

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18380117

研究課題名（和文）

多様化した魚類補体成分アイソタイプが構築する補体活性化ネットワークの解明

研究課題名（英文）

Elucidation of the activation network constructed by isotypic complement components diversified in the bony fish.

研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO MIKI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50212080

研究成果の概要：コイを実験魚として用い、魚類において多様化した補体成分アイソタイプの機能的多様性を解析し、補体アイソタイプ間、補体アイソタイプと異物感の反応ネットワークを解明することを目的とした。補体成分 C1 の亜成分アイソタイプをクローニングおよび精製するとともに、組換え体あるいは天然の C3、C4、C7 および MBL アイソタイプを調製し、それらの相互作用の多様性を明らかにした。特に、C3 の反応については魚類特異的アイソタイプの多機能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,200,000

研究分野：魚類免疫学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：免疫、補体、硬骨魚類、多様性、アイソタイプ、遺伝子、発現、増養殖

1. 研究開始当初の背景

補体は、感染初期の自然免疫機構として、および自然免疫（抗原非特異的）と獲得免疫（抗原特異的）の掛け橋として重要な役割を担っている。近年、申請者らの研究によって、コイやニジマスなど多くの硬骨魚類が複数コピーの補体成分遺伝子を持つことが分かってきた¹。これらの遺伝子重複によって生じた複数の補体成分アイソタイプがどのような機能分化を遂げ、その結果補体系がどのような特性を獲得しているかは、硬骨魚類における補体を中心とした自然免疫を理解する上で非常に重要な研究課題である。これまで

に申請者は、コイ補体成分のうち標的異物に結合する成分（特に C3 とマンノース結合レクチン(MBL)）の多重化が、補体による異物認識のレパートリーを拡大していることを報告して来た。しかしながら、異物認識には直接関与しない補体成分の多重化がどのような生物学的意義をもつのかは不明なままである。

2. 研究の目的

本研究は、コイの多重化した補体成分（C1、C3、C4、C5、C9、B因子、MBL、MBL関連セリンプロテアーゼ(MASP)、I因子および

その補助因子群)の間の相互作用をタンパク質レベルで網羅的に解析し、補体アイソタイプが織りなす反応ネットワークを解明することを目的とする。具体的には、3年の研究期間で、各成分のアイソタイプタンパク質を精製し、あるいは組換え体として発現させ、全成分アイソタイプ間の結合親和性(結合・解離定数)を水晶発振子マイクロバランス法によって解析し、これまで哺乳類で知られている反応経路以外の、アイソタイプ特異的補体反応経路をあぶり出し、魚類補体系におけるネットワーク的な活性化メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 補体成分の精製、組換え体発現

コイ補体成分タンパク質のうち、MBL, GalBL, MASP2, C3-H1, C3-S, C4-2, Df については、コイ血清から精製した。また、C2, C4, C5, C7, および Bf のアイソタイプについては、それらの全分子をバキュロウイルス/昆虫細胞で、あるいは一部のドメインを pCold-I, pGEX ベクターと大腸菌によって、それぞれ組換え体として発現させるとともに、ポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を作成して機能を解析した。

(2) 機能解析

①溶血反応: 溶血反応は抗体感作ヒツジ赤血球および非感作ウサギ赤血球を用いた既報の方法によって行った。

②異物への結合特異性: 特異抗体と FITC 標識二次抗体を用いて、パン酵母および各種細菌への補体成分アイソタイプの結合をフローサイトメトリーで解析した。なお、MBL, GalBL の結合特異性は、SDS-PAGE おおびウエスタンブロットングによって決定した。

(3) 遺伝子クローニングおよび構造解析

cDNA ライブラリーはコイ肝臓 mRNA から調製した。RT-PCR および RACE-PCR には、ゼブラフィッシュおよびコイの各臓器から調製した total RNA を用いた。増幅産物は pGEM-T ベクターにクローニング後、CEQ-8800 シーケンサーを使って塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) MBL アイソタイプ (MBL, GalBL) の糖鎖認識・異物認識多様性

一次構造から、MBL はマンノースや N アセチルグルコサミンを、GalBL はガラクトースを特異的に認識すると推定されていたが、分裂酵母およびそのガラクトース欠損変異体を用いた結合試験により、GalBL が確かに酵母表面糖鎖のガラクトースを認識すること

