

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14985

研究課題名(和文) インタラクトーム解析で切り拓く魚類補体成分の血液外での新機能同定

研究課題名(英文) Detection and identification of complement components in bony fish skin mucus and their interactome analysis

研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO, Miki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50212080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：補体系は自然免疫の主要な液性因子であり、哺乳類ではその構成成分は主に肝臓で合成され、血漿などの体液中で機能すると考えられている。魚類においては肝臓以外の臓器や部位でも補体成分の遺伝子発現が確認されているが、補体成分タンパクの魚体内分布や局所での機能については不明な点が多い。そこで本研究は、生体防御の第一線のバリアである体表粘液に着目し、粘液中に存在する補体成分の同定とその反応機構を明らかとすることを目標とした。その第一ステップとして、コイの各補体成分に対する抗体を使用したウェスタンブロットにより、コイ体表粘液中の補体成分の存在をタンパク質レベルで明らかとすることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、魚類の体表、生殖腺、脳などで発現することが判明している補体成分の、それら局所での未知の機能を明らかにするために、局所で補体成分が相互作用する分子を網羅的に探索した。このアプローチは、既知の補体系内での機能という先入観にとらわれず、補体成分の新機能に推定することができる。本研究の考え方と方法論は、補体成分のみならず、ゲノムデータ中で配列と発現部位しかわかっていない多くの機能未知遺伝子について、それらの生物学的役割りに迫る一般的な研究戦略として展開可能となる。

研究成果の概要(英文)：The complement system is a major humoral factor in innate immunity, and in mammals its components are mainly synthesized in the liver and are thought to function in body fluids such as plasma. In fish, gene expression of complement components has been confirmed in organs and regions other than liver, but there are many unknown points about the distribution in the fish of the complement component protein and the function in the area. In this study, we focused on body surface mucus, which is the first barrier in the body defense, and aimed to identify the complement components present in mucus and clarify the reaction mechanism. As the first step, it was attempted to clarify the presence of complement components in carp surface mucus at the protein level by Western blot using antibodies against each complement component of carp.

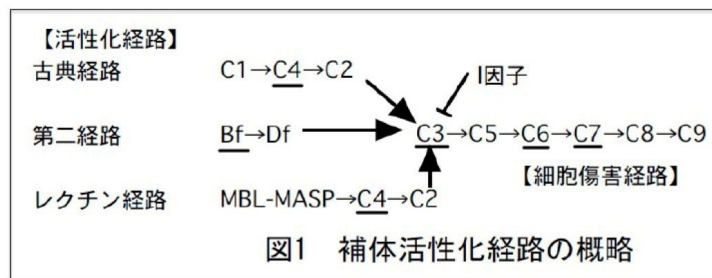
研究分野：比較免疫学

キーワード：免疫 生体防御 補体 体表 粘液 インタラクトーム 相互作用 魚類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補体系は、約 30 種の血漿・膜タンパク質で構成され、抗体依存的・非依存的な 3 つの活性化経路と異物細胞を破壊する細胞障害経路を備える（主な補体成分で描いた反応概略図を図 1 に示す）。哺乳類では、補体系は溶菌・白血球活性化作用を担う自然免疫の液性因子として主に血漿中で機能すると考えられてきた。しかしながら、魚類では、申請者自身や他の国内外の研究者によって、様々な魚種において多くの補体成分が多様な臓器・部位で発現していることがわかってきている。それらのデータは「血液や免疫担当組織以外の様々な局所で、補体系が生体防御に働いている。」と解釈されているが、私は、部位によってはその解釈は正しくないと考えている。その理由は、局所によっては、補体が異物を認識して排除するために必要な成分が揃っていないからである。たとえば、魚類の体表では図 1 中の下線で示した補体成分のみが発現しており、どの活性化経路のカスケード（連鎖的反応）も完結しない。このような状況で、局所で発現する個々の補体成分が果たす役割は全く解明されないままであった。



2. 研究の目的

本研究は、局所で発現する幾つかの補体成分が、既知の補体活性化カスケードとは独立した、未知の機能を持つと仮定し、その機能解明の糸口を、相互作用する物質の網羅的同定（interactome = インタラクトーム解析）に求める。すなわち、補体成分の新しいリガンドを同定することによって、その未知の反応機構を解明する方法論を確立することを目的とする。本研究では、特に、コイの皮膚・体表粘液に焦点を絞り、各補体活性化経路における Key component として C1q, Bf, C2, properdin, C3, C7 のタンパク質レベルでの存在状態と活性化機構の解明を試み、補体成分間の相互作用解析を行った。

