充織細胞による自然免疫システムにおいては、他のタンパク質も関与しているのかもしれない。

### ***ApSRCR1* 遺伝子とイトマキヒトデにおける *SRCR* 遺伝子ファミリー**

ムラサキウニ *S. purpuratus* において、体腔細胞に対するバクテリアや菌類などの病原体の暴露によって、多様な *SRCR* 遺伝子が転写レベルでダイナミックな発現調節を受けていることが報告されている(Pancer, 2000)。また、*S. purpuratus* における *SRCR* 遺伝子の多様性はゲノム解析によって明らかにされ、218 種の *SRCR* タンパク質をコードする 1000 以上の *SRCR* ドメインが発見されている(Rast et al., 2006)。しかし、イトマキヒトデにおいては、ウニと同じ棘皮動物に属しているものの、このような多様性は存在しないと考えられる。理由として以下の事実を述べる。まず、*S. purpuratus* において、複数の *SRCR* 遺伝子の増幅が認められた degenerate プライマーで、イトマキヒトデでは *ApSRCR1* 以外の cDNA は増幅されなかった。また、*ApSRCR1* 遺伝子の転写及び翻訳産物は、ノーザンブロット及びウエスタンブロット解析において単一のバンドとして検出された(Fig. 4-2)。さらに、免疫応答に対する *ApSRCR1* タンパク質の阻害効果は、バクテリアに対する凝集塊形成及び貪食作用の不全として明らかに証明された(Fig. 4-6)。これらの結果から、*ApSRCR1* タンパク質は、ヒトデにおいて特有のタンパク質であることが推測される。*S. purpuratus* と同様に、もしイトマキヒトデにおいて膨大な *SRCR* 遺伝子が存在するのであれば、本研究によって得られる結果は非常に複雑であったと考えられる。イトマキヒトデにおける *SRCR* 遺伝子の多様性は、現在進行中のゲノム解析によって明らかになるであろう。



## 材料と方法

### 実験動物、受精ならびに発生

第2章と同様の方法でイトマキヒトデ *A. pectinifera* を採集、飼育し、受精卵を得た。受精卵は人工海水 (ASW) で発生させ、胞胚、中期原腸胚、後期原腸胚、ビピンナリア幼生を得た。一部の実験では、受精後4日目のビピンナリア幼生約100個体当たり100 mlのASWを15 cmシャーレに入れ、50 rpmで巡回培養した。餌として珪藻を4日ごとに与え、ブラキオラリア幼生まで発生させた。

モルフォリノオリゴ (MO) の顕微注射用の未成熟卵の調製は、第3章に記述した方法で行った。

### 間充織細胞及び体腔細胞

単一な間充織細胞集団は、第2章に記した方法で培養下に単離した。成体の体腔細胞は、Dan-Sohkawa らの方法 (Dan-Sohkawa et al., 1993) に従い、体腔から得た。簡単に記述すると、18G×1/2”針 (TERUMO) を用い、1 ml シリンジ (TERUMO) で成体の体腔から体腔液を抜くことにより準備した。

### cDNA クローニング、シーケンシング及び配列解析

第3章で作製した培養間充織細胞由来の cDNA ライブラリーをテンプレートとして、第3章と同様に、degenerate PCR を行った。degenerate プライマーは、Pancer ら (1999) が後生動物の SRCR 遺伝子配列から設計した SRCR.F1 (5'-TGGGGIACIRTNTGYGA) 及び SRCR.R2 (5'-CAIACIACNCCNGCRTC) を用いた。PCR 反応は、rTaq (TOYOBO) を用いて 94°C-3 分間の後 94°C-30 秒間、42°C-2 分間、74°C-2 分間を 5 サイクル、94°C-30 秒間、43°C-1 分間、74°C-2 分間を 40 サイクル、74°C-10 分間で行った。3 つの SRCR ドメイン配列を有していた PCR 産物をプローブとして、上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンの中で最も大きなサイズであった 5 kb のクロー

ンをシーケンシングし、*ApSRCR1* と名付けた。*ApSRCR1* 遺伝子の全長配列を得るために、*SRCR1-5'race* プライマー (5'-CAGCAGGTGGCAGCTACAGCCTC) 及び *SRCR1-3'race* プライマー (5'-GTCTTGAGCTTCAGTGCCATGACG) を用いて、それぞれ 5'-RACE、3'-RACE を第3章と同様の方法で行った。

全てのシーケンシング反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて Fluorescence DNA sequencer 3100 (ABI PRISM) によって行った。*ApSRCR1* 遺伝子及びタンパク質の配列解析は、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 及び Expert Protein Analysis System (<http://us.expasy.org>) で行った。

### ノーザンブロット解析

様々な発生ステージのサンプルから、第3章に記述した方法に従い、それぞれ total RNA を抽出した。7.5 µg の各 total RNA を 1%アガロース・6%ホルムアルデヒドゲル中で分離し、ナイロンメンブレン(PALL Biotransfer membrane) にブロットイングした。*SRCR1-p.5'* プライマー (5'-TGGTTGTGATTGGCCAGGAC) 及び *SRCR1-p.3'* プライマー (5'-CATTCCGTCTTCAGGCC) で増幅した *ApSRCR1* 遺伝子の cDNA 断片を rediprime™ II random prime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP で標識し、プローブとした。内在性コントロールのプローブとして、*Ap18S-f* (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAAG) 及び *Ap18S-r* (5'-GCTCTGCTGTCCAGGCGGTC) で増幅したイトマキヒトデ 18S rRNA の cDNA 断片を、同様に [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP で標識した。ハイブリダイゼーションは、過去の報告に従い行った(Hase et al., 2003)。

### ポリクローナル抗体の作製

*SRCR5-8F* プライマー (5'-CACCAACTATGAGGCTGTAGATGC) 及び *SRCR5-8R* プライマー (5'-CAACACAAGTGCCATGGACAC) を用いて、cDNA 断片を増幅した(本章 4-3 参照)。増幅産物を pET100/D-TOPO vector

(Invitrogen)にサブクローニングし、*E. coli* BL21 株にトランスフェクションした。*E. coli* で発現させたりコンビナントタンパク質 (rSRCR5-8)は、8 M urea を用いた変性条件下で、HiTrap™ HP カラム (1 ml、Amersham Bioscience) を用いて説明書に従って精製した。精製した rSRCR5-8 タンパク質 100 µg を抗原とし、2 週間のインターバルで計 4 回モルモットを免疫した。初回免疫時はフロイント完全アジュバント、2 回目以降は不完全アジュバントを用いた。4 回目の免疫後に採血し、HiTrap™ Protein A HP カラム (1 ml、Amersham Bioscience)を用いて IgG (抗 rSRCR5-8 抗体)を精製した。対照実験に用いた normal IgG は、免疫前の血清から精製した。

