

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（A）・一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21248025

研究課題名（和文） サメ由来一本鎖モノクローナル抗体の大量生産技術の開発と魚介類感染症治療への応用

研究課題名（英文） Development and application of the shark single chain monoclonal antibody for the treatment of fish and shellfish diseases

研究代表者

青木 宙 (AOKI TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・特任教授

研究者番号：00051805

研究成果の概要（和文）：サメ類は、重鎖ホモ 2 量体のユニークな構造の免疫グロブリン New antigen receptor (IgNAR)をもつ。IgNAR 遺伝子は他の脊椎動物の免疫グロブリンに比べ単純な構造であることから、魚介類病原微生物に特異的な人工モノクローナル IgNAR の材料に適していると考えられた。そこで、ドチザメ IgNAR の cDNA クローニングを行い、本 IgNAR 可変領域を組み込んだファージディスプレイライブラリーを構築し、抗原特異的クローンの単離を試みた。

研究成果の概要（英文）：Cartilaginous fish possess a unique immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) which is composed of only two heavy chains. Because of its simple and unique structure, the variable region of the shark IgNAR is suitable for the production of an artificial monoclonal antibody against fish and shellfish pathogens. Here, we cloned cDNA encoding IgNAR from the banded houndshark *Triakis scyllium*. The phage display library, possessing a variable region of the IgNAR, was constructed and clones specifically binding to a certain antigen were isolated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2011年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
年度			
年度			
総計	25,900,000	7,770,000	33,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：免疫学・バイオテクノロジー・感染症・水産学

1. 研究開始当初の背景

養殖現場では、今日でも様々な病原微生物感染症が発生し問題となっている。これら感染症の診断法には、病原微生物を単離培養する方法と、PCR や抗原抗体反応を応用した方法がある。後者は時間と労力が少なく済むことから近年広く活用されている。病原体の遺伝子配列情報があれば検出系を容易に構築できる PCR 法と違い、抗原抗体反応を利用

した方法を確立するためには、病原微生物に特異的に結合する抗体を作製する必要がある。さらに、抗体には抗原を接種した動物の血清をそのまま用いるポリクローナル抗体と、特異抗体を産生する B 細胞をクローン化することで作られるモノクローナル抗体があり、モノクローナル抗体の方が一般に特異性が高い。しかしながら、従来のモノクローナル抗体の作成には、時間と労力が必要とな

る。

近年の分子生物学的な進歩により、人為的に多様性を付与した抗体の可変領域をファージ粒子の表面に発現させるファージディスプレイ法と、抗原に結合するファージを増幅しクローン化するバイオパニング法を組み合わせることで、特異的なモノクローナル抗体を調製する技術が開発されつつある。しかしながら、哺乳類の免疫グロブリンの場合、重鎖と軽鎖の二本鎖がヘテロ二量体を形成することで抗原へ結合し、各鎖には抗原特異性を決定する相補性決定領域 (complementary determining region: CDR) が3箇所ずつあることから、人為的に抗原特異的な抗体配列を得ることが難しいとされている。

2. 研究の目的

軟骨魚類は、免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig)、T細胞受容体あるいは主要組織適合遺伝子複合体遺伝子など、獲得免疫の成立に重要な遺伝子が進化の過程で最初に出現した動物であり、分子進化的に重要な位置を占めている。軟骨動物の免疫グロブリンには、硬骨魚類にもみられる IgM の他に、IgW および Ig-new antigen receptor (IgNAR) がある。このうち、IgNAR は、ほ乳類の免疫グロブリンとは異なり重鎖ホモ二量体であり、重鎖の可変領域のみで抗原と結合する。

軟骨魚類の IgNAR は軽鎖を伴わないことから、遺伝子組換え手法を用い CDR 領域に多様性を付与することにより、人工的に任意の抗原に対して結合能をもつ分子が作れる可能性が示されている。そこで、本研究では、日本近海に広く生息するドチザメの IgNAR を利用して人為的なモノクローナル抗体調製技術を確立し、魚介類病原微生物の迅速診断法および感染症の抗体治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ドチザメ免疫グロブリンの cDNA クローニング

他の軟骨魚類の IgM、IgNAR および IgW 遺伝子の塩基配列を参考に縮重プライマーを作成し、ドチザメ各組織から調製した cDNA を鋳型として、各遺伝子 cDNA の部分断片を増幅した。決定した配列をもとに rapid amplification of cDNA ends-PCR 法により全長 cDNA の配列を決定した。各配列について多様性を確認するため、数クローンずつ配列決定した。IgNAR については可変領域の配列多様性を詳細に解析するため、次世代シーケンサー-Genome Sequencer FLX を用い PCR で

