

令和元年5月17日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07841

研究課題名(和文)水温に依存する魚類の生体防御機構におけるインタ-フェロンの役割

研究課題名(英文) Roles of the interferon in temperature-dependent immunity of fish

研究代表者

一色 正 (ISSHIKI, Tadashi)

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：30378319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インタ-フェロン(IFN)の発現を誘導するポリイノシンポリシチジル酸、あるいは我々が構築したリコンビナントIFN(rIFN)ベクタ-を接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子群の発現動態を解析し、IFNが関与する生体防御機能に及ぼす水温の影響を検討した。その結果、ヒラメのIFNに関わる水温依存性は、IFN自体の発現機構に対してよりもむしろIFNの免疫関連因子誘導機構に対して機能している可能性があると考えられた。また、構築したrIFNベクタ-はヒラメの免疫機構の解明に有用であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、魚類の自然免疫系における水温依存性をIFNの機能に着目して明らかにしたものである。一般に魚類の免疫系のうち、水温の影響を受けやすいのは獲得免疫系であると考えられてきたが、本研究によって自然免疫系も水温の影響を受けることが示された。魚類の水温依存性免疫の制御機構を明らかにするためには、免疫系の総合的な解析が必要であることが強く示唆される。本研究成果は、徐々に情報が集積しつつある魚類の免疫応答機構をより詳細に解析する手掛かりになるものと思われる。また、本研究において構築されたrIFNベクタ-は、ヒラメの免疫機構を研究するためのツ-ルとしての有用性が高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was injected with recombinant plasmid expressing the type-I interferon (IFN) gene as well as the polyinosinic-polycytidylic acid, an IFN inducer, and then maintained at 10 or 20 . Measurements of the expression level of immune-related genes in the muscles around the injection site and/or in the head kidney of Japanese flounder collected at different time points after the injection demonstrated that the difference of water temperatures affected expression of IFN-inducible genes (Mx or ISG15) rather than IFN gene. The results suggest that IFN-inducing activities of fish may depend on temperature and that the recombinant IFN expression plasmid constructed in this study should help to clarify the biological function of IFN in fish.

研究分野：魚病学

キーワード：水産学 魚病 免疫 インタ-フェロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚類は哺乳類の持つ生体防御能に劣らない機能を持ち、特異的および非特異的に働く様々な生体防御機構を備えているが、興味深いことに変温動物である魚類の生体防御機構は水温に依存するという側面がある。一般に魚類の免疫系のうち、水温の影響を受けやすいのは獲得免疫系であると考えられているが、魚類の水温依存性免疫がどのように制御されているのかを明らかにするためには、免疫系を支配する各種調節因子を含めた総合的な解析が必要である。研究代表者は科学研究費補助金(基盤研究(C)課題番号19580204)の助成を得て考案したヒラメのウイルス性出血性敗血症(VHS)に対するホルマリン不活化ワクチンの防御効果はワクチン接種後の飼育水温に依存し、ヒラメの適水温20℃で飼育した場合にのみ有効性が確認されること、およびワクチン接種魚はVHSウイルス(VHSV)の再感染後、数日以内に顕著なウイルス抵抗性を示すが、その血中からは中和抗体が検出されず、インターフェロン(IFN)関連遺伝子が発現していることを明らかにしている。このことから、当該ワクチンにより誘導される水温依存性の生体防御機構にはIFNが重要な役割を果たしていると推察した。IFNは脊椎動物細胞を抗ウイルス状態に誘導する分泌タンパク質であり、哺乳類等の高等脊椎動物では相互作用する受容体、および関係している免疫応答に基づいて3つのサブファミリー; Ⅰ型, Ⅱ型, およびⅢ型IFNsに同定されている。近年、硬骨魚類においてもⅠ型およびⅡ型IFNsの存在が明らかになり、いくつかの魚種においてⅠ型IFN遺伝子がクローン化されている。さらに、リコンビナントIFNタンパク質(rIFN)あるいはrIFN発現プラスミド(rIFNベクター)を生体に注射し、抗ウイルス防御能に果たすIFNの役割が解析されており、Ⅰ型IFNの活性はMx, ビペリン, ISG15, およびPKRを含む広範囲のIFN刺激遺伝子の発現を誘導し、抗ウイルス状態の増強をもたらすことが判明している[1]。ヒラメのⅠ型IFN遺伝子については、VHSVに感染した腎臓において発現が誘導されること[2]、およびポリイノシンポリシチジル酸(ポリ(I:C))注射後の腎臓においても顕著に誘導されること[3]などが確認されていることから、ヒラメのⅠ型IFN(JF-IFN1)遺伝子の発現は、ウイルス刺激のみならず、ウイルス模倣体によっても誘導され、ヒトと同様の機構によって調節されることが示唆されている。このように、Ⅰ型IFNは魚類ウイルス病に対する重要な免疫関連因子であるとともに、ヒラメにおいてもその遺伝子の情報と発現誘導が報告されていることから、ヒラメをモデル動物として、ポリ(I:C)あるいはrIFNを利用することで、水温に依存する魚類の生体防御機構におけるIFNの役割を探る研究が可能であると推察される。