### モルフォリノアンチセンスオリゴの顕微注射

*ApSRCR1*-MO 及び control-MO は Gene Tools LLC.より得た。*ApSRCR1*-MO の配列は、5'- CGAAGTGACGTCATGATGAGGTATC であり、*ApSRCR1* mRNA のスタートコドン (下線) を含んだ配列に対する相補的な配列とした。control-MO (5'- GATACCTCATCATGACGTCACCTTCG) は、*ApSRCR1*-MO に対する相補的な配列とした。各 MO は、滅菌水で 120 µM となるように調製した。未成熟卵への顕微注射は、第 3 章で記述した方法で行った。

### バクテリアチャレンジ及び結合アッセイ

培養した *E. coli* を ASW で OD<sub>600</sub> を 0.5 に調製し、5 分間煮沸した。幼生への注射は、第 3 章と同様の方法で行った。成体の場合は、100 µg の抗 rSRCR5-8 抗体又は normal IgG を含んだ 1 ml の *E. coli* 懸濁海水を体腔に注入した。なお、成体 1 個体 (平均湿重量: 50 g) 当たりの体腔液量は、約 10 ml である。

*ApSRCR1* タンパク質のバクテリアへの結合は、注入 2 時間後に回収した体腔液を用いて解析した。この時間の体腔液中では、注入した *E. coli* はほとんど観察されない。この体腔液 5 ml を、4°C、6500×g で 10 分間遠心し、細胞のペレット及び上清を得た。5 ml の上清を用いて、抗 rSRCR5-8 抗体存在下或いは非存在下で、新たに調製したバクテリアを 20°C で 30 分間インキュベートした。その後 ASW で 2 回洗浄した。

## Real-time PCR

第3章と同様の方法で成体の体腔細胞から cDNA を調製し、テンプレートとした。162 bp の *ApSRCR1* 遺伝子断片 (nucleotides: 3722-3883) を、SRCR-CYTO-f (5'- AAGGGAAGAAATAAGAATATTGGCC) 及び SRCR-CYTO-r (5'- CTAGATGTCCTCCCCCATTCGG) で増幅した。リファレンス遺伝子及び real-time PCR の方法は、第3章と同様とした。

## ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングのサンプルは以下に記す方法で調製した。(1) 受精卵、胚、幼生サンプルは、第2章に記した方法により準備した。(2) 培養間充織細胞及び成体の体腔細胞は、1700×g で5分間遠心した後、5 µl のペレットに対し200 µl の1% Triton X-100 (TX-100) を含む或いは含まないホモジェナイズバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM PMSF、10 µg/ml Leupeptin) を加えた。ダウンス型ホモジェナイザーを用いて、ルーズペストルで30回、続いてタイトペストルで50回、氷上でホモジェナイズした。ホモジェネートを16000×g で10分間遠心することにより上清及びペレットを得、それぞれ可溶性画分、不溶性画分とした。(3) PNGase F 処理は、TX-100 を含まないホモジェナイズバッファー中で、(2)の方法でホモジェナイズした間充織細胞及び体腔細胞に対して行った。各細胞のホモジェネートを700×g で10分間遠心し、ホモジェナイズバッファーを用いて上清のタンパク質濃度を1 µg/µl に調製した。次に8 µl の上清に1 µl の PNGase F (BioLabs) 及び1 µl の10% NP40 (BioLabs) を加え、37°C で1時間インキュベートした。(4) バクテリアチャレンジを施した成体のサンプルは以下のように調製した。体腔液及び体腔細胞のサンプルは、バクテリア注入後2時間の成体から得た5 ml の体腔液を、4°C、6500×g で10分間遠心して細胞ペレット及び上清に分離した。上清は1/100 PBS 中で透析後、凍結乾燥した。体腔細胞は ASW で2回洗浄した。バクテリアサンプルは、上述した方法によって調製した。各サンプルのタンパク質濃度は、BCA Protein Assay kit (Pierce) を用いて行った。

SDS-PAGE 及びブロッティングは、過去の報告(Kaneko et al., 2005)に従って行った。但し、一次抗体として抗 rSRCR5-8 抗体 (1000 倍希釈) 又は normal

IgG (1000 倍希釈)、二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated goat anti-guinea pig IgG (10000 倍希釈, Jackson ImmunoResearch)を用いた。化学発光剤は、ECL plus system (GE Healthcare)を用いた。

## 免疫組織化学染色

種々の発生段階の胚及び細胞を、冷メタノール(100 %)中で 20 分間処理して固定した。ビピンナリア及びブラキオラリア幼生の場合は、0.37 M MgCl<sub>2</sub> で 2 分間麻醉処理し、冷メタノールで固定した。これらのサンプルを、一次抗体 (抗 rSRCR5-8 抗体, 1000 倍希釈)及び二次抗体 (Alexa488-conjugated goat anti-guinea pig IgG, 2000 倍希釈, Molecular Probes)を用いて染色した。核を染色する場合は、二次抗体で処理する際に、PI (0.1 µg/ml, Wako)を加えた。MC5 mAb で染色する場合は、第 2 章で記述した方法で行った。全てのサンプルは、第 2 章と同様、共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview, Olympus)で観察した。

バクテリアチャレンジ実験における胞胚腔中のバクテリアの可視化は、高解像度のノマルスキー明視野像をモニタ上で拡大し、個々のバクテリアを Photoshop (Adobe)を用いてマゼンタでペイントして行った。

## 第 5 章

総括及び考察、ならびに今後の展望

## 5-1 総括

本研究では、イトマキヒトデ幼生の間充織細胞が有する生体防御機能及びそれを裏打ちする分子メカニズムの解析を通して、イトマキヒトデを材料とした比較免疫学的研究基盤の確立を目指した。

