

平成 2 2 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580220

研究課題名（和文）

CD4ファミリーマーカー解析による魚類Tリンパ球亜集団の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of fish T lymphocyte subgroup based on the CD4 family marker

研究代表者

J・M ダイクストラ（J・M DIJKSTRA）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10387681

研究成果の概要（和文）：

CD4関連遺伝子と考えられるG6F-like分子について詳細な解析を行なった。その遺伝子が存在するゲノム領域は原始的MHC領域に相当し、哺乳類G6F遺伝子の場合と同様である。G6F-like分子は、CD4/LAG-3分子群、及びヒトのトロンボサイトのマーカーであるG6F分子と配列の共通性を有している。さらに有するモチーフ、トロンボサイト及び血小板での発現の共通性に基づき魚類G6F-likeは四足類G6Fの相同分子の可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The main project target was to elucidate the CD4 family of molecules in teleost fish, with clonal ginbuna crucian carp as major fish model. This family of molecules is known to form major markers for leukocyte subpopulations, predominantly of T lymphocytes. We found a homologue of mammalian G6F, a marker of platelets, which we designated G6F-like. We could determine that G6F and G6F-like are related to the CD4 family. A monoclonal antibody against G6F-like was established and we found the molecule expressed in ginbuna thrombocytes and erythrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,450,000

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、免疫学的予防、CD4、Tリンパ球、細胞表面マーカー、

1. 研究開始当初の背景

CD4 やLAG-3などの哺乳動物CD4ファミリーメンバーは、最も重要なTリンパ球表面マーカーである。本プロジェクトでは、ギンブナのCD4ファミリーメンバー関連遺伝子について、研究を行なう。クローン系統が得られるギンブナは、魚類の細胞機能を研究する際の主要なモデル種である。本研究では、CD4関連遺伝子のリコンビナントタンパク質を発現させ、それらのレセプターと予想されるMHCクラスII分子や、T細胞活性化のために結合するLck等との相互作用を解析する。さらにCD4関連分子特異的な抗体を確立する。魚類リンパ球機能の理解の進展は、有効な魚類ワクチンの開発に寄与し、人間の医学に対するモデルシステムとしての魚類の利用に貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ギンブナにおけるCD4関連遺伝子を研究する。我々は既にCD4関連遺伝子を見い出しており、これについて、詳細な解析を行なう。

(2) CD4関連遺伝子産物に対する抗体を作製する。この特異抗体を用いて、CD4関連分子が発現する細胞を特定する。

(3) CD4関連ペプチドとLCKとの反応を詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) CD4関連遺伝子のcDNAを詳細に解析する。

(2) CD4関連遺伝子産物に対して抗体を作製し、遺伝子産物が発現している細胞を特定する。

(3) CD4関連ペプチドとLCKとの反応をSPR (surface plasmon resonance) を用いて調べる。

4. 研究成果

研究の主な成果：

(1) ギンブナにおいてCD4-1、CD4-2、LAG-3に関して、それぞれ複数の配列を明らかにした。これらの遺伝子は、他の魚種で既に報告がある。クローンギンブナで複数の配列がある理由は、コイのグループで

1200万年前に全ゲノムの増幅が起こったことによる。クローンギンブナは、3種の関連種のハプロイドゲノムから生じたアロトリプロイドである。

また、これらに対する抗体も作製した。CD4-1及びCD4-2に関する論文をまとめ中である。

(2) CD4関連遺伝子と考えられる哺乳類のG6Fのホモログ、G6F-likeについて詳細な解析を行なった。存在する遺伝子領域はG6Fと類似している。G6F-likeはITAMモチーフを有しているが、G6Fでは見いだされない。G6F、G6F-likeに別の共通したモチーフが観察される。両者ともBLASTサーチでCD4関連分子がトップに出てくる。

(3) G6F-like分子に対する抗体を作製した。作製した抗体は特異的にG6F-like分子に反応する事が確認された。

(4) G6F-likeはthrombocytesとerythrocytesで特異的に発現している事が明らかとなった。ギンブナ及び金魚では両方で発現している事が確認されたが、ニジマスでは、thrombocytesのみで発現が確認された。

