

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580206

研究課題名(和文) コイのインターフェロンの構造と機能解析

研究課題名(英文) Characterization of type 1 interferon in common carp *Cyprinus carpio*

研究代表者

酒井 正博(SAKAI MASAHIRO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20178536

研究成果の概要(和文): 二つの I-IFN 遺伝子(CL1, CL2) をクローニングした。コイの I-IFN 遺伝子は 183～186 個のアミノ酸残基から構成されていることが確認された。二つのアイソフォームの I-IFN 遺伝子の相同性は 75.2% を示した。免疫賦活剤の刺激により、I-IFN 遺伝子(CL2) の発現量が増加していることが確認された。I-IFN 誘導物質の発現動態は、免疫賦活剤の刺激では 24 時間後に I-IFN 誘導物質(Mx) の発現量が最大になり、I-IFN タンパク質の刺激では、一時間後に Mx の発現量が最大になり、その後減少が見られた。

研究成果の概要(英文): The type I interferon (I-IFN) gene has recently been cloned and sequenced in the common carp species *Cyprinus carpio* L. Carp I-IFN cDNA is composed of 675 base pairs and is translated into a protein of 186 amino acid residues. The carp I-IFN encodes a predicted signal peptide of 23 amino acid residues and contains the I-IFN family signature His<sup>140</sup>-Trp<sup>158</sup>. Analysis of the homology between carp I-IFN and other known I-IFN and type II interferon (II-IFN) family members has revealed significant similarities to grass carp I-IFN. Phylogenetic analysis demonstrated that carp I-IFN clusters with I-IFN in teleosts, away from the other II-IFN family members. In addition, the gene structure for carp I-IFN is composed of 5 exons and 4 introns, a composition that is similar to that of the teleost I-IFN gene. RT-PCR analysis did not reveal gene expression in un-stimulated tissues including intestine, liver, gill, head kidney, muscle, spleen, mid-kidney and skin. However, I-IFN expression levels increased following stimulation with imiquimod in the head kidney cells. Furthermore, recombinant carp I-IFN protein (mature form) produced via the cell-free protein synthesis system stimulated the expression of the interferon-inducible Mx gene in the head kidney cells.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：魚類免疫学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：インターフェロン、コイ、遺伝子、TLR、発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

インターフェロンは、動物体内で病原体（特にウイルス）や腫瘍細胞などの異物の侵入に反応して細胞が分泌するタンパク質である。ウイルス増殖の阻止や細胞増殖の抑制、免疫系および炎症の調節などの働きを示し、サイトカインの一種に含められる。ほ乳類では、インターフェロンは、その機能の違いによってタイプ1とタイプ11に分類されている。タイプ1インターフェロンは、リンパ球（T細胞、B細胞）、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞など多くのタイプの細胞で産生され、特に抗ウイルス応答の重要な要素である。タイプ1インターフェロンはまたマクロファージとNK細胞とともに刺激し、腫瘍細胞に対しても直接的に増殖抑制作用を示すことが知られている。このインターフェロンは、ヒトにおいて、すでに医薬品としてC型肝炎やいくつかの腫瘍の治療に用いられている。

魚類においてインターフェロンは、抗ウイルス活性を持つタイプ1の遺伝子はAltmanら(2003)により、マクロファージを活性化するタイプ11の遺伝子は、著者らの研究（参考文献33）によってクローニングされその存在が明らかになっている。しかし、その機能については未だに明らかにされていない。本研究は、コイを用いてタイプ1インターフェロンの機能を明らかにし、それを用いて疾病の予防を行うことを目的としている。

