

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03064

研究課題名(和文) 生物時計が調節する魚類の免疫リズムの解明～感染症の防除を目指して～

研究課題名(英文) Immune rhythms in fish modulated by biological clocks

研究代表者

河野 智哉 (Kono, Tomoya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60527547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚類における免疫分子の発現動態を調査し、炎症性サイトカインや病原体認識受容体の発現には概日リズムが備わっていることを突き止めた。また当該リズムは時計遺伝子群によって制御されていることを明らかにした。さらに、時計遺伝子破壊メダカに免疫刺激を与えたところ、炎症性サイトカインの発現応答が野生メダカと比べ減弱化した。続いて、異なる時刻に病原細菌をメダカに感染させると、死亡率に有意な差異が生じることを見出した。また、異なる時刻に不活化菌体を接種したメダカの腎臓において、免疫分子の発現に違いがあることを明らかにした。以上のことから、魚類の免疫は概日リズム性の制御機構を有す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

本研究によって、魚類の免疫システムには時計遺伝子群によって制御された概日リズムが備わっていること、また、病原細菌感染に対する免疫応答も感染時刻によって異なることが明らかとなった。これらの成果は、魚類免疫学分野に新たな側面をもたらすこととなり、これまで解明されていない免疫現象の理解を可能にする。また、水産増養殖現場の魚病問題解決に寄与するものであり、新たな水産用医薬品の開発や飼養管理技術の向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Expression dynamics of immune molecules in medaka fish were investigated and understood that the expression of inflammatory cytokines and pathogen-recognition receptors has a circadian rhythm. It was also revealed that these rhythms are regulated by a group of clock genes. Furthermore, the expression response of inflammatory cytokines was attenuated in the clock gene knockout medaka compared to immune-stimulated wild type medaka. Subsequently, it was found that infecting wild type medaka with pathogenic bacteria at different durations resulted in significant changes in mortality. Differential expression of immune molecules was observed in kidneys of wild type medaka inoculated with inactivated bacteria at different time points.

研究分野：時間免疫学

キーワード：魚類 免疫 概日リズム 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

魚類の概日リズムに関する研究は、成熟や産卵リズムなどの繁殖生理、摂餌行動や内分泌機構の制御などに関するものが多く、「免疫応答の概日リズム (免疫リズム)」を対象にした研究はほとんどない。近年、我々の研究グループは、免疫応答の調節に重要な役割を果たすサイトカインの一種である腫瘍壊死因子 (TNF)- α が、時計遺伝子 (Bmal1・Clock) と逆位相の概日リズムを有することを明らかにした。さらに、Bmal1 および Clock を過剰発現させた細胞において、TNF- α 遺伝子の発現量が有意に増加することを確認した。また我々は、炎症制御に関わる CC ケモカイン (CCL)2 やインターロイキン (IL)-1 β 、病原体認識に関わる Toll 様受容体 (TLR)9、溶菌酵素リゾチーム (LYZ)-C などの免疫系遺伝子についても、発現に概日リズムが存在することを突き止めている。これらは、魚類の免疫も哺乳類と同様に概日リズムを有しており、免疫増強剤の効果が時間帯によって異なる可能性を示すものである。しかしながら、魚類の免疫リズムの制御機構は未だ詳細に理解されていない。

2. 研究の目的

水産増養殖分野において、感染症 (魚病) は生産を著しく減少させる大きな問題の一つである。これまで、魚病の防除に関わる学問分野 (魚病学や魚類免疫学) では、免疫増強技術の開発が試みられてきた。現在では、ブリ属魚類、ヒラメ、マダイなどの疾病に対するワクチンが承認され、養殖現場で使用されている。しかしながら、ワクチンなどの免疫増強剤を使用しても、その効果が十分に発揮されず、甚大な被害をもたらす魚病 (細胞内寄生細菌感染症など) が未だ存在する。また、これらの免疫増強剤の使用に関しては、用法や用量に指定はあるものの、投与のタイミングについて指示があるものはない。一方哺乳類では、免疫増強剤の投与タイミングの違いが、その後の免疫増強に關与する免疫分子の産生に大きな影響を与えることが報告されている。そこで本研究では、時計遺伝子によって制御される魚類の免疫リズムを解明するとともに、免疫力を最大限に増強できる薬剤投与の時間帯を明らかにすることを目的とする。そのために、以下の点を明らかにする。1. 時計遺伝子が免疫分子の転写を“直接的”に制御し、概日リズムを発振させているのか。2. 免疫応答の強弱に概日リズムはあるのか。3. 免疫増強剤への応答は時刻によって異なるのか。

