

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03958

研究課題名(和文)軟骨魚類の自然抗体を応用した魚類感染症の新規防除法の開発

研究課題名(英文)Application of natural antibodies from cartilaginous fish

研究代表者

近藤 秀裕 (Kondo, Hidehiro)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：20314635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨魚類は血中に高濃度に抗体分子を持ち、その抗体は様々な物質に対して非特異的に結合することが報告されている。これらの抗体が病原微生物に結合することができるのであれば、感染症の予防を含めた様々な応用が期待できる。そこで本研究は軟骨魚類の抗体の病原微生物に対する結合能について解析するとともに、他の魚類のものと比較した。日本近海に生息するドチザメを対象に血清から抗体分子を精製し性状を解析したところ、本抗体は養殖現場で問題となる種々の細菌感染症原因菌に対して結合した。しかしながら、菌の働きを抑えるには至らなかった。同様の結合能は、硬骨魚類の中でも軟骨魚類に近いチョウザメにおいても確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の獲得免疫において中心的に働く抗体は、軟骨魚類の祖先が無顎類から分岐した後に獲得したと考えられていることから、最も原始的な獲得免疫系を持つ動物である。軟骨魚類の抗体は非特異的に様々な物質に結合可能であることや、同様の性質がチョウザメの抗体にも見られることなど、原始的な抗体のもつ性状が本研究により明らかとなったことは魚類獲得免疫の進化を考える上で重要な知見である。さらに、魚類の獲得免疫は養殖において疾病防除に役立つと考えられ、本研究で得られた知見を硬骨魚類にも押し広めることにより新たな感染症予防法の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Cartilaginous fish have high concentrations of antibody in the blood, and the antibody have been reported to bind to a variety of substances nonspecifically. If these antibodies can bind to pathogenic microorganisms, they could have a variety of applications, including the prevention of infectious diseases. In this study, we analyzed the binding activities of cartilaginous fish antibodies to pathogenic bacteria and compared them with those of other fishes. The antibody was purified from the serum of banded houndshark, which inhabit the seas around Japan. Although the antibody bound to the bacteria isolated from diseased fish in Japanese aquaculture, it did not coagulate them and did not suppress the proliferation. The same binding ability was also observed in sturgeon, which is a cartilaginous fish among hard-bodied fish.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：魚介類免疫 抗体 バイオテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体は獲得免疫において中心的に働く分子のひとつである。抗体遺伝子は脊椎動物の祖先が無顎類から分岐した後、軟骨魚類を含む魚類の祖先から出現したと考えられる。脊椎動物では、外部から侵入した異物を認識し排除するため、遺伝子組み換えにより特異的な抗体が産生される。脊椎動物の血中には常に一定濃度の抗体が存在しており、このような抗体は自然抗体と呼ばれる。例えば、ヒトの血液型は赤血球膜上に存在する糖鎖の型により決定するが、自然抗体は自身と異なる血液型の血球を凝集させる作用をもつ。このような自然抗体は生来的に備わったものではなく、成長に伴いバリエーションを増していくものと考えられている。ほ乳類では免疫グロブリン M (IgM) が主要な自然抗体である。

魚類の主要な血中抗体分子は IgM である。硬骨魚類は血漿中に数～数十 mg/mL の自然抗体をもつ。魚類血中の自然抗体量は水温や個体の栄養状態に影響を受け、自然免疫において何らかの働きがあると考えられる。これらの自然抗体はパンデミックを引き起こすような病原微生物と特異的に結合することはないため、特定の感染症に対する抵抗性を高めるためには、ワクチンなどを用いて免疫することにより特異抗体価を高める必要がある。

