

機関番号：17601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780180

研究課題名(和文) サイトカイン遺伝子をバイオマーカーとした魚類の健康診断

研究課題名(英文) The health checkups of fish with cytokine genes as bio-marker

研究代表者

河野 智哉 (KONO TOMOYA)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：60527547

研究成果の概要(和文): 魚類のインターロイキン(IL)17 ファミリー遺伝子について詳細な解析を行い、魚類には IL-17A/F, IL-17C, IL-17D が存在することを明らかにした。さらに、他の脊椎動物において知られていないタイプの IL-17N (Novel IL-17) の分離・同定を行うことに成功した。さらに分子進化を探る目的で、両生類、昆虫のゲノムデータベースの解析を行ったが、当該分子の存在は認められなかった。このことから、IL-17N は魚類特有の分子である可能性が示唆された。病原体感染時におけるサイトカインの発現解析において、IL-2 や Transforming Growth Factor (TGF)- $\cdot$ 1 などの細胞増殖制御性のサイトカインの発現が顕著に誘導されることが明らかとなった。このことから、健康状態を把握するマーカーとしてこれらの分子は有効であると判断された。

研究成果の概要(英文): It was found that teleost fish possesses interleukin-17 family genes including IL-17A/F, IL-17C and IL-17D. Recently, I found a novel type of IL-17 gene named IL-17N unknown in other vertebrates. Moreover, it was found that IL-17N gene does not exist on the genome of insect and amphibians by synteny analysis. Therefore, it was suggested that IL-17N molecule is characteristic for teleost fish. The expression analysis of cytokine genes in fish infected with pathogen suggested that cytokines to control cell proliferation such as IL-2 and TGF- $\cdot$ 1 play important role at early stage of immune response. Consequently, these cytokines will be important for analyzing the health condition of fish.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：魚病、免疫、サイトカイン、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

| サイトカインは、細胞間の情報伝達を担うー

群のタンパク質である。特に、免疫系を刺激するシグナル因子としての働きは重要で、抗原提示を受けた未分化のヘルパー細胞(Th0)を Th1 や Th2 へ分化させ、さらに特異免疫をつかさどる B 細胞の抗体産生の促進、非特異免疫応答を担うキラー T 細胞やマクロファージなどを活性化することが知られている。この働きにより、生体内での自然免疫/特異免疫の免疫応答のバランスが保たれている。魚類のサイトカインの分離は、1990 年代後半から様々な手法により行われてきたが、哺乳類におけるサイトカインとの相同性の低さなどから、分離・同定が非常に困難を極めた。しかし、2002 年のフグゲノムデータベースの公開に伴い、魚類におけるサイトカイン遺伝子の分離は飛躍的に加速した。これまでに我々も、急性炎症反応に関与する TNF, IL-6、リンパ球の増殖を活性化する IL-2、リンパ球の炎症部位への遊走を誘起するケモカインなどのサイトカインを分離報告している。しかしながら、哺乳類で知られるサイトカインについて、魚類では未だに分離されていないものがあること、また、分離されたサイトカインについても機能面の解析が進んでいないことから、魚類の免疫応答の解明は哺乳類と比べ進んでいないのが現状である。

日本において水産業は非常に重要な産業の一つであるが、これに伴う病害は非常に深刻な問題となっている。これに対し、抗生物質やワクチン投与が行われてきたが、魚類の免疫に対する知見の乏しさから、根本的な解決には至っていない。

## 2 . 研究の目的

背景でも述べたように、魚類のサイトカインは未だ分離されていないものが多い。そこで、フグのゲノムデータベースの利用し、新規のサイトカインの分離を行う。さらに、同定し

たサイトカインに加え、これまで我々が分離してきたサイトカイン遺伝子をバイオマーカーとして、魚類の免疫応答を解析すると共に、健康状態を把握できる技術(健康診断法)の開発を試みる。

## 3 . 研究の方法

### (1)サイトカイン遺伝子の分離

以下の方法でサイトカイン遺伝子(哺乳類のサイトカインに対し新規なホモログ遺伝子)の分離を行う。

哺乳類の既知サイトカイン遺伝子を鋳型に魚類(フグ/ゼブラフィッシュ)のゲノムデータベースを検索し、ホモログ分子を検索する。

ホモログ分子の周辺遺伝子を検索し、哺乳類の染色体と比較することでシンテニー解析を行う。

ホモログ遺伝子に対する特異プライマーを設計し、PCR 法によってサイトカイン遺伝子をクローニングする。PCR で増幅した断片の塩基配列は、DNA シークエンサーで決定する。さらに必要な場合は RACE-PCR によって、サイトカイン遺伝子の全長解析を行う。