増幅した可変領域断片を対象としたアンプリコン解析を行うとともに、IgNAR 可変領域を増幅するプライマーを用いゲノム配列をも決定した。さらに、各遺伝子について、発現臓器を RT-PCR 法により確認した。

(2) ドチザメ IgNAR ファージディスプレイライブラリーの構築および解析

ドチザメ脾臓由来の cDNA を鋳型として IgNAR の可変領域を増幅した。得られた cDNA 断片を制限酵素で処理し、T7Select 10-3 cloning kit (Novagen) を用いてファージディスプレイライブラリーを構築した。魚病原因細菌の *Aeromonas hydrophila*、*A. salmonicida* あるいは *Edwardsiella tarda* のホルマリン不活化菌体を抗原とし、ライブラリーから T7select biopanning kit (Novagen) を用いて抗原特異的クローンの単離を試みた。

また、ドチザメ IgNAR の可変領域のうち、CDR3 をランダムな配列に組み替えた cDNA 断片を PCR 法により調製し、上述の方法によりファージディスプレイライブラリーを構築した。本ライブラリーよりニワトリ卵白リゾチーム (hen egg lysozyme: HEL) および viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) に対して特異的なクローンの単離を試みた。

(3) ドチザメ-Nurse shark キメラ IgNAR 発現ファージの構築および解析

ドチザメ IgNAR の CDR3 を、HEL 特異的な Nurse shark IgNAR のものに置換したキメラ IgNAR をコードする cDNA 断片を PCR で調製した。本断片をファージミド pHEN1 ベクターに組み込み、ヘルパーファージを用いてキメラ IgNAR を膜表面に発現する M13 ファージを調製した。同様に、ドチザメ IgNAR および HEL 特異的な Nurse shark IgNAR 可変領域を組み込んだ M13 ファージを調製し、各ファージの HEL との結合を ELISA 法により解析した。

4. 研究成果

(1) ドチザメ免疫グロブリンの cDNA クローニング

ドチザメが他のサメ類と同様、IgNAR をもつかどうかを確認するとともに、このサメがもつ他の Ig 重鎖についても解析するため、cDNA クローニングを行った。ドチザメは他の軟骨魚類と同様、IgM、IgNAR および IgW をもつことが明らかとなった。IgNAR の可変領域には2箇所のシステイン残基がみられた。いくつかのクローンを解析したところ、本領域中2箇所で多様性が高くなっており、他の軟骨魚類 IgNAR との比較から、これらが CDR1 および 3 であることが示された。さらに、次世代シーケンサーを用いて IgNAR

の可変領域の配列を解析し多様性を評価したところ、他のサメ類の IgNAR と同様、ドチザメ IgNAR も CDR3 で特に配列の多様性が高いことが明らかとなった(図 1)。ゲノム配列解析の結果、ドチザメ IgNAR は少なくとも 3 つの遺伝子領域にコードされており、それぞれの領域において、CDR3 で遺伝子組換えが起こることが示された。

