

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380111

研究課題名（和文） 魚類における補体活性化制御因子を活用した免疫応答の最適化

研究課題名（英文） Modulation and optimization of immune response utilizing complement regulatory factors in fish

研究代表者

中尾 実樹（NAKAO MIKI）

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50212080

研究成果の概要（和文）：魚病ワクチンの効果を高めるために、自然免疫の液性因子である補体系の制御因子による、魚類の免疫応答調節メカニズムの解明を目指した。特に膜型 RCA タンパク質である Tecrem とプロパージン（Pf）に着目し、組換え Tecrem と抗 Tecrem モノクローナル抗体を利用した機能解析をコイとギンブナで進め、さらにコイ Pf のクローニングと組換えタンパク質の調製にも成功し、これら補体制御因子がウイルス感染時の免疫応答に関与することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate molecular mechanism of complement regulatory factors, Tecrem and properdin (Pf), in modulating immune responses in fish, gene diversity, functional analysis at both mRNA and protein levels of zebrafish, carp, and ginbuna crucian carp Tecrem were conducted. We succeeded to prepare of recombinant carp Tecrem and to establish monoclonal antibody to carp Tecrem, and elucidated its wide tissue and cellular distribution, expression response to viral infection, suggesting key role of Tecrem in host immune system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

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：魚類、免疫、生体防御、補体

1. 研究開始当初の背景

魚病対策として様々なタイプのワクチン・免疫強化剤の開発が進められているが、まだ十分な効果を上げていたとは言い難く、有効な防御法の確立が急がれている。そのため、免疫応答のタイプを適切にコントロールする必要がある。

補体系は、主に血漿中に存在し、溶菌・白血球活性化・炎症惹起を担う自然免疫の液性因子として古くから認知され、感染防御の第一線で病原体の排除を担うと考えられてきた。しかしながら、近年の哺乳類における研究の進展によって、補体には、B細胞による抗体産生応答および細胞性免疫応答に必要

な Th1 細胞の分化・増殖と制御性 T 細胞 (Treg) の誘導など、様々な獲得免疫応答調節作用があることがわかってきた。

このような補体による獲得免疫の調節機構が、原始的な脊椎動物である魚類にもすべて備わっているかどうかは不明であるが、申請者らの最近の研究に寄って、少なくとも、哺乳類で免疫調節作用を示す補体成分とその活性化断片は存在することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、コイおよびギンブナを用い、CD46 ホモログ (Tecrem) およびプロパージンを経した補体活性化制御による細胞性免疫の増強・調節効果を検証することを目的とした。特に、Tecrem が属する RCA (Regulators of Complement Activation) ファミリータンパク質、およびプロパージンの魚類における構造的多様性を明らかにするとともに、それらの機能をタンパク質・細胞レベルで解明することに力点を置いた。

3. 研究の方法

(1) In silico クローニング

ヒト補体制御因子 (H 因子、DAF、C4 結合タンパク質、MCP および CR1) のアミノ酸配列を用い、ゼブラフィッシュゲノムデータベースを対象として、TBLASTN 検索を行い、相同性を示す RCA 遺伝子を探索した。エクソン-イントロンの構成は、Softberry プログラム (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) を用いて推測した。

(2) cDNA クローニング

ゼブラフィッシュ、コイおよびギンブナ (S3N 系統) の肝臓から RNA を抽出し、オリゴdT プライマーを使用して第一鎖 cDNA を逆転写した。これをテンプレートとして用い、RT-PCR、5'-および 3'-RACE 法を駆使して cDNA を増幅した。増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって精製後、pGEM-T ベクターにサブクローニングし、塩基配列を解読した。少なくとも 3 クローンの配列を照合することによって、PCR における増幅ミスを検証・補正した。

(3) 組換えタンパク質の調製

①コイ Tecrem 発現 CHO 細胞の樹立

コイ Tecrem (cTecrem) のシグナルペプチドを、6xHis タグをコードする配列をアダプターとして含むプライマーで増幅した。また、4xSCR モジュール、STP 様ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインから成る成熟タンパク質をコードする配列も PCR 増幅した。両増幅産物を連結してから、pCDNA3.1 ベクターにサブクローニングして CHO 細胞にリポフェ

クション法によって導入し、ゲンタマイシン耐性を指標に培養を続け、組換え cTecrem (rcTecrem) の安定発現株を選抜した。

②組換えコイプロパージン (rPf) の調製

コイプロパージンのアイソタイプ (Pf-1 および Pf-2) の全長をコードする各 cDNA 配列から、TSP-4~TSP-5 ドメインをコードする塩基配列を PCR で増幅し、pCold-I ベクターにサブクローニングした。これを大腸菌 Origami B 株に導入して培養後、15°C で 24 時間振盪して組換えタンパク質の発現を誘導した。菌体を破碎後、封入体として発現した rPf1 および rPf2 を 6 M 塩酸グアニジンで可溶化し、Ni-NTA アガロースカラムに吸着させた。このまま On column refolding 法によって、rPf1 および rPf2 を可溶性タンパク質として回収した。

