

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780158

研究課題名（和文） SEREX 法を用いた魚類食細胞マーカー膜タンパク質の探索

研究課題名（英文） Serological cloning of membrane protein of fish-phagocyte by recombinant expression cloning method.

研究代表者 松山 知正 (Matsuyama Tomomasa)

水産総合研究センター・養殖研究所・病害防除部・健康管理研究グループ・主任研究員

研究者番号：20372021

研究成果の概要：

ヒラメの食細胞 mRNA を基に作製した哺乳類細胞発現ライブラリーを、食細胞に対する抗血清でスクリーニングし、膜タンパク質遺伝子を含むクローンを選択的に分離した。本手法で得られたクローンの 60.4% が膜タンパクをコードしていた。抗体スクリーニング前のライブラリーでは、膜タンパクをコードする割合は 20% 程度であり、本手法により効率的に膜タンパク遺伝子を単離できた。発現解析により幾つかの遺伝子は食細胞に特異的に発現することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,000,000	0	1,000,000
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	480,000	3,080,000

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：生理

1. 研究開始当初の背景

安全な養殖生産には魚の健康管理が欠かせないが、健康管理の基礎となる魚類の生体防御機構に関する研究は遅れており、健康度を判断する指標が無い。生体防御の主体となる白血球は、魚の生理状態に応じて血中組成が変動するため、健康度の判断基準になると考えられている。特にリンパ球を中心とした特異免疫

系の未発達な魚類では、食細胞を中心とした非特異的生体防御機構の相対的な重要性が高く、食細胞は病原体の感染に鋭敏に反応する。そのため、食細胞の動態は養殖魚の健康度を判断する指標として有望である。しかしながら魚類においては、食細胞の動態・機能解析に必要な食細胞マーカータンパクは同定されておらず、マーカータンパクの同定が求められている。

膜タンパク質は、一般的に細胞膜を貫通し

て細胞の内外をつないでおり、細胞外からの刺激を細胞内に情報伝達し、刺激に対する細胞の応答を調整する重要なタンパク質である。細胞の機能と、その細胞が発現している膜タンパク質には密接な関係がある。

魚類の食細胞は顆粒球とマクロファージから構成されている。顆粒球は病原体などの異物に対して最初に応答する細胞で、高い貪食活性と殺菌分解能を有する。マクロファージは顆粒球より殺菌活性は低いと考えられているが、貪食した異物の抗原をリンパ球に提示することで特異免疫系を刺激する。

細胞の機能解析には、目的とする細胞を純粋に分離する必要がある。細胞表面に発現した膜タンパク質を認識するモノクローナル抗体は、細胞分離のための強力なツールである。残念ながら魚類の顆粒球あるいはマクロファージを特異的に認識するモノクローナル抗体は殆ど作製されていない。そのため、魚類の食細胞機能に関する研究の多くは、顆粒球とマクロファージが混在した細胞群を対象に行われているのが現状である。魚類では両細胞を純粋に分離することが困難なため、顆粒球とマクロファージの機能的な違いや、両細胞の役割分担に関してはあまり研究が進んでいない。

医学の分野では、白血球細胞集団を識別するマーカーとして、細胞表面に発現した膜タンパク質が利用されている。魚類でもリンパ球マーカー遺伝子は比較的多く同定されており、B 細胞マーカーとして CD20 が、T 細胞マーカーとして TCR, CD3, CD8 が報告されている(Nam et al., 2003; Byon et al., 2005; Park et al., 2005)。リンパ球に関してはこれらマーカー分子を指標に、発現解析や細胞動態解析が行われている。また、マーカー遺伝子情報を基にリンパ球を特異的に認識するモノクローナル抗体が作製されつつある(Jansson et al., 2003)。しかしながら、魚類食細胞の特異マーカーとなる分子については全く

報告例が無く、遺伝子情報から抗体を作製することは出来ない。しかも、魚類食細胞が発現している細胞膜タンパク質に関する遺伝子情報は限られている。そこで、まず食細胞膜タンパク質の遺伝子情報を多数獲得し、その中から食細胞に特異的なマーカー遺伝子を探索することが必要と考える。

申請者の所属する研究室では、DNA チップを用いて、ヒラメ白血球における遺伝子発現を網羅的に解析している(Matsuyama *et al.*, 2006)。我々は DNA チップを作成する過程で、サブトラクション法および EST 解析により、白血球が発現している約 1200 の遺伝子情報を取得した。作製した cDNA ライブラリーには膜タンパク質をコードする 39 の遺伝子が含まれており、その内 30 クローンは免疫応答に関連する遺伝子であった(藤原ら、平成 17 年度日本魚病学会講演要旨集)。しかし、これまでに行ってきた cDNA ライブラリーを無作為にシーケンスする方法では、膜タンパク質遺伝子が得られる確率はシーケンスを行った全クローンの 3.3%に過ぎず、膜タンパク質情報を得るには効率が悪い。

