

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02524

研究課題名(和文) 魚類免疫系を活用した一本鎖抗体取得システムの開発

研究課題名(英文) Development of the system for obtaining a single-chain antibody using goldfish immunity

研究代表者

田丸 浩 (Tamaru, Yutaka)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：50324554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：3コピーのhLGR5遺伝子を搭載したタンデムリピート型プラスミドをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションすることで、hLGR5タンパク質を発現することに成功した(特許出願1件)。

次に、キンギョIg遺伝子についてコイ科およびニジマスのゲノム情報と比較した結果、キンギョゲノムにはIgM遺伝子に加えて、IgZ、IgZ2、IgZ3遺伝子の存在が確認された。さらに、大腸菌曝露前後におけるキンギョIg遺伝子発現量の変動を確認した結果、キンギョ(和金)ではIgZ、IgZ2は鰻でのみ遺伝子発現量が増加し、IgM遺伝子はゼブラフィッシュほどの発現増加は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュでは標的遺伝子をタンデムに配列したプラスミドをインジェクションすることで、hLGR5のような発現困難な膜タンパク質を発現させることができた。このことは、創薬標的となる膜タンパク質の発現系としてゼブラフィッシュが有益な宿主であることが判明した。一方、キンギョ(水泡眼、和金)はIgMに加えて、ヒトIgAに相当するIgZ遺伝子がゲノム上に存在することが明らかになった。また、大腸菌の曝露によってIg遺伝子の発現が誘導されるため、今後はこのメカニズムを活用することで、これまで取得困難であった抗体およびその配列情報から一本鎖抗体(scFv)を構築して、CAR-T細胞治療などに活用できる。

研究成果の概要(英文)：A tandem repeat of plasmid carrying three hLGR5 genes was injected into zebrafish fertilized eggs. As a result, Expression of the recombinant hLGR5 in zebrafish embryos was succeeded. (Patent application #1)

Next, the immunoglobulin genes in goldfish genome were investigated in comparison with the genomic information on zebrafish, carp, and rainbow trout. As a result, the genes encoding IgZ, IgZ2, and IgZ3 in goldfish genome was found in addition to IgM. Furthermore, the gene expression pattern among those Igs was observed before or after exposing Escherichia coli. As a result, although expression of IgZ and IgZ2 in Wakin type goldfish was increased, expression pattern of IgM in Wakin type goldfish was not similar to that of zebrafish IgM.

研究分野：生物工学、生化学・分子生物学

キーワード：一本鎖抗体 キンギョ ゼブラフィッシュ ファージディスプレイ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗体(免疫グロブリン)の産生は顎口類(有顎類)の免疫系で広く保存されており、魚類には免疫グロブリン IgM のみが存在する。また、魚類 IgM は四量体であり、糖鎖を含有する。Joshuaらは次世代シーケンサーを用いて、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)の免疫グロブリン遺伝子の多様性について解析した(Science 3245(928):807-810, 2009)。その結果、哺乳類と比べてB細胞の数は少ないが、抗原との結合に関与する部位をコードする遺伝子セグメントの組換えが起こっており、遺伝子セグメントの組換えの際に起こる鋳型遺伝子に存在しない塩基の挿入や再構成された抗体遺伝子への変異の導入が見つかった。以上の結果は、ゼブラフィッシュ IgM 遺伝子の多様性に関する機構は哺乳類と同様であることが判明した。

これまでの我々の研究で、キンギョ(スイホウガン)の IgM では H 鎖についてはトランスコロン型、L 鎖はクラスター型で V(D)J 再編がそれぞれ起こっていると考えられ、ゼブラフィッシュやコイの IgL サブファミリーに加えて、キンギョ固有の IgL サブファミリーが存在することも判明した。

### 2. 研究の目的

近年、分子標的薬である抗体医薬に加えて、CAR-T 細胞治療に利用される一本鎖抗体(single chain Fv: scFv)が注目されている。そこで、高性能な scFv を低コストで生産・供給するための技術開発に期待が寄せられているが、抗原となる膜タンパク質の調製が困難であったり、マウスやウサギにヒト由来タンパク質を免疫しても有用な抗体が得られない場合があり、これらが大きな課題となっている。そこで本研究では、キンギョ(スイホウガン)を免疫動物として活用することで短期間に抗体を取得するとともに、水泡液中の B 細胞から次世代シーケンサーを用いて IgM の配列情報を網羅的に解析することで、免疫後の scFv をファージライブラリ化してスクリーニングし、抗原特異的で親和性の高い scFv を取得する一貫システムの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

これまでに確立したゼブラフィッシュ発現系のさらなる生産性の向上を実現することで、組換えタンパク質(抗原:ヒト LGR5)の量産化を行う。次に、抗原特異的で親和性の高い scFv を取得するために、キンギョゲノム情報を基にコイ科(ゼブラフィッシュ、コイ)ゲノムとニジマスゲノムと比較して、免疫グロブリン(Ig)遺伝子の多様性について調べる。さらに、従来のおよび水泡眼の免疫法に加えて、大腸菌曝露によって得られたキンギョ(和金)の皮膚、鰓、および血清中の Ig 遺伝子発現を比較検討した。B 細胞における各種 Ig 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で比較・定量した。最後に、大腸がんバイオマーカーであるヒト LGR5 発現ゼブラフィッシュを構築し、キンギョ抗体の多様性と抗原タンパク質の特異性ならびに親和性を評価する。

### 4. 研究成果

1 コピー-hLGR5 遺伝子を搭載したプラスミドと 3 コピーの hLGR5 遺伝子を搭載したタンデムリピート型プラスミドをそれぞれゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションして hLGR5 タンパク質の発現量を比較した。銀染色で hLGR5 タンパク質を確認した結果、タンデムリピート型プラスミドのみ組換えタンパク質が確認でき、ゼブラフィッシュ初期胚からの膜タンパク質調製法を確立することができた(特許出願 1 件)。