### 2. 研究の目的

#### (1) ポリ(I:C)を接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析

IFNの発現を誘導するポリ(I:C)を異なる水温で飼育したヒラメに接種し、IFN関連遺伝子であるⅠ型IFN, Mx および ISG15 遺伝子の発現解析を行う。

#### (2) rIFNベクターの構築

既報の遺伝子情報を基にJF-IFN1遺伝子のcDNAを合成し、ヒラメ体内でrIFNを発現させるベクターを構築するとともに、構築したベクターをヒラメに筋肉内接種することで、rIFN遺伝子が発現するか否かを確認する。

#### (3) rIFNベクターを接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析

構築したrIFNベクターをヒラメの筋肉内に接種したのち経時的に筋肉および頭腎を採材し、rIFN遺伝子およびMx遺伝子の発現誘導を検討するとともに、得られた解析結果からヒラメの免疫機構の解明におけるrIFNベクターの有用性を確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポリ(I:C)を接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析

供試魚: 種苗生産されたヒラメ(平均全長7cm)を2群に分け、一方を水温20℃, 他方を水温10℃に1週間馴致させて供試した。

ポリ(I:C)の腹腔内注射および組織の採取: 実験区には、ポリ(I:C)カリウム塩(sigma)を100 µg/100 µLの濃度に溶解した滅菌ミリQ水をヒラメに100 µL/尾ずつ腹腔内注射後、馴致された水温でそれぞれ飼育する20℃ポリ(I:C)区および10℃ポリ(I:C)区を設けた。対照区には滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて同様に処理する20℃PBS区および10℃PBS区を設けた。注射してから0(注射直後), 3, 6, 12, 24, 48 および 96 時間後にヒラメを各区から3尾ずつ取り上げ、脾臓および頭腎を摘出し、RNAlater(Invitrogen)に浸漬して使用時まで-80℃で凍結保存した。

免疫関連遺伝子の発現動態: 個体別に脾臓および頭腎をプールのし、1サンプルとして用いた。各サンプルはISOGEN(ニッポンジーン)を用いてRNAを抽出後、DNase処理を行い、ゲノムDNAを排除した。得られたRNA(100 ng)を用いて、SuperScript RT(Invitrogen)による逆転写反応を行い、cDNAを合成した。目的遺伝子はIFN-1, Mx および ISG15 ならびに内部標準遺伝子は  $\beta$ -actin とした。リアルタイムPCRはStepOnePlus™ Real-Time PCR System(Applied Biosystems) および THUNDERBIRD SYBR qPCR mix(東洋紡)を使用し、インターカレーター法によって行った。サンプルの測定はトリプリケートで行い、測定した結果を基に、比較Ct法を用いて遺伝子発現の相対定量を行った。