### (2)サイトカイン遺伝子の発現動態の解析

(1)で分離に成功したサイトカイン遺伝子の発現パターンを定量 PCR によって解析する。

健康な状態(何も処理をしていない状態)の脳、頭腎、肝臓、脾臓、腸管、心臓、鰓、皮膚等におけるサイトカイン遺伝子の発現を解析する。

免疫賦活剤で魚類の白血球を処理し、経時的にサイトカイン遺伝子の発現動態を定量 PCR によって解析する。

(3) 魚類サイトカインの組換えタンパク質の作製および機能解析

小麦胚芽抽出液を用いた無細胞組換えタンパク質発現系を利用して魚類組換えサイトカインを作製する。方法は以下に示す通りである。

サイトカイン遺伝子をヒスチジン(His)タグを持つ発現ベクターに組み込み、これを無細胞系タンパク質発現システムで転写・翻訳反応を行い、組換えサイトカインを合成する。合成したタンパク質はニッケルカラムを用いて精製する。精製したタンパク質の純度は SDS-PAGE によって確認する。

組換えサイトカインの機能解析

- 1 魚類からリンパ球を分離する。
- 2 リンパ球に合成した組換えサイトカインを作用させる。
- 3 各サイトカインの主要な活性(リンパ球の増殖活性等)の測定および自然免疫応答の活性化の指標となる貪食活性、活性酸素産生能の測定を行う。

(4) 病原体感染時のサイトカイン遺伝子の発現動態の解析および健康診断マーカーの検討

疑似感染モデルを作製し、サイトカイン遺伝子の発現動態を解析する。病原体由来成分を魚類の腹腔に接種し、その後継時的にサンプリング(二次リンパ器官の摘出)を行い、常法に従って cDNA を合成する。これを鋳型として、(1)で分離したサイトカインおよびこれまでの研究で分離されているサイトカインの発現動態を解析する。当該解析の結果をもとに、魚類の健康状態を把握するためのバイオマーカーを検討する。

#### 4. 研究成果

初年度である平成 21 年度は、魚類の健康診断法を確立するためのマーカー遺伝子の分離ならびに、免疫刺激下における当該遺伝

子の発現動態を解析した。

フグより、炎症反応の中でも特に抗細菌(細胞外増殖性)および抗真菌免疫応答において重要な働きをするインターロイキン(IL)-17 遺伝子の分離を試みた。その結果、フグには、哺乳類で知られる 6 つのファミリーメンバー(IL-17A, B, C, D, E, F)のうち、IL-17A または F(A/F)、C および D にホモログな遺伝子が存在することが明らかとなった。さらに、どのファミリーメンバーにも属さない新規の IL-17 ファミリー分子(IL-17 Novel: IL-17N)の分離・同定にも成功した。さらに、当該分子の分子進化を探る目的で、哺乳類、両生類、昆虫などのゲノムデータベースを解析した。しかしながら、IL-17N に相同な遺伝子は確認されなかった。このことから、IL-17N は魚類特有の IL-17 ファミリーメンバーである可能性が示唆された。

続いて組織における発現を確認したところ、頭腎(IL-17C1, -17N)や脾臓(IL-17A/F3)などの造血組織、表皮(IL-17A/F2)や鰓(IL-17A/F3, -17C2, -N)などの粘膜組織において、顕著に高い発現が認められた。当初、粘膜免疫の中心的な役割を果たす腸において発現が高いことを予想していたが、当該器官における発現は、いずれの IL-17 遺伝子においても低いものであった。続いて、グラム陰性菌(大腸菌)の細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)で経時的に頭腎細胞を刺激し、炎症時における IL-17 遺伝子の発現動態を予測した。その結果、全ての IL-17 遺伝子が、LPS の刺激によってコントロールと比べ有意に発現量が増加した。さらに、LPS 刺激後 1~12 時間において、各遺伝子の発現量はピークをむかえ、その後減少する傾向にあった。これらの結果から、急性の炎症反応において、魚類の IL-17 は重要な役割を果たすことが示唆された。以上の成果