ドチザメ IgM および IgNAR 遺伝子は、抗体産生細胞が多くみられる脾臓のほか様々臓器で発現が確認されたが、IgW 遺伝子は脾臓で強く発現がみられた。

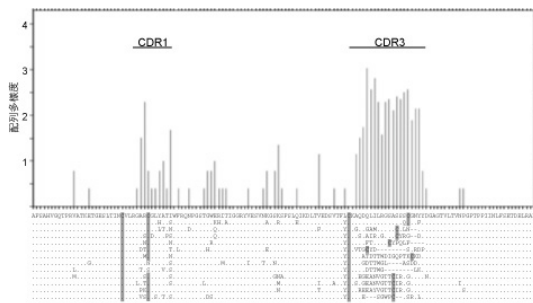


図 1 ドチザメ IgNAR 可変領域のアミノ酸配列多様度

上段、配列多様度；下段、増幅産物の演繹アミノ酸配列

(2)ドチザメ IgNAR フェージディスプレイライブラリーの構築および解析

ドチザメ IgNAR 可変領域を組み込んだフェージディスプレイライブラリーからバイオパニング法によるスクリーニングを行ったが、抗原として用いた魚類病原細菌に対して特異的に結合するクローンを得ることは出来なかった。今回 PCR の鋳型として用いたドチザメ脾臓は免疫していない動物のものであったため、抗原とした細菌類に特異的なクローンが得られなかったことが考えられた。これまでに他のサメを用いた研究で、IgNAR の CDR3 にランダム化した配列を組み込むことによる、フェージディスプレイライブラリーが多様化できることが報告されている。そこで、同様の方法によりドチザメ IgNAR 可変領域の CDR3 をランダム化したフェージディスプレイライブラリーを構築し、HEL および VHSV に対して特異的に結合するクローンの単離を試みた。いずれの抗原に対しても結合するクローンは得られたが、各クローンを用いた ELISA の値は低く、結合力は高くないと考えられた(図 2)。各クローンの抗原に対する結合能が低いことは、VHSV に対するクローン配列をもとに調製した組換えタンパク質を用い、ウイルス中和試験を行ったところ、感染防御効果がほとんどみられなかったことから示唆された。

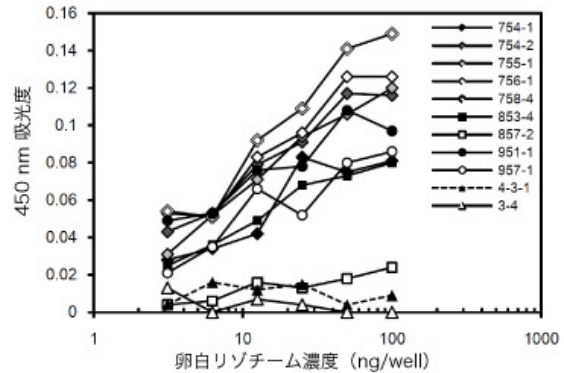


図 2 卵白リゾチーム特異的なドチザメ IgNAR 可変領域発現フェージの抗原への結合

(3)ドチザメ-Nurse shark キメラ IgNAR 発現フェージの構築および解析

IgNAR の抗原特異性の決定には CDR3 の配列が重要であると考えられる。そこで、既報の HEL に特異的な Nurse shark IgNAR の CDR3 配列を参考に、本領域を組み込んだキメラドチザメ IgNAR 可変領域を作成した。キメラタンパク質、HEL に特異的な Nurse shark IgNAR 可変領域、あるいはドチザメ IgNAR 可変領域をウイルス表面に発現する M13 フェージを調製し、各フェージの HEL への結合を ELISA で確認した。興味深いことに、すべてのフェージが HEL に結合することが示されたが、Nurse shark のものが若干高い結合性を示した。

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)

1) Honda Y, Kondo H, Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2010) cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain genes in banded houndshark *Triakis scyllium*. Fish Shellfish Immunol 29, 854-861.

2) Ohtani M, Hikima J, Jung TS, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2012) Construction of an artificially randomized IgNAR phage display library: screening of variable regions that bind to hen egg white lysozyme. Mar Biotechnol (NY) DOI: 10.1007/s10126-012-9456-1.

[学会発表] (計 5 件)

1) 本多由佳、近藤秀裕、青木宙、廣野育生
ドチザメ IgNAR 可変領域の多様性に関する研究
日本魚病学会大会 平成 21 年 9 月 29 日 於
東北大学 (仙台市)

2) 隅田慧光、廣野育生、青木 宙、近藤秀裕
ドチザメ IgNAR 人工組換え体の作製に関する研究

第 14 回マリンバイオテクノロジー学会大会
2011 年 5 月 28 日 於静岡県コンベンション
アーツセンター (静岡市)

3) Ohtani M, Hikima J, Kondo H, Hirono I, Jung
TS, Aoki T

Isolation of antigen specific V-region molecule
from artificially randomized IgNAR phage
display library

ヨーロッパ魚病学会大会 2011 年 9 月 14 日
スプリット (クロアチア)

4) 大谷真紀、引間順一、近藤秀裕、廣野育
生、Jung TS、青木宙

ランダム化したドチザメ IgNAR フェージデ
ィスプレイライブラリーからの抗原特異的
なクローンの選択

平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年
10 月 1 日 長崎大学 (長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 宙 (東京海洋大学・海洋科学技術研
究科・特任教授)

研究者番号 : 00051805

(2) 研究分担者

廣野 育生 (東京海洋大学・海洋科学技術
研究科・教授)

研究者番号 : 00270926

近藤 秀裕 (東京海洋大学・海洋科学技術
研究科・准教授)

研究者番号 : 20314635