

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03050

研究課題名(和文) 補体C3の細胞内活性化による魚類T細胞の活性化制御と細胞性免疫応答の強化

研究課題名(英文) Regulation of T-cell activation and cellular immune response by intracellular activation of complement C3 in fish

研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO, Miki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50212080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、哺乳類において細胞内における補体活性化の生理作用が注目されているが、その系統発生的な検討は全くなされていない。そこで、細胞内補体活性化の系統発生と生理機能を解明するために、本研究では、コイ白血球細胞内における補体成分C3の活性化断片の検出と細胞内C3断片化に関わるプロテアーゼの特定を目指した。その結果、コイ白血球にはC3が存在し、恒常的に補体活性化とは異なる限定水解を受け未活性化型としてはほとんど残っていないこと、この限定水解はヒト細胞での報告とは異なり、カテプシンL以外のプロテアーゼによること、および細胞外からC3を取り込み断片化している可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、プロテアーゼの特定には至らなかったものの、コイPBL内C3の存在と断片化が示された。本研究成果は、学術的には細胞内補体系の系統発生と生理機能の理解を深める重要な知見であるだけでなく、細胞内補体活性化を指標とした、魚類の生体防御能レベルのモニタリング法の開発などの応用につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, physiological effects of intracellular complement activation in mammals have attracted much attention, but its phylogenetic development has not been investigated at all. To elucidate the phylogeny and physiological function of intracellular complement activation, this study aimed to detect activated fragments of the complement component C3 in carp leukocyte cells and to identify proteases involved in intracellular C3 fragmentation. The results suggested that C3 is present in carp leukocytes and undergoes limited hydrolysis, which is different from complement activation, on a permanent basis, and that little remains in the unactivated form; that this limited hydrolysis is caused by proteases other than cathepsin L, unlike that reported for human cells; and that C3 may be taken up and fragmented from the extracellular C3 from outside the cell and fragmentation.

研究分野：比較免疫学

キーワード：補体 C3 細胞内活性化 コイ 白血球

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、補体系は血漿などの体液中で微生物などの異物を検知して活性化すると理解されてきた。一方、近年、C3がヒトCD4陽性T細胞で産生され、細胞内でカテプシンL (CTSL) による限定水解で活性化型に変換されることが報告された。細胞内補体活性化はCD4陽性T細胞のみならず、B細胞、単球、線維芽細胞、上皮細胞および内皮細胞でも観察され、その生理作用が注目されている。この細胞内補体系は、遺伝子翻訳や細胞周期進行など細胞の恒常性維持に寄与する、生体防御よりも進化的に起源の古いメカニズムと提唱されている。細胞の恒常性維持といった生命維持の重要なシステムに関わるものであれば、細胞内補体系は多くの生物に保存されていると予想ができるが、現在までヒト、マウス以外の生物での報告はされておらず、系統発生学的な検討は全く行われていなかった。

### 2. 研究の目的

細胞内C3活性化の系統発生とその下等脊椎動物における生理機能を解明するために、本研究では、まずコイ (*Cyprinus carpio*) 末梢白血球 (PBL) 中でのC3の活性化断片の検出と断片化に関与するプロテアーゼの特定を目指した。さらに、細胞によるC3の取り込み・活性化を検証するため、ビオチン標識C3および培養細胞株を用いて、細胞内C3の断片化を観察した。また、細胞による外部からのC3取り込みを検証するため、ビオチン標識C3を用いた取り込み試験を実施した。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. コイ末梢白血球 (PBL) におけるC3活性化断片の検出

コイ末梢血からPercoll比重遠心分離により白血球を分離し、10%トリクロロ酢酸 (TCA) で固定した。その細胞溶解液を、抗コイC3 $\alpha$ 鎖ポリクローナル抗体、コイC3のアイソタイプ (C3-H1およびC3-S) に特異的なモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングに供試し、細胞内に由来するC3の断片化を分析した。

3.2. コイ細胞内C3断片化に関与するプロテアーゼの検討：コイPBLをCTSL阻害剤 (Calpain inhibitor II)、セリンプロテアーゼ阻害剤 (3,4-Dichloroisocoumarin) を含む培地中でインキュベートした。その後、TCAで固定し、その細胞溶解液を、抗コイC3 $\alpha$ 鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで分析することにより、細胞内C3断片化へのCTSLおよびセリンプロテアーゼの関与を調べた。実験3. コイPBLによるC3の取り込みと活性化の検証：PBLを、ビオチン標識C3-H1、C3-Sを含む培地中でインキュベートし、TCAで固定した。その細胞溶解液をSDS-PAGEで泳動し、PVDF膜に転写後、膜上のC3-H1およびC3-Sをavidin-biotinylated peroxidase complex法で検出することで、細胞によるC3の取り込みと断片化を調べた。