統計解析: 統計解析はエクセル統計2012を用いて行い、危険率5%で検定した。各遺伝子

の発現量（平均値 ± 標準偏差）は、同水温での対照区と実験区間および異なる水温間での有意差を、F 検定を行ったのち、スチューデントの t 検定またはウェルチの t 検定を用いて調べた。また、経過時間ごとの遺伝子発現量の比較には一元配置分散分析法を行ったのち、多重比較検定（Tukey-Kramer 法）を用いて調べた。

## (2) rIFN ベクターの構築

供試魚：種苗生産された 2 群のヒラメ（平均全長 10 cm あるいは 20 cm）を用いた。

ウイルス接種による JF-IFN1 遺伝子の発現誘導：供試魚に VHSV KRRV9822 株を  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/尾あるいは  $10^{4.6}$  TCID<sub>50</sub>/尾となるように腹腔内接種し、水温 14 で飼育した。接種から 1, 3 および 5 日後に採取した供試魚の脾臓および頭腎を摘出し、RNA later に浸漬して使用時まで -80 で凍結保存した。

JF-IFN1 遺伝子の検出：摘出した全ての脾臓および頭腎（計 24 サンプル）を用いて、前述と同様に RNA を抽出し、cDNA を合成した。JF-IFN1 遺伝子（Gene Bank Accession No. JN411721）を PCR 増幅するためのプライマーは、GENETYX-WIN Ver. 3.2（ソフトウェア開発株式会社）を用いて設計し、cDNA をテンプレートにして PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルから切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up（TaKaRa）を用いて精製した。

DNA シーケンス：PCR により目的遺伝子の発現が確認された計 10 サンプルについて行った。DNA シーケンス反応と精製は、反応キット；BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kits（Thermo Fisher）、および精製キット；BigDye X Terminator® Purification Kit（Thermo Fisher）を使用して行った。塩基配列の解析は、3130x1 Genetic Analyzer（50 cm キャピラリー使用、Thermo Fisher）、および DNA Sequencing Analysis Software Ver. 5.3.1 を使用して行った。また、アミノ酸配列の解析は GENETYX-WIN Ver. 3.2 を使用して行った。得られた塩基配列およびアミノ酸配列は、GenBank に登録済みの JF-IFN1 の塩基配列（Accession No. JN411721）、およびそれに基づくアミノ酸配列と比較して相違を調べた。

クロニングベクター：塩基配列を解読できたサンプルのうち、JF-IFN1 に対する相同性が最も高いサンプルの精製した PCR 産物（JF-rIFN1 遺伝子）を供試した。JF-rIFN1 遺伝子は Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®（TaKaRa）を用いて、pMD20-Tvector ヘライゲーションした（以下、Tvector-JF-rIFN1）。大腸菌 *Escherichia coli* コンピテントセル *E. coli* DH5（TaKaRa）を調整後、Tvector-JF-rIFN1 を導入した。コロニー PCR を行って形質転換を確認後、illustra™ Plasmid Prep Mini Spin Kit（GE Healthcare）を用いて、Tvector-JF-rIFN1 を抽出精製した。

発現ベクター：精製した Tvector-JF-rIFN1 および pcDNA3.1(+)（Invitrogen）を制限酵素処理後、JF-rIFN1 遺伝子を pcDNA3.1 ヘライゲーションした（以下、pcDNA3.1-JF-rIFN1）。クロニングベクターと同様に形質転換した大腸菌を LB 液体培地で培養後、EndoFree® Plasmid Mega Kit（QIAGEN）を用いて pcDNA3.1-JF-rIFN1 を精製し、rIFN ベクターとした。

pcDNA3.1-JF-rIFN1 接種による JF-rIFN1 遺伝子の発現誘導：供試魚 1 尾に pcDNA3.1-JF-rIFN1 15 µg を含む PBS 50 µL を有眼側背鰭基部の筋肉内に注射し、24 時間後に取り上げた。筋肉（注射部位）、頭腎、脾臓、肝臓および心臓を摘出し、前述と同様に RNA の抽出、cDNA の合成、および PCR を行って JF-rIFN1 遺伝子を検出した。