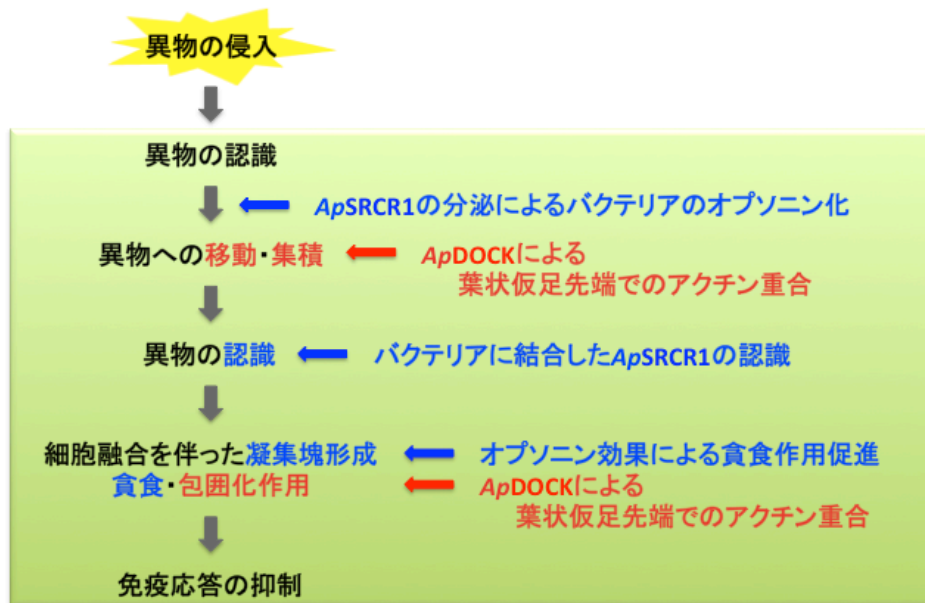
第2章では、ヒトデ幼生の生体防御システムにおいて間充織細胞が示す貪食行動及びその構造、機能特性を解析した。その結果、(1) 未感作状態において大半の間充織細胞が体壁直下でダイナミックなネットワーク構造を構築していること、(2) 間充織細胞はほとんど全ての異物に対して貪食性の行動を示し、特に比較的大量あるいはサイズの大きな異物に対しては多核凝集体を形成して包囲化すること、(3) 細胞性異物に対して形成する多核凝集体の形態は、異物の種類や表面構造によってバリエーションがあること、(4) 間充織細胞は、生きた同種間充織細胞に対しては免疫応答を生じないこと、そして(5) 間充織細胞は外胚葉上皮から流出した細胞残渣や体壁を通過して胞胚腔中に侵入した異物を貪食することを明らかにした。以上の結果により、間充織細胞が、幼生の生体防御システムを担う能力を携えていることを証明した。同時に、細胞レベルにおける間充織細胞による生体防御システムの解析系を確立した。

第3章では、第2章で明らかとなった間充織細胞の貪食行動のダイナミクスを細胞内で制御するタンパク質として、*ApDOCK* タンパク質を同定した。モルフオリノアンチセンスオリゴを用いて *ApDOCK* タンパク質をノックダウンした幼生の間充織細胞は、(1) 注射された非細胞性異物に向かう移動及びその異物に対する包囲化作用の維持が不全となる。一方、(2) 貪食作用や細胞融合は正常に行うことを明らかにした。同様の行動は、ノックダウン幼生に対するバクテリアの注射によっても確かめられた。*In vitro* での解析から、*ApDOCK* mRNA の発現量変化は間充織細胞の免疫行動と相関があることも明らかとなった。さらに、*ApDOCK* タンパク質の機能を阻害した間充織細胞では、葉状仮足先端における繊維状アクチン細胞骨格の構築が不全になることにより、葉状仮足形成が十分に生じないことも明らかにした。これらの結果から、免疫応答の過程において、間充織細胞による異物への移動及び包囲化作用の維持は、*ApDOCK* タンパク質が葉状仮足伸長端でアクチン細胞骨格を再構築することにより制御されていると結論づけられた。

第4章では、間充織細胞の貪食作用を細胞外で制御するタンパク質として *ApSRCR1* タンパク質を同定した。ヒトデの個体発生において、*ApSRCR1* タンパク質は幼生の間充織細胞のみならず成体の体腔細胞でも発現しており、ヒトデの免疫細胞特異的なタンパク質であることが明らかになった。さらに、両細胞種における *ApSRCR1* タンパク質の局在性として、*ApSRCR1* タンパク質は細胞質領域の小胞膜上で発現していることが明らかになった。また、*ApSRCR1* タンパク質の機能阻害により、間充織細胞のみならず体腔細胞においてもバクテリアに対する貪食作用及び凝集塊形成は不全となった。バクテリアで感作された成体の体腔液を用いた解析から、*ApSRCR1* タンパク質はバクテリア刺激によって小胞内で切断後、細胞外に分泌されることが明らかになった。この分泌型 *ApSRCR1* タンパク質は、バクテリアに結合することも判明した。以上の結果から、*ApSRCR1* タンパク質は、ヒトデ幼生のみならず成体の自然免疫システムにおいてオプソニンとして機能することにより、幼生の間充織細胞及び成体の体腔細胞による貪食作用を制御していることを証明した。一方、間充織細胞及び体腔細胞で発現する *ApSRCR1* タンパク質の発現量及び糖鎖修飾の程度の違いに加え、生体防御システムにおける寄与の程度が間充織細胞と体腔細胞で異なっているという興味深い事実も明らかになった。

本研究により明らかになった棘皮動物ヒトデ幼生の間充織細胞による防御行動及びその制御メカニズムを Fig. 5-1 にまとめた。以上の研究成果を踏まえ、以下の2つの項目において考察し、続いて今後の展望を述べる。





**Fig. 5-1 間充織細胞による防御行動の素過程とその制御メカニズムの概要**

バクテリアの侵入を例として示した。ApDOCK タンパク質による行動制御を赤字で、ApSRCR1 タンパク質による行動制御を青字で示している。未感作時において、間充織細胞は幼生の体壁直下で動的なネットワーク構造を形成した状態で配置している。バクテリアの侵入を認識した間充織細胞は ApSRCR1 タンパク質を放出し、バクテリアをオプソニン化する。続いて ApDOCK mRNA がアップレギュレートされ、異物侵入部位に移動、集積する。集積した間充織細胞は、バクテリアに結合した ApSRCR1 タンパク質を認識することにより凝集塊形成を伴った貪食作用を促進する。なお、この凝集塊形成による異物の包囲化作用は、ApDOCK タンパク質によって制御される葉状仮足形成により維持される。

## 5-2 ヒトデ幼生間充織細胞と哺乳類マクロファージの機能類似性

第2章で記述したように、間充織細胞による生体防御機能の特徴として、活発な貪食作用能及び貪食不可能な異物に対する「不成功の貪食作用能」、そして高い細胞融合能が挙げられる。間充織細胞が示すこれらの細胞機能のいずれも、哺乳類マクロファージの機能的特徴と共通している。これらの事実から、ヒトデ幼生の間充織細胞は、哺乳類マクロファージの細胞祖先であると考えられる。