### 4. 研究成果

#### 4.1.1. コイ末梢白血球における補体C3の断片化

コイPBL溶解液を、抗C3 $\alpha$ 鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングに供試したところ、 $\alpha$ 鎖に由来する分子量47,000、44,000、25,000のバンドが検出され、細胞内でC3の断片化が起こっていることが判明した。これらの断片の分子量は、C3が血清中で活性化されて生じる断片の分子量とは異なっていた。(Fig. 1)

#### 4.1.2. CTSL阻害試験

CTSL阻害PBLサンプルを、抗C3 $\alpha$ 鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングに供試したところ、 $\alpha$ 鎖に由来する分子量90,000、44,000、25,000のバンドが検出された (Fig. 2)。Calpain inhibitor IIの存在下においても $\alpha$ 鎖断片は観察され、バンドのサイズに変化は生じなかった。

また、セリンプロテアーゼ阻害PBLサンプルを、抗C3 $\alpha$ 鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングに供試したところ、 $\alpha$ 鎖に由来する分子量44,000、25,000のバンドが検出された (Fig. 3)。DCIの存在下においても $\alpha$ 鎖断片は観察され、バンドのサイズに変化は生じなかった。

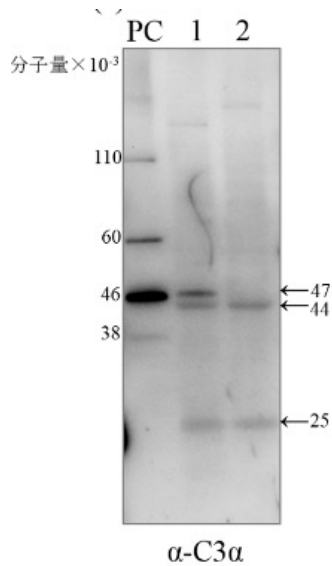


Fig. 1. コイ PBL Lysate の抗コイ C3 $\alpha$  鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング。Lane 1 と 2 は異なるコイ個体の結果。Lane PC は、ザイモサンで活性化させたコイ血清 (陽性コントロール)

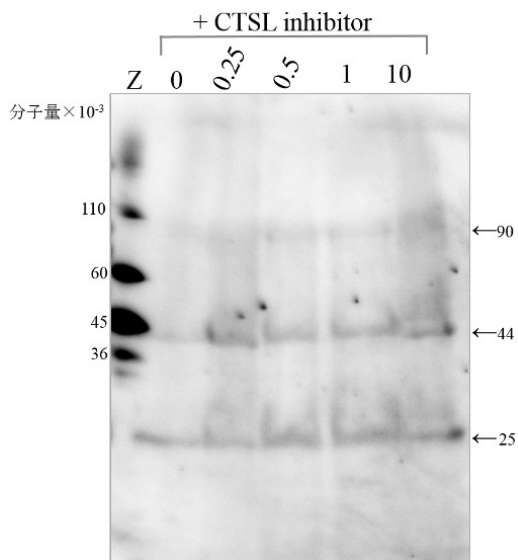


Fig. 2. CTSL 阻害剤添加した PBL のウエスタンブロット。Lane Z はザイモサンで補体を活性化させたコイ血清。CTSL inhibitor 濃度の単位は nM である。

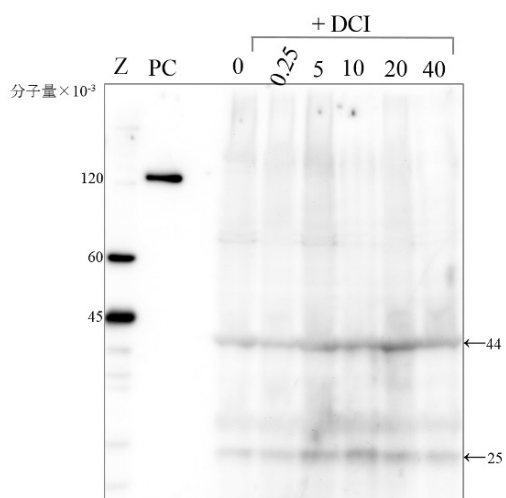


Fig. 3. セリンプロアーゼ阻害剤 (DCI, 0-40  $\mu$ M) で処理した PBL のウエスタンブロット。Z は Fig. 2 と同じ。PC は精製コイ C3。

#### 4. 2. コイ白血球による C3 の取込みと断片化

ビオチン標識 C3 取り込み試験では、ABC 法に PBL のすべての試験区から分子量 119,000、72,000、14,000 のバンドが検出された (Fig. 4)。また、ビオチン標識 C3-H1 の存在下でインキュベートした PBL においては分子量 66,000、45,000、42,000、30,000 のバンドが検出された