3. 研究の方法

まず、各種補体成分タンパク質を検出するために、モノクローナル・ポリクローナル抗体の作成を進め、ウエスタンブロッティングによる検出法を最適化した。特に、微量の補体成分を高感度に出すために、化学発光法による検出条件を確立した。

また、タンパク質間相互作用解析は、水晶発振子マイクロバランス法とアフィニティーカラムを用いた溶出法によって行った。C3b 固定化アフィニティー担体の調製には、Activated-Thiol-Sepharose を用い、特に微量試料のアッセイを可能にするために、直径 4mm のマイクロカラムを自作した。

4. 研究成果

ゲルろ過で約 200 kDa に相当するフラクションに C3 鎖 (120 kDa) が検出された。アイソタイプ別に見ると、C3-H1 アイソタイプとその活性化型 (C3b) の鎖がそれぞれ 120 kDa および 103 kDa のバンドとして検出された一方で、血清中では C3-H1 と同レベルで存在する C3-S のバンドは粘液中には検出されなかった。この結果から、体表粘液中に分泌された C3-H1 が実際に活性化されることが示唆されたので、C3 の活性化を担う因子の候補としてまず古典経路の成分を探索した。その結果、C2 は約 100 kDa に相当するフラクションに、未活性化型 (118 kDa) および活性化型 (C2a, 73 kDa) のバンドとして検出された。しかし、C2 の上流で活性化に関与する成分については、C4-2 アイソタイプの鎖 (33 および 39 kDa) が約 200 kDa のフラクションに検出されたのみで、C4 の活性化に関与するとされる C1q は検出されなかったことから、粘液中には C1q に依存しない、新規な古典経路様の補体活性化機構の存在が示唆された。C3 の下流で MAC を形成する成分としては、C5 の鎖 (110 kDa) が約 200 kDa のフラクションに検出された。Df は、化学発光基質を用いたウエスタンブロッティングにおいて粘液中には検出されなかった。

抗 Properdin (Pf) 抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、ゲルろ過において Void volume ~ 400 kDa に相当するフラクションに、SDS-PAGE の分離ゲル上端にトラップされた抗原バンドが検出された。

抗 C7 抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいても、Properdin の試験と同様のゲルろ過フラクションに、分離ゲルに進入していない凝集タンパク質のバンドが検出された。粘液から分画した Pf と C7 が、血清中とは異なり、ポリアクリルアミドゲルにほとんど進入しないほど大きな凝集物として検出される原因を調べるため、N 結合型糖鎖の存在を

Lectin-Blotting で検討したが、ConA に認識されるような糖鎖は検出されなかった。次に、粘液から調製した泳動サンプル中の Pf や C7 が、SH 基の再酸化によって凝集している可能性を検討するために、Alkylation assay を行ったが、泳動パターンに変化は見られなかった。