第4章で、*ApSRCR1* タンパク質がオプソニン効果により間充織細胞による貪食作用を促進していることを明らかにしたが、哺乳類マクロファージにおいても *SRCR* タンパク質がバクテリアやアポトーシス細胞に対する貪食作用に関与していることが報告されている(Sarrias et al., 2004)。また、マクロファージによる比較的小さな異物の貪食作用にはクラスリンタンパク質が関与することがよく知られているが、イトマキヒトデにおけるクラスリンオーソログ、*ApClathrin* (未発表)が、間充織細胞による貪食作用に関与しているという予備的データも得られている。さらに、第3章において、*ApDOCK* タンパク質のノックダウンによって包囲化作用の不全や培養基質上での伸展面積の減少が生じたという事実は、間充織細胞による「不成功の貪食作用」に *ApDOCK* タンパク質が関与していることを意味している。哺乳類マクロファージにおいても、*DOCK180-Crk* 複合体が「不成功の貪食作用」に関与していることが示唆されている(Lee et al., 2007)。これまで、間充織細胞の融合に関わる分子的知見は得られていないが、現在進めている間充織細胞で発現している免疫関連遺伝子の網羅的解析において、*ApDOCK* とは異なる *DOCK180* 関連遺伝子の部分配列が得られている。この新たな *DOCK180* オーソログが、*DOCK180* と同様、細胞融合や貪食作用に関与している可能性が考えられる。

現在のところ、ヒトデ幼生の間充織細胞の生体防御機能に関与する分子的知見は予備的データも含めてまだ限られている。しかしながら、ヒトデ幼生の間充織細胞及び哺乳類マクロファージを特徴付ける共通の生体防御機能において、両者が共通の分子種を用いているという事実は非常に興味深い。今後、現在進行中の間充織細胞における免疫関連遺伝子の網羅的解析の結果から、両者の機能類似性を裏打ちする新たな分子的知見が得られることが期待される。

### 5-3 免疫細胞の防御行動を細胞内外で制御するタンパク質の進化的共通性と多様性

本研究で得られた *ApDOCK* 及び *ApSRCR1* タンパク質は、共に後生動物の進化の過程で保存されたタンパク質ファミリーである。これらのタンパク質ファミリーが、ヒトデ幼生の間充織細胞のみならず哺乳類マクロファージを特徴付ける細胞行動に関与していることは前項で述べた。しかし、両タンパク質ファミリーの構造及びこれらに制御される細胞行動には、以下に示す共通性と多様性が認められる。

*ApDOCK* タンパク質は、*DOCK180* 関連タンパク質の中で *DOCK-A* サブファミリーに分類されるが、*DOCK-A* サブファミリーに属するタンパク質の構造は高度に保存されており、全て *DHR-1*、*DHR-2* ドメインに加え N 末端側に *SH3* ドメインを有している。*DOCK-A* サブファミリータンパク質の機能実体はアクチン経路の制御である (Cote and Vuori, 2007)。しかしながら、それぞれのタンパク質が制御する細胞行動には多様性がある。ヒトデ幼生では免疫応答における間充織細胞の移動及び「不成功の貪食作用」に関与していた。哺乳類では、マクロファージによる通常の貪食作用及び「不成功の貪食作用」や細胞融合には *DOCK180* が関与するが (Cote and Vuori, 2007; Lee et al., 2007; Pajcini et al., 2008)、免疫細胞の移動は *DOCK2* によって制御されている (Nishihara et al., 1999; Reif and Cyster, 2002)。一方、ショウジョウバエでは筋芽細胞の融合及び上皮細胞の移動 (Erickson et al., 1997; Rushton et al., 1995)、線虫ではアポトーシス細胞の貪食及び遠端細胞の移動に関与する (Wu and Horvitz, 1998)。このように、*DOCK-A* サブファミリーは様々な動物種において共通の構造で共通のシグナル経路に関与しているが、そのアウトプットとしての細胞行動に多様性が認められる。

一方、*SRCR* タンパク質ファミリーにおいては、*DOCK-A* サブファミリーで認められる共通性と多様性が逆である。*SRCR* タンパク質は、病原体関連分子パターンに対する代表的な異物認識分子であると考えられている。実際、哺乳類をはじめ多くの動物種において、生体防御システムで機能する *SRCR* タンパク質の大半が異物の貪食作用に関与していることが報告されている (Sarrias et al., 2004)。同様に、*ApSRCR1* タンパク質も、オプソニンとしてバクテリアに結合することにより貪食作用時の異物認識に関与していることが明らかとなっ

た。しかし、**SRCR** タンパク質の構造は非常に多様であり、**SRCR** ドメインを一つ以上有していること以外に共通性は認められない(Sarrias et al., 2004)。すなわち、分子構造上の多様性が存在しても、貪食作用時の異物認識という機能に関しては共通である。

細胞内及び細胞外で免疫細胞の防御行動を制御するこれら 2 つのタンパク質ファミリーにおいて、構造及び機能に関する進化的共通性及び多様性の違いは非常に興味深い。**DOCK180** 関連タンパク質の分子系統樹 (Fig. 3-1D)から考慮すると、動物進化の初期で生じた**DOCK-A** サブファミリータンパク質の機能は、細胞移動におけるアクチン細胞骨格の制御であったと推測される。その後の進化の過程で、それぞれの動物種における特定の細胞機能に適応して、機能の多様性が生じたのであろう。これに対し、**SRCR** タンパク質ファミリーによる細胞外での異物認識に関しては、それぞれの動物種の生息環境や体内の生理環境に伴い、認識対象となる異物の多様性が推測される。その結果、異物の多様性に対応したタンパク質構造の多様性が獲得されてきたと考えられる。

#### 5-4 ヒトデ幼生及び成体における異物認識戦略の変化と今後の展望

第2章において、間充織細胞の異物認識能力を明らかにしたが、その結果は驚くべきものであった。間充織細胞は同種異個体認識能力を携えていないのみならず (Fig. 2-9)、生きた同種細胞であれば例えそれが精子であっても免疫応答を生じなかった (Fig. 2-8)。この結果は、間充織細胞による免疫応答は生きた同種細胞に対しては抑制性であることを意味している。間充織細胞による自己非自己認識メカニズムは、哺乳類の自然免疫の一翼を担うナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) の認識モデル (Lanier, 2005) を拡張することにより説明できる。NK 細胞の認識メカニズムは、標的細胞上に存在する自己マーカー (自己抗原) を認識し、自己マーカーが無ければ攻撃する「missing-self (自己喪失)」認識である。ヒトデ幼生の間充織細胞による認識機構も、同様のものであると考えられる。但し、ヒトデ幼生の場合は、自己マーカーのように個体ごとに特異的な分子ではなく、種特異的な分子を認識するという点で異なる (Fig. 5-2)。つまり、「missing-species (種喪失)」認識である (Furukawa, 2012; 古川, 2009b)。「この種特異的な分子の実体は何か？」という問題は、非常に興味深い。現在、グリコシダーゼ混合液で処理したヒトデ精子は、生きた状態であってもウニ精子と同様に貪食されることが明らかになっている (Furukawa, 2012; 古川, 2009b)。ヒトデ幼生の間充織細胞が認識する種特異的な分子は糖を含んでおり、この糖構造が間充織細胞による自己認識 (同種認識) に重要であると推測される (Furukawa, 2012)。