(Fig 4)。抗コイ C3 $\alpha$  鎖ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、PBL のすべての試験区において分子量 84,000、42,000、30,000 のバンドが検出された (Fig. 4)。さらに、ビオチン標識 C3-H1 の存在下でインキュベートした PBL においては分子量 45,000 のバンドも検出された (Fig. 5)

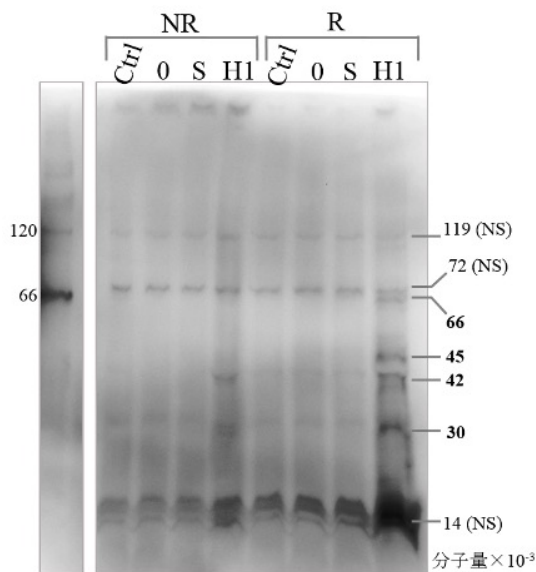


Fig. 4. コイ PBL lysate 中のビオチン標識 C3 の ABC 法によるウエスタンブロッティング。  
 レーン Ctrl は、分離直後に固定した PBL、レーン 0 は C3 未取込み PBL、レーン S, H1 は、それぞれ標識 C3-S および C3-H1 とインキュベートした PBL。  
 NR、R は非還元・還元条件を示す。

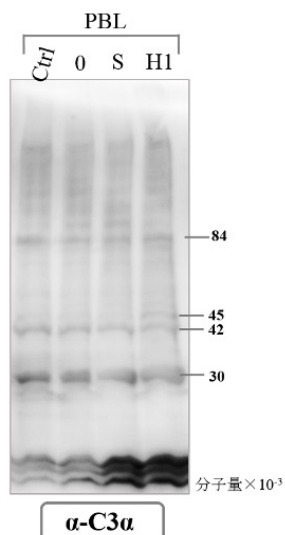


Fig. 5. コイ PBL 中の標識・非標識 C3 を抗コイ C3 $\alpha$  ポリクローナル抗体で検出したウエスタンブロッティング。略号は Fig. 4 と同じ。

以上のように、本研究では、1) コイ PBL には C3 が存在し、その C3 は恒常的に補体活性化とは異なる限定水解を受け未活性化型としてはほとんど残っていないこと、2) この限定水解はヒト細胞での報告とは異なり、CTSL 以外のプロテアーゼによること、および 3) 細胞外から C3 を取り込み、断片化している可能性があることが示唆された。しかし、白血球の種類別の解析や断片化に関わるプロテアーゼの特定には至らなかった。細胞内補体系の系統発生と生理機能を理解するためにも、硬骨魚類における細胞内 C3 の局在、分解に関与するプロテアーゼの解明が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nehlah R, Yamamoto A, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional Analysis of Two Divergent C4 Isotypes in the Classical and Lectin Pathways of Complement Activation in the Common Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse11040707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Prakash H, Sato M, Kojima K, Sato A, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a filter device for the prevention of aquatic bacterial disease using a single-chain variable fragment (scFv)-conjugated affinity silk.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13408-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中尾実樹	4. 巻 80
2. 論文標題 補体の多面性：生物の進化から探る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1723-1727
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 -
1. 著者名 中尾実樹	4. 巻 59
2. 論文標題 魚類の粘膜免疫と補体	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 補体	6. 最初と最後の頁 108-113
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 -

1. 著者名 Prakash H, Sato M, Kojima K, Sato A, Maruyama S, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a filter device for the prevention of aquatic bacterial disease using a single-chain variable fragment (scFv)-conjugated affinity silk	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse11040707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中尾実樹	4. 巻 80
2. 論文標題 補体の多面性：生物の進化から探る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1723-1727
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 -

1. 著者名 中尾実樹	4. 巻 59
2. 論文標題 魚類の粘膜免疫と補体	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 補体	6. 最初と最後の頁 108-113
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 -

