

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07915

研究課題名(和文) 魚類の免疫応答における概日リズムの解明～免疫増強剤の効果向上を目指して～

研究課題名(英文) Understanding of circadian rhythm in the fish immunity

研究代表者

河野 智哉 (Kono, Tomoya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60527547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系遺伝子TNF-alpha, IL-1beta, CCケモカイン(CCL18L, 19, 25L)、CXCケモカイン(CXCL11)の発現に概日リズムが存在することを明らかにした。また、これらの免疫系遺伝子の転写調節領域には、時計遺伝子応答配列が存在することを明らかにした。続いて、時計遺伝子Bmal1:Clock1はTNF-alpha遺伝子の転写調節領域に結合し、発現制御を行うことを明らかにした。さらに、リズムを有する免疫分子の発現は、発現リズムの頂点位相を示す時間帯に免疫刺激をすることで強く誘導されることが確認された。以上の結果より、魚類の免疫応答には概日制御が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で魚類の免疫リズムの一端を明らかにしたことは、魚類分野に貢献するばかりでなく、脊椎動物の免疫システムにおける多様性と画一性を解き明かす鍵となり、進化生物学や比較免疫学の発展に寄与するものである。さらに、研究より見出された「異なる時間帯での免疫刺激は、その後誘導される免疫応答に違いをもたらす」という知見は、水産増養殖現場で免疫賦活剤を使用する際の投与タイミングの重要性を示唆しており、将来的には疾病対策の効果改善に大きく寄与するものとなる。

研究成果の概要(英文)：The circadian expression of immune-related genes such as TNF-alpha, IL-1beta, CC chemokines (CCL18L, 19, 25L) and CXC chemokines (CXCL11) was revealed. In addition, it was clarified that clock gene response elements exist in the transcription regulatory regions of the said immune-related genes. Subsequently, it was revealed that the clock gene Bmal1:Clock1 heterodimer binds to the transcriptional regulatory region of TNF-alpha gene and regulates the expression. Furthermore, it was confirmed that expression of immune-related genes with circadian rhythm shown above was strongly induced by immuno-stimulation during a time zone showing the acrophase of the clock gene expression. These results suggest that circadian control exists in fish immune responses.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類 免疫 概日リズム 時計遺伝子 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無脊椎動物から脊椎動物に至るまで、生物体内には「概日リズム」を形成する機構が備わっている。一般には「体内時計」として知られており、この働きによって、体内環境を外的環境(光、気温、食事など)に同調させ、1日を約24時間周期に保っている。概日リズムを調整する体内分子は時計遺伝子と呼ばれ、リズムの調整はもとより、恒常性の維持に関わる様々な生理機構を制御することが知られている。近年の哺乳類における研究では、時計遺伝子が免疫関連遺伝子の転写調節領域に直接結合し、その発現を制御することで、免疫応答にも概日リズムをもたせていることが報告されている(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 2015)。

一方、魚類の概日リズムに関する国内外の研究は、成熟や産卵リズムなどの繁殖生理、摂餌行動や内分泌機構の制御などに関するものが多く、「魚類の免疫応答における概日リズム」に関する知見は非常に乏しい。これまで、魚類の免疫に関わる学問分野(魚病学や魚類免疫学)では、魚病対策技術の開発が試みられており、現在では、ブリ属魚類、ヒラメ、マダイ、アユなどの疾病に対するワクチンが承認され、養殖現場で使用されている。しかしながら、ワクチンや免疫賦活剤などの免疫増強剤を使用しても、その効果が十分に発揮されず、甚大な被害をもたらす魚病(細胞内寄生細菌感染症など)が未だ多数存在する。これらの免疫増強剤の使用に関しては、用法や用量に指定はあるものの、投与のタイミング(時間帯)についての指示があるものはない。

申請者は、様々な生体防御関連分子の分離・同定や、免疫細胞の機能を調べることで、魚病対策を講じるための基礎的知見の収集を行ってきた。特に、免疫応答の誘導に重要な役割を果たす「サイトカイン」に着目し、当該分子による免疫調節機構の解明に取り組んできた。近年の研究では、免疫増強剤を接種した魚体内では、免疫細胞の活性化に重要な、インターロイキン(IL)やインターフェロン(IFN)などのサイトカイン遺伝子の発現が増加することを明らかにしている(*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 151, 2013)。さらに、その発現量と免疫力の間には正の相関があることも確認され、免疫力を高めるためには、サイトカインの発現増強が必須であることが分かった(*Int. Immunopharmacol.*, 17, 2013)。本知見にもとづき、サイトカインの発現を指標として免疫増強技術の開発を試みてきたが、この過程において、これまで魚類において知られていない興味深い現象を新たに見出した。具体的には、増強剤を投与していない魚においても、一部のサイトカイン遺伝子が低レベルながら発現していること、さらにその発現量には日内変動(概日リズム様現象)があるという知見である。