3. 研究の方法

(1) 時計遺伝子による免疫分子の転写調節機構の解析

本実験項目では、我々の研究グループが既に発現リズムを確認している免疫分子「TNF- α 、IL-1 β 、CCL2、LYZ-C、TLR9」をターゲットとした。はじめに、メダカのゲノムデータベースを利用し、これらの免疫分子の転写調節領域の配列を網羅的に解析し、時計遺伝子 (Bmal1, Clock, ROR α) が転写制御を行う際に結合する可能性のある配列 (E-box : CANNTG, RORE : WAWNTRGGTCA) を探索した。時計遺伝子の結合配列の予測に続いて、実際の制御機構を検討するために、時計遺伝子過剰発現試験および発現抑制試験を行った。具体的には、時計遺伝子 (Bmal1, Clock, ROR α) を PCR で増幅し、過剰発現ベクターに組み込んだ後、過剰発現プラスミドをメダカ培養細胞に導入し 24 時間培養した。同時に、時計遺伝子の転写を特異的に阻害するモルフォリノオリゴをメダカ培養細胞に作用させ、発現抑制実験区とした。時計遺伝子を過剰発現または発現抑制したメダカ培養細胞より RNA を抽出し cDNA を合成した。続いて定量リアルタイム PCR (qPCR) で上記免疫分子の発現を解析し、時計遺伝子による免疫分子の転写調節を調査した。

(2) 時計遺伝子ノックアウト (KO) メダカの作出および免疫応答の変動調査

時計遺伝子の機能を詳細に理解するために、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて時計遺伝子が機能しない KO メダカの作出を試みた。ターゲットとする時計遺伝子は、他の分子の転写を促進制御する Bmal1 および ROR α とした。まず、メダカの受精卵に、変異を加えるために必要なゲノム切断酵素 (Cas9 ヌクレアーゼタンパク質) および標的時計遺伝子の特定領域 (切断予定箇所) に特異的に結合する RNA (ガイド RNA) を注入した。発生したメダカについて変異の有無をヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA) によって確認した。塩基配列中にフレームシフトによる終始コドンの挿入が確認できた個体を F0 変異個体とし、野生型 (WT) とのかけ合わせを経て F2 世代 (ホモで変異が入った個体) を作出した。続いて、作出した KO メダカを明暗条件下で飼育し、以下の試験を行った。はじめに、KO メダカの成長や行動に影響が現われるかを調べた。次に、時計遺伝子 KO メダカの免疫刺激に対する応答を WT メダカと比較することで、時計遺伝子の免疫制御について検討した。具体的には WT および時計遺伝子 KO メダカの腹腔にリポ多糖 (LPS) を接種し、その後の炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) の発現応答を qPCR で解析した。

(3) 異なる時間帯での病原体感染に対する免疫応答の解析

メダカに病原性を示す *Edwardsiella piscicida* (E381) で異なる時刻 (明期および暗期) に人為感染試験を実施した。その後、各感染試験区における累積生残率を観察するとともに、魚体内の細

菌数の変化を経時的に測定した。続いて、同様の感染試験を行った各実験区のメダカより経時的に脾臓および頭腎を摘出し、免疫分子 (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TLR1, TLR5m, TLR9) の発現動態を qPCR によって解析した。さらに、同組織サンプルより免疫細胞 (好中球・マクロファージなどの食細胞) を分離し、病原細菌に対する貪食能を測定した。続いて、ホルマリンで不活化した *E. piscicida* を、明期 (ZT2) および暗期 (ZT14) にメダカの腹腔に接種し、その後の免疫分子の発現応答を qPCR で調べた。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子による免疫分子の転写調節機構の解析

これまでの研究で、免疫関連遺伝子: TNF- α , IL-1 β , CCL2, LYZ-C, TLR9 の発現には、概日リズムが備わっていることを明らかにした。そこで、当該リズムの発振機構を探るために、各遺伝子の転写調節領域に時計遺伝子応答配列 (E-Box, RORE) が存在するかを確認した。その結果、全ての遺伝子に E-Box および RORE 配列が複数認められ、時計遺伝子による転写制御を受けていることが示唆された。続いて、時計遺伝子 (Bmal1/Clock1, ROR α) 過剰発現細胞を作製し、上記遺伝子の発現が変調するかを調べたところ、Bmal1/Clock1 過剰発現細胞において TNF- α , IL-1 β , LYZ-C および TLR9 遺伝子の有意な発現増加が認められた。また、ROR α 過剰発現細胞において CCL2 遺伝子の発現が有意に増加した。続いて、モルフォリノオリゴを用いて時計遺伝子の発現を抑制した細胞 (KD 細胞) における、IL-1 β (Bmal1-KD 細胞) および CCL2 (ROR-KD 細胞) 遺伝子の発現を調べたところ、共に発現量が有意に減少することが明らかとなった。これらの結果から、対象とした免疫関連遺伝子は時計遺伝子によって制御された転写リズムを有することが示唆された。

