

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15323

研究課題名(和文) 補体活性を抑制した急性ショック・炎症フリー魚の作出

研究課題名(英文) Assessment of inflammatory response by inhibition of complement C5a in zebrafish

研究代表者

長澤 貴宏 (Nagasawa, Takahiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：70775444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では硬骨魚類の炎症誘導メカニズム解明を目標とし、感染初期の炎症誘導に重要と考えられる補体成分C5aに着目、ゼブラフィッシュC5aの組換え体と抗C5a抗体を作製し、C5aの投与あるいは抗体による機能阻害により硬骨魚類C5aの機能解析を行った。作製した組換えC5aはゼブラフィッシュ腎臓由来白血球に対し誘引活性の他、貪食能亢進活性、ケモカイン発現の誘導がみられ、炎症反応の引き金として重要な因子であることがわかった。また活性化血清による白血球誘引活性は抗C5a抗体により顕著に抑制されたことから、C5aが感染部位へ白血球を動員する際の主要な因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は硬骨魚類の炎症惹起メカニズムを解明し、それら免疫応答を適切に調節することで増養殖の生産性向上を目指すものである。本研究によりC5aを投与または抑制した際の影響が示され、生体内においてC5a産生が免疫活性化、炎症誘引に非常に大きな影響を与えていることがわかった。また作製した組換えzfC5aタンパク及び抗zfC5a抗体はそれらの反応を誘発、抑制するツールとして有用であり、これらを用いてさらなる炎症メカニズム研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function of complement C5a in zebrafish, by establishing recombinant zebrafish C5a(recombinant zfC5a; rzfC5a) and anti-zfC5a antibody. The rzfC5a chemo-attracted zebrafish kidney leukocytes in chemotaxis chamber, enhanced phagocytic activity, upregulated expressions of chemokines, suggesting that zfC5a are a key molecule to initiate inflammatory response in early phase of infection. Migration of the leukocytes to zymosan-activated serum was inhibited by anti-zfC5a, suggesting that C5a is a dominant chemoattractant in zebrafish plasma.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：補体 C5a アナフィラトキシン 自然免疫 魚類免疫 ゼブラフィッシュ 炎症

1. 研究開始当初の背景

補体系は病原体感染時に迅速に活性化する液性自然免疫因子であり、感染局所へ白血球を動員し、異物の除去にはたらく一方で、補体の過剰な活性化は宿主組織を傷害する負の側面も有している。これまでの水産増養殖業における魚類免疫学のアプローチはその免疫活性を上げることに重点を置いていたが、逆に過剰な免疫応答が症状を増悪させ急性ショック死などに繋がる可能性といった負の側面については検討されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は魚類の免疫機能を適切に調節することで急性応答を抑え生産性向上を図る、増養殖の新たな形を目指すものであり、そのためには炎症惹起のメカニズムとその影響を理解し評価するための知見が必要と考えた。本研究では感染初期に炎症を強く誘導する因子として補体系に着目し、その中でもアナフィラトキシンと呼ばれ強力な炎症誘引作用を有する C5a とターゲットとして、その機能の詳細を解析し影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ C5a 組換え体の作製：大腸菌発現系を用いて、グルタチオン-S-転移酵素(GST)との融合タンパクとして活性化ゼブラフィッシュ C5a(zfC5a)全長を発現させ、その後 zfC5a 配列部を切り離し組換えタンパク(rzfC5a)として精製した。

(2) 抗ゼブラフィッシュ C5a 抗体(anti-zfC5a)の作製：精製した rzfC5a をウサギに免疫し、得られた抗血清中の IgG を精製し anti-zfC5a とした。

(3) rzfC5a 及び anti-zfC5a 抗体の機能検証：ゼブラフィッシュ腎臓より単離した白血球に対し rzfC5a を投与し、遊走活性、貪食活性、免疫関連遺伝子発現を解析した。また酵母の細胞壁成分であるザイモサンで補体を活性化させたゼブラフィッシュ血清に対し anti-zfC5a を混合し、白血球遊走活性を抑制できるか検証した。

(4) C5a 受容体(zfC5aR)遺伝子欠損系統の作製：共に G タンパク質共役受容体であり zfC5a の受容体と推定される zfC5aR1 及び zfC5L2 に対し CRISPR/Cas9 法に用いるガイド RNA 配列を設計、Cas9 タンパクと共に受精直後のゼブラフィッシュ胚に顕微注入、ゲノム編集により C5a 受容体の遺伝子欠損個体作出を目指した。

4. 研究成果

(1) rzfC5a の作製：GST を切り離した rzfC5a は SDS-PAGE において分子量約 10,000 のバンドとして検出され、zfC5a の予想サイズと一致する可溶性タンパクとして得られた。