一方、軟骨魚類は血漿タンパク質の 50% 近くが自然抗体であり、これらは様々な分子を認識することが示されている。申請者らはドチザメの自然抗体が種々の魚類病原微生物を凝集させることを確認している。近年のゲノム解析により、軟骨魚類は抗体産生細胞への抗原提示を司る CD4 T 細胞の機能に関わる遺伝子群を欠いていることが明らかとなった。このことは、軟骨魚類が抗原特異的な抗体を産生する能力がない、もしくは低いことを示唆している。これまでに軟骨魚類を免疫して特異抗体価を測定してきた研究はいくつか報告されているが、いずれも免疫には数ヶ月の時間を要することを報告している。

病原微生物特異的な抗体は、生化学的な研究を始め病原微生物の検出や感染症防除に利用されている。しかしながら、特異的な抗体を調製するためには動物を免疫する必要があり、免疫期間中の動物の飼育に時間とコストがかかる。近年、分子生物学的な手法を応用することにより、抗原特異的に結合する抗体遺伝子を人工的に調製する手法が開発されているが、より効率的に抗原特異的な配列を同定するためには、免疫動物由来の抗体遺伝子をライブラリー作製に用いることが必要となる。

2. 研究の目的

本研究は、軟骨魚類の自然抗体そのものを魚類感染症の防除に応用することを目的として、その病原微生物に対する性状を解析するとともに、受動免疫に応用可能かを明らかとする。さらに、多様な病原微生物を認識可能な自然抗体を硬骨魚類にも産生させるため、軟骨魚類が上述のように特徴的な自然抗体を産生する機構を解析し種々の魚類のものと比較することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟骨魚類抗体の性状解析

軟骨魚類抗体の性状を解析する目的でドチザメ *Triakis scyllium* を対象に研究を行った。ドチザメ血清抗体の性状を解析するため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った。また、電気泳動的に分画したドチザメ IgM を用いてウサギを免疫し、ドチザメ抗体に対する抗血清を調製した。さらに、ドチザメ抗体の種々病原微生物に対する結合能を ELISA および凝集試験で解析した。また、ドチザメ抗体産生臓器において発現する遺伝子を網羅的に解析するため、種々臓器を対象にトランスクリプトーム解析を行った。

(2) チョウザメ抗体の性状解析

硬骨魚の中でも軟骨魚類に近いベステルチョウザメ *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* を対象に抗体の性状を解析した。ベステルチョウザメ血清より Protein A カラムを用いて IgM を精製し、本 IgM を用いてウサギ抗血清を調製した。得られた抗血清を用い、チョウザメ抗体の種々病原微生物に対する結合能を ELISA および凝集試験で解析した。また、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子断片を用いてファージディスプレイライブラリーを構築し、抗原特異的な配列の単離を試みた。

(3) 硬骨魚類の抗体産生機構の解析

軟骨魚類の抗体産生について硬骨魚類のものと比較することを目的として、硬骨魚における自然抗体および特異抗体の産生に関わる分子機構の解明を目的として、様々な硬骨魚類を対象に実験を行った。

4. 研究成果

(1) 軟骨魚類抗体の性状解析

ゲル濾過クロマトグラフィーによりドチザメ血清を分画したところ、IgM と考えられる分子は 1,000kDa 以上の成分および 250kDa 成分が含まれる画分に存在した (図 1)。