は、Fish and Shellfish 誌に受理・掲載された。

平成 22 年度は、組換えタンパク質を利用した魚類(フグ)のサイトカインの機能解析と、病原体感染時におけるサイトカイン遺伝子の発現動態を解析した。

組換えタンパク質の合成は、哺乳類において免疫応答の方向付けに重要なことが知られる、IFN $\cdot$ 、IL-4/13A, IL-4/13B, IL-17A/F1, TGF- $\cdot$ 1 などのサイトカインを対象とした。無細胞系の組換えタンパク質発現システムを用い合成を行ったところ、全ての組換えサイトカインが不溶性となることが判明したため、合成(翻訳)温度(15 $^{\circ}$ C)を 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C に変更し再度検討した。しかしながら、可溶性タンパク質としての合成は認められず、また合成効率の低下も確認された。このことから、合成システムを無細胞系から大腸菌を用いた組換えタンパク質合成系に変更することとした。しかしながら、研究期間内に機能解析に供試できる十分量の組換えタンパク質を回収するには至らなかった。当該解析は、研究期間終了後も継続して行われている。

病原体感染時におけるサイトカイン遺伝子の発現解析では、バクテリア疑似感染モデル[リポポリサッカライド接種魚]を作製して行った。対象とするサイトカイン遺伝子は、こちら免疫応答の方向付けに重要な働きをする IFN $\cdot$ 、IL-2, IL-4/13A, IL-4/13B, IL-10, IL-17A/F1, IL-17A/F2, IL-17A/F3, IL-21, TGF- $\cdot$ 1 とした。刺激後の早い段階(4 時間)で有意な発現の増加が認められた遺伝子は、IFN $\cdot$ 、IL-4/13A, IL-17A/F2, IL-21, TGF- $\cdot$ 1 であった。また、リンパ球(免疫担当細胞)の増殖因子として非常に重要な IL-2 遺伝子は、刺激後 8 時間目から増加が認められ、48 時間後にはコントロールと比べ約 46 倍の発現量となった。この時、細胞増殖抑制作用

をもつ制御性サイトカイン TGF- $\cdot$ 1 遺伝子の発現量も顕著な増加(コントロールに対し 47 倍)が認められた。これらの結果は、魚類における免疫システムが、サイトカインによって複雑に制御されていることを示唆するものである。以上の結果より、魚類の健康状態の把握には、特にリンパ球の増殖制御に深く関わるサイトカインである IL-2 や TGF- $\cdot$ 1 遺伝子などを指標にすることが有効であると考えられる。

#### 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 2 件)

1) Tomoya Kono, Hiroaki Korenaga and Masahiro Sakai  
Genomics of fish IL-17 ligand and receptors: A review. Fish and Shellfish Immunology, in press, 2011 (査読有)

2) Hiroki Korenaga, Tomoya Kono, Masahiro Sakai  
Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Talifugu rubripes*. Fish and Shellfish Immunology, 28, 809-818, 2010 (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1) 河野智哉・是永大樹・酒井正博, シンテニーから見た魚類特有の IL-17 ファミリー遺伝子, 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2010 年 6 月 25 日, 北九州国際会議場(福岡県)

2) Haruka Kuse, Tomoya Kono, Hiroki Korenaga, Hiroaki Takayama, Yuki Matumoto and Masahiro Sakai. Characterization and expression of interleukin-34 gene in Teleosts. First European Organization of Fish Immunology Symposium, 25/May/2010, Domus La Quercia (Viterbo, Italy)

3) Tomoya Kono, Hiroki Korenaga and Masahiro Sakai. Interleukin-17 ligand and receptor genes in teleosts. First European Organization of Fish Immunology Symposium, 25/May/2010, Domus La Quercia (Viterbo, Italy)

4) 是永大樹、河野智哉、酒井正博、魚類におけるIL-17 遺伝子ファミリー遺伝子、平成21年度日本魚病学会大会、2009年9月27日、東北大学(宮城県)

5) Yoichi Kitao, Tomoya Kono, Masahiro Sakai. Characterization and expression analysis of type I interferon in common carp *Cyprinus carpio* L. 26<sup>th</sup> ESCPB<sup>new</sup> Congress, 6/September/2009, University of Innsbruck (Innsbruck, Austria)

6) Tomoya Kono, Hiroki, Korenaga, Masahiro Sakai. The analysis of interleukin-17 genes in Japanese pufferfish. *Takifugu rubripes*. 26<sup>th</sup> ESCPB<sup>new</sup> Congress, 6/September/2009, University of Innsbruck (Innsbruck, Austria)

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 智哉 (KONO TOMOYA)  
宮崎大学・IR推進機構・助教  
研究者番号：60527547

### (2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：