が確認された。また、各種グラム陰性・陽性細菌への結合試験により、MBL と GalBL が一部異なる種の細菌を認識することが判明した(表1)。

表1 コイ MBL, GalBL および MFAP4 レクチンの結合特異性と四次構造

		特異性	天然のリガンド	四次構造
コイ	MBL	Mannose	<i>M. lysodeikticus</i>	12~18量体
		GlcNAc	<i>A. salmonicida</i>	
	Glucose	<i>S. pombe</i> <i>zymosan</i>		
	GalBL	Galactose	<i>S. pombe</i>	12~18量体
	MFAP4	Acetyl group	いずれの異物とも結合しなかった	3量体

(2) C4 の機能的多様性

コイ C4-1 と C4-2 の γ 鎖内の NTR ドメインを組換え体として発現させ、これらに特異的なウサギ抗体を調製した。これら特異抗体を用いて、補体の溶血反応の阻害試験を行ったところ、抗 C4-2 は古典経路による感作ヒツジ赤血球の溶血反応を完全に阻害したが、抗 C4-1 は部分的には阻害しなかった。このことから、古典経路における両アイソタイプは異なる役割りを果たすことが強く示唆された。

(3) C3 アイソタイプの異物認識多様性および経路特異的活性化

コイ血清中に存在する主要な C3 アイソタイプ (C3-H1 および C3-S) のそれぞれを特異的に認識するモノクローナル抗体 (MAb) を樹立した。これらの MAb を用いたフローサイトメトリーあるいは ELISA により、各 C3 アイソタイプの異物への結合特異性の違い、および C3 を活性化する経路の違いによる活性化能の違いを精査した。

その結果、非常に驚いたことに、他の動物種にも共通して存在する、ユニバーサルなタイプの C3 アイソタイプ (C3-H1) は魚類ではあまり異物に結合できず、むしろ魚類にしか存在しないタイプ (C3-S) が主要な異物結合 C3 として機能していることが判明した(図1)。活性化経路の違いにはそれほど認められなかった。

特に、病原性の高い魚病細菌に対する結合は、ほとんど C3-S にのみ認められたことは、魚類補体系の反応機構の特異性を解明する上で非常に重要な知見である。

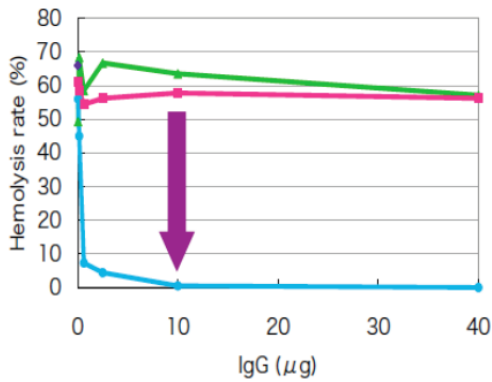


図1 抗コイ C3-S(青線)による溶血活性の阻害。抗コイ C3-H1 と対照区抗体は全く阻害効果を示さなかった。

(4) C1 亜成分のクローニングと同定
抗体依存的な高効率の補体活性化を担うと考えられる、C1 成分の全サブユニット (= 亜成分) の構成を解明した。組換え C1q 亜成分に対する特異抗体を作成し、これを用いた免疫化学的アフィニティー精製により、コイ血清から直接 C1 を単離し、その亜成分組成を二次元電気泳動とアミノ酸配列解析 (質量分析およびエンドマン分解) によって進めた (図 2)。一方、魚類では未同定であった C1s 様分子を cDNA クローニングすることにも成功した。これらタンパク質レベルおよび遺伝子レベルのデータを総合的に比較することにより、コイ C1 は、哺乳類 C1 の亜成分 C1q、C1r および C1s に相同な亜成分を全て含むことが明らかとなった。