## (3) rIFN ベクターを接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析

供試魚：種苗生産されたヒラメ（平均全長約 18 cm）を 2 群に分け、それぞれを水温 20 および 10 に 1 週間馴致させて供試した。

rIFN 発現ベクターの筋肉内注射および組織の採取：馴致された水温別に、3 種類の実験区；pcDNA3.1-JF-rIFN1 区、pcDNA3.1 区、および PBS 区を設けた。各実験区の供試魚にそれぞれ pcDNA3.1-JF-rIFN1 を 15 µg/50 µL 含む PBS、pcDNA3.1(+) を 15 µg/50 µL 含む PBS、および PBS を 1 mL 容シリンジを用いて有眼側背鰭基部の筋肉内に 50 µL ずつ注射した。その後、供試魚を実験区別に分けて、馴致した水温で飼育した。注射してから 0 時間（注射直後）、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、3 日、5 日および 7 日後にヒラメを各区から 3 尾ずつ取り上げ、筋肉（注射部位）および頭腎を摘出し、RNA later に浸漬して使用時まで -80 で凍結保存した。

免疫関連遺伝子の発現動態：摘出した筋肉および頭腎を各 1 サンプルとして用いて、(1)と同様に RNA 抽出、cDNA 合成、およびリアルタイム PCR を行った。なお、目的遺伝子は IFN-1 および Mx とした。

統計解析：(1)と同様に行った。

## 4. 研究成果

### (1) ポリ (I:C) を接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析（図 1）

Mx 遺伝子（図 1a）：20 ポリ (I:C) 区では、接種 3 時間後（15.79 倍）から接種 12 時間後（29.77 倍）まで Mx 遺伝子の発現量が増加し、接種 12 時間後に発現のピークに達した。その後、急激に減少し接種 24 時間後以降は低い水準でほとんど保たれた。一方、10 ポリ (I:C) 区では接種 12 時間後までは発現量がほとんど増加しなかったが、接種 24 時間後（44.75 倍）に急激に増加し、その後減少した。同一水温下で発現量を比較した結果、水温 20 において接種 12 時間後に、水温 10 においては接種 3 時間後にポリ (I:C) 区と PBS 区の間で有意差が

認められた。

ISG15 (図 1b): 20 ポリ (I:C) 区は接種 12 時間後までは発現量が高いレベルを示し、接種 6 時間後にはピーク (169.72 倍) を示した。接種 24 時間後以降はピークを示した接種 6 時間後より発現量が有意に低くなった。20 ポリ (I:C) 区と 10 ポリ (I:C) 区との間で発現量を比較した結果、接種 6 時間および接種 12 時間後には 20 ポリ (I:C) 区の方が有意に高かったが、接種 96 時間後には 10 ポリ (I:C) 区の方が有意に高くなった。

IFN: 20 ポリ (I:C) 区においては、有意差は確認されなかったものの、接種 6 時間後にピーク (20.36 倍) を示し、接種 24 時間後以降はほとんど確認されなかった。なお、10 ポリ (I:C) 区および 10 PBS 区では接種直後の全ての個体から Ct 値が得られず、IFN 遺伝子の発現量を算出することができなかった。

