

機関番号：12614

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780194

研究課題名 (和文) 魚類の病原微生物特異的な初期免疫応答機構に関する研究

研究課題名 (英文) Pathogen specific innate immune responses in fish

研究代表者

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：20314635

研究成果の概要 (和文)：魚類において、病原微生物特異的に発現変動する遺伝子を同定するとともに、その応答機構について解析するため、主にヒラメを用いて実験を行った。魚類の病原細菌に対する応答では、グラム陽性菌に比べグラム陰性菌に対して強く免疫関連遺伝子の発現が誘導されることを明らかとした。さらに魚類のウイルスに対する免疫関連遺伝子の発現応答は、温度に強く影響を受けることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Genes differently expressed in a pathogenic microorganisms specific manner were identified and the regulation mechanisms of their expression were evaluated in fish, especially for Japanese flounder. In response to bacteria, a number of immune-related genes were strongly induced by Gram-negative bacteria rather than by Gram-positive bacteria. In response to viruses, gene expression profiles were strongly influenced by rearing temperatures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：魚類病原微生物、魚類免疫学、自然免疫応答、分子生物学、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

魚類の病原微生物に対するワクチンの中には、効果が非常に高いものと低いものがある。ヒラメでは、グラム陽性菌である *Streptococcus iniae* に対する不活化菌体ワクチンは感染防御効果が高いが、グラム陰性菌の *Edwardsiella tarda* に対する不活化菌体ワクチンは効果が低いことが知られている。このような違いが生じる原因を解明するため、これら2種類の不活化菌体を投与した個体において、発現動態の異なる遺伝子をマ

イクロアレイ法により解析したところ、*S. iniae* 菌体投与後に発現量が上昇するものの、*E. tarda* 菌体投与後には発現動態に変化がみられない遺伝子、および *E. tarda* 菌体投与に伴い発現量が上昇するものの、*S. iniae* に対しては発現動態に変化がない遺伝子が同定されている。これらの遺伝子は、expressed sequence tag (EST) 解析により得られた cDNA クローンであるため、その cDNA 全長配列は不明なままであり、その機能も未知である。しかしながらこれらの遺伝子は、個々の菌体

に対して特異的な発現応答をすることから、ある種の病原微生物に特異的な感染防御機構に関わることが期待された。

2. 研究の目的

本研究は、上述のマイクロアレイ解析により同定された遺伝子の機能解析を行うことにより、*S. iniae*に対する特異的な免疫機構について解析するとともに、様々な病原微生物に対して特異的な発現導体に変化する遺伝子を網羅的に同定し、個々の遺伝子の機能解析を行うことにより、魚類における種々の病原微生物に対する特異的な生体防御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒラメにおいて、上述のマイクロアレイ解析で同定された *E. tarda* あるいは *S. iniae* に対して特異的に発現動態が変化する遺伝子について、その発現動態を確認するとともに、全長 cDNA 配列の決定を試みた。

(2) これまで用いたマイクロアレイは cDNA ライブラリよりランダムに選別したクローンの挿入断片を PCR で増幅し、これら増幅断片をスライドガラス上にスポットするものであった。このような cDNA マイクロアレイでは、ある程度の長さをもつ二本鎖の cDNA 断片を用いるため、ミスマッチハイブリダイゼーションなどの影響により、データの信頼度が下がる傾向がある。さらに cDNA マイクロアレイでは各スポット上の DNA 濃度をスライドガラスごとに均一化できないため、個々のスライドガラス間の比較を行うことが困難であった。そこで、これまでに遺伝子配列データベースに登録されているヒラメの遺伝子配列情報を用い、より感度と特異性が高く、個々のスライドガラス間の比較が容易なオリゴマイクロアレイの構築を試みた。さらに、遺伝子配列情報の充実を目的として、次世代シーケンサーを用いた網羅的な発現遺伝子配列解析を試みた。

(3) 上述のマイクロアレイを用い、グラム陰性菌の *E. tarda* および *Vibrio anguillarum*、ならびにグラム陽性菌の *Lactococcus garvieae* および *S. iniae* のホルマリン不活化菌体をヒラメ腹腔内に投与した際、これらの病原細菌に対して腎臓において特異的に発現変動する遺伝子の同定を試みた。

(4) マイクロアレイ解析により発現変動することが確認された遺伝子、および細菌感染の初期に発現量が顕著に上昇することが報告されている炎症性サイトカインのインタ

ーロイキン 1β (IL- 1β) およびインターフェロン γ (IFN γ) 遺伝子について、種々の魚介類病原細菌のホルマリン不活化菌体を投与した際の発現動態の変化をリアルタイム PCR 法により解析した。