では、この間充織細胞による「missing-species」認識は、成体の体腔細胞においても当てはまるのであろうか？この問題を明らかにするために、成体の体腔細胞の移植を試みた (Fig. 5-3A)。蛍光ラベルした個体 I の体腔細胞を個体 II に注射した12時間後、個体 II の体腔液中には凝集塊を形成した体腔細胞が多数観察された (Fig. 5-3B; 同種異個体移植)。さらに、個体 I に由来する蛍光シグナルは、その凝集塊中にも観察され、遊離細胞では全く検出されなかった (Fig. 5-3C, D) (Furukawa, 2012)。この事実は、注射した個体 I の体腔細胞は、全て個体 II の体腔細胞によって貪食されていることを意味している。一方、自家移植を行った個体 III では、体腔細胞による凝集塊形成は全く認められなかった (Fig. 5-3B; 自家移植)。これらの結果から、成体の体腔細胞が、哺乳類NK細胞と同様に同種異個体細胞を識別できることが明らかとなった (Furukawa, 2012)。つまり、幼生から成体への変態に伴い、自己非自己認識メカニズムが、幼生の

「missing-species」認識から成体の「missing-self」認識へとシフトしたことが示唆される。

無脊椎動物において、個体発生の過程で生体防御システムにおける認識メカニズムがこれほど大きく変化することを示した研究はこれまで報告されていない。今後、幼生の間充織細胞、成体の体腔細胞がそれぞれ認識する種特異的な分子及び個体特異的な分子、ならびに両者の受容体の探索が必要である。同時に、間充織細胞と体腔細胞の発現遺伝子及びタンパク質の比較解析を通して、両者の機能差を明らかにしていくことも重要である。これらの探索、解析を通して、「1種類の細胞によって構築される原始的な生体防御システム」の根幹的なメカニズムの提示のみならず、「1種類の細胞による生体防御システムが個体発生の過程でどのように構築されるのか？」という問題に関して新たな生命現象の発見が期待される。

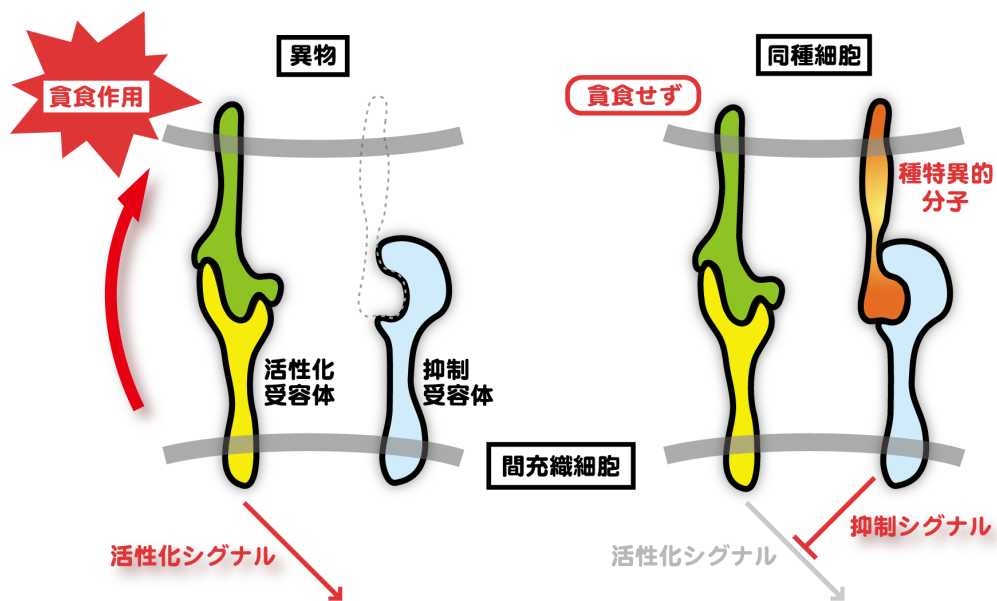
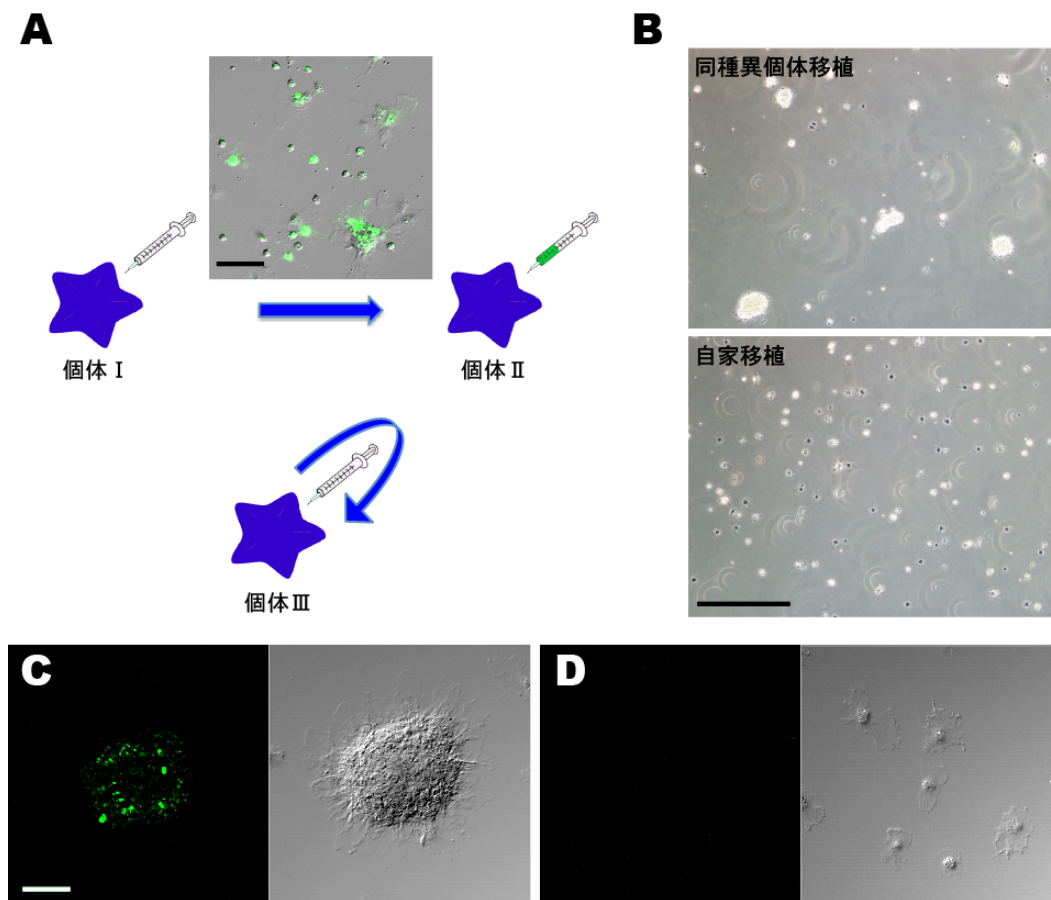