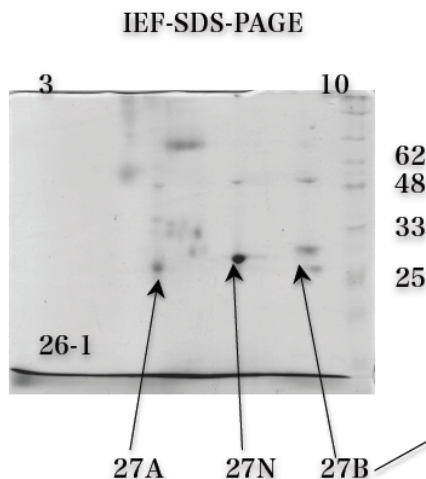


図2 二次元電気泳動によるコイ C1 構成ポリペプチドの分離。27A、27N および 27B がそれぞれ C1q-B、A、C 鎖と同定された。

(5) C7 アイソタイプの機能的多様性
これまでにニジマスとゼブラフィッシュで

のみ 2 種の C7 アイソタイプが報告されていたが、コイでも C7-1 と C7-2 という 2 種のアイソタイプが認められた。系統発生的な解析により、C7-1 と C7-2 の 2 系統は魚類全体に広がっていることが示唆された。また、両 mRNA は異なる組織分布を示すことから、機能的に多様化していることが示唆された。さらに、一般に C7 中の FIMAC ドメインが C5 と相互作用する際に重要であると考えられるが、互いに 60% のアミノ酸配列同一性しか示さないコイの C7-1 と C7-2 のこのドメインを組換え体として発現させることに成功した。また、コイ C5 の NTR ドメイン (C7 との相互作用ドメイン) の組換え体発現にも成功し、これがコイ血清による溶血反応を競合的に阻害することが確認された。

(6) 膜型補体制御因子の同定

多様なアイソタイプ組成を示すコイ補体成分 (特に C3 アイソタイプ) の活性化を制御するためには、多様な制御因子のバリエーションが必要である、という仮説のもと、ゼブラフィッシュとコイから補体制御因子をクローニングした。結果として得られた Tecrem 分子は、魚類からは初めて見つかった膜型の補体制御因子として同定された。非常に興味深いことに、多様な C3 アイソタイプを備えていることとは対照的に、硬骨魚類は哺乳類よりもむしろ少ない種類の補体制御因子しか持っていないことが、ゲノムデータのサーベイから示唆された。さらにタンパク質・細胞レベルでの補体制御活性を調べるために必要な、Tecrem 発現培養細胞 (CHO) の樹立にも成功した。

(7) 総括

コイやゼブラフィッシュなどの硬骨魚類における補体の多様性は、これまでは cDNA やゲノムレベルでの知見がほとんどであったが、本研究により、主にコイを用いてタンパク質レベルでの機能解析が進んだ。得られた知見は、予想通りに各アイソタイプが高度に多様化した機能を持っていることを示唆したが、一方で、全く予期していなかったような、魚類特異的な反応メカニズムと反応ネットワークが発見された。

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 8 件)

(1) Somamoto T, Okamoto N, Nakanishi T, Ototake M, and Nakao M, In vitro

generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*, *Virology*, in press, 2009.

- (2) Shin DH, Webb BM, Nakao M, Smith SL, Characterization of shark complement factor I gene(s): Genomic analysis of a novel shark-specific sequence, *Molecular Immunology*, doi:10.1016/j.molimm.2009.04.002,2009.05.
- (3) Nomiyama H, Hieshima K, Osada N, Kato-Unoki Y, Otsuka-Ono K, Takegawa S, Izawa T, Yoshizawa A, Kikuchi Y, Tanase S, Miura R, Kusada J, Nakao M, Yoshie O, Extensive Expansion and Diversification of the Chemokine Gene Family in Zebrafish: Identification of a Novel Chemokine Subfamily CX, *BMC Genomics*, 9: 222, 2008.
- (4) Nonaka S, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Ototake M, Nakanishi T, Nakao M, Molecular cloning of CD4 from ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Fisheries Science*,74(2): 341-346,2008.04.
- (5) Shin DH, Webb B, Nakao M, Smith SL. Molecular cloning, structural analysis and expression of complement component Bf/C2 genes in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(11):1168-82.
- (6) 中尾実樹、杣本智軌。補体活性化の系統発生、臨床免疫・アレルギー科,48(1): 80-85, 2007.07.
- (7) Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T. Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5471-9.
- (8) Somamoto T, Yoshiura Y, Sato A, Nakao M, Nakanishi T, Okamoto N, Ototake M. Expression profiles of TCRbeta and CD8alpha mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp. *Virology*. 2006 May 10;348(2):370-7.

[学会発表] (計 39 件)

- (1) Nakao M, Functional divergence and its biological significance of complement component isotypes in bony fish., Swedish-Japan STINT-meeting on

Innate Immunity, 2008.10.17.

