

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23780211

研究課題名（和文）魚類獲得免疫の成立に及ぼすサイトカインの影響

研究課題名（英文） Effects of cytokines on the regulation of adaptive immunity in fish

研究代表者

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：20314635

研究成果の概要（和文）：本研究では、魚類における獲得免疫成立に及ぼすサイトカインの作用を解析した。本研究ではまず、ヒラメを対象に新規サイトカイン遺伝子群、すなわち 2 種類のインターロイキン（IL）1 様遺伝子、4 種類の IL-12 ファミリー遺伝子、および 4 種類のケモカイン遺伝子を同定した。次に、炎症系サイトカインである IL-1 $\beta$  の獲得免疫に及ぼす影響を解析し、本サイトカインがタンパク質抗原および DNA ワクチンに対する抗体価を上昇させることを示した。さらに、魚類における I 型インターフェロンの作用機序について解析した。

研究成果の概要（英文）：In this research aimed to reveal the function of cytokines in the regulation of adaptive immunity. The research is divided into three parts. First, some novel cytokine genes were identified in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* including 2 novel interleukin (IL) 1 like genes, 4 types of IL-12 family component genes, and 4 novel chemokine genes. Second, the role of IL-1 $\beta$  in the regulation of adaptive immunity was evaluated. The cytokine enhanced specific antibody titers against protein antigen and DNA vaccine in Japanese flounder. Third, the functional mechanisms of type I interferon system in fish were investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：DNA ワクチン、遺伝子発現、獲得免疫、抗体価、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

魚類養殖において病原微生物による感染症を制御することは、生産効率を高めるためにも重要な問題である。海面養殖において、1990 年代後半からワクチンによる感染症制御が一般的となり、現在の水産養殖はワクチンの存在なしには行えないと言っても過言ではない。

しかしながら一方で、未だにワクチンに夜制御が困難な病原微生物が存在する。例えば、細胞内寄生性細菌であるミコプラズマ、ノカルジア菌、あるいは *Edwardsiella tarda* など、一般的なワクチン投与手法では、感染症

の発症を完全に防除することが困難である。

魚類のワクチンは、哺乳類のものと同様、背の生物がもつ獲得免疫に依存している。獲得免疫には細胞性免疫と液性免疫がある。病原微生物の侵入に伴い、どのような免疫が成立するかは、種々のサイトカインが制御するサイトカインネットワークにより決定する。

ワクチンの効果を高める目的で、鉱油や細菌菌体、あるいはアルミニウム塩などを抗原とともに投与することがある。これらの物質はアジュバントと呼ばれる。アジュバントを用いることで、ワクチンに対する抗体価の上昇、あるいは特異的な細胞性免疫の付与が見

込まれる場合がある。

哺乳類では、アジュバントとしてサイトカインそのものを用いることにより、効果的に抗原に対する免疫を制御する方法の開発が試みられている。近年のゲノム研究により、魚類も哺乳類などと同様に、獲得免疫を制御するサイトカインネットワークが存在することが示されている。しかしながら、これらのサイトカインがどのように魚類の獲得免疫を制御するかについては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

脊椎動物において、種々のサイトカインは獲得免疫の制御に重要である。哺乳類では、個々のサイトカインをワクチン投与時のアジュバントとして利用することで、個別の病原微生物に対して効果的な免疫を成立させる試みがなされている。一方、魚類においても種々のサイトカインが同定されつつあるが、これらが獲得免疫の成立にどのように関わるかは不明な点が多い。

魚類サイトカインが獲得免疫の成立に及ぼす効果を解析することは、ワクチンの効果を高めるために必須である。そこで本研究は、いくつかの新規魚類サイトカイン遺伝子を同定するとともに、サイトカインが抗原特異的な抗体価の上昇に及ぼす影響を解析した。さらに、サイトカインの作用機序についても検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ヒラメ新規サイトカイン遺伝子群の同定  
ヒラメ Expressed sequence tag (EST) 解析により得られた遺伝子配列データベースより、他生物種のサイトカイン遺伝子と相同性がみられた配列を同定した。これらの配列断片をもとにタンパク質コード領域を PCR で増幅し、塩基配列を解析した。