## 2. 研究の目的

本研究では、期間内に以下の点について明らかにする予定である。

1) コイのタイプ1インターフェロンの遺伝子をクローニングし、その構造を明らかにする。

2) 免疫刺激した魚でのインターフェロンの

遺伝子の発現を明らかにする。

3) インターフェロンを誘発するTLRをコイでクローニングを行う。

## 3. 研究の方法

1) コイインターフェロン遺伝子のクローニング以下の方法で、コイからインターフェロンの遺伝子をクローニングする。

ゼブラフィッシュのインターフェロンの遺伝情報を基にPCRのプライマーを作製する。インターフェロンは、通常の状態では極めて発現量が少なく遺伝子のクローニングが困難であることが知られている。さらに、発現期間も短いことが報告されている。従って、まず、コイの腎臓を、インターフェロン誘導物質であるポリIC、オリゴCpGで刺激し、その後、計時的にmRNAを分離し、これらをすべてミックスして、cDNAを合成する。このcDNAをインターフェロン遺伝子のクローニングするための鋳型として用いる。

調整したcDNAを用いて、インターフェロン遺伝子をPCR法でクローニングを行う。PCRで増幅された断片を、クローニングしそのDNAの塩基配列をDNAシーケンサーで決定する。

この同定した遺伝子断片が、インターフェロンであった場合、全長をクローニングするために、5'および3' レース法を行い、全長を決定する。

2) 新しく開発された無細胞系を用いたレコンビナントタンパク質の作製

従来のレコンビナントタンパク質作製は、大腸菌の系が主に用いられてきたが、多くのレコンビナントタンパク質が、大腸菌内で封入対を形成するため、その精製が困難であった。さらに、大腸菌から生産されたレコンビナントタンパク質は、真核生物で

見られるような修飾が起こらないため、本来のタンパク質に比べると立体構造が異なる場合が多い。今回用いる小麦胚芽をベースにした無細胞系のレコンビナントタンパク質作製システムでは、封入対を作ることもなく、さらに翻訳後の修飾も行われるので、きわめて天然のレコンビナントタンパク質を産生することが可能である。

無細胞系システムを用いて、コイインターフェロンのレコンビナントタンパク質を作製するための方法を以下に示す。

コイのインターフェロン遺伝子をヒスチジンタグを持つ発現ベクターに挿入する。

これを、無細胞系タンパク質発現システムに入れて、タンパク質合成を行う。

合成されたタンパク質を、ヒスチジンカラムを用いて回収する。

この合成されたコイレコンビナントインターフェロンの精度をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認する。

### 3) 免疫賦活剤投与魚におけるインターフェロン遺伝子の発現解析

今回クローニングされたインターフェロンの機能を解析するために、免疫賦活剤で処理した腎臓を用いて、インターフェロン遺伝子の発現動態の解析を行った。免疫賦活剤としては、LPS、イムキモット、PoyI:Cを用いて、コイの頭腎細胞に作用させた。その後、mRNAを抽出し、判定量法解析を用いて、インターフェロン遺伝子の発現を調べた。

### 4) コイTLR7 遺伝子のクローニングとその構造解析

TLRは、自然免疫応答に関与する重要なレセプターである。特に、インターフェロンの発現に関与するものとしてTLR7は、重要であるがコイにおいてはまだクローニングされていない。そこで本研究では、コイの

TLR7 遺伝子を以下の方法でクローニングを行った。

ゼブラフィッシュのTLR7の遺伝情報を基にPCRのプライマーを作製する。

前述した方法で調整したcDNAを用いて、TLR7 遺伝子をPCR法でクローニングを行う。PCRで増幅された断片を、クローニングしそのDNAの塩基配列をDNAシーケンサーで決定する。

この同定した遺伝子断片が、TLR7であった場合、全長をクローニングするために、5'および3' レース法を行い、全長を決定する。

## 4 研究成果

### 1) コイのタイプ1インターフェロン遺伝子のクローニング

2つのインターフェロン遺伝子(CL-1、CL-2)をクローニングすることが出来た。コイのインターフェロン遺伝子は、183から186個のアミノ酸残基から構成されていることが確認された。コイのインターフェロン遺伝子は、ゼブラフィッシュと66.6%、フグとは21.2%、キャットフィッシュとは31.5%、ヒトとは19.3%の相同性が認められた。CL-1とCL-2の2つのインターフェロン遺伝子の相同性は、75.5%であった。これらの遺伝子の発現は、それぞれの組織で通常ではまったく見られなかったが、イムキモットの刺激後1時間目の頭腎細胞で発現が確認され、24時間目にピークに達した。