(4) コイ・ギンブナ白血球および KF-1 細胞株の培養と増殖測定

コイおよびギンブナの頭腎・体腎を摘出して細胞懸濁液を調製後、Percoll 密度勾配遠心法 (比重 1.08) を用いて、白血球画分を分離した。KF-1 (コイ鱗上皮細胞株) は、水産総合研究センター増養殖研究所から分与された。各細胞の培養は、RPIM-1640 培地中で 25°C、5% CO₂ 下で行った。

細胞増殖は、BrdU 取込み法によって測定した。

(5) モノクローナル抗体の樹立

①免疫

CHO-rcTecrem (1x10⁷ cells) を BALB/c マウスに 7 日毎に 4 回腹腔内注射した。最終投与の 2 日後に、同量の抗原によってブースター注射を行った。

②細胞融合

ブースター注射の 3 日後にマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞をミエローマ Sp2/0-Ag14 と PEG4000 を用いて常法により融合させた。

③スクリーニング

融合させた細胞は 96 穴プレートに播種し、HAT (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン) を添加した GIT 培地 (和光純薬) を用いて培養した。約 10 日後にハイブリドーマが成育してから培養上清を採取し、1) CHO 親株、2) CHO-rcTecrem、3) KF-1 を接着させたマイクロプレートを用いた ELISA に供試し、抗 cTecrem 抗体を産生するハイブリドーマを選抜した。

④クローニング

抗 cTecrem 抗体分泌ハイブリドーマを限界希釈法に 2 回供試し、単クローンとした。ク

ローン化された細胞は、無血清培地に順化後、大量培養し、その定常期培養上清を Protein G-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけて、抗体を精製した。

(6) フローサイトメトリー

Beckman Coulter Epics XL フローサイトメーターを用いた。得られたデータは、EXPO 32 MultiCOMP software で解析した。

(7) ELISA、免疫沈降法およびウェスタンブロットティング

①ELISA

96 穴マイクロプレートを用い、ブロッキングには 0.5% BSA-0.1% gelatin-PBS を用いた。二次抗体として 1/2000 希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG を供試し、ABTS と過酸化水素から成る基質液を発色させ、405 nm における吸光度を測定した。

②免疫沈降法

CHO-rcTecrem (1×10^7 cells) を 1% Triton X100 を含む細胞溶解液で溶解後、抗 cTecrem モノクローナル抗体を反応させて、生じた免疫複合体を Protein G-Sepharose で沈降させた。沈降物を PBS で洗浄後、SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングに供試した。

③ウェスタンブロットティング

試料を 10% ポリアクリルアミドゲルで還元条件下にて泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜 (NCM) に転写した。NCM は、5% スキムミルク-PBS でブロッキング後、抗 6xHis Tag 抗体で処理後、HRPO 標識二次抗体と発色基質液 (4-クロロナフトール/過酸化水素) で抗原バンドを発色させた。

4. 研究成果

(1) 魚類 RCA タンパク質の多様性

ゼブラフィッシュゲノムデータベースを活用した RCA 遺伝子の包括的な検索・解析により、6 番染色体、22 番染色体および 23 番染色体から、合計で 10 種類の RCA 遺伝子を同定することができた。このうち 2 種は I 型膜蛋白質であり、Tecrem-A、Tecrem-B と命名した。可溶性 RCA タンパク質をコードする遺伝子は 8 種見つかったが、7 種は哺乳類で同定されている H 因子 (CFH) に相同性が高く、1 種は H 因子群よりもむしろ Tecrem に近い分子であった。図 1 にこれら RCA 遺伝子のドメイン構成を示す。

(2) ギンブナ Tecrem の cDNA クローニング

コイ Tecrem の cDNA 塩基配列を基に設計したプライマーを用いた 3' -RACE によって、ギンブナ肝臓から Tecrem の全長をコードする

cDNA を単離することに成功した。図 2 に示すように、ギンブナからは、互いに 78% の相同性を示す 3 種の Tecrem (gTecrem-1~3) が見つかった。これらは、コイ Tecrem と 65%、ゼブラフィッシュ Tecrem とは 49% のアミノ酸配列同一性を示した。gTecrem-1~3 の間には、SCR ドメインの数と細胞質ドメインの長さに違いが認められた (図 2)。