医学の分野、特に癌研究では、癌患者血清中の抗腫瘍抗体を用いて腫瘍組織由来の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングすることにより、腫瘍抗原を同定するという SEREX 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) が確立された(Sahin *et al.*, 1995)、約 1700 もの癌抗原遺伝子が効率的に同定されている。そこで本研究では SEREX 法を応用し、ヒラメをモデルに、食細胞の膜タンパク質に対する抗血清を作製し、食細胞 mRNA を基に作製した発現ライブラリーを抗血清でスクリーニングする事で、ライブラリー中から膜タンパク質遺伝子を含むクローンを特異的に選び出し、効率的に膜タンパク質遺伝子情報を取得する。スクリーニングで得られた遺伝子群については、発現解析を行うことで食細胞特

異マーカー遺伝子を選別する。

参考文献

Matsuyama T, Fujiwara A, Nakayasu C, Kamaishi T, Oseko N, Hirono I and Aoki T. (2006) Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus olivaceus*) during course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.* 22 (6) 598-607.

藤原篤志・松山知正・中易千早・倉田修 E. *tarda*感染ヒラメを用いた白血球由来新規遺伝子の単離と発現解析 平成17年度日本魚病学会講演要旨集 p53.

Nam BH, Hirono I, Aoki T. (2003) The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains. *J Immunol.* 170(6):3081-90.

Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T. (2005) Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 18(2):135-47.

Park CI, Hirono I, Aoki T. (2005) Molecular characterization of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, CD3epsilon and evolution of the CD3 cluster. *Dev Comp Immunol.* 29(2):123-33.

Jansson E, Gronvik KO, Johannisson A, Naslund K, Westergren E, Pilstrom L. (2003) Monoclonal antibodies to lymphocytes of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 14(3):239-57.

Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 11810-11813.

2. 研究の目的

ヒラメの食細胞の膜タンパク質をコードする遺伝子を網羅的且つ選択的にクローニングする。得られた遺伝子情報を元に発現解析を行い、食細胞特異マーカー遺伝子を選別する。

3. 研究の方法

ヒラメ食細胞の膜タンパク質に対する抗血清を作製し、食細胞 mRNA を基に作製した発現ライブラリーを抗血清でスクリーニングする事で、ライブラリー中から膜タンパク質遺伝子を含むクローンを特異的に選出し、効率的に膜タンパク質遺伝子情報を取得する。スクリーニングで得られた遺伝子群については、発現解析を行うことで食細胞特異マーカー遺伝子を選別する。

4. 研究成果

大腸菌を宿主とした発現ライブラリーでは、抗血清との非特異的な交叉反応が多く、抗体によるスクリーニングが有効に行われなかった。そこで、哺乳類細胞で作製した発現ライブラリーを用いて、培養細胞表面に発現したヒラメ膜タンパク質を、食細胞全タンパク質を抗原として作製した抗血清でスクリーニングする方法を試みた。

レトロウイルスをベクターとした方法では、組替

えタンパクの発現量が少なく、抗体によるスクリーニングが困難であった。一方、哺乳類細胞用の発現プラスミドベクターにヒラメ白血球のcDNAを組み込み、COS7細胞にプラスミドをトランスフェクションした一過性発現ライブラリーでは、組替えタンパクの発現量が充分で、抗血清によるスクリーニングを行うことができた。本ライブラリーと抗血清を反応し、抗体に反応した細胞を磁気ビーズで標識した2次抗体を用いて分離することで、効率的なライブラリーのスクリーニングが可能となった。

抗体を用いて分離した細胞からプラスミドを再抽出し、大腸菌にクローニングした。ランダムに48クローンの塩基配列を決定したところ、60.4%が膜タンパクをコードしていた。抗体によるスクリーニング前のライブラリーでは、膜タンパクをコードする割合は20%程度であり、本手法により効率的に膜タンパク遺伝子を単離できたと考えられる。得られた配列の約80%はヒラメで新規な遺伝子、約5%は魚類で新規な遺伝子であった。

既存のモノクローナル抗体を用いて組分画したヒラメ白血球からRNAを抽出し、今回クローニングした18遺伝子について発現解析を行ったところ、GCSFR, CD209, ADAM19は食細胞に特異的に発現しており、これらの遺伝子は食細胞マーカーとして有望である。今後、GCSFR, CD209, ADAM19に特異的な抗体を作製し、食細胞の動態・機能解析に応用したい。

培養細胞を用いて作製した発現ライブラリーを、抗血清を用いてスクリーニングし、網羅的に膜タンパク遺伝子を取得する本手法は、哺乳類以外では試みられた例は無く、新規性が高い。

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 1件)

T. Matsuyama, C. Nakayasu, T. Sakai and N. Oseko, Production and characterization of monoclonal antibodies to leucocytes and serum immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fisheries Science, 75(2) 335-341, 2009(査読有り)

[その他]
ホームページ等

<http://nria.fra.affrc.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 知正 (Matsuyama Tomomasa)

水産総合研究センター・養殖研究所・病害防除部・健康管理研究グループ・主任研究員
研究者番号:20372021