- (2) Nakao M, Mutsuro J, Kato-Unoki Y, and Somamoto T, Structural and functional diversity of the complement components in bony fish: implication for innate immune defense., International Conference of Advanced Research on Marine Bioresources, 2008.05.08.
- (3) Nakao M, Somamoto T, Kato-Unoki Y, and Mutsuro J, The Complement System of Teleost: Isotypic Diversity of Its Components in the Structure, Expression, and Functions, World Fisheries Congress 2008, 2008.10.21.
- (4) Akahoshi S, Somamoto T, and Nakao M, Identification and Expression Analysis of Two Isotypes of Carp Complement Component C7, World Fisheries Congress 2008, 2008.10.21.
- (5) Ichiki S, Kato-Unoki Y, Somamoto T, and Nakao M, Functional Analysis of Carp Complement C3 Isotypes Using Monoclonal Antibodies, World Fisheries Congress 2008, 2008.10.21.
- (6) Tsujikura M, Somamoto T, Kato-Unoki Y, and Nakao M, Molecular identification of a novel regulator of complement activation in teleost immune system, World Fisheries Congress 2008, 2008.10.21.
- (7) Nakao M, Mutsuro J, Kato-Unoki Y, Yano T, and Dodds AW., C3 and C4 isotypes with a non-catalyzed thioester in carp fish: phylogenetic implications, *Immunochemistry in Oxford Symposium*, 2008.07.20.
- (8) 占部慎二、鮫島史朗、杣本智軌、中西照幸、中尾実樹、ギンブナ由来細胞株における4種のMHCクラスI遺伝子のクローニングおよび、CHNV感染後の発現動態,日本比較免疫学会,2008.08.25.
- (9) 辻倉正和・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実樹、コイおよびゼブラフィッシュの膜型補体制御因子,日本比較免疫学会,2008.08.25.
- (10) 一木昭土、畑中大作、杣本智軌、中尾実樹、補体レクチン経路に関与するコイ血清レクチンの多様性,日本比較免疫学会,2008.08.25.
- (11) 赤星佐和、辻倉正和、杣本智軌、中尾実樹、コイ補体成分C7アイソタイプのクローニングと発現解析,補体シンポジウム,2008.07.11.
- (12) 杣本智軌・中西照幸・乙竹 充・中尾実樹、ウイルス特異的障害活性を有するギンブナ培養リンパ球のCD8αとTCRβのmRNAの発現解析,日本水産学会,2008.03.
- (13) 辻倉正和・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実