Fig. 5-2 間充細胞による「missing-species」認識モデル

ヒトデ幼生における自己／非自己は、間充細胞が認識する標的表面上に種特異的な分子が存在するかないかによって決定される。間充細胞表面上に存在する抑制受容体が種特異的な分子に結合した場合、抑制シグナルが伝達され免疫応答が抑制される。一方、種特異的な分子を有さない対象は全て異物と見なされ貪食される。



**Fig. 5-3** イトマキヒトデ成体における異個体間の体腔細胞の移植

(A) 体腔細胞の移植実験系。ASW で 30  $\mu\text{g/ml}$  に調製した蛍光標識試薬、5- or 6-(N-Succinimidyl)oxycarbonyl-fluorescein 3', 6'-diacetate (Dojindo)を、個体 I のそれぞれの足に 200  $\mu\text{l}$  ずつ計 1 ml 注入した。8 時間後、個体 I から 1 ml の体腔液を抜いて体腔細胞を回収し、ASW で洗浄後、1 ml の ASW に懸濁した。この蛍光標識された個体 I の体腔細胞(写真)の懸濁液を、個体 II のそれぞれの足に 200  $\mu\text{l}$  ずつ注入した(同種異個体移植)。下段は、個体 III から 1 ml の体腔液を抜いて、再度個体 III に注入した対照実験(自家移植)。(B) 移植 12 時間後の個体 II (同種異個体移植)及び個体 III (自家移植)の体腔細胞(播種 10 分後)。同種異個体移植では、体腔細胞による凝集塊形成が生じている。(C) 同種異個体移植に対して形成された凝集塊の光学的切片像ならびにノマルスキー明視野像。個体 I の体腔細胞に由来する蛍光シグナルが凝集塊中で観察される。(D) 同種異個体移植 12 時間後において凝集塊を形成していない遊離の体腔細胞の光学的切片像ならびにノマルスキー明視野像。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$ (A, C-D); 200  $\mu\text{m}$ (B)。N = 3。



## 参考文献

- Abdelsadik, A., Trad, A., 2011. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum. Immunol.* 72, 1188-1193.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.
- Anderson, J.M., 2000. Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 40-47.
- Bertheussen, K., 1983. Complement-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 21-31.
- Blumbach, B., Pancer, Z., Diehl-Seifert, B., Steffen, R., Munkner, J., Muller, I., Muller, W.E., 1998. The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 17), 2635-2644.
- Bowen, M.A., Aruffo, A.A., Bajorath, J., 2000. Cell surface receptors and their ligands: In vitro analysis of CD6-CD166 interactions. *Proteins-Structure Function and Genetics* 40, 420-428.
- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G., 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 67, 97-103.
- Cannon, G.J., Swanson, J.A., 1992. The macrophage capacity for phagocytosis. *J. Cell Sci.* 101 ( Pt 4), 907-913.
- Cannon, J.P., Haire, R.N., Litman, G.W., 2002. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat Immunol* 3, 1200-1207.
- Carra, G., Gerosa, F., Trinchieri, G., 2000. Biosynthesis and

- posttranslational regulation of human IL-12. *J. Immunol.* 164, 4752-4761.
- Chambers, T.J., Spector, W.G., 1982. Inflammatory giant cells. *Immunobiology* 161, 283-289.
- Chen, E.H., Grote, E., Mohler, W., Vignery, A., 2007. Cell-cell fusion. *FEBS Lett.* 581, 2181-2193.
- Chia, F.S., 1977. Scanning electron microscopic observations of the mesenchyme cells in the larvae of the starfish *Pisaster ochraceus*. *Acta Zoologica* 58, 45-51.
- Claudianos, C., Dessens, J.T., Trueman, H.E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G.A., Crompton, T., Sinden, R.E., 2002. A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol. Microbiol.* 45, 1473-1484.
- Clow, L.A., Raftos, D.A., Gross, P.S., Smith, L.C., 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *J. Exp. Biol.* 207, 2147-2155.
- Cote, J.F., Vuori, K., 2002. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J. Cell Sci.* 115, 4901-4913.
- Cote, J.F., Vuori, K., 2007. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 17, 383-393.
- Couso, N., Castro, R., Noya, M., Obach, A., Lamas, J., 2002. Formation of short-lived multinucleated giant cells (MGCS) from cultured gilthead seabream macrophages. *Anat. Rec.* 267, 204-212.
- Crawford, B., Abed, M., 1983. The Role of the Basal Lamina in Mouth Formation in the Embryo of the Starfish *Pisaster ochraceus*. *J. Morphol.* 176, 235-246.
- Crawford, B.J., 1990. Changes in the Arrangement of the

Extracellular-Matrix, Larval Shape, and Mesenchyme Cell-Migration during Asteroid Larval Development. *J. Morphol.* 206, 147-161.

Crawford, B.J., Campbell, S.S., Reimer, C.L., 1997. Ultrastructure and synthesis of the extracellular matrix of *Pisaster ochraceus* embryos preserved by freeze substitution. *J. Morphol.* 232, 133-153.

Crawford, B.J., Chia, F.S., 1978. Coelomic pouch formation in the starfish *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea). *J. Morphol.* 157, 99-119.

Dan-Sohkawa, M., Kaneko, H., Noda, K., 1995. Paracellular, transepithelial permeation of macromolecules in the body wall epithelium of starfish embryos. *J. Exp. Zool.* 271, 264-272.

Dan-Sohkawa, M., Suzuki, J., Towa, S., Kaneko, H., 1993. A comparative study on the fusogenic nature of echinoderm and nonechinoderm phagocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 267, 67-75.

Dan-Sohkawa, M., Tamura, G., Mitsui, H., 1980. Mesenchyme cells in starfish development: effect of tunicamycin on their differentiation, migration and function. *Dev. Growth Differ.* 22, 495-502.

Du Pasquier, L., 2005. Immunology. Insects diversify one molecule to serve two systems. *Science* 309, 1826-1827.

Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M., Joiner, K.A., 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1863-1867.

Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., Tryggvason, K., 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80, 603-609.

Erickson, M.R.S., Galletta, B.J., Abmayr, S.M., 1997. *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* 138, 589-603.

