

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580213

研究課題名（和文）LAG-3 分子解析による魚類調節性 T リンパ球垂集団の新規解明

研究課題名（英文） New understanding of fish regulatory T lymphocytes by LAG-3 molecule analysis

研究代表者 J. M. ダイグストラ, 助教, 総合医科学研究所, 藤田保健衛生大学
(Johannes M. Dijkstra)

研究者番号：10387681

研究成果の概要（和文）：

魚類調節性 T 細胞システムのマーカーとなり得る分子群、即ち、LAG-3、MHC class II、インターロイキン-15 受容体 α 鎖 (IL-15Ra) そしてインターロイキン-2 (IL-2) 等の分子に関する解析において大きな進展が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Considerable progress in understanding presumable markers of the fish regulatory T cell system was achieved, including LAG-3, MHC class II, interleukin 15 receptor alpha (IL-15R α) and interleukin 2 (IL-2).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物においては、免疫応答の抑制的反応は調節性 T 細胞 (Treg) によって介されるが、魚類においてはこれらの細胞群についてはまだ不明である。Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) タンパク質は、魚類における Treg 候補を同定し解析するために有用なマーカーであ

ると考えられる。

(2) Treg を含む T 細胞同士の反応は、抗原を提示し LAG-3 と結合できる多型性を示す古典的 MHC クラス II 分子により担われている。

(3) 本プロジェクトの進行中に、別のグループより、魚類において IL-15Ra が Treg 細胞のマーカーであるとの報告がなされた。

哺乳類においては、IL-15Ra の遺伝子重複産物である IL-2Ra (CD25) がその役目を担っているが、それとは異なる結果である。

2. 研究の目的

(1) 魚類 Treg とそのマーカーとなり得る分子の解析

(2a) クローンギンブナ・モデルシステムにおける MHC 遺伝子の解析

(2b) 古典的及び非古典的 MHC クラス II 分子に機能的に分化している魚類 MHC 遺伝子に関する総合的な解析

(3) ニジマス IL-15Ra とそのリガンドの一つである IL-15L の解析

3. 研究の方法

(1) ニジマスとサケにおいて LAG-3 遺伝子を同定し、様々な組織や細胞群におけるその発現を RT-PCR を用いて解析した。ギンブナやマスのリコンビナント LAG-3 を大腸菌のタンパク質として発現させたが、残念ながら可溶性のタンパク質とすることができず、それ以降の解析が遅れている。Treg の様な細胞集団の同定に有用と考えられるコイ T 細胞系列のクローン化の確立を続ける予定である。コイとギンブナにおいて Treg を刺激する IL-2 を同定し、大腸菌で可溶性のリコンビナントタンパク質を作成させることに成功した。

(2a) 麻布大学の村上博士より、diploid ギンブナ、triploid ギンブナ、ゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、キンブナ、金魚など、多くの個体を入手した。これらの個体を用いて LAG-3/CD4 関連遺伝子である G6F-like の塩基配列決定を行った。以前の実験から triploid のクローンギンブナモデル系統において 3 種の異なる G6F-like

遺伝子配列を既に同定しており、今回の実験から diploid ギンブナが triploid ギンブナの祖先である可能性が高いことが示された。そこで MHC クラス I、MHC クラス IIA 及び MHC クラス IIB の配列を多くの diploid ギンブナ及びクローンの triploid ギンブナ個体を用いて決定し、多型性の解析を行った。

(2b) MHC クラス II の進化を明らかにするために、魚類ゲノム配列データベースを用いて詳細な解析を行った。多型性を解明する目的で、いくつかのタイプのクラス II 遺伝子配列に関してサケの多数の個体を用いて解析を行った。また様々なクラス II 遺伝子の相対的な発現量を比較するために transcriptome や RT-PCR を用いた解析を実施した。

(3) ニジマスの IL-15Ra や IL-15L 遺伝子に関して、RT-PCR や配列決定の実験を実施した。リコンビナントの可溶性型 IL-15a や IL-15L を用いて、哺乳動物細胞への co-transfection を行い、結合を調べ、FACS で細胞表面出現を解析し、細胞培養上精の Western blot 解析を行った。

4. 研究成果

(1a) ニジマスと大西洋サケの LAG-3 が同定され、特異的に鰓で発現していることが確認された。鰓はそのサイトカイン発現に基づく Treg/Th2 にシフトした免疫環境を有していると考えられる (文献 1 及び 2)。