1. 著者名 Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M	4. 巻 9
2. 論文標題 Homeostatic functions of Tecrem, a CD46-like regulatory protein of complement activation, on epithelial cells in carp fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse9070687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiota K, Sukeda M, Prakash H, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T	4. 巻 118
2. 論文標題 Local immune responses to two stages of <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> in ginbuna crucian carp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2021.08.013	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 Meidong R, Nakao M, Sakai K, Tongpim S	4. 巻 531
2. 論文標題 <i>Lactobacillus paraplantarum</i> L34b-2 derived from fermented food improves the growth, disease resistance and innate immunity in <i>Pangasium bocourti</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 735878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2020.735878	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 該当する

1. 著者名 Meidong R, Buatong A, Nakao M, Sakai K, Tongpim S	4. 巻 132
2. 論文標題 Mixed culture of <i>Bacillus aerius</i> B81e and <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> L34b-2 derived from in vivo screening using hybrid catfish exhibits high probiotic effects on <i>Pangasius bocourti</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 423-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.06.006	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 該当する

1. 著者名 Sukeda M, Shiota K, Kondo M, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T	4. 巻 115
2. 論文標題 Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8+ T cells against the protozoan parasite <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> in the ginbuna crucian carp, <i>Carassius auratus langsdorfii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 103886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2020.103886	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 Seisuke Tajimi, Masakazu Kondo, Teruyuki Nakanishi, Takahiro Nagasawa, Miki Nakao, Tomonori Somamoto	4. 巻 93
2. 論文標題 Generation of virus-specific CD8+ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology,	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2018.12.009	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 又吉百音、長澤貴宏、杉本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 細胞内補体活性化の系統発生的検討: コイ末梢白血球における補体C3の断片化
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白山智恵、長澤貴宏、中尾実樹
2. 発表標題 ドチザメ血清中の抗菌因子の探索と同定
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 又吉百音、長澤貴宏、杉本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 魚類におけるC3の細胞内活性化の可能性
3. 学会等名 日本補体学会学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Miki Nakao
2. 発表標題 Mucosal innate defense in carp fish involving T cells, complement system, and epithelial cells
3. 学会等名 The 2nd Congress of Asian Society of Developmental and Comparative Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉迫郁子、長澤貴宏、杉本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 コイ体表粘液中の補体成分と補体活性化
3. 学会等名 日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nehlah R, Yamamoto A, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M
2. 発表標題 Functional analysis of two complement C4 isotypes of carp using recombinant proteins
3. 学会等名 The 1st Congress of Asian Society of Developmental and Comparative Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sukeda M, Shiota K, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T.
2. 発表標題 Direct cytotoxic activity of CD8+ T cells against Ichthyophthirius multifiliis in ginbuna crucian carp, Carassius auratus
3. 学会等名 3rd International Society of Fish and Shellfish Immunology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakao M
2. 発表標題 Mucosal innate defense in carp fish, involving T cells, complement system, and epithelial cells
3. 学会等名 The 2nd Congress of Asian Society of Developmental and Comparative Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 又吉百音、長澤貴宏、杉本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 細胞内補体活性化の系統発生学的検討: コイ末梢血白血球における補体C3の断片化
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白山智恵、長澤貴宏、中尾実樹
2. 発表標題 ドチザメ血清中の抗菌因子の探索と同定
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 又吉百音、長澤貴宏、杉本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 魚類におけるC3の細胞内活性化の可能性
3. 学会等名 日本補体学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉迫郁子、長澤貴宏、杣本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 コイ体表粘液中の補体成分と補体活性化
3. 学会等名 日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山紗矢香、長澤貴宏、杣本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 コイ血清中におけるC3の二量体形成
3. 学会等名 日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱 珈凝、友井千帆里、長澤貴宏、杣本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 ドチザメ血清中のザイモサン結合レクチンの同定と発現解析
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥居爽花・長澤貴宏・中尾実樹
2. 発表標題 イヌザメ血清レクチンの構造・機能分析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤武尊・長澤貴宏・杣本智軌・中尾実樹
2. 発表標題 魚類炎症反応におけるC5aの役割解明のための組換えゼブラフィッシュC5aの作製
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harsha Prakash、丸山真平、佐藤充、小島桂、佐藤巧視、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌
2. 発表標題 アフィニティーシルクを用いた魚病細菌除去フィルターの開発
3. 学会等名 日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友井千帆里、長澤貴宏、瀧 虹花、杣本智軌、中尾実樹
2. 発表標題 ドチザメ血清中のザイモサン結合タンパク質の同定、日本比較免疫学会学術集会
3. 学会等名 日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾実樹
2. 発表標題 魚類補体研究の最近の進展と動向
3. 学会等名 日本補体学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中尾実樹 (小川和夫、飯田貴次編)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 204
3. 書名 新版 魚病学概論 第2章 魚類の生体防御と耐病性育種	

〔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	杉本 智軌  (SOMAMOTO TOMONORI)  (40403993)	九州大学・農学研究院・准教授    (17102)	

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