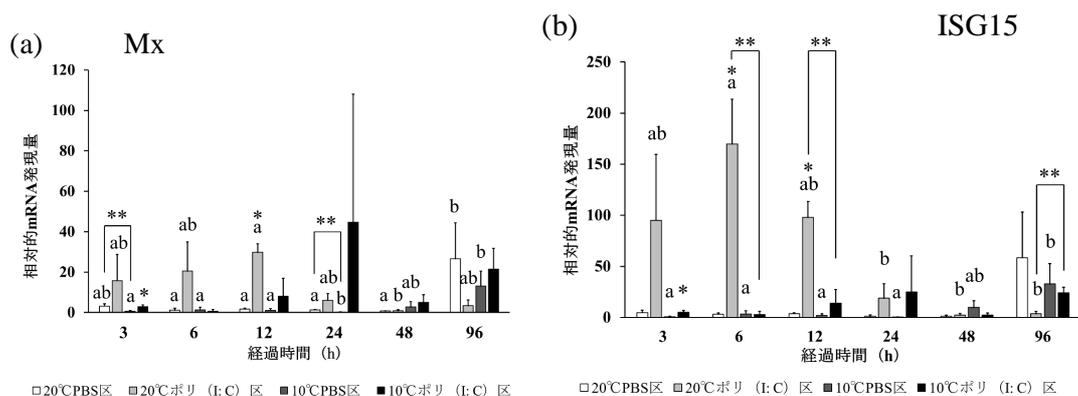


図 1. 20 のポリ (I:C) 区および PBS 区、ならびに 10 のポリ (I:C) 区および PBS 区における Mx 遺伝子 (a) あるいは ISG15 遺伝子 (b) の発現量の変化。データは 3 個体の平均値で表した。各ヒストグラム上のエラーバーは標準偏差を示す。\*は同一水温でのポリ (I:C) 区と PBS 区との間の有意差を、\*\*は異なる水温での試験区間の有意差を、アルファベットは同一試験区内での異なる経過時間の間の有意差を示す。

## (2) rIFN ベクター - の構築

ウイルス接種による IFN1 遺伝子の発現誘導: PCR により JF-IFN1 遺伝子を検出した結果、cDNA 合成を行った 24 サンプルのうち、10 サンプルにおいて標的遺伝子 (495 bp) の発現が確認された。

DNA シーケンス: 解読した各サンプルの塩基配列および変換したアミノ酸配列をヒラメ IFN1 のものと比較した結果、最も相同性の高いサンプルで 2 bp および 2 残基の違いであった。

発現ベクター: 精製した pcDNA3.1-JF-rIFN1 (約 600  $\mu$ L) の核酸量を測定した結果、精製液の濃度は約 1000 ng/ $\mu$ L であった。

pcDNA3.1-JF-rIFN1 接種による JF-rIFN1 遺伝子の発現誘導: 標的遺伝子の発現は、筋肉において確認された。しかし、頭腎、脾臓、および肝臓においては確認されなかった。一方、PBS を接種したヒラメでは、調べたいずれの組織においても標的遺伝子の発現は確認されなかった。

## (3) rIFN ベクター - を接種したヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現解析 (図 2)

10 -IFN (図 2a および b): pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの筋肉および頭腎における発現量は接種 5 日後までほとんど確認されなかったが、接種 7 日後に急激に増加しそれぞれ 19.23 倍および 6.01 倍となり、実験期間内での発現量の最大を示した。なお、pcDNA3.1 区、および PBS 区のヒラメについては、いずれの組織においても、全ての期間を通して IFN 遺伝子の発現量は 3.87 倍以下であった。

10 -Mx (図 2c および d): pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの筋肉における発現量は、接種 24 時間後までほとんど確認されなかったが、接種 3 日後および接種 5 日後にはやや増加し、それぞれ 2.69 倍および 2.63 倍となった。その後、接種 7 日後には上方制御され 6.89 倍となり、最も高い値を示した。pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの頭腎における発現量は、接種 5 日後までは 0.65 倍 (接種 3 日後) から 3.12 倍 (接種 12 時間後) を示し、接種 7 日後には急激に増加して 13.44 倍となった。

20 -IFN (図 2e および f): pcDNA3.1-JF-IFN1 区の筋肉における発現量は、接種 12 時間後までほとんど認められなかったが、24 時間後にやや増加し、4.84 倍となった。その後、3 日後から 5 日後にかけて徐々に下方制御されたが、7 日後に急増し、ピーク (41.85 倍) を示した。pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの頭腎における発現量は、接種 24 時間後まではほとんど認められなかったが、3 日後に 18.51 倍まで増加し、5 日後にピーク (36.08 倍) を示した。その後、7 日後にやや減少して 25.43 倍となった。なお、pcDNA3.1 区および PBS 区のヒラメについては、