(2) anti-zfC5a の作製：得られた抗血清は rzfC5a 及びゼブラフィッシュのザイモサン活性化血清と反応し、ウエスタンブロットで分子量約 10,000 のバンドを検出した。

(3) rzfC5a の白血球活性化作用と anti-zfC5a による機能阻害：ゼブラフィッシュ腎臓由

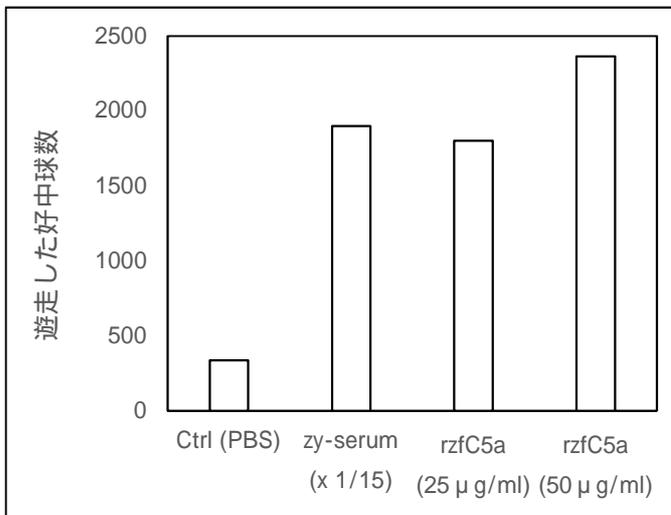


図1 . rzfC5a に対する白血球遊走活性。ケモタキシスチャンパー下層に遊走した白血球をフローサイトメトリーで測定し、好中球数を計測した。陽性対照区としてザイモサンで補体活性化させたゼブラフィッシュ血清(zy-serum; 15倍希釈)を用いた。

来白血球を用い、ケモタキシスチャンパーを用いた走化性試験に供試したところ、下層の rzfC5a 濃度依存的に遊走する白血球の数が上昇し(図1) 典型的なアナフィラトキシンとしての活性を有することが示された。フローサイトメトリーによる試験では、rzfC5a 存在下で白血球の貪食活性が上昇し、より多くの白血球が蛍光標識したザイモサンを取り込んでいた。この rzfC5a を加えた白血球では CXC ケモカイン等の発現上昇がみられたことから、C5a が引き金となることで更なる白血球動員、活性化を誘導していることが示唆された。また anti-zfC5a 存在下ではゼブラフィッシュ活性化血清及び rzfC5a に対する白血球の遊走が顕著に抑制された(図2)

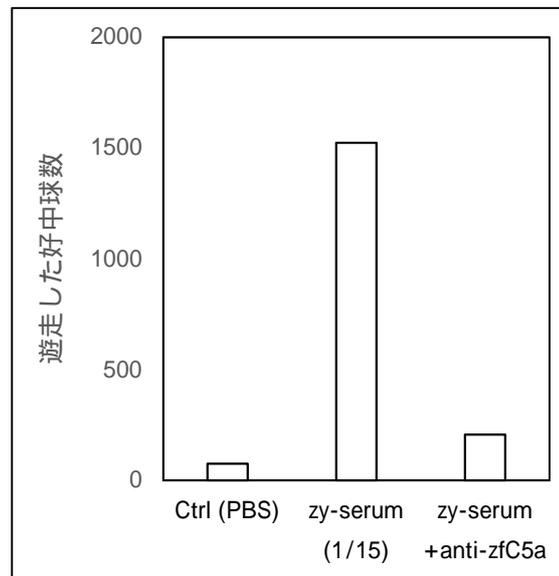


図2 . Anti-zfC5a による遊走阻害作用

ことから、anti-zfC5a が C5a の機能を抑制していることが示唆され、また活性化血清中において C5a が主要な遊走促進因子として機能していることがわかった。

(4) zfC5a 受容体欠損の初期発生における影響: zfC5aR1 及び zfC5L2 に対する gRNA/Cas9 混合物をそれぞれ胚に顕微注入し、HMA 法により変異導入を確認したところ、両遺