### 2) コイインターフェロンのレコンビナントタンパク質の作成

小麦胚芽の系を用いて、分子量21kDaの-IFN(CL-1)タンパク質を合成することが出来た。このタンパク質(100ng)をコイの腎臓の細胞に作用させた結果、1時間後に8倍のMx 遺伝子の発現の上昇が観察された。

その後、この Mx 遺伝子の発現は減少し、48 時間後には平常値に戻った。従って、今回合成した -IFN タンパク質は、ほ乳類と同様な抗ウイルス作用があると考えられた。さらに、この遺伝子は、腎臓の細胞を CpG による刺激によって、発現の上昇が観察された。

### 3) 免疫賦活剤投与によるインターフェロン遺伝子の発現解析

-IFN 遺伝子の発現は、LPS 処理したコイの頭腎白血球において有意な増加を観察されなかった。さらに、Mx 遺伝子の増加も確認されなかった。一方、PolyI:C もしくはイムキモットで処理をした頭腎白血球は、-IFN 遺伝子の発現を有意に増加させた。その後、これらの白血球から Mx 遺伝子の発現の有意な増加も確認された。

### 4) コイ TLR7 遺伝子のクローニングと発現解析

コイの TLR7 遺伝子をクローニングした結果、その遺伝子は 1049 個のアミノ酸塩基より構成され、シグナル伝達に必要な種々のモチーフはよく保存されていた。コイの TLR7 遺伝子は、ゼブラフィッシュと 89.6%、フグとは 83.4%、ニジマスとは 80.6% の相同性を示した。本遺伝子の発現はすべての組織で確認された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 2 件)

Tanekhy, M., Kono, M., Sakai, M.  
Cloning, characterization, and expression analysis of Toll-like receptor-7 cDNA from common carp *Cyprinus carpio*. Comparative Biochemistry and Physiology D, 5: 245-255(2010)査読有り

Kitao, Y., Kono, T., Korenaga, H., Iizasa, T., Nakamura, K., Savan, R., Sakai, M. Characterization and

expression analysis of type 1 interferon in common carp *Cyprinus carpio*. Molecular Immunology, 46: 2548-2556(2009)査読有り

#### [学会発表](計 5 件)

Tanekhy, M., Kono, T., Sakai, M.  
Cytokine responses in carp kidney leucocytes treated by LPS, PolyI:C and imiquimod. First EOFFI Symposium (2010 年 5 月 24 日、ピテルボ、イタリア)

Kitao, Y., Kono, T., Sakai, M.  
Characterization and expression analysis of type 1 interferon in common carp *Cyprinus carpio*. 26<sup>th</sup> ESCPB Congress (2009 年 9 月 6 日、インスブルック、オーストリア)

Sakai, M., Kitao, Y., Kono, T. Two isoforms of type1 interferon gene in the common carp *Cyprinus carpio* L. 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress (2008 年 10 月 22 日、横浜)

Kitao, Y., Kono, T., Sakai, M. Two isoforms of type1 interferon gene isolated from the common carp *Cyprinus carpio* L. 25<sup>th</sup> ESCPB Congress (2008 年 9 月 11 日、ラベンナ、イタリア)

Kitao, Y., Kono, T., Sakai, M.  
Characterization and expression analysis of two isoforms of type1 interferon in the common carp *Cyprinus carpio* L. The 7<sup>th</sup> symposium on Diseases in Asian Aquaculture(2008 年 6 月 25 日、台北、台湾)

#### [図書](計 0 件)

#### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 正博（SAKAI MASAHIRO）  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：20178536

##### (2) 研究分担者

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

研究者番号：