次に、キンギョゲノム解読(Chen et al., Sci. Adv. (2019) 5:eaav0547)の論文発表を受けて、キンギョ Ig 遺伝子についてゼブラフィッシュ、コイおよびニジマスのゲノム情報と比較した。その結果、キンギョゲノムには IgM 遺伝子に加えて、IgZ、IgZ2、IgZ3 遺伝子の存在が確認された。さらに、これら 3 種の Ig 遺伝子の情報をもとに、大腸菌曝露前後における遺伝子発現量の変動をリアルタイム PCR で確認した。その結果、ゼブラフィッシュでは皮膚、鰓、および血清中の全てで IgM 遺伝子の発現量が増加した。一方、キンギョ(和金)では IgZ、IgZ2 は鰓でのみ遺伝子発現量の増加し、IgM 遺伝子はゼブラフィッシュほどの発現増加は検出されなかった。以上の結果から、ゼブラフィッシュでは大腸菌を異物として認識し、粘膜や菌叢への影響が少なかったと推察された。キンギョも同様に推察されるが、ゼブラフィッシュに比べ体長の違い等を考慮した曝露条件を検討する必要があると考えられた。

#### 〔産業財産権〕

出願番号:特願 2019-163719

発明の名称:「発現ベクター及び目的タンパク質の製造方法」

出願日:2019/09/09

出願人:国立大学法人三重大学、シンフォニアテクノロジー株式会社

〔雑誌論文〕(計 1 件)

・田丸 浩・小幡 宏志郎・山田 紗理奈. 魚類免疫系を活用した一本鎖抗体取得システムの開発. 細胞 53(7),34-37,2021.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ・ 山田紗里奈,小幡宏志郎,田丸 浩.キンギョを用いた新規抗体遺伝子の取得. 第 85 回日本生化学会中部支部例会,オンライン開催.2021 年 5 月 22 日.
- ・ Obata K, Yamada S, Tamaru Y. Acquisition of new antibody genes using goldfish.2021 Sakura-bio Meeting, オンライン開催, 2021 年 5 月 29 日.
- ・ ○小幡宏志郎, 山田紗里奈, 田丸 浩.キンギョを利用した新規抗体遺伝子の取得.2021 年度日本生物工学会大会, オンライン開催, 2021 年 10 月 28 日.
- ・ 山田紗里奈,岡崎文美,梅川碧里,中谷 肇,堀 克敏,田丸 浩.魚類養殖におけるプロバイオティクス飼料開発. 2021 年度日本生物工学会大会,オンライン開催,2021 年 10 月 29 日.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 田丸 浩, 小幡 宏志郎, 山田 紗理奈	4. 巻 53
2. 論文標題 魚類免疫系を活用した一本鎖抗体取得システムの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 34-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 田丸 浩, 岡崎文美
2. 発表標題 未来社会の食料増産を目指したナマズ養殖の取組み
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田丸 浩
2. 発表標題 サーキュラーエコノミーに基づく地域バイオコミュニティの構築
3. 学会等名 第20回バイオマス部会・研究会 合同交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中谷肇, 山田尚毅, 荒川友子, 橋本直樹, 小幡宏志郎, 岡崎文美, 田丸浩, 堀克敏
2. 発表標題 飼育環境によるニジマス表皮細菌叢の変遷
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 岡崎文美, 額田夏生, 百瀬直樹, 田丸 浩
2. 発表標題 キンギョ由来抗体遺伝子の多様性解析と抗原特異的scFvの取得
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎文美, 栗山風貴子, 安達優華, 田丸 浩
2. 発表標題 リボソームを用いたキンギョ免疫法によるscFv断片の取得
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎文美, 田丸 浩
2. 発表標題 キンギョゲノムを基にした水泡液中の遺伝子発現と抗体遺伝子の多様性解析
3. 学会等名 第42回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka TAMARU
2. 発表標題 Construction of scFv antibody library in the lymph fluids of goldfish, bubble Eye
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koshiro OBATA, Fumiyoshi OKAZAKI, Yutaka TAMARU
2. 発表標題 Comparison of recombinant protein quantities with mRNA and plasmid under zebrafish expression system
3. 学会等名 Sakura-Bio 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田紗里奈, 小幡宏志郎, 田丸 浩
2. 発表標題 キンギョを用いた新規抗体遺伝子の取得.
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Obata K, Yamada S, Tamaru Y.
2. 発表標題 Acquisition of new antibody genes using goldfish
3. 学会等名 2021 Sakura-bio Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小幡宏志郎, 山田紗里奈, 田丸 浩
2. 発表標題 キンギョを利用した新規抗体遺伝子の取得
3. 学会等名 2021年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田紗里奈, 岡崎文美, 梅川碧里, 中谷 肇, 堀 克敏, 田丸 浩.
2. 発表標題 魚類養殖におけるプロバイオティクス飼料開発
3. 学会等名 2021年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田丸浩, 岡崎文美, 家戸敬太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 246
3. 書名 細胞表層工学の進展	

1. 著者名 田丸 浩	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社 情報機構	5. 総ページ数 181
3. 書名 医薬品開発におけるオミクス解析技術	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 新規フラボバクテリウム科細菌および魚類の保護	発明者 岡崎文美, 田丸浩, 堀克敏, 中谷肇	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-202121	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 発現ベクター及び目的タンパク質の製造方法	発明者 都築祥子, 田丸浩	権利者 シンフォニアテ クノロジー株式 会社、三重大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-163719	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------