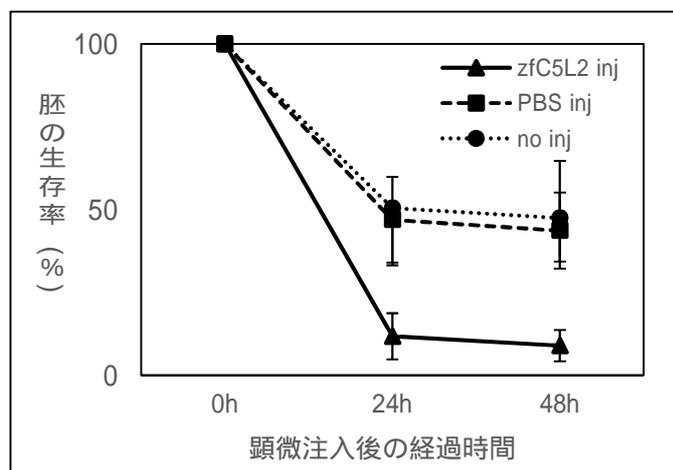


図3 . 顕微注入後の胚生存率(zfC5L2)

伝子共に胚への変異導入が検出された。一方でこれら変異導入胚は注入後短期間でその多くが死滅し、約一月後に尾鱗片由来ゲノム DNA を確認した際には変異の導入された個体は全くみられなかった。この結果は C5a の受容体とされる膜タンパクが免疫応答だけでなく、個体発生時に重要な役割を担っていることを示唆しており、C5a 受容体の進化系統的な知見となる可能性がある。RT-PCR による解析では、zfC5aR1, zfC5L2 共に幅広い臓器で発現が検出されたが、特に zfC5aR1 は頭腎での発現が高く典型的な C5a 受容体として機能している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Tajimi Seisuke, Kondo Masakazu, Nakanishi Teruyuki, Nagasawa Takahiro, Nakao Miki, Somamoto Tomonori | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Generation of virus-specific CD8+ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology | 6. 最初と最後の頁 37-44 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2018.12.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Tomonori Somamoto, Shinpei Maruyama, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Atsushi Sato, Hajime Hatta, Mitsuru Sato, Yukie Murakami-Yamaguchi, Kumiko Kizu-Mori, Yuki Hirakawa, Hiroshi Narita | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Development of Anti-atypical Aeromonas salmonicida Monoclonal Antibodies for Diagnosis of "New Ulcer Disease" in Koi Carp | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Fish Pathology | 6. 最初と最後の頁 36-39 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Meidong Ratchanu, Khotchanalekha Kulwadee, Doolgindachbaporn Sompong, Nagasawa Takahiro, Nakao Miki, Sakai Kenji, Tongpim Saowanit | 4. 巻 73 |
| 2. 論文標題 Evaluation of probiotic Bacillus aerius B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong Pangasius bocourti | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2017.11.032 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Tomonori Somamoto, Shinpei Maruyama, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Atsushi Sato, Hajime Hatta, Mitsuru Sato, Yukie Murakami-Yamaguchi, Kumiko Kizu-Mori, Yuki Hirakawa, Hiroshi Narita | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Development of Anti-atypical Aeromonas salmonicida Monoclonal Antibodies for Diagnosis of "New Ulcer Disease" in Koi Carp | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Fish Pathology | 6. 最初と最後の頁 36~39 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.53.36 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Tokunaga Yumie, Shirouzu Masamichi, Sugahara Ryota, Yoshiura Yasutoshi, Kiryu Ikunari, Ototake Mitsuru, Nagasawa Takahiro, Somamoto Tomonori, Nakao Miki | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Comprehensive validation of T- and B-cell deficiency in rag1-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7536 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08000-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計27件(うち招待講演 1件/うち国際学会 8件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木泰也, 牧貴海, 中村雅之, 長澤貴宏, シロワニ繁殖協議会 |
| 2. 発表標題 飼育下シロワニの飼育環境変化と繁殖周期 |
| 3. 学会等名 第64回水族館技術者研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長澤貴宏 |
| 2. 発表標題 魚類免疫学の近年の概況～粘膜免疫と寄生虫対策～ |
| 3. 学会等名 第35回九州沖縄ブロック動物園水族館獣医師臨床研究会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, and Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Production of type-I interferon and the regulatory mechanisms in carp thrombocytes |
| 3. 学会等名 3rd International Conference on Fish & Shellfish Immunology Gran Canaria(国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masaki Sakeda, Koumei Shiota, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto |
| 2. 発表標題 Direct cytotoxic activity of CD8+ T cells against Ichthyophthirius multifiliis in ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii |
| 3. 学会等名 3rd International Conference on Fish & Shellfish Immunology Gran Canaria (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 長澤貴宏・池尻夏菜・ 杣本智軌・中尾実樹 |
| 2. 発表標題 アユのサイモサン結合性レクチンの機能解析 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤村拓実、室谷冬香、野崎玲子、矢澤良輔、長澤貴宏、杣本智軌、中尾実樹、廣野育生、近藤秀裕 |
| 2. 発表標題 軟骨魚類自然抗体の抗原結合能に及ぼす生息地域の影響 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 鳥居爽花・長澤貴宏・中尾実樹 |