(2) 時計遺伝子 KO メダカの作出および免疫応答の変動調査

時計遺伝子の機能を詳細に理解するために、ゲノム編集技術 CRISPR / Cas9 システムを用いて、時計遺伝子 Bmal1 および ROR α -KOメダカの作出を試みた。各時計遺伝子 KO メダカ (F2) について、HMA およびシーケンシングによって変異を確認したところ、1) Bmal1-KO メダカにおいては、Bmal1 遺伝子のエキソン配列上に 16 塩基の挿入が生じており、フレームシフトによって機能ドメイン (PAS-A, PAS-B) を欠損していることが確認された。また、2) ROR α -KO メダカにおいては、ROR α 遺伝子のエキソン配列上に 11 塩基の挿入が生じており、フレームシフトによって機能ドメイン (DBD, LBD) を欠損する変異が認められた。続いて、各時計遺伝子 KO メダカの雌雄 (F2) を掛け合わせ、F3 ホモ個体の作出を試みた。Bmal1-KO メダカの作出においては、ホモ変異個体 (F3) の作出に成功した。しかしながら、ROR α -KO メダカについては、得られる個体は早老となり実験を継続することができなかった。哺乳類において、時計遺伝子を破壊すると早老や未成熟など、様々な生理機構に変化が生じることが報告されている。このことから、本研究で見られた現象も時計遺伝子破壊によるものである可能性は高いが、今後さらなる調査を実施する予定である。続いて、得られた Bmal1-KO メダカについて行動を観察し、WT メダカと比較したところ、WT メダカの遊泳が緩慢になる夜間 (暗闇) において、KO メダカは活発な遊泳を見せた。また、受精卵から仔魚の発生までにかかる日数が WT と比べ Bmal1-KO メダカは長いことが分かった。これらは、生理機構のリズムを司る時計遺伝子の破壊による表現型であると考えられる。続いて、LPS を接種した Bmal1-KO メダカの腎臓における炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) 遺伝子の発現応答を調査した。その結果、同様の LPS 接種試験を行った WT メダカと比べ、炎症性サイトカイン遺伝子の発現応答が減弱化することが確認された。このことから、実際の炎症時反応誘導時にも Bmal1 が炎症性サイトカインの発現を制御していることが示唆された。