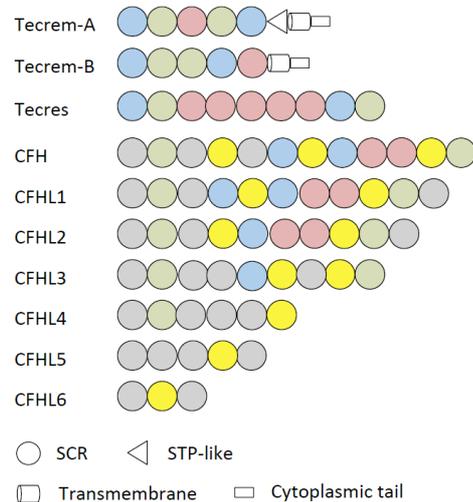


図 1. ゼブラフィッシュのゲノムワイドな検索によって同定された RCA タンパク質のドメイン構造

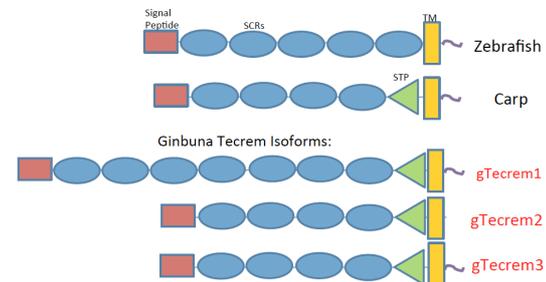


図 1. ギンブナ Tecrem isoforms のドメイン構造

(3) 抗コイ Tecrem モノクローナル抗体の樹立

図 3(A) に示すように、CHO-rcTecrem に結合し、mock CHO (親株) には結合しないモノクローナル抗体 (1F12, IgG₁) を樹立することができた。1F12 は、KF-1 細胞株にもよく結合し、His タグでなく Tecrem そのものを認識する抗体であることが確認された。免疫沈降法によって、1F12 は CHO-rcTecrem から 66 kDa の Tecrem バンドを検出した (図 3(B))。cTecrem のアミノ酸配列から計算した分子量は約 40 kDa なので、cTecrem は高度に糖鎖付加されていることが示唆された。これは cTecrem には O 型糖鎖が付加できる STP-like 領域が存在することによっても支持される。

(4) Tecrem 発現細胞の同定

すでに RT-PCR によってゼブラフィッシュおよびコイにおいて Tecrem が幅広い組織で発現することを示しているが、Tecrem タンパク質の血液細胞における局在を 1F12 抗体を用いたフローサイトメトリーで解析したところ、図 4 に示すように、末梢血赤血球・白血球および頭腎白血球のすべてが Tecrem 強陽性を示した。このような広い組織分布は、哺乳類では、Tecrem に最も近いホモログである MCP の発現が比較的限られ、たとえば赤血球には発現しないことが報告されていることは対照的である。

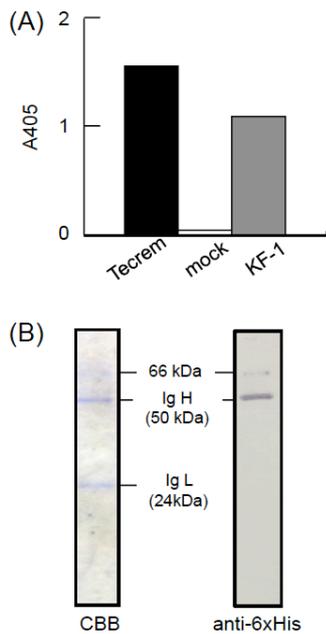


図 3. 抗 cTecrem モノクローナル抗体 1F12 の ELISA における反応性 (A) と 1F12 の認識抗原の同定

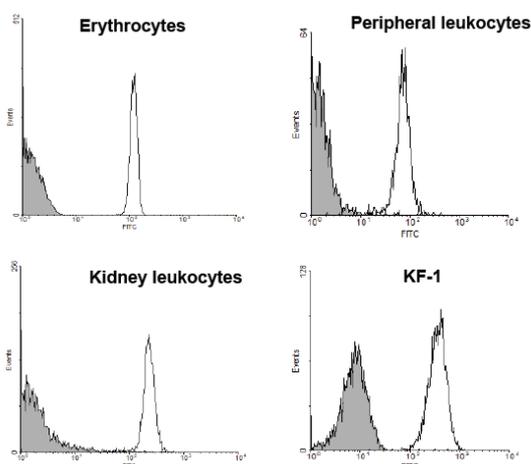


図 4. 1F12 を用いたフローサイトメトリーによる cTecrem の血球における発現。×軸は蛍光強度。

(5) コイヘルペスウイルス (KHV) 感染時の KF-1 細胞における Tecrem の発現動態

KF-1 細胞にコイヘルペスウイルス (KHV) を MOI=0.02 の強度で感染させ、4, 24, および 120 時間後の Tecrem 発現量を ELISA 法によって追跡したところ、KHV 感染によって Tecrem 発現が著しく阻害された。この結果は、哺乳類において Tecrem のホモログである MCP がウイルス感染時にエントリーレセプターとして利用される際の挙動と一致している。

