



免疫機構の進化に関する研究，並びに絶滅危惧生物の効率的な系統保存と資源活用

人間文化学部 健康科学科

教授 藤井 保（ふじい たもつ）

連絡先 県立広島大学 広島キャンパス 1523研究室
Tel 082-251-9786 Fax082-251-9786
E-mail fujii@pu-hiroshima.ac.jp

専門分野： 免疫生物学 動物学

キーワード： 円口類（無顎類） 原始的補体系 環境指標生物
絶滅危惧生物 ゲノム多様性

●研究内容

○ 補体系を含む免疫機構の進化について研究しています。無脊椎動物にも存在する生体防御機構から，脊椎動物型の精緻な獲得免疫系がどのような道筋を経て成立してきたのでしょうか。この課題への一つのアプローチとして，私達は，両動物群をつなぐ位置にある円口類（無顎類）の免疫（生体防御）系を主な研究対象としています。

○ 沖縄島北部及び奄美大島の森林地帯にのみ棲息し，日本で最も美しいカエルと言われるイシカワガエルは，近年の環境破壊やペット目的の乱獲等により絶滅の危機に瀕しており，沖縄県及び鹿児島県では県の天然記念物に，環境省レッドデータブックでは絶滅危惧 IB 類に指定されています。我々は，イシカワガエルの保全に有用な選択肢の1つとなる人工繁殖技術の確立を試みるとともに，遺伝的多様性の評価手段として有効と考えられるミトコンドリア DNA (mtDNA) の情報を用いて，本種の遺伝的多様性の解明を試みています。

●研究成果

○ 円口類ヌタウナギ補体 MASP 遺伝子の cDNA クローニング：哺乳類 B 因子および C2 のセリンプロテアーゼ・ドメインのアミノ酸配列を基に PCR プライマーを作成し，ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) の肝臓 mRNA から同ドメイン様の cDNA 断片 (240 bp) を RT-PCR 法により増幅しました。

次ぎに同断片をプローブとして用い，ヌタウナギ肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングし，5' RACE 法を併用することにより同種セリンプロテアーゼ（補体成分）の全一次構造をコードする完全長 cDNA クローン (2,290 bp) を単離しました。この cDNA クローンは 713 残基のアミノ酸をコードする翻訳領域を含んでいました。翻訳直後の分子量が 80.4 kDa と予想される推定アミノ酸配列は，ヒト補体成分の一つであるマンノース結合レクチン関連セリンプロテアーゼ-1 (MASP-1) と最も高い類似性 (40.7%) を示しました。また，活性中心セリンが TCN でコードされていること，セリンプロテアーゼ・ドメインが分断エキソンによってコードされていることも，推定アミノ酸配列分子がヌタウナギ MASP-1 であることを強く示唆していました。これらの結果は，推定アミノ酸配列がヌタウナギ MASP-1 をコードするものであることを，強く支持するものです。

○ 実験室での交雑実験の結果，本種の人工繁殖にウシガエルの脳下垂体を用いた人工受精法の応用が可能となりました。また，本種 mtDNA の全ゲノム解析から，同 mtDNA には本種に固有の遺伝子配置の変化が認められ，これが本種の系統関係を探る有用なマーカーとなり得ることがわかりました。さらに，ND2 遺伝子の解析結果から，集団や個体レベルの違いを容易に検出できること，同情報が本種における遺伝的多様性を把握する上で極めて有効であることがわかりました。また，本種の皮膚に含まれる抗菌作用をもつ物質の検索を行い，11種類の抗菌ペプチドの同定に成功しています。



Complement System in Hagfish, and Efficient Genetic Preservation of an Endangered Species.

Department of Health Sciences,
Faculty of Human Culture and Science
Professor Tamotsu Fujii, D.Sc.

Prefectural University of Hiroshima Office Hiroshima 1523
Tel +81-82-251-9786 Fax +81-82-251-9405
E-mail: fujii@pu-hiroshima.ac.jp
URL <http://www.pu-hiroshima.ac.jp>

Research Fields : Comparative Immunology
Zoology
Keywords : complement, hagfish, MASP,
endangered species, mtDNA, frog

● Research Topics

cDNA Cloning of a Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP) Gene from Hagfish (*Eptatretus burgeri*).

In this study, we first attempted to identify a hagfish Bf or C2 as a C3 convertase by RT-PCR using degenerative primers designed on the basis of the conserved amino acid stretches among the several kinds of serine proteases. Contrary to our expectation, homology search of cloned RT-PCR product suggested that there was a partial cDNA encoding the homologue of neither Bf nor C2 but a mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP). Analyses of a full-length cDNA clone isolated from a hagfish liver cDNA library by using the partial cDNA as a probe indicated that this cDNA encoded hagfish MASP 1. (Zool. Sci. 22: 897, 2005.)

Efficient Genetic Preservation of an Endangered Species Based on DNA Sequence Data and Resource Utilization.

Due to the recent environment destruction and the excessive hunting for the pet market, Ishikawa's frog (*Rana ishikawae*) is endangered and has been designated as a protected species by Okinawa and Kagoshima Prefectures and also as the Endangered Species Category IB in the Red Data

Book of Japan published by the Ministry of Environment. In this study, the technology of artificial breeding was developed as one of the effective ways of conserving Ishikawa's frog and the genetic diversity of this species was determined by using mitochondrial DNA (mtDNA), a useful technique for evaluating genetic diversity in the preservation of strains or in the natural environment. The results of the crossing experiments in the laboratory showed that the artificial fertilization using the pituitary gland of bullfrogs could be applied to the artificial breeding of Ishikawa's frog. On the other hand, as a result of the analysis of the entire mtDNA genome, gene rearrangements unique to the species of Ishikawa's frog were observed and it was indicated that the gene rearrangements would become a good marker for elucidating phylogenetic relationships among related species. It was demonstrated furthermore that since the differentiation at population and individual levels are easily detected by analyzing the nucleotide sequences of the ND2 gene, the sequence information of this species is vitally important for evaluating the genetic diversity within species. Such information is expected to be used as criteria in taking species protection measures, because it is very useful information for determining priorities among those measures for each population. In addition, it is already known from the in-laboratory breeding that Ishikawa's frog is vigorous and resistant to diseases, and in effect as a result of the detection of antimicrobial substances from the skin of this species, eleven kinds of antimicrobial peptide were identified.