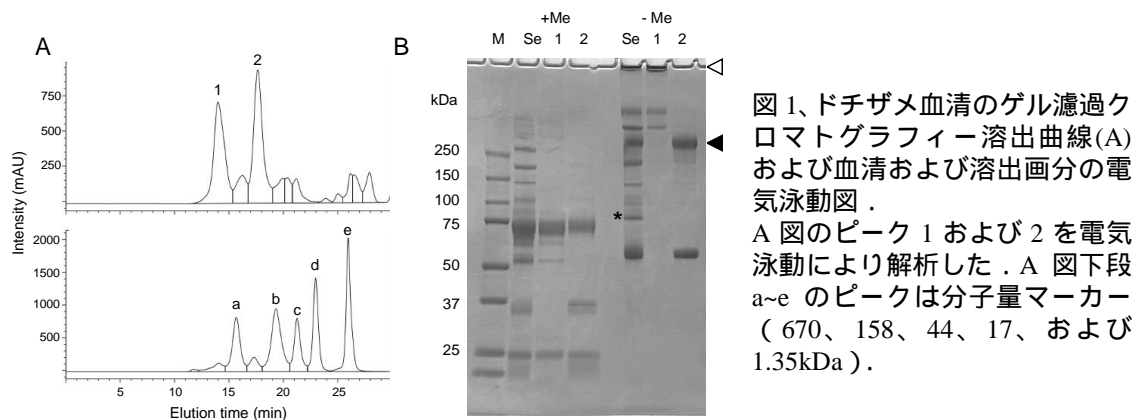


図 1、ドチザメ血清のゲル濾過クロマトグラフィー溶出曲線(A)および血清および溶出画分の電気泳動図。A 図のピーク 1 および 2 を電気泳動により解析した。A 図下段 a~e のピークは分子量マーカー (670、158、44、17、および 1.35kDa)。

電気泳動で分離した各 IgM に対して特異的な抗血清の調製を試みたが、1,000kDa 以上の成分と 250kDa 成分を区別することはできなかつたため、これらは共通する重鎖および軽鎖をもつ 5 量体および単量体であると考えられた。また、ドチザメ血清を用い IgM の種々の病原細菌に対する結合能を解析したところ、免疫をしていないドチザメ由来の IgM であっても病原微生物に結合することが示された。このような結合能は個体差が大きいものの、個体を採取した地域によって変化することが示唆された。マンノースおよびガラクトースカラムを用いたアフィニティー精製により IgM がこれら糖鎖を認識することが示されたことから、このようなドチザメ IgM の病原微生物に対する結合には糖鎖への結合が関与することが考えられた。一方、ドチザメ血清はこれらの病原微生物に対して凝集活性を示さないことから、本 IgM の病原微生物に対する結合能は小さいことが考えられた。

さらに、トランスクリプトーム解析の結果、ドチザメは脾臓およびエピゴナル器官で抗体を強く産生していることが示された。また、ドチザメ IgM 遺伝子の発現は肝臓においても強く観察された。肝臓では、肝臓特異的に発現する抗体重鎖様遺伝子が見いだされた。本遺伝子は 4 つの免疫グロブリンドメインをコードしているものの、多様性決定領域が一つのエキソンのみにコードされ、遺伝子組換えに関わる VDJ 遺伝子を欠いていた。また、ドチザメ肝臓は C 型リゾチーム遺伝子の発現が顕著に見られ、本タンパク質は血中で活性を持つことも明らかとなった。

(2) チョウザメ抗体の性状解析

バステルチョウザメの血清についてもゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分画したところ、ドチザメの場合と同様に分子量の異なる 2 種類の IgM が存在することが示された。チョウザメについても IgM に対する抗血清を調製し、種々病原細菌に加えてスカシガイヘモシアニンやニワトリ卵白リゾチームに対する IgM の結合を調べたところ、いずれに対しても IgM が結合することが示された (図 2)。

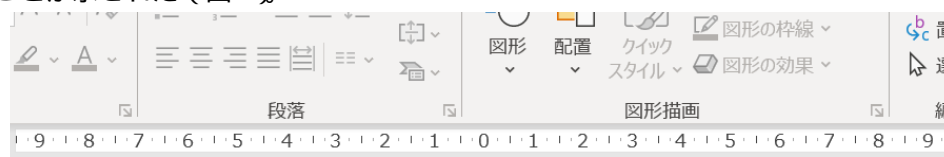


図 2、チョウザメ血清の各抗原に対する結合能
チョウザメ血清を表記の倍率に希釈した後、ELISA 法により各抗原に対する結合能を測定した。KLH, スカシガイヘモシアニン; HEL, ニワトリ卵白リゾチーム