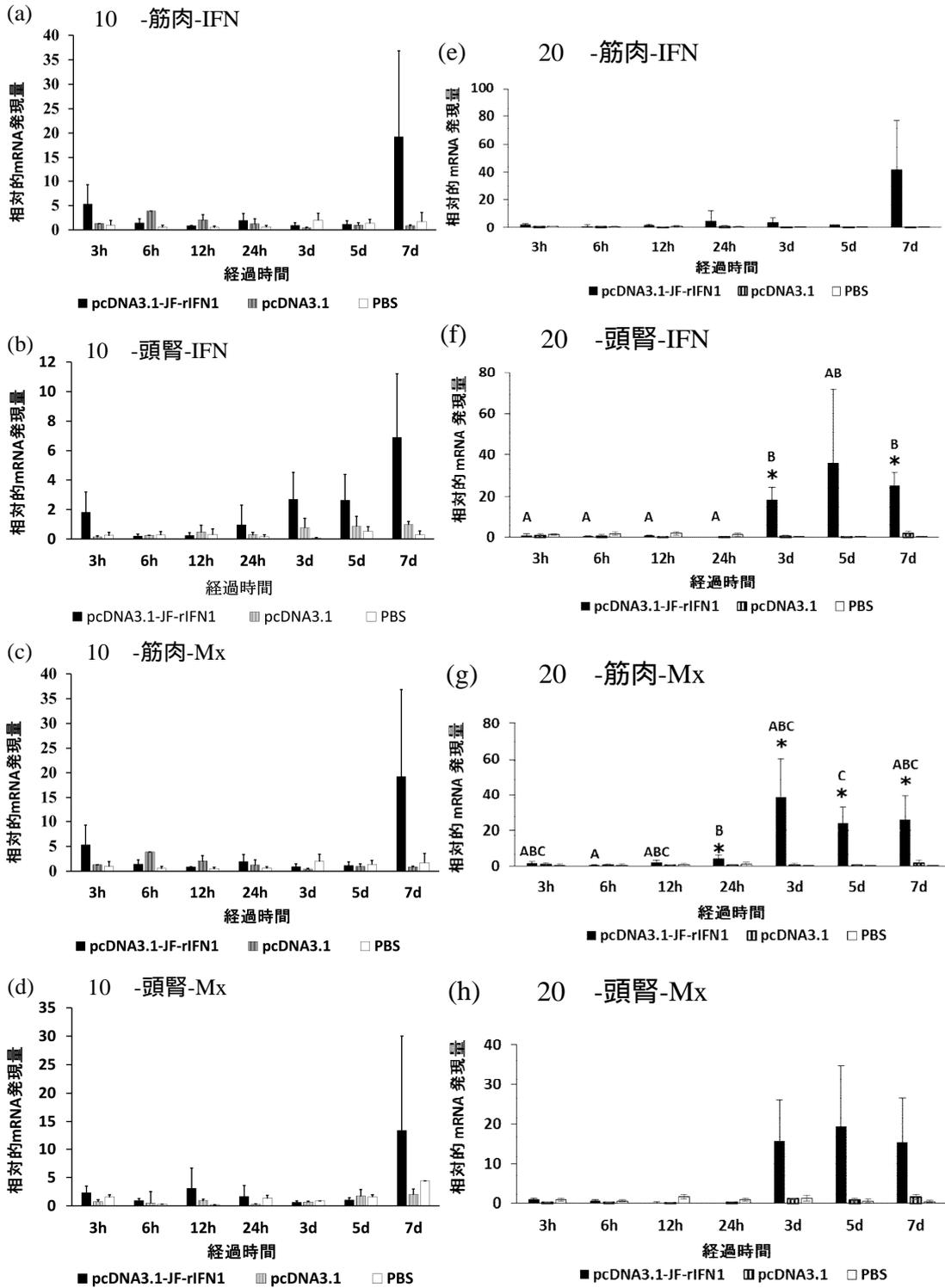


図2. pcDNA3.1-JF-rIFN1 区, pcDNA3.1 区, および PBS 区のヒラメの筋肉と頭腎における IFN あるいは Mx の発現量の変化。データは 3 個体の平均値で表した。各ヒストグラム上のエラーバーは標準偏差を示す。経過時間別の 3 実験区間における検定結果を\*, および実験区別の各経過時間における検定結果をアルファベットでそれぞれ示す。\*の付加されたデータと付加されていないデータ, および異なるアルファベットが付加されたデータ間には, 有意差が認められる ( $p < 0.05$ )。飼育水温: (a) ~ (d); 10 , (e) ~ (h); 20 .