(5) ウイルス感染の初期に発現量が増大することが知られている I 型インターフェロン (I 型 IFN) は、Mx 遺伝子などの抗ウイルスタンパク質遺伝子の発現を誘導することにより、様々な RNA ウイルスに対する抵抗性を高めることが知られる。I 型 IFN 遺伝子の発現を誘導する分子として二本鎖 RNA のアナログであるポリイノシン・ポリシチジン酸 (polyI:C) およびヒラメラドウィルスのグリコタンパク質をコードする DNA ワクチン (pHiRVG) が知られている。これらの分子は、I 型 IFN を強く誘導することにより RNA ウイルスに対する抵抗性を高めることが知られているが、個々の分子がどのように I 型 IFN を誘導するかについては、魚類では不明なままである。このような応答が、様々な海産魚種で確認されるかどうかを調べるため、RNA ウイルスの一種であるノダウィルス症が問題となっているマハタを対象に、polyI:C およびこの DNA ワクチン投与に伴う Mx 遺伝子の発現動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 研究に先立ち報告されていた、*E. tarda* あるいは *S. iniae* の投与に伴い発現変動する遺伝子断片について、発現動態を確認するため実験を行った。ヒラメ腹腔内に *E. tarda* あるいは *S. iniae* のホルマリン不活化菌体を投与し、報告されている遺伝子の発現動態を解析したが、これまで報告されているような菌種毎に特異的な遺伝子の発現上昇は確認できなかった。

これは、これまで報告されていた実験と今回のものとの間で何らかの条件が違った可能性が考えられたが、その詳細は不明なままである。これらの遺伝子については、菌種毎に特異的な発現変動が確認できなかったことから、その cDNA 全長配列解析は行わず、新規の病原微生物に特異的に発現変動する遺伝子の同定のため、(3) のマイクロアレイ解析を進めた。

(2) これまで用いていた cDNA マイクロアレイよりも感度と特異性が高いオリゴマイクロアレイを構築するため、GenBank データベース上に登録されていた約 400 の mRNA 配列、および約 10,000 の expressed sequence tag (EST) 配列について重複するものを除き、EST 配列については相同配列の検索を行った。このようにして得られた 4,500 弱の重複する

ものが少ない配列を用い、オリゴヌクレオチドプローブを設計し、新規のオリゴマイクロアレイを構築した。

また、真核生物の遺伝子は 20,000 以上あることが知られ、転写産物としては 100,000 種類を超えることが予測されていることから、上述の GenBank データベース上の配列を用いて作成した上述のオリゴマイクロアレイでは、種々の組織や細胞で発現する遺伝子の発現動態を網羅的に解析するためには不十分であると考えられた。そこで、次世代シーケンサーGS-FLX を用い、ヒラメ臓器における遺伝子転写産物の網羅的な配列解析を行った。

解析の結果、約 90,000 配列の情報が得られたものの、これらの多くはリボゾーム RNA をコードしていた。今回の解析では、mRNA にのみ存在するポリ A 配列を標的に解析をしたにも関わらず、何故ポリ A 配列を持たないはずのリボゾーム RNA の配列が解析されてしまったのかは不明である。

(3) 上記(2)で新規に開発したオリゴマイクロアレイを用い、方法で述べた 4 種類の病原細菌のホルマリン不活化菌体に対して特異的に発現変動する遺伝子の同定を試みた。これらの病原細菌の菌体を投与すると、多くの遺伝子で発現動態の変化が観察された。しかしながら、処理間で発現動態に顕著な差のある遺伝子はみつからなかった。

一方、発現変動していたほとんどの遺伝子が、グラム陽性菌よりもグラム陰性菌の菌体を投与した際に顕著に発現変動することが示された。特に顕著な発現上昇が観察された遺伝子には、3 型甲状腺ホルモン脱ヨウ素酵素 (Dio3)、ハプトグロビン、可溶性 Toll 様受容体 5、顆粒球コロニー刺激因子などをコードするものがあつた。

(4) 上記(3)で同定された遺伝子のうち Dio3 遺伝子についてグラム陽性菌および陰性菌に対する遺伝子発現応答の詳細な解析を行った。併せて、IL-1 β および IFN γ 遺伝子についても解析した。