(3) 異なる時間帯での病原体感染に対する免疫応答の解析

LD12:12 に馴致した WT メダカを 1.0×10^5 CFU/ml 濃度の病原細菌 (*Edwardsiella piscicida*) 液で 2 時間浸漬感染し、その後の斃死率および体内での菌数変化を調べた。その結果、ZT2 感染区における死亡率は ZT14 感染区と比べ有意に低く、また体内で増殖した細菌数も有意に少ないことが確認された。さらに、ZT2 感染区における炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8) および Toll 様受容体 (TLR5m) の発現は ZT14 感染区と比べ顕著に増加した。これらのことから、病原体に対する生体防御能は時刻によって異なることが示唆された。続いて、病原細菌 (*E. piscicida*) をホルマリンで不活化したものを免疫増強剤とし、時刻別の接種試験を行った。具体的には、LD12:12 で飼育したメダカの腹腔に ZT2 または ZT14 に上記増強剤を接種し、経時的に腎臓における炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) および Toll 様受容体 (TLR1, TLR5m, TLR9) の発現を調べた。その結果、ZT2 に免疫増強剤を接種したメダカの頭腎における IL-6, TNF- α , TLR1, TLR5m および TLR9 の発現は、ZT14 接種区と比べ有意に高いことが確認された。このことから、免疫増強剤の投与時刻によって、その後誘導される免疫応答には違いがあることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aki Nishihara, Takechiyo Sumiyoshi, Koushirou Arakawa, Natsuki Morimoto, Shinya Yasumoto, Masakazu Kondo, Tomoya Kono, Masahiro Sakai, Jun-ichi Hikima	4. 巻 58
2. 論文標題 Susceptibility of Japanese Medaka to <i>Edwardsiella piscicida</i> and <i>E. anguillarum</i> isolated from aquacultured fish.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 175-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.58.175	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 Takahiko Hata, Suzuka Setoguchi, Natsuki Morimoto, Hidetoshi Shimawaki, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono	4. 巻 154
2. 論文標題 Comprehensive analysis of diel rhythmic expression of the medaka tlr gene family	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 105143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2024.105143. Epub 2024 Feb 9.	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 Tomoya Takeuchi, Takahiko Hata, Hiroshi Miyanishi, Takumi Yuasa, Suzuka Setoguchi, Ayaka Takeda, Natsuki Morimoto, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai and Tomoya Kono	4. 巻 127
2. 論文標題 Diel rhythm of the inflammatory cytokine il1b in the Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>) regulated by core components of the circadian clock	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 238-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2022.06.020	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 Yo Okamura, Tomoya Kono, Masahiro Sakai, Juichi Hikima (Review article)	4. 巻 132
2. 論文標題 Evolutional perspective and functional characteristics of interleukin-17 in teleosts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 108496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2022.108496	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 Tomoya Kono	4. 巻 87
2. 論文標題 Study on fish cytokines regulating innate immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nippon Suisan Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 213-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2331/suisan.WA2820	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 Yo Okamura, Hiroshi Miyanishi, Masato Kinoshita, Tomoya Kono, Masahiro Sakai, Jun-ichi Hikima	4. 巻 11
2. 論文標題 IL-17RA1 gene knockout causes weight loss and reduction of intestinal metabolism-related genes in Japanese medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-114142/v1	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 Genki Taira, Teika Onoue, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai and Tomoya Kono	4. 巻 105
2. 論文標題 Circadian clock components <i>Bmal1</i> and <i>Clock1</i> regulate <i>tlr9</i> gene expression in the Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish and Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 438-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2020.07.009. Epub 2020 Jul 9.	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 Yuri Tsutsui, Teika Onoue, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai and Tomoya Kono	4. 巻 22
2. 論文標題 Diel variation of CC chemokine gene expression in the Japanese pufferfish <i>Takifugu rubripes</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 607-612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-020-09988-x. Epub 2020 Sep 2.	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 Masahiro Sakai, Jun-ichi Hikima and Tomoya Kono	4. 巻 87
2. 論文標題 Fish cytokines: current research and applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01476-4	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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平瀬楓香、川口航世、西原輝、楠ひかり、吉田恵史郎、加藤豪司、宮西弘、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題 養殖メダカに発生した不明病の病原体検出
3. 学会等名 令和5年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西原輝、住吉竹千代、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題 Edwardsiella piscicida Ivyのリゾチーム阻害作用およびivy欠損株の宿主に対する感受性
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀬戸口すずか・引間順一・酒井正博・河野智哉
2. 発表標題 概日リズムを発振するメダカTLR分子の探索
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	羽田崇彦・竹内智哉・宮西弘・湯浅拓・瀬戸口すずか・武田彩香・森本和月・引間順一・酒井正博・河野智哉
2. 発表標題	メダカil1bの概日リズム制御
3. 学会等名	令和4年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	羽田崇彦・竹内智哉・宮西弘・湯浅拓巳・瀬戸口すずか・武田彩果・森本和月・引間順一・酒井正博・河野智哉
2. 発表標題	概日リズムを有するメダカIL-1bによる免疫制御機構
3. 学会等名	令和4年度日本水産学会九州支部総会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	中神賢太郎、木下政人、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題	mpeg1遺伝子を標的としたマクロファージ蛍光標識メダカの作出
3. 学会等名	第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	森本和月、坂田篤哉、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題	メダカにおけるインフラマソーム構成分子の細胞内局在と細胞死誘導
3. 学会等名	第32回日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 高橋良枝、岡村洋、原田七輝、渡邊美香、宮西弘、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題 炎症を誘導したIL-22遺伝子KOメダカの腸管における機能的変化
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野智哉
2. 発表標題 魚類サイトカインによる自然免疫応答の概日リズム制御に関する研究
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田七輝、岡村洋、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題 メダカ(<i>Oryzias latipes</i>)における2つのインターロイキン17受容体C遺伝子の同定およびリガンドとの結合性解析
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 森本和月、岡村洋、河野智哉、酒井正博、引間順一
2. 発表標題 メダカにおける3つのasc遺伝子の同定および発現解析
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

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

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