Feller, S.M., 2001. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20, 6348-6371.

Freeman, M., Ashkenas, J., Rees, D.J., Kingsley, D.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Krieger, M., 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8810-8814.

Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., Sasazuki, T., 2001. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412, 826-831.

Furukawa, R., July 2012. Immunological recognition in starfish larvae and adults: the alteration of immune cells via metamorphosis. The 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, Fukuoka, Japan.

Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Nakamura, R., Yamada, H., Maeda, N., Ishikawa, T., Hoshino, K., Uruno, T., Cao, Q., Higashi, S., Kawaguchi, Y., Enjoji, M., Takayanagi, R., Kaisho, T., Yoshikai, Y., Fukui, Y., 2010. Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* 207, 721-730.

Green, R.S., Stone, E.L., Tenno, M., Lehtonen, E., Farquhar, M.G., Marth, J.D., 2007. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity* 27, 308-320.

Gross, P.S., Al-Sharif, W.Z., Clow, L.A., Smith, L.C., 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 429-442.

Hamanaka, G., Matsumoto, M., Hoshi, M., Kaneko, H., 2010. Studies on

function of MC5 molecule that is a novel membrane-type metalloproteinase of astacin family during morphogenesis of the starfish, *Asterina pectinifera*, in: Harris, L.G., Bottger, S.A., Walker, C.W., Lesser, M.P. (Eds.), *Echinoderms*: Durham. Taylor & Francis Group, London, pp. 457-462.

Hase, S., Kobayashi, K., Koyanagi, R., Hoshi, M., Matsumoto, M., 2003. Transcriptional pattern of a novel gene, expressed specifically after the point-of-no-return during sexualization, in planaria. *Dev. Genes Evol.* 212, 585-592.

Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S., 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 186, 1431-1439.

Heiple, J.M., Wright, S.D., Allen, N.S., Silverstein, S.C., 1990. Macrophages Form Circular Zones of Very Close Apposition to Igg-Coated Surfaces. *Cell Motil. Cytoskeleton* 15, 260-270.

Hohenester, E., Sasaki, T., Timpl, R., 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat. Struct. Biol.* 6, 228-232.

Holmskov, U., Mollenhauer, J., Madsen, J., Vitved, L., Gronlund, J., Tornoe, I., Kliem, A., Reid, K.B., Poustka, A., Skjodt, K., 1999. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10794-10799.

Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K., Raz, A., 1996. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res.* 56, 4530-4534.

Ippagunta, S.K., Malireddi, R.K., Shaw, P.J., Neale, G.A., Walle, L.V., Green, D.R., Fukui, Y., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., 2011. The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. *Nat Immunol* 12,

1010-1016.

Kadota, J., Nakajima, Y., Dan-Sohkawa, M., Kaneko, H., 2001. Further study on a membrane-molecule expressed in embryonic mesenchyme cells of the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev. Growth Differ.* 43, S132.

Kanatani, H., 1969. Induction of spawning and oocyte maturation by L-methyl-adenine in starfishes. *Exp. Cell Res.* 57, 333-337.

Kaneko, H., Kawahara, Y., Dan-Sohkawa, M., 1995. Primary Culture of Mesodermal and Endodermal Cells of the Starfish Embryo. *Zoolog. Sci.* 12, 551-558.

Kaneko, H., Okai, M., Murabe, N., Shimizu, T., Ikegami, S., Dan-Sohkawa, M., 2005. Fibrous component of the blastocoelic extracellular matrix shapes epithelia in concert with mesenchyme cells in starfish embryos. *Dev. Dyn.* 232, 915-927.

Kaneko, H., Takaichi, S., Yamamoto, M., Dan-Sohkawa, M., 1990. Acellularity of starfish embryonic mesenchyme cells as shown in vitro. *Development* 109, 129-138.

Kaneshiro, E.S., Karp, R.D., 1980. The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricata*. *Biol. Bull.* 159, 295-310.

Karlsson, A., Christenson, K., Matlak, M., Bjorstad, A., Brown, K.L., Telemo, E., Salomonsson, E., Leffler, H., Bylund, J., 2009. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 19, 16-20.

Kiehart, D.P., 1982. Microinjection of echinoderm eggs: apparatus and procedures. *Methods Cell Biol.* 25 Pt B, 13-31.

Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., Matsuda, M., 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12, 3331-3336.

Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., Krieger, M., 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343, 531-535.

Kominami, T., 1985. The Role of Cell-Adhesion in the Differentiation of Mesendodermal Tissues in the Starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev. Growth Differ.* 27, 679-688.

Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Tanaka, Y., Takii, R., Noda, M., Inayoshi, A., Watanabe, K.I., Sanematsu, F., Sasazuki, T., Sasaki, T., Fukui, Y., 2006a. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* 174, 647-652.

Kunisaki, Y., Tanaka, Y., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Nakayama, T., Harada, M., Taniguchi, M., Sasazuki, T., Fukui, Y., 2006b. DOCK2 is required in T cell precursors for development of Valpha14 NK T cells. *J. Immunol.* 176, 4640-4645.

Lanier, L.L., 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-274.

Lee, W.L., Cosio, G., Ireton, K., Grinstein, S., 2007. Role of CrkII in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 282, 11135-11143.

Litman, G.W., Cannon, J.P., Dishaw, L.J., 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5, 866-879.

Liu, L., Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Zhang, H., Wang, M., Vinu, S.S., Song, L., 2011. A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 227-239.

Madsen, J., Tornøe, I., Nielsen, O., Lausen, M., Krebs, I., Mollenhauer, J., Kollender, G., Poustka, A., Skjodt, K., Holmskov, U., 2003. CRP-ductin, the mouse homologue of gp-340/deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), binds gram-positive and gram-negative bacteria and interacts with lung surfactant protein D. *Eur. J. Immunol.* 33, 2327-2336.

Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., Dixit, V.M., 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213-218.

McNally, A.K., Anderson, J.M., 2005. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp. Mol. Pathol.* 79, 126-135.

Meller, N., Merlot, S., Guda, C., 2005. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J. Cell Sci.* 118, 4937-4946.

Metchnikoff, E., 1891. Lectures on the comparative pathology of inflammation, delivered at Pasteur Institute. Dover [reprinted in 1968], New York.

Mogilenko, D.A., Kudryavtsev, I.V., Orlov, S.V., Kharasova, A.D., Polevshikov, A.V., 2010. Expression of the starfish complement component C3 gene homolog under the influence of bacterial lipopolysaccharide. *Mol. Biol.* 44, 67-76.

Moore, C.A., Parkin, C.A., Bidet, Y., Ingham, P.W., 2007. A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* 134, 3145-3153.

Nathan, C.F., 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79, 319-326.