2. 研究の目的

水産増養殖の現場で発生する魚病に対し、これまでワクチンや免疫賦活剤などの免疫増強剤が使用されてきた。しかしながら、その効果が十分に発揮されず、甚大な被害をもたらす魚病が未だ多数存在する。免疫増強剤の使用に関しては、用法や用量の指定はあるものの、投与タイミングについて指示があるものはない。上記のように、哺乳類の研究において、免疫増強剤を投与する時間帯の違いが、誘導する免疫力の違いを生むこと(免疫応答の概日リズム)が明らかにされている。そこで本研究では、水産分野における免疫増強剤の効果の向上を目的として、魚類における免疫応答の概日リズムを調べ、異なる時間帯での免疫刺激に対する応答を検討した。

3. 研究の方法

H29年度の研究では、(1) LD12:12 条件下で飼育したトラフグにおける、サイトカイン遺伝子ならびに時計遺伝子の発現リズムを解析し、体内時計と免疫応答の関係を探った。(2)さらに、時計遺伝子によるサイトカイン遺伝子の発現制御機構を検討した。

(1) トラフグを水温 20°Cの循環式水槽内で、照射光 3,000 ルクス・LD12:12 の明暗条件を与え、2 週間飼育した(馴致期間)。2 週間後の明期開始時点から、4 時間ごとに免疫系組織である頭腎を摘出し、当該組織における時計遺伝子 Bmal1 の発現を、定量リアルタイム PCR によって解析した。さらに、同サンプルについて、炎症性サイトカイン(IL-1beta, IL-6, TNF-alpha)、抗炎症性サイトカイン(IL-10, TGF-beta)、抗ウイルス性サイトカイン(I-IFN, II-IFN)、リンパ球増殖制御サイトカイン(IL-2, IL-7)などのサイトカイン遺伝子の発現動態を調べた。

(2) 時計遺伝子(Bmal1, Clock)が作用する転写調節領域は、時計遺伝子応答配列[E-box や RORE (10 塩基程度の特定配列)]などが知られており、本領域に時計遺伝子が結合することで、リズム的な転写が促される。トラフグのゲノムデータベースを利用し、リズムの確認されたサイトカイン遺伝子の転写調節領域における時計遺伝子応答配列の有無を確認した。

H30 年度は、まず初めに、初年度の研究でリズムの確認された TNF-alpha 遺伝子を対象に、時計遺伝子による転写調節機構をレポーターアッセイで調べた。続いて、外的環境の変化が、時計遺伝子およびサイトカイン遺伝子の発現に与える影響について検討した。初年度の実験では、LD12:12 を外的環境条件として設定したが、当該条件を LL または DD に変更した。条件変更の際には、初年度(1)と同様に 2 週間の馴致期間を設け、サンプリングについても同条件で実施した。次に、時計遺伝子ならびにリズムの確認されたサイトカイン遺伝子について、定量リアルタイム PCR を用い発現量の変動を確認した。得られた結果を初年度のデータと比較し、外的環境の変化が発現リズムにおよぼす影響を調べた。

H31 年度は、まず初めに、白血球の遊走調節に重要な役割を果たす CC および CXC ケモカイン遺伝子の発現動態を、H29 年度の研究と同条件で調べた。続いて、免疫増強剤の投与タイミングの違いが、その後の免疫増強効果に違いをもたらすかについて検討した。サイトカイン遺伝子 [TNF-alpha, CC ケモカイン(CCL13L, 14L, 17L, 18L, 19, 20, 25L)および CXC ケモカイン(CXCL11, 12, 13)]の発現量が高い時間帯、および低い時間帯を選択し、各時間帯のトラフグに免疫賦活剤を投与した。免疫賦活剤には、擬似的な細菌感染を誘導するために、細菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖(LPS)を用いた。LPS を異なる時間帯で投与したトラフグより、頭腎を経時的に摘出し、TNF-alpha、CC および CXC ケモカイン遺伝子の発現量を測定した。