- 樹,魚類における新規補体制御因子の同定,日本水産学会,2008.03.
- (14) Nakao M, Mutsuro J, Kato-Unoki Y, and Somamoto T, Structural and functional diversity of the complement components in bony fish: implication for innate immune defense, International Conference of Advanced Research on Marine Bioresources, 2008.05.
- (15) 岩谷健太郎・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実樹, コイ補体 B 因子アイソタイプ遺伝子の構造と発現制御, 日本水産学会, 2008.03.
- (16) 野中誠子・杣本智軌・中西照幸・乙竹充・中尾実樹, 2種類 of ギンブナ CD4 様分子, 日本水産学会九州支部会, 2008.01.
- (17) Nevien K, Abdelkhalek, Komiya A, Kato-Unoki Y, Somamoto T, Nakao M, Identification and expression analysis of a novel interleukine 8 (IL-8)-like CXC chemokine in carp (Cyprinus carpio), 日本魚病学会, 2007.09.
- (18) Ichiki S, Kato-Unoki Y, Somamoto T, and Nakao M, Functional analysis of carp C3 isotypes using monoclonal antibodies, Japan-Germany International Cooperative Project on Education and Research, 2007.09.
- (19) Nakao M, Antibacterial substances from bony fish: structure, function, and application, Philippines Society of Microbiology, 2007.10.
- (20) 市居 敬, 杣本智軌, 鶴木(加藤)陽子, 中尾実樹, コイ補体成分 C1 タンパク質の同定, 補体シンポジウム, 2007.08.
- (21) 一木智子, 鶴木(加藤)陽子, 杣本智軌, 中尾実樹, モノクローナル抗体を用いたコイ C3 アイソタイプの機能解析, 補体シンポジウム, 2007.08.
- (22) 辻倉正和, 杣本智軌, 鶴木(加藤)陽子, 中尾実樹, 魚類における新規補体制御因子の同定, 補体シンポジウム, 2007.08.
- (23) 鮫島史朗, 鶴木陽子, 杣本智軌, 中尾実樹, ギンブナ頭腎、体腎、脾臓の Expressed Sequence Tag 解析, 日本比較免疫学会, 2007.08.
- (24) 杣本智軌, 占部慎二, 鮫島史朗, 中西照幸, 中尾実樹 1, クローンギンブナ由来細胞株における MHC クラス I による抗原提示機構関連遺伝子のクローニング, 日本比較免疫学会, 2007.08.
- (25) 大蔵千恵, 杣本智軌, 近藤昌和, 中尾実樹, コイの個体発生における補体成分アイソタイプの発現解析, 日本比較免疫学会, 2007.08.
- (26) 新原美樹, 杣本智軌, Vo Kha Tam, 加藤陽子, 中尾実樹, ゼブラフィッシュ補体成分の遺伝子の同定と発現解析, 日本水産学会大会, 2007.03.
- (27) 中尾実樹, 加藤陽子, 市居 敬, 杣本智軌, コイ補体成分 C4, C5 の組換え体の発現と機能解析, 日本水産学会大会, 2007.03.
- (28) 大蔵千恵, 新原美樹, 杣本智軌, 中尾実樹, 近藤昌和, 発現パターンから見た魚類補体の生体防御機能の推定, 南中九州・西四国水族防疫会議, 2007.02.
- (29) 吉田大志, 杣本智軌, 加藤陽子, 中尾実樹, コイの新奇補体制御因子の cDNA クローニング, 日本比較免疫学会学術集会, 2006.08.
- (30) 辻倉正和・杣本智軌・加藤陽子・中尾実樹, ゼブラフィッシュ新奇補体制御因子の cDNA クローニング, 日本魚病学会, 2006.09.
- (31) Nakao M, Yoshida T, Jose P. Peralta and Aklani Rose D. Hidalgo, Molecular cloning of C3d, a fragment from complement component C3 with possible adjuvant activity, from marine cultured fish, International Forum on the Coastal Environment and Utilization of Fisheries Resources, 2006.09.
- (32) Kato-Unoki Y, Komiya A, Sameshima S, Nakao M, EST Analysis of mRNAs Expressed in Gill and Intestine of Carp (Cyprinus carpio. L), Asia-Pacific Aquatic Genomics Symposium 2006, 2006.11.
- (33) Shinbara M, Vo Kha Tam, Kato-Unoki Y, Somamoto T, and Nakao M, Identification of the genes encoding complement components from the zebrafish genome database, Asia-Pacific Aquatic Genomics Symposium 2006, 2006.11.
- (34) Somamoto T, Nonaka S, Kato-Unoki Y, Ototake M, Nakanishi T and Nakao M, Molecular cloning and characterization of CD4 in ginbuna crucian carp, 10th Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2006.07.
- (35) Somamoto T, Vo Kha Tam, Kato-Unoki Y and Nakao M, Molecular cloning and characterization of the complement C1q A, B, and C chains in common carp, 10th Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2006.07.
- (36) Nakao M, JADCI: Evolving through annual meetings, 10th Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2006.07.
- (37) Nakao M, The complement system in invertebrates and lower vertebrates, 10th Congress of International Society

for Developmental and Comparative Immunology,2006.07.

- (38) Okura C, Iwatani K, Shibata D, Kato-Unoki Y, Somamoto T and Nakao M, Diversification of complement component isotypes in the common carp: Expression and some functional aspects, 10th Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2006.07.
- (39) 柚本智軌、Vo Kha Tam、加藤陽子、中尾実樹,コイ補体 C1q A,B,C 鎖の cDNA のクローニング,補体シンポジウム,2006.08.

[図書] (計1件)

Nakao M, Kato-Unoki Y, Nakahara M, Mutsuro J, Somamoto T. Diversified components of the bony fish complement system: more genes for robust innate defense? Adv Exp Med Biol. 2006;586:121-38.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO MIKI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：50212080

(2) 研究分担者

柚本 智軌 (SOMAMOTO TOMONORI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40403993

鵜木 陽子 (KATO-UNOKI YOKO)
九州大学・農学部・技術専門職員
研究者番号：10380560