(5) CD8ペプチドとLCKとの反応を調べた。ニジマスのCD8由来のペプチドとLCK由来のペプチドを合成し、それらの相互作用をSPR (surface plasmon resonance) で測定し解析した。その結果、これらの分子は亜鉛依存的に結合することが明らかとなった。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望等：

詳細な魚類CD4ファミリーマーカー解析を行なった結果CD4/LAG-3分子と関係のある分子として見い出した哺乳類G6F類似分子である魚類特異的分子G6F-likeについて、世界で初めて重要な知見が得られた。この分子はその細胞質ドメイン領域に、他の重要な免疫学的機能を有する分子に限定して良く見い出されユニークなモチーフとして知られるITAM (immuno-receptor tyrosine-based motif) を有していることが判明し、この事はG6F/G6F-like分子群が免疫システムの進化と密接な関係を持つ事を示唆している。ギンブナG6F-like分子に対して作成した特異

的なモノクローナル抗体を用いて、この分子が魚類トロンボサイトや赤血球の細胞表面に発現している事を明らかにした。トロンボサイトと赤血球両者におけるG6F-likeの発現は、これらの細胞がおそらく止血作用において共通した機能を有する事を示唆しており、また血液細胞生成過程においてこれらの細胞の類縁関係を示唆していると考えられる。詳細なゲノム解析を行なった結果、CD4/LAG-3/G6F/G6F-like遺伝子群は、真骨類魚類のゲノムにおいて、本研究がその解析に重要な寄与をしていると考えられる原始的なMHC(主要組織適合遺伝子複合体)ゲノム領域に似た領域に存在しているを明らかにした。現在、G6F-like分子とCD4/LAG-3/G6F/G6F-like分子群の進化に関する論文を投稿中である。

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5件)

1 Ohashi K, Takizawa F, Tokumaru N, Nakayasu C, Toda H, Fischer U, Morimoto T, Hashimoto K, Nakanishi T, Dijkstra JM. A molecule in teleost fish, related with human MHC-encoded G6F, has a cytoplasmic tail with ITAM and marks the surface of thrombocytes and in some fishes also of erythrocytes. Immunogenetics in press. 査読有り

2 Hayashi N, Takeuchi M, Nakanishi T, Hashimoto K, Dijkstra JM. Zinc-dependent binding between peptides derived from rainbow trout CD8a and LCK. Fish Shellfish Immunology 28, 72-76 (2010) 査読有り

3 Moore LJ, Dijkstra JM, Koppang EO, Hordvik I. CD4 homologues in Atlantic salmon. Fish Shellfish Immunol. 26, 10-18 (2009) 査読有り

4 Ohtani M, Hayashi N, Hashimoto K, Nakanishi T, Dijkstra JM. Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. Immunogenetics 60, 383-397 (2008) 査読有り

5 Suetake H, Araki K, Akatsu K, Somamoto T, Dijkstra JM, Yoshiura Y, Kikuchi K,

Suzuki Y. Fish Shellfish Immunol. 23, 1107-1118 (2007) 査読有り

[学会発表](計4件)

1 Dijkstra JM, Hashimoto K. Molecular characteristics of the leukocyte markers CD4-1, CD4-2, LAG-3, CD8alpha and CD8beta in teleost fish. 日本比較免疫学会 藤沢 2009年8月4日

2 Dijkstra JM. Evolution of genes related to CD4. 11 International Congress International Society of Developmental and Comparative Immunology. Prague, Czech Republic, June 28-July 4 (2009)

3 Dijkstra JM, Ohtani M, Hayashi N, Nakanishi T, Hashimoto K. Evolution of cytokines important for T helper cell differentiation. 第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月

4 Dijkstra JM, Hashimoto K. Unique features of major histocompatibility complex (MHC) genes in fish. 第30回日本分子生物学会年会、横浜、2007年12月11日

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

J・M ダイクストラ (J・M
DIJKSTRA)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助
教

研究者番号：10387681

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

林 宣宏 (HAYASHI NOBUHIRO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
分子生命科学専攻・准教授

研究者番号：80267955

中西照幸 (NAKANISHI TERUYUKI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00322496

橋本敬一郎 (HASHIMOTO KEIICHIRO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教
授

研究者番号：70192268