以上要するに、Tecrem は魚類の幅広い範囲の細胞に発現し、補体制御活性のみならず、感染に対する宿主応答に深く関与し免疫応答調節などの多様な機能を果たすことが示唆された。

本研究の成果は、魚類においてリンパ球を中心とした獲得免疫応答に補体制御因子が密接に関与することを示唆しており、今後、細胞性免疫応答の人為的誘導など、ワクチン効果の向上に向けた魚類の免疫調節法の確立に道を開くものである。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Somamoto T, Nakanishi T and Nakao M. Identification of anti-viral cytotoxic effector cells in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*, Dev. Comp. Immunol. 39, 370-377, 2013.03. doi: 10.1016/j.dci.2012.11.001
2. Ichiki S, Kato-Unoki Y, Somamoto T, Nakao M, The binding spectra of carp C3 isotypes against natural targets independent of the bindingspecificity of their thioester, Dev. Comp. Immunol. 38(1), 10-16, 2012.08. doi: 10.1016/j.dci.2012.03.004
3. Sameshima S, Nakao M, Somamoto T. , Diversity of CD2 subfamily receptors in cyprinid fishes., Result Immunol, 2, 25-34, 2012.02. doi: 10.1016/j.rinim.2012.01.003,
4. Urabe S, Somamoto T, Sameshima S, Unoki-Kato Y, Nakanishi T, Nakao M, Molecular characterization of MHC class I and beta-2 microglobulin in a clonal strain of ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*, Fish Shellfish Immunol., 31, 3, 469-74, 2011.09. doi: 10.1016/j.fsi.2011.06.004.
5. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK,

Somamoto T., The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. Dev Comp Immunol. 2011 Dec; 35(12): 1296-308. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.003

6. 辻倉正和、杣本智軌、鵜木陽子、中尾実樹. 魚類における膜型補体制御因子の同定と機能解析: 次世代魚病ワクチンアジュバントへの展開に向けて. 生物機能研究 14, 2010.11.

[学会発表] (計 23 件)

1. 豊福太樹、山下基子、長沢貴宏、杣本智軌、中尾実樹. ギンブナ樹状細胞マーカー CD83 に対する抗体の作製と発現. 日本水産学会春季大会. 2013.03.27. (東京水産大学)
2. 長沢貴宏、中易千早、杣本智軌、中尾実樹. コイ栓球は他の白血球により活性化され貪食能を示す. 日本水産学会春季大会, 2013.03.27. (東京水産大学)
3. 鵜木陽子、辻倉正和、一木智子、杣本智軌、中尾実樹. コイ補体成分 Properdin の cDNA クローニングと構造解析. 日本水産学会九州支部大会, 2013.01.26. (九州大学)
4. 中村亮太、原田光利、長澤貴宏、Indriyani Nur、辻倉正和、一木智子、杣本智軌、中尾実樹. 魚類 CD46 様補体制御因子の多様性と機能の解析, 補体シンポジウム, 2012.08.24. (大阪府立成人病センター)
5. Somamoto T, Nakanishi T, Nakao M. Functions of CD8-positive and CD4-positive lymphocytes against virus-infection in ginbuna crucian carp. 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2012.07.10. (Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel, Fukuoka)
6. Nagasawa T, Nakayasu C, Matsuyama T, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, Nakao M. Phagocytosis and bactericidal abilities of teleost thrombocytes. 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2012.07.11. (Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel, Fukuoka)
7. 辻倉正和、中尾実樹、杣本智軌、ゲノムデータからみた魚類補体制御因子の多様性, アクアゲノム研究会東京大会, 2012.03.26. (東京海洋大学)
8. 山本 暁、一木智子、杣本智軌、中尾実樹. コイ補体成分 C4 アイソタイプ(C4-1, C4-2)の結合特異性の解析、補体シンポジウム, 2011.09.02. (名古屋市立大学)
9. Nakao M, Ichiki S, Mutsuro J, Tsujikura M, Somamoto T. Functional diversity of the complement component isotypes in bony fish innate immunity: a model study using the common carp., 9th International Congress on the Biology of Fish, 2010.07.08.

[図書] (計 1件)

中尾実樹、杣本智軌. 補体への招待 2-5-2. 補体系の進化: 脊椎動物, メジカルビュー, 2011.04.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中尾 実樹 (NAKAO MIKI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 50212080

(2)研究分担者

杣本 智軌 (SOMAMOTO TOMONORI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40403993