チョウザメ血清について、上記の病原微生物あるいはタンパク質成分を用いたアフィニティー精製に供したところ IgM が精製され、精製された IgM は対応する抗原を特異的に認識していることが示された。そこで、チョウザメ IgM 軽鎖および重鎖遺伝子配列を解析し、それぞれの多様性決定領域を PCR で増幅した後、ファージディスプレイライブラリーを構築し、パニング法を用いて抗原特異的な抗体遺伝子配列の探索を試みたが、抗原に特異的に結合する抗体遺伝子の単離には至らなかつた。

(3) 硬骨魚類の抗体産生機構の解析

硬骨魚類においてサイトカインが抗体産生に及ぼす影響を調べるためヒラメ *Paralichthys olivaceus* を対象に研究を行った。種々の病原微生物分子パターン (PAMPs) としてペプチドグリカンおよび polyIC を用い、組換えタンパク質抗原と PAMPs を組み合わせて投与した場合の抗体価の変化を解析した。組換えタンパク質抗原に対する抗体価は、本タンパク質のみを投与した場合と比べてペプチドグリカンを混合投与した場合に高くなり、polyIC を混合投与した場合に低くなった。polyIC を投与した区でのみ I 型インターフェロン遺伝子の遺伝子発現が見られたことから、本サイトカインが抗原特異的な抗体の産生に抑制的に働くことが考えられた。