得られた配列をもとに各遺伝子の組織発現、および種々の病原微生物認識パターン分子 (PAMPs) や病原微生物感染時における発現動態を調べた。

(2) 獲得免疫の成立に及ぼすインターロイキン (IL) -1 $\beta$  の影響

IL-1 $\beta$  が抗原特異的な特異抗体の産生に関わるかどうかを調べるため、ヒラメ IL-1 $\beta$  の大腸菌組換えタンパク質および当該遺伝子を組み込んだ真核生物発現用プラスミドを調製し、ヒラメに投与した。さらに、組換えプラスミドについてはタンパク質抗原あるいは DNA ワクチンとともに投与した際の各抗原に対する特異抗体価の変化を解析した。

(3) I 型インターフェロン (I 型 IFN) 作用機序の解析

I 型 IFN 系の活性化剤である polyIC を用い、

その作用機序を魚類個体および魚類細胞を用いて解析した。魚類個体を用いた解析では、マハタ個体の背側筋中に polyIC を投与し、腎臓における I 型 IFN 応答遺伝子の発現動態を解析し、神経壊死症ウイルスに対する抵抗性を調べた。その際、これらの応答に及ぼす温度の影響を調べるため、個体を異なる水温で飼育した。

さらに、細胞内での I 型 IFN 系の活性化機構を調べるため、異なる温度で培養した細胞を polyIC で刺激し、マイクロアレイを用いて発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) ヒラメ新規サイトカイン遺伝子群の同定  
既報のヒラメ EST データおよび、次世代シーケンサーを用いた解析により、数万の点差産物配列情報を得た。バイオインフォマティクス解析により他生物種のサイトカイン遺伝子と相同性を示したもののうち、以下に示した遺伝子群について解析した。

### ① ヒラメ新規 IL-1 様遺伝子群

IL-1 $\beta$  は炎症系サイトカインとして、炎症反応を制御し、獲得免疫に関わる血球細胞を活性化する。これまでにヒラメ IL-1 $\beta$  の塩基配列は既に報告されている。今回さらに、2 種類の新規 IL-1 $\beta$  様遺伝子、novel IL1 $\beta$ -like 1 (nIL1 $\beta$ -L1) および nIL1 $\beta$ -L2 を同定した。これらは主に、エラ、胃、腎臓および脾臓で発現していた。系統解析の結果、nIL-1-L2 は他魚種の IL-1 $\beta$  と相同性を示した。一方、nIL1 $\beta$ -L1 は他魚種のものとは比べて分子サイズが大きく、他生物の IL-1 $\beta$  との相同性も低かった。末梢白血球において、nIL1 $\beta$ -L2 は LPS の刺激により発現上昇したものの、nIL1 $\beta$ -L1 の発現動態に変化はみられなかった。末梢白血球では LPS の刺激により既報の IL-1 $\beta$  遺伝子の発現が顕著に上昇したことから、これらの遺伝子は既報のものとは異なる機能を持つことが示唆された。

### ② ヒラメ IL-2 様遺伝子

IL-2 は T 細胞の分化に伴い発現が誘導される。本サイトカインは、細胞性免疫を活性化する Th1 サイトカインの 1 つとして知られる。ヒラメ IL-2 は、他生物種のものとは 30% 程度のアミノ酸同一率を示した。本遺伝子は解析した全ての臓器で発現が確認され、ウイルス感染により腎臓における発現が上昇した。

### ③ ヒラメ新規 IL-12 ファミリー遺伝子群

IL-12 は p35 および p40 のヘテロ二量体からなり、T 細胞の分化誘導に重要である。IL-12 ファミリーには IL-23、IL-27 および IL-35 があり、いずれもヘテロ二量体からなる。p35 は IL-35 のサブユニットでもあり、

p40 は IL-27 のサブユニットでもある。IL-12 ファミリーの構成因子には、他にも Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) などがある。本研究では、p35、EBI3 および 2 種類の p40 遺伝子、p40a および b、を同定した。p35 および p40a 遺伝子は、解析した全ての臓器で顕著に発現していたものの、EBI3 および p40b 遺伝子は主に、エラ、腎臓および脾臓で発現していた。これらはいずれも、LPS や細菌感染により発現が上昇した。