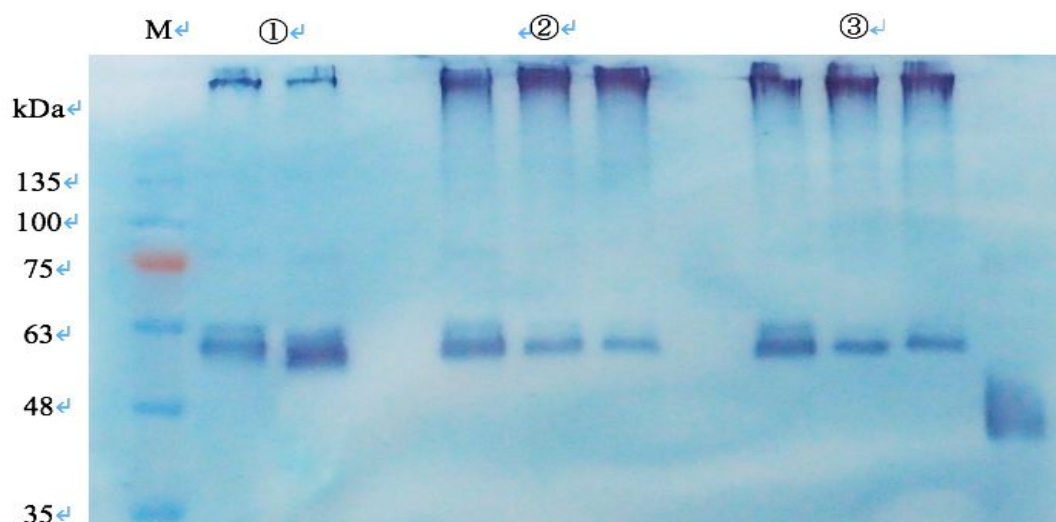


図2 . 粘液サンプルと血清サンプルを混合したサンプルのウエスタンブロット . 粘液サンプルと血清から Properdin を粗精製したサンプルを 3 種の条件下で混合したものをウエスタンブロットに供試した。いずれの場合も、血清由来 Pf は約 60 kDa の、粘液由来の Pf はゲルに侵入できない巨大分子のバンドとして検出された。すなわち、粘液中では Pf は血清中とは異なる形態の分子として存在することがわかった。

C3 アイソタイプと Properdin アイソタイプとの相互作用については、mock カラムと C3i-H1 カラムと比較して、CaPf1, CaPf2 の C3i-S カラムからの溶出に遅れが認められ、両 Pf アイソタイプが C3i-S アイソタイプと選択的に相互作用することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tajimi S, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T, Generation of virus-specific CD8⁺ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp, *Developmental and Comparative Immunology*, 2019; 93, 37-44. DOI: 10.1016/j.dci.2018.12.009. (査読有)
2. Somamoto T, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Sato A, Hatta H, Sato M, Murakami-Yamaguchi Y, Kizu-Mori K, Hirakawa Y, Narita H. Development of anti-atypical *Aeromonas salmonicida* monoclonal antibodies for diagnosis of "New ulcer disease" in Koi carp. *Fish Pathology*, 2018; 53: 36-39. DOI: 10.3147/jsfp.53.36. (査読有)
3. Somamoto, T., Maruyama, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sato, A., Hatta, H., Sato, M., Murakami-Yamaguchi, Y., Kizu-Mori, K., Hirakawa, Y., Narita, H., Development of anti-atypical *Aeromonas salmonicida* monoclonal antibodies for diagnosis of "new ulcer disease" in koi carp, *Fish Pathology*, 2018; 53: 36-39. DOI:10.3147/jsfp.53.36 (査読有)
4. Meidong R, Khotchanalekha K, Doolgindachbaporn S, Nagasawa T, Nakao M, Sakai K, Tongpim S. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*, *Fish and Shellfish Immunology*, 2018; 73: 1-10. DOI:10.1016/j.fsi.2017.11.032. (査読有)
5. Yoshioka K, Kato-Unoki Y, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Carp properdin: Structural and functional diversity of two isotypes. *Immunobiology* 2016;221:1210. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.06.188. (査読有)
6. Kolder IC, van der Plas-Duivestijn SJ, Tan G, Wiegertjes GF, Forlenza M, Guler AT, Travin DY, Nakao M, Moritomo T, Irnazarow I, den Dunnen JT, Anvar SY, Jansen HJ, Dirks RP, Palmblad M, Lenhard B, Henkel CV, Spaink HP, A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp., *BMC Genomics*, 2016; 17: 701-1-701-12. DOI:10.1186/s12864-016-3038-y. (査読有)

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 齋藤武尊, 長澤貴宏, 柚本智軌, 中尾実樹. 魚類炎症反応における C5a の役割解明のための抗ゼブラフィッシュ C5a 抗体の作成, 日本水産学会春季大会, 2019.
2. Nakao M, Iwanaga S, Nagasawa T, Somamoto T. Phylogenetic inference on functions of the classical complement pathway in bony fish. 14th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology. 2018
3. Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M, Homeostatic functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in carp fish, 日本水産学会春季大会, 2018.
4. Nakao M, Noguchi M, Akahoshi S, Nagasawa T, Somamoto T, Functional diversity of two C7 isotypes in bony fish, a primitive vertebrate model, European Meeting on Complement in Human Disease, 2017.09,
5. Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M, Functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in the common carp, The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium, 2017.09.
6. 赤司小百合、長沢貴宏、柚本智軌、中尾実樹, コイ補体成分 B/C2-B の組換え体作成と機能解析, 日本比較免疫学会学術集会, 2017.08.
7. 野口真代, 長澤貴宏, 中尾実樹, 柚本智軌, コイ補体 C7 アイソタイプの機能解析, 日本水産学会春季大会, 2017.03.

〔図書〕(計 1 件)

1. 中尾実樹, 補体系の進化, 動物学の百科事典(日本動物学会編) pp 508-509, 2018.

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。