Nishihara, H., Kobayashi, S., Hashimoto, Y., Ohba, F., Mochizuki, N., Kurata, T., Nagashima, K., Matsuda, M., 1999. Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 179-187.

Pahler, S., Blumbach, B., Muller, I., Muller, W.E., 1998. Putative multiadhesive protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR-, and a complement control protein module. *J. Exp. Zool.* 282, 332-343.



Pajcini, K.V., Pomerantz, J.H., Alkan, O., Doyonnas, R., Blau, H.M., 2008. Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* 180, 1005-1019.

Pancer, Z., 2000. Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13156-13161.

Pancer, Z., Amemiya, C.T., Ehrhardt, G.R., Ceitlin, J., Gartland, G.L., Cooper, M.D., 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430, 174-180.

Pancer, Z., Rast, J.P., Davidson, E.H., 1999. Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. *Immunogenetics* 49, 773-786.

Papadimitriou, J.M., Walters, M.N., 1979. Macrophage polykarya. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 6, 211-255.

Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., Vasta, G.R., 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 513-520.

Rast, J.P., Smith, L.C., Loza-Coll, M., Hibino, T., Litman, G.W., 2006. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* 314, 952-956.

Reif, K., Cyster, J., 2002. The CDM protein DOCK2 in lymphocyte migration. *Trends Cell Biol.* 12, 368-373.

Reinisch, C.L., Bank, F.B., 1971. Cell recognition: reactions of the sea star (*Asterias vulgaris*) to the injection of amebocytes of sea urchin (*Arbacia punctulata*). *Cell. Immunol.* 2, 496-503.

Resnick, D., Pearson, A., Krieger, M., 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 19, 5-8.

- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M., Bate, M., 1995. Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121, 1979-1988.
- Sanders, M.A., Ampasala, D., Basson, M.D., 2009. DOCK5 and DOCK1 regulate Caco-2 intestinal epithelial cell spreading and migration on collagen IV. *J. Biol. Chem.* 284, 27-35.
- Sanui, T., Inayoshi, M., Noda, M., Iwata, E., Stein, J.V., Sasazuki, T., Fukui, Y., 2003. DOCK2 regulates Rac activation and cytoskeletal reorganization through interaction with ELMO1. *Blood* 102, 2948-2950.
- Sarrias, M.R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., Lozano, F., 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 24, 1-37.
- Silva, J.R.M.C., Peck, L., 2000. Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler 1906) at 0°C. *Polar Biology* 23, 225-230.
- Smith, H.W., Marra, P., Marshall, C.J., 2008. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *J. Cell Biol.* 182, 777-790.
- Smith, L.C., 2002. Thioester function is conserved in SpC3, the sea urchin homologue of the complement component C3. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 603-614.
- Suzuki, Y., Tsutsumi, Y., Nakagawa, M., Suzuki, H., Matsushita, K., Beppu, M., Aoki, H., Ichikawa, Y., Mizushima, Y., 2001. Osteoclast-like cells in an in vitro model of bone destruction by rheumatoid synovium. *Rheumatology (Oxford)*. 40, 673-682.
- Takemura, R., Stenberg, P.E., Bainton, D.F., Werb, Z., 1986. Rapid redistribution of clathrin onto macrophage plasma membranes in response to Fc receptor-ligand interaction during frustrated phagocytosis. *J. Cell Biol.*

102, 55-69.

Tamura, M., Dan-Sohkawa, M., Kaneko, H., 1998. Coelomic pouch formation in reconstructing embryos of the starfish *Asterina pectinifera*. *Dev. Growth Differ.* 40, 567-575.

Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Mehta, D., Moorjani, P.G., Smith, L.C., 2006. Unexpected diversity displayed in cDNAs expressed by the immune cells of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Physiol Genomics* 26, 134-144.

Van den Heuvel, M.M., Tensen, C.P., van As, J.H., Van den Berg, T.K., Fluitsma, D.M., Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Droste, A., Van Gaalen, F.A., Sorg, C., Hogger, P., Beelen, R.H., 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J. Leukoc. Biol.* 66, 858-866.

van der Laan, L.J., Dopp, E.A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C.D., Gordon, S., Tryggvason, K., Kraal, G., 1999. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J. Immunol.* 162, 939-947.

Vignery, A., 2000. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 291-304.

Watabe-Uchida, M., Govek, E.E., Van Aelst, L., 2006. Regulators of Rho GTPases in neuronal development. *J. Neurosci.* 26, 10633-10635.

Watson, F.L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., Schmucker, D., 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309, 1874-1878.

Weed, S.A., Parsons, J.T., 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20, 6418-6434.

Wu, Y.C., Horvitz, H.R., 1998. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration

protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392, 501-504.

古川 亮平, 2009a. ヒトで幼生に探るマクロファージのご先祖 ①メチニコフの発見から 100 年, ミクロスコピア. ミクロスコピア出版会, 日本, pp. 9-16.

古川 亮平, 2009b. ヒトで幼生に探るマクロファージのご先祖 ②自己と非自己をさかのぼって考える, ミクロスコピア. ミクロスコピア出版会, 日本, pp. 14-18.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御高配を賜りました、慶應義塾大学理工学部准教授 松本緑博士、慶應義塾大学文学部教授 金子洋之博士、放送大学客員教授、東京工業大学名誉教授 星元紀博士に謹んで感謝の意を表します。

終始適切な御助言を賜りました慶應義塾大学文学部准教授 倉石立博士ならびに階層生物学研究ラボ責任研究員 団まりな博士、実験の場所を快く提供して下さった慶應義塾大学日吉生物学教室の先生方にも心から感謝致します。また、温かい御助言を賜り、研究を進める自信を与えて下さった比較免疫学研究所所長 古田恵美子博士ならびに熊本大学名誉教授 高橋潔博士に深く感謝致します。

実験材料であるイトマキヒトデの採集にご協力を頂きました他大学の研究者の皆様、臨海実験所及び漁協の皆様にも深く感謝致します。特に、獨協医科大学助教 川瀬撰博士には、南三陸町自然環境活用センターに御在任中、急なお願いにも関わらず幾度と無く材料を提供して頂きました。深い感謝の意を表すとともに、東日本大震災で被災された南三陸町及び自然環境活用センターの一日も早い復興をお祈り申し上げます。

共に研究に励み、有意義な議論を戦わせてくれた発生生殖生物学研究室ならびに DECI Lab.の諸先輩方、同輩、後輩達に感謝致します。特に、公私にわたって温かい御指導と格別な御厚情を賜りました弘前大学准教授 小林一也博士に深く感謝致します。また、同じく格別な御厚情を賜りました故伊藤城治氏に謹んで感謝と哀悼の意を表します。

最後に、このような機会を与えてくれ、常に支え見守ってくれた家族に感謝致します。

2012年9月