#### ④ ヒラメ新規ケモカイン遺伝子群

ケモカインは、免疫細胞を炎症部位へ誘導する走化性因子として重要である。これまでもヒラメでは種々のケモカイン遺伝子が同定されてきたが、今回 3 種類の CC ケモカイン遺伝子を同定した。3 種類の CC ケモカインは、これまでヒラメで同定されている 4 種類の遺伝子とは異なる配列であった (表 1)。

表 1 ヒラメ ケモカイン遺伝子

ID	アクセション番号 or 相同分子
JFCC1	AB070836
JFCC2	AB427185
JFCC3	AB111860
JFCC4	AB080611 AU090535
JFCC5	CC ligand 4 ( <i>Epinephelus coioides</i> )
JFCC6	CC19 precursor ( <i>Anoplopoma fimbria</i> )
JFCC7	Eotaxin-like ( <i>Maylandia zebra</i> )

JFCC5~7 が本研究で同定された遺伝子。

さらに、IL-8 と相同性を示す新規 CXC ケモカイン遺伝子をもみいだした。本遺伝子は、既報のヒラメ IL-8 と 40% 程度のアミノ酸同一率を示した。

これらケモカイン遺伝子は、エラ、腎臓あるいは脾臓において発現し、LPS や細菌感染により発現誘導された。

#### (2) 獲得免疫の成立に及ぼす IL-1 $\beta$ の影響

ヒラメ IL-1 $\beta$  が獲得免疫の成立に及ぼす影響を解析した。まず、大腸菌組換えヒラメ IL-1 $\beta$  およびヒラメ IL-1 $\beta$  遺伝子を組み込んだ真核生物発現用プラスミド (pcDNA-IL-1 $\beta$ ) を調製し、それぞれをヒラメ背側筋中へ注射した。いずれも場合も、腎臓における IL-1 $\beta$  および tumor necrosis factor 遺伝子の発現上昇が確認されたことから、IL-1 $\beta$  が機能していることが示された。しかしながら、組換えタンパク質は必要な量が多いことに加え、効果が一定とならなかったため、以降の解析は発現プラスミドを用いて行った。

抗原としてウシ血清アルブミン (BSA) を用い、抗体産生応答を調べた。BSA とともに pcDNA-IL-1 $\beta$  を注射した場合、BSA のみ、あるいは BSA とともに対照となるプラスミド

(pcDNA) を投与した区と比べ、顕著に抗体価が上昇した (表 2)。

表 2 抗原 (BSA) 投与 30 日後の抗体価

処理	抗体価
PBS	0.43 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
BSA	0.69 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>
pcDNA	0.33 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
pcDNA-IL-1 $\beta$	0.49 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
BSA+ pcDNA	0.67 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>
BSA+ pcDNA-IL-1 $\beta$	0.91 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>

値は平均値  $\pm$  標準偏差で、統計的な有意差は異なるアルファベットで示す (p < 0.05)。

抗原として GFP 遺伝子を組み込んだ真核生物発現用プラスミド (pCI-GFP) を用いた場合にも、pcDNA-IL-1 $\beta$  を同時に投与することで抗体価の上昇傾向がみられた (表 3)。

表 3 pCI-GFP 投与 30 日後の抗 GFP 抗体価

処理	抗体価
PBS	0.36 $\pm$ 0.19
pCI-GFP	0.47 $\pm$ 0.21
pcDNA	0.44 $\pm$ 0.12
pcDNA-IL-1 $\beta$	0.34 $\pm$ 0.06
pCI-GFP + pcDNA	0.48 $\pm$ 0.13
pCI-GFP + pcDNA-IL-1 $\beta$	0.59 $\pm$ 0.21