| 2. 発表標題 イヌザメ血清レクチンの構造・機能解析 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤武尊・長澤貴宏・杣本智軌・中尾実樹 |
| 2. 発表標題 魚類炎症反応におけるC5aの役割解明のための 組換えゼブラフィッシュC5aの作製 |
| 3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Zhao Ge, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto |
| 2. 発表標題 Phagocytosis of CD8 + T cell in ginbuna crucian carp, <i>Carassius auratus langsdorfii</i> |
| 3. 学会等名 令和元年度日本水産学会九州支部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 友井千帆里, 長澤貴宏, 瀧 虹花, 杣本智軌, 中尾実樹 |
| 2. 発表標題 ドチザメ血清中のザイモサン結合タンパク質の同定 |
| 3. 学会等名 日本比較免疫学会第31回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Harsha Prakash, 丸山真平、佐藤充、小島桂、佐藤巧視、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌 |
| 2. 発表標題 アフィニティーシルクを用いた魚病細菌除去フィルターの開発 |
| 3. 学会等名 日本魚病学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nehlal Rosli, Takahiro Nagasawa, Tomonri Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Functional analysis of two complement C4 isotypes of carp using recombinant proteins |
| 3. 学会等名 The 1st Congress of Asian Society of Developmental and Comparative Immunology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉迫郁子, 黒木将武, 長澤貴宏, 杣本智軌, 中尾実樹 |
| 2. 発表標題 コイ体表粘液中に存在する補体成分の検出 |
| 3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 斎藤武尊, 長澤 貴宏, 杣本智軌, 中尾実樹 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 H31年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 塩田昂明, 助田将樹, 中西照幸, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌 |
| 2. 発表標題 繊毛虫Ichthyophthiriusmultifiliisの成長段階の違いによるギンプナの免疫応答の比較 |
| 3. 学会等名 H31年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 中尾実樹, 木村美智代, 長澤貴宏, 杣本智軌 |
| 2. 発表標題 特異抗体を利用したコイ補体成分C5の迅速精製 |
| 3. 学会等名 H31年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 VIRAL LIGAND RECOGNITIONS OF CARP THROMBOCYTES AS NATURAL TYPE I INTERFERON PRODUCING CELLS. |
| 3. 学会等名 The 14th Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Type I IFN production by carp thrombocytes as professional antiviral leukocytes, like mammalian plasmacytoid dendritic cells, via IRF7 signaling pathway. |
| 3. 学会等名 Asian invertebrate immunity symposium 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Miki nakao, Sayo Iwanaga, Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto |
| 2. 発表標題 PHYLOGENETIC INFERENCE ON FUNCTIONS OF THE CLASSICAL COMPLEMENT PATHWAY IN BONY FISH |
| 3. 学会等名 The 14th Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中尾実樹, 岩永彩代, 長澤貴宏, 杣本智軌 |
| 2. 発表標題 硬骨魚類における古典経路の機能解析から系統発生学的考察 |
| 3. 学会等名 第55回日本補体学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 助田将樹, 塩田昂明, 長澤貴宏, 中尾実樹, 杣本智軌 |
| 2. 発表標題 ギンブナCD8+Tリンパ球の寄生原虫に対する細胞遊走活性 |
| 3. 学会等名 H30年度日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Harsha Prakash, Shiori Motobe, Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Homeostatic functional analysis of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in carp fish |
| 3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Ligand recognition specialty of carp thrombocytes as natural type I IFN producing cells. |
| 3. 学会等名 The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium 「Fisheries Science for Future Generations」 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Harsha Prakash, Shiori Motobe, Takahiro Nagasawa, Tomonori Somamoto, Miki Nakao |
| 2. 発表標題 Functional analysis of tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in the common carp |
| 3. 学会等名 The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium 「Fisheries Science for Future Generations」 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 長澤貴宏、柚本智軌、中尾実樹 |
| 2. 発表標題 コイ栓球によるI型インターフェロン産生機構 |
| 3. 学会等名 平成29年日本魚病学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 長澤貴宏、柚本智軌、中尾実樹 |
| 2. 発表標題 コイ栓球のI型インターフェロン産生能 |
| 3. 学会等名 平成29年度日本比較免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 赤司小百合、長澤貴宏、柚本智軌、中尾実樹 |
| 2. 発表標題 コイ補体成分B/C2-Bの組換え体作製と機能解析 |
| 3. 学会等名 平成29年度日本比較免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|