グラム陽性菌の *S. iniae* およびグラム陰性菌の *E. tarda* について乾燥不活化菌体を調製し、同じ重量ずつヒラメ腹腔内に投与した後、経時的に腎臓を採取した。本臓器におけるこれらの遺伝子のいずれも、*E. tarda* 菌体を投与した個体の腎臓で強い発現誘導が観察された。これらの菌体を用い、培養末梢白血球を用いて *in vitro* で実験を行ったところ、とくに IFN γ 遺伝子の発現上昇は *E. tarda* 菌体を投与した際のみ観察された。

グラム陽性菌と陰性菌では菌体を構成する成分に大きな違いがあるため、単純な比較はできないが、今回の結果から、グラム陽性

菌と陰性菌では、ヒラメ体内で発現誘導される遺伝子の誘導の強さに違いがあることが示唆された。

このような違いはグラム陽性菌と陰性菌がもつ病原微生物パターン分子 (PAMPs) の違いに依ることが考えられる。今後個々の菌がもつ PAMPs が、どのように宿主の細胞における遺伝子発現を制御するのかを調べるとともに、このような遺伝子発現動態の違いが獲得免疫の成立にどのような影響を及ぼすか興味を持たれる。

(5) マハタに pHiRVG を筋肉内注射し、3 日後の腎臓および脳を採取した。I 型 IFN により誘導される Mx 遺伝子の発現を確認したところ、pHiRVG を投与した個体では、いずれの臓器でも、遺伝子の発現上昇は確認できなかった。また、このプラスミド投与個体についてノダウイルスに対する感染試験を行ったところ、その生残率はコントロールのものと同程度に低かった。したがって、マハタでは、他の魚種と異なり、pHiRVG による I 型 IFN 遺伝子の誘導がないことが考えられた。

一方、ヒラメラブドウイルスは低温で発症することが知られ、これまでの報告でもほとんどが 15 $^{\circ}$ C 程度の低水温で実験を行っていた。今回のマハタを用いた研究は 25 $^{\circ}$ C 程度の水温で行っていたことから、水温が本プラスミドの効果に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、マハタを 15 $^{\circ}$ C および 25 $^{\circ}$ C で飼育し、polyI:C および pHiRVG を筋肉内に投与したところ、polyI:C については、いずれの温度でも腎臓における Mx 遺伝子の発現上昇が観察されたのに対し、pHiRV 処理の場合は水温が 25 $^{\circ}$ C では応答がほとんどみられず、15 $^{\circ}$ C で強く応答がみられた。

さらに、同様の応答が他魚種でも観察されるかどうかを確認するため、コイを 15 $^{\circ}$ C および 25 $^{\circ}$ C で飼育し、polyI:C および pHiRVG を筋肉内に投与した。コイではいずれの水温においても、腎臓における pHiRVG に対する Mx 遺伝子の発現応答は観察されなかったものの、polyI:C に対しては 15 $^{\circ}$ C で飼育した個体において、25 $^{\circ}$ C のものと比べて 10 倍以上強い発現誘導が観察された。

I 型 IFN は、特に RNA ウィルスに対する抵抗性の付与に重要である。本タンパク質をコードする遺伝子の発現動態が温度によって強く影響を受けることは、本系を利用した感染防除法を開発する上で重要な知見であると考えられる。

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

①岡田峻・山下浩史・近藤秀裕・青木宙・廣野育生、ハタ類におけるDNA ワクチンを利用した自然免疫活性化に関する研究、平成 23 年度、日本水産学会春期大会、震災のため、要旨のみの発表

②川名由利子・鈴木克彰・近藤秀裕・青木宙・廣野育生 ヒラメにおける病原微生物特異的に働く免疫関連遺伝子の探索、平成 22 年度日本魚病学会大会、2010 年 9 月 21 日、三重大学(三重県津市)

③ Y Kawana, Y Suzuki, H Kondo, T Aoki , I Hirono、Identification of deiodinase type 3 as an inducible gene after treatments of bacterial pathogen associated molecular patterns、第 6 回水生動物衛生に関する国際シンポジウム、2010 年 9 月 8 日、タンパ(アメリカ、フロリダ州)

④鈴木克彰・近藤秀裕・川名由利子・青木宙・廣野育生、ヒラメに対するオリゴDNAマイクロアレイの開発および発現解析、平成 22 年度日本水産学会春季大会、平成 22 年 3 月 28 日、日本大学生物資源学部(神奈川県藤沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号：20314635