値は平均値  $\pm$  標準偏差で示す。

#### (3) I 型 IFN 作用機序の解析

マハタに polyIC を投与した場合、I 型 IFN 系の活性化により、腎臓における Mx 遺伝子の発現が上昇した。さらに、本剤を投与した個体は神経壊死症ウイルスに対して抵抗性を示した。このような I 型 IFN 系の活性化は数日間持続したが、その持続日数は温度依存的に変化し、低温で飼育した場合に活性化状態が長く続くことが示された。

ヒラメ培養細胞を polyIC で刺激した場合にも、25°C で培養したものに比べて 15°C で培養した場合に I 型 IFN 系の活性化状態が長く続くことが示された。15°C および 25°C で培養した細胞を用い、マイクロアレイ解析を行った。これまでに報告されている種々のインターフェロン応答遺伝子群の発現が、各温度で上昇していたが、それぞれの経時的な発現動態は培養温度毎に異なっていた。また、各温度で異なる発現動態を示す新規遺伝子もみつかっており、これらについては現在解析を続けている。

#### 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 1 件)

Taechavasonyoo A, Kondo H, Nozaki R, Suzuki

Y, Hirono I. Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish and Shellfish Immunology, 34 (2013) 393–396. doi:10.1016/j.fsi.2012.10.001

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 杉山巴美、近藤秀裕、廣野育生. ヒラメ Epstein-Barr virus-induced gene 3 遺伝子の構造および発現解析、平成 25 年度日本水産学会春季大会、平成 25 年 3 月 28 日(東京海洋大学、東京都)
- ② Apichaya Taechavasonyoo, Hirono I, Kondo H. The immuno-adjutant effect of interleukin-1 $\beta$  in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). International Society of Developmental and Comparative Immunology、平成 24 年 7 月 10 日(福岡シーホーク、福岡県)
- ③ 坂井二千佳、山下浩史、近藤秀裕、廣野育生. マハタにおける温度依存的な自然免疫関連遺伝子の発現に関する研究、平成 24 年度日本水産学会春季大会、平成 24 年 3 月 29 日(東京海洋大学、東京都)
- ④ Taechavasonyoo A, Hirono I, Kondo H. The immuno-adjutant effect of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin-1 $\beta$  on immune response. 平成 24 年度日本水産学会春季大会、平成 24 年 3 月 29 日(東京海洋大学、東京都)
- ⑤ Taechavasonyoo A, Kondo H, Hirono I. Cloning of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin-12 p40 and p35. 平成 24 年度日本魚病学会春季大会、平成 24 年 3 月 18 日(東京海洋大学、東京都)
- ⑥ Kondo H, Taechavasonyoo A, Suzuki Y, Hirono I. Identification of 2 novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. International Plant & Animal Genome XX、平成 24 年 1 月 14 日(サンディエゴ、アメリカ)
- ⑦ Sakai N, Kondo H, Hirono I. Temperature-dependent regulation of Mx protein gene expression in fish culture cells. Genomics in Aquaculture 2011、平成 23 年 9 月 15 日(クレタ、ギリシア)
- ⑧ Taechavasonyoo A, Hirono I, Kondo H. The cytokines profiling of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* injected with expression vector and recombinant IL-1 $\beta$ . 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish organized by the EAFP、平成 23 年 9 月 14 日(スプリット、クロアチア)
- ⑨ 井上僚、加藤豪司、近藤秀裕、廣野育生. ヒラメ新規ケモカインの発現解析、第 14

回マリンバイオテクノロジー学会、平成 23 年 5 月 28 日(静岡県コンベンションアーツセンター、静岡市)

- ⑩ 坂井二千佳、岡田峻、近藤秀裕、廣野育生. 魚類における温度依存的な自然免疫活性化に関する研究、第 14 回マリンバイオテクノロジー学会、平成 23 年 5 月 28 日(静岡県コンベンションアーツセンター、静岡市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学海洋科学技術研究科・准教授  
研究者番号：20314635