4 . 研究成果

トラフグの頭腎における時計遺伝子 Bmal1 遺伝子の発現は、明期(ZT4 ; 明期開始時=ZT0)で最大となり、暗期(ZT20)において最低となる発現パターンを示した。また、その発現パターンは周期性を持つことが分かった。このことから、魚類の一次リンパ組織における概日リズムの存在が確認された。さらに、同サンプルにおけるサイトカイン遺伝子の発現パターンを解析したところ、炎症性サイトカイン TNF-alpha およびリンパ球の増殖・分化を制御する IL-2 ならびに IL-21 遺伝子について、概日リズム様の発現パターンが認められた。このことから、魚類におけるサイトカイン遺伝子の発現も、哺乳類と同様に概日リズム性の振幅を示すことが明らかとなった。リズムの確認された全てのサイトカイン遺伝子の転写調節領域を解析したところ、全ての遺伝子において E-box または RORE の存在が確認された(H29 年度)。

レポーターアッセイの結果、時計遺伝子 Bmal1 および Clock 1 を共発現させた際に、TNF-alpha 遺伝子の転写活性が増強されることを確認した。さらに、哺乳類において知られる E-box 配列 2 種(CACGTG or CATTG)が、魚類においても応答配列として働くことが確認された。これらのことから、魚類の時計遺伝子は哺乳類と同様に、免疫調節分子サイトカインのリズミックな発現調節に関与することが示唆された(H30 年度)。

明暗飼育条件を変更[明期 12 時間・暗期 12 時間 (LD12:12) → 恒明 (LL) / 恒暗 (DD)]した際の時計遺伝子およびサイトカイン遺伝子の発現リズムを解析したところ、LL または DD 条件での飼育は、LD12:12 条件と比べ、各遺伝子の発現位相に変化(位相のずれ・乱れ)をもたらすことが確認された。特に LL 条件での飼育において、この傾向は強く認められた。このことから、光条件は魚類の時計遺伝子ならびにサイトカイン遺伝子の発現に影響することが示唆された(H30 年度)。

CC ケモカイン遺伝子の発現解析の結果、CCL18L, 19 および 25L の発現に概日リズムが認められ、さらに頂点位相および最下点位相は、それぞれ ZT12 および ZT0 であった。また、CXC ケモカイン: CXCL11 および 13 は、ZT4 に頂点位相を、ZT16 に最下点位相を示す概日リズムを有することが確認された。続いて、ゲノムデータベースを利用し、リズムを有した CC および CXC ケモカインの転写調節領域に時計遺伝子応答配列が存在するかを確認した。その結果、時計遺伝子 ROR が結合する RORE 配列が、CCL18L, 19, 25L, および CXCL11 遺伝子の転写調節領域に認められた。また、時計遺伝子 Bmal1/Clock1 が結合する E-box 配列が、CCL25L および CXCL11 遺伝子の転写調節領域に認められた。このことから、CC および CXC ケモカインのいくつかは、時計遺伝子によって制御された概日リズムを有することが示唆された(H31 年度)。

TNF-alpha、CCL18L, 19, 25L および CXCL11 遺伝子の発現リズムの頂点位相および最下点位相で LPS 刺激を行ったところ、最下点位相での免疫刺激よりも、頂点位相での免疫刺激の方が、より強い応答(発現増強効果)を示すことが、全ての遺伝子において確認された。したがって、異なる時間帯における免疫刺激は、その後誘導される免疫応答に違いをもたらすことが示唆された(H31 年度)。

以上の結果より、魚類の免疫分子の発現には概日リズムが存在すること、また発現を最大限に増強できる免疫刺激のタイミングが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Teika Onoue, Goshi Nishi, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai and Tomoya Kono	4. 巻 70
2. 論文標題 Circadian oscillation of TNF-alpha gene expression regulated by clock gene, BMAL1 and CLOCK1 in the Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 362-371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2019.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoya Kono, Takanori Ida, Natsumi Kawahara, Fumiya Watanabe, Gouranga Biswas, Takahiro Sato, Kenji Mori, Mikiya Miyazato	4. 巻 73
2. 論文標題 Identification and immunoregulatory function of neuromedin U (NMU) in the Japanese pufferfish <i>Takifugu rubripes</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 246-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2017.03.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 尾上禎佳、引間順一、酒井正博、河野智哉
2. 発表標題 メダカTNF-alpha遺伝子の日内変動
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teika Onoue, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono
2. 発表標題 Circadian oscillation of bmal1 and cytokine genes in the medaka
3. 学会等名 The Japanese Society of Fisheries Science (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野智哉
2. 発表標題 ペプチド研究を水産養殖業に活かす
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Teika Onoue, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono
2. 発表標題 Diurnal variation of CC motif chemokine 13 gene regulated by clock gene in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多比良元輝、尾上禎佳、引間順一、酒井正博、河野智哉
2. 発表標題 メダカTLR9遺伝子の概日リズム発現
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----