いずれの組織においても、全ての期間を通して IFN 遺伝子の発現量は 1.88 倍以下であり、ほとんど確認されなかった。経過時間別に実験区間で組織別の発現量を比較した結果、頭腎においてのみ有意な差が認められ、接種 3 日後と 7 日後において、pcDNA3.1-JF-rIFN1 区は他の実験区よりも有意に高かった。また、実験区別に各経過時間の間で組織別の発現量を比較した結果、pcDNA3.1-JF-rIFN1 区の頭腎においてのみ有意な差が認められ、24 時間後以前の各経過時間は 3 日後、あるいは 7 日後よりも有意に低かったが、5 日後との間では有意な差が認められなかった。

20 -Mx (図 2g および h): pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの筋肉における Mx 遺伝子の発現量は、接種 12 時間後までは 2.09 倍以下であり大きく変化しなかったが、24 時間後から上方制御され、3 日後にピーク (38.38 倍) に達した。その後、5 日後に減少して 23.82 倍となり、7 日後までほぼ保たれた。pcDNA3.1-JF-IFN1 区のヒラメの頭腎における Mx 遺伝子の発現量は、接種 24 時間後まではほとんど認められなかったが、3 日後に 15.74 倍まで増加し、5 日後にピーク (19.43 倍) を示した。その後、7 日後にやや減少して 15.38 倍となった。なお、pcDNA3.1 区および PBS 区のヒラメについては、いずれの組織においても、全ての期間を通して Mx 遺伝子の発現量は 2.09 倍以下であり、ほとんど確認されなかった。経過時間別に実験区間で組織別の発現量を比較した結果、筋肉においてのみ有意な差が認められ、接種 24 時間以降の各経過時間において、pcDNA3.1-JF-rIFN1 区は他の実験区よりも有意に高かった。また、実験区別に各経過時間の間で組織別の発現量を比較した結果、pcDNA3.1-JF-rIFN1 区の筋肉においてのみ有意な差が認められ、6 時間後は 24 時間後あるいは 5 日後よりも、および 24 時間後は 5 日後よりもそれぞれ有意に低かった。

以上の結果から、20 で飼育されたヒラメにおける IFN 誘導遺伝子群 (Mx あるいは ISG15) の発現量は 10 で飼育されたものに比べて早期に増加する傾向にあることが明らかとなった。したがって、ヒラメの IFN に関わる水温依存性は、IFN 自体の発現機構に対してよりもむしろ IFN の免疫関連因子誘導機構に対して機能している可能性があると考えられる。一方、本研究で構築した rIFN ベクターの筋肉内接種によって、筋肉および頭腎において rIFN の発現が誘導され、IFN として認識されたことで、各々の組織において Mx 遺伝子の持続的な発現量の増加が誘導されることが示された。したがって、構築した rIFN ベクターはヒラメの免疫機構の解明に有用であると思われる。

#### < 引用文献 >

[1] Zou, J. and C. J. Secombes (2011): Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 253-264. [2] Ohtani, M., J. Hikima, H. Kondo, I. Hirono, T.S. Jung and T. Aoki (2011): Characterization and antiviral function of a cytosolic sensor gene, MDA5, in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 554-562. [3] Takami, I., S. R. Kwon, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2010): Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by Poly (I:C) immunization. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 109-115.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6 . 研究組織

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 悠太郎  
ローマ字氏名：(SUZUKI, Yutaro)  
研究協力者氏名：中島 智優  
ローマ字氏名：(NAKASHIMA, Chihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。