(1b) コイから T 細胞のクローンを確立することに成功した (文献 3)。そして、ゼブラフィッシュ、コイ、ギンブナを含むコイ科魚類より初めて IL-2 遺伝子を同定することに成功した。哺乳類において IL-2 は最も重要な T 細胞増殖因子であり、また特に Treg 細胞を刺激することが知られて

いるため、現在 T 細胞クローン安定株の産出に対するコイのリコンビナント IL-2 の影響を調べている。

(2a) 我々は G6F-like 遺伝子配列 (文献 4 他) を解析することによって、triploid ギンブナが、以前他の研究者によって他種の可能性が考えられていたのとは異なり、diploid ギンブナのみから生じた可能性を示した。また、diploid ギンブナは、大きな genetic pool を有しており、そこからニゴロブナ、キンブナ、金魚などの亜種が生じ、または作成された可能性を示した。ゲンゴロウブナは、亜種ではなく異なる種と考えられる。diploid ギンブナ個体において多型性を示す MHC クラス I、IIA そして IIB 遺伝子を見い出したが、これらはクローンのギンブナ系統のものに相当することを明らかにした。

(2b) 魚類 MHC クラス II を詳細に解析した結果、これまで未知だった古い起源を持つ遺伝子系統を明らかにした。これは他の魚類クラス II とは異なり、その遺伝子は原始的な MHC 領域に留まったままであった。また哺乳動物と同様に、魚類においても非古典的クラス II 分子は低レベルで発現し、高い多型性を示さず、ペプチド結合や CD4 結合モチーフを有していないことを明らかにした (Dijkstra 他、準備中)。

(3) IL-15Ra は魚類における Treg のマーカーとして有望であるが、その遺伝子及びリガンドとして考えられる IL-15L の遺伝子をニジマスより同定し増幅することができた。膜結合型の IL-15Ra と co-transfection した時のみ、IL-15L は細胞表面に検出でき、また可溶性の IL-15a と co-transfection した時のみ、細胞培養上清に IL-15L を見い出すことができた。従って、IL-15Ra は IL-15L に結合し、チャ

ペロンとして、または哺乳類の IL-15Ra と IL-15 の場合に知られている様にサイトカインのヘテロダイマーの構成成分として必要とされることを示す結果を得た (Dijkstra 他、準備中)。

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 4 件)

[1] Yamaguchi T, Katakura F, Someya K, Dijkstra JM, Moritomo T, Nakanishi T. Clonal growth of carp (*Cyprinus carpio*) T cells in vitro: long-term proliferation of Th2-like cells. *Fish & Shellfish Immunology* 34(2), 2013, 433-442
doi:10.1016/j.fsi.2012.11.005.

[2] Hughes CE, Radhakrishnan UP, Lordkipanidzé M, Egginton S, Dijkstra JM, Jagadeeswaran P, Watson SP. G6f-like is an ITAM-containing collagen receptor in thrombocytes. *PLoS One* 7(12), 2012, e52622.
doi:10.1371/journal.pone.0052622.

[3] Takizawa F, Dijkstra JM, Kotterba P, Korytář T, Kock H, Köllner B, Jaureguiberry B, Nakanishi T, Fischer U. The expression of CD8 α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35(7), 2012, 752-763
doi:10.1016/j.dci.2011.02.008.

[4] Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer

U, Dijkstra JM. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology* 48(12-13), 2011, 1360-1368
doi:10.1016/j.molimm.2011.02.014.

[学会発表] (計2件)

(1) MHC in salmonid fish and its linkage associations with disease resistance and social behaviour. J.M. Dijkstra, M. Ototake, N. Nakanishi, K. Hashimoto. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan. Aug 2010

(2) Thrombocytes and erythrocytes in teleost fish express a surface marker related to mammalian G6F with a cytoplasmic tail bearing an ITAM. J.M. Dijkstra, K. Ohashi, F. Takizawa, H. Toda, T. Nakanishi and K. Hashimoto. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan. Aug 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

J.M. ダイグストラ

助教

総合医科学研究所

藤田保健衛生大学

(Johannes M. Dijkstra)

研究者番号 : 10387681

(3) 連携研究者

中西 照幸
名誉教授 授与 大学名
生物資源科学部
獣医学科
日本大学

(Nakanishi Teruyuki)

研究者番号 : 00322496