また、硬骨魚類における特異抗体産生の高感度検出法の開発を目指し、マダイイリドウイルスワクチンで免疫したマダイ *Pagrus major* におけるウイルスタンパク質特異的な抗体の検出を試みた。抗原候補となる大腸菌組換えタンパク質に対する抗体価の変化を ELISA 法により解析したところ、ワクチン液を用いた場合よりも高感度に特異抗体を検出することができた。さらに、組換えタンパク質を用いて魚を免疫した場合、未精製の組換えタンパク質では特異抗体を強く誘導することができなかったことから、魚類では免疫抗原の種類のみならず純度も特異抗体の産生に影響を及ぼすことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kondo Hidehiro, Murotani Fuyuka, Koiwai Keiichiro, Hirono Ikuo	4. 巻 134
2. 論文標題 Chicken-type lysozyme is a major bacteriolytic enzyme in the blood of the banded houndshark <i>Triakis scyllium</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 104448 ~ 104448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2022.104448	査読の有無 無
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 Kondo Hidehiro, Kikumoto Tatsuharu, Yoshii Keisuke, Murase Naoya, Yamada Hidetoshi, Fukuda Yutaka, Hirono Ikuo	4. 巻 56
2. 論文標題 Effects of Peptidoglycan and Polyinosinic: Polycytidylic Acid on the Recombinant Subunit Vaccine Efficacy Against <i>Edwardsiella tarda</i> in Japanese Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 149 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.56.149	査読の有無 無
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 Yasumoto Kyutaro, Koiwai Keiichiro, Hiraoka Kiyoshi, Hirono Ikuo, Kondo Hidehiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Characterization of natural antigen-specific antibodies from naïve sturgeon serum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103770 ~ 103770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2020.103770	査読の有無 無
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 Hanyu Yoshiro, Kato Mieko	4. 巻 25
2. 論文標題 Screening Antibody Libraries with Colony Assay Using scFv-Alkaline Phosphatase Fusion Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2905 ~ 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25122905	査読の有無 無
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 Hanyu Yoshiro, Komeiji Yuto, Kato Mieko	4. 巻 24
2. 論文標題 Potentiating Antigen-Specific Antibody Production with Peptides Obtained from In Silico Screening for High-Affinity against MHC-II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2949 ~ 2949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24162949	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 Kondo Hidehiro, Chung Seangmin, Hirose Eriko, Hirono Ikuo	4. 巻 84
2. 論文標題 Adjuvant effects on protection and immune response of Japanese flounder immunized by the formalin-killed cells of <i>Edwardsiella tarda</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2018.09.071	査読の有無 無
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 Jirapongpaiboj Walissara, Hirono Ikuo, Kondo Hidehiro	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification and expression analysis of Fc receptor-like proteins in Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2019.01.002	査読の有無 無
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 Kato Mieko, Hanyu Yoshiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Single-step colony assay with autoinduction of scFv expression for the screening of antibody libraries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 194 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2018-0195	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 近藤秀裕・Walissara Jirapongpaibroj・野崎玲子・廣野育生（海洋大）
2. 発表標題 複数魚種由来のIgMを認識する人工抗体の作出
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 室谷冬香・矢澤良輔・廣野育生・近藤秀裕（海洋大）
2. 発表標題 ドチザメ <i>Triakis scyllium</i> リゾチームの性状解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊本辰善（海洋大）・吉井啓亮・村瀬直哉・山田英俊・福田穰（大分水研）・野崎玲子・廣野育生・近藤秀裕（海洋大）
2. 発表標題 ヒラメエドワジエラ症に対するペプチドグリカンおよびpolyICのアジュバント効果の検討
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤哲平・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 コイの高温飼育が抗体産生に及ぼす影響
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田邊勇樹・川戸智・野崎玲子・白樫正・近藤秀裕・廣野育生
2. 発表標題 Neobenedenia girellaeに対するワクチン抗原遺伝子探索のための発達段階別トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊本辰善・野崎玲子・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 Edwardsiella tarda DNAのアジュバント効果の検討
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤村拓実・室谷冬香・野崎玲子・矢澤良輔・長沢貴宏・杣本智軌・中尾実樹・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 軟骨魚類自然抗体の抗原結合能に及ぼす生息地域の影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室谷冬香・矢澤良輔・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 ドチザメIg産生器官における網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣澤英里子・小祝敬一郎・野崎玲子・廣野育生・近藤秀裕
2. 発表標題 Edwardsiella tarda 由来 DNA で刺激した H1NAE 細胞における網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 平成30年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 秀裕・安本 玖太郎・小祝 敬一郎・平岡 潔・廣野 育生
2. 発表標題 チョウザメ由来ナイーブ抗体の応用に向けた抗体遺伝子の配列解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Walissara Jirapongpaibroj, Ikuo Hirono, Hidehiro Kondo
2. 発表標題 BINDING OF FC RECEPTOR-LIKE PROTEINS TO IGM AND BACTERIA IN JAPANESE FLOUNDER (PARALICHTHYS OLIVACEUS)
3. 学会等名 International Society for Developmental and Comparative Immunity 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyutaro Yasumoto, Keiichiro Koiwai, Kiyoshi Hiraoka, Ikuo Hirono, Hidehiro kondo
2. 発表標題 Purification and characterization of antigen-specific antibodies from naive sturgeon serum
3. 学会等名 International Society for Developmental and Comparative Immunity 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eriko Hirose, Hidemasa Kawakami, Ikuo Hirono, Hidehiro Kondo
2. 発表標題 Interferon gamma expression responses by PAPMs and Freund's complete adjuvant injection in Japanese flounder
3. 学会等名 International Society for Developmental and Comparative Immunity 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安本 玖太郎・小祝 敬一郎・千葉 隆史・鈴木 宏明・平岡 潔・廣野 育生・近藤 秀裕
2. 発表標題 非免疫チヨウザメ末梢白血球からの抗原特異 B 細胞の単離
3. 学会等名 第20回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	廣野 育生 (Hirono Ikuo) (00270926)	東京海洋大学・学術研究院・教授 (12614)	
研究 分担者	羽生 義郎 (Hanyu Yoshiro) (20357792)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究 分担者	筒井 繁行 (Tsutsui Shigeyuki) (20406911)	北里大学・海洋生命科学部・准教授 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	矢澤 良輔 (Yazawa Ryosuke) (70625863)	東京海洋大学・学術研究院・准教授 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関