

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292125

研究課題名(和文)人工モノクローナル魚類抗体の迅速作出法の開発およびその応用

研究課題名(英文)Development and application of artificial monoclonal fish antibody

研究代表者

近藤 秀裕 (Hidehiro, Kondo)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：20314635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は魚類の抗体産生細胞を単離し、得られた細胞由来の遺伝子を用いて抗原に特異的に結合する人工抗体を作出することを目的とした。ヒラメ、ニジマスおよびチョウザメを対象に、種々の抗原で免疫した際の抗体価の上昇を測定し、抹消白血球より抗原を特異的に認識する細胞の分離を試みたところ、チョウザメでのみ病原微生物菌体を認識し、抗体遺伝子を発現する細胞を分離することができた。今後本手法を改良していくことで、魚類抗体遺伝子を用いた人工抗体を作出できると考えている。さらに本研究では、魚類の抗体産生に関する免疫機構に関わる遺伝子群の同定および解析を行い、魚類において抗体価を高めるための手法についても検討した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is development of artificial antibody using the nucleotide sequence encoding variable region of fish immunoglobulin genes. Antibody responses in Japanese flounder, rainbow trout and bester sturgeon were measured before and after immunization with various antigens, including pathogenic bacteria and certain proteins. In Japanese flounder and rainbow trout, specific antibody titers were increased after the immunization, while the leukocytes expressing specific antibody were not isolated. In contrast, bester sturgeon possessed specific antibodies against various antigen without immunization. We isolated cDNA from a single sturgeon blood leukocyte, which bound to the fluorescent labeled bacterial cells, and amplified the IgM heavy chain gene. This technique will allow us to develop artificial fish monoclonal antibodies. In addition, we identified a number of genes involved in immunity and specific antibody responses.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：魚介類免疫学 抗体 バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

魚類の抗体は、他の脊椎動物の場合と同様、生体防御の重要な位置を占めている。動物の体内で作られる抗体は、複数種類のB細胞から作られるポリクローナル抗体となるため、病原微生物などで免疫した場合、個々の抗原に対してそれぞれ複数種類の抗体が作られる。病原微生物の構成成分のうち、抗原となる分子の数は複数あるため、抗原と抗体の組み合わせは莫大な数になる。したがって、病原微生物構成成分のうちワクチン抗原として理想的な分子を同定することは困難である。

一方、マウスやラットなど一部の動物では、単一の抗体タンパク質のみを産生するB細胞を株化細胞と細胞融合させることにより増殖能を付与し、これをクローン化することでモノクローナル抗体を調製することが可能である。モノクローナル抗体は単一のエpitepopeのみを認識する抗体であるため、上記のような抗原分子の同定には威力を発揮する。

申請者らを含む多くの研究グループは、養殖対象魚種の病原微生物について抗原分子を同定するため、免疫血清を用いたスクリーニングを行ってきた。しかしながらこれらの研究は、ポリクローナルな抗体を用いたものである。したがって、個々の抗原に対するモノクローナル抗体を調製することが可能となれば、この抗体を用いたアフィニティー精製により個々の抗原分子を容易に同定することが可能となるのみならず、個々の抗体と各抗原の親和性や各抗体を用いた抗原分子の機能解析が可能となると期待された。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、申請者は魚類において抗原特異的なモノクローナル抗体を開発することが、魚類の生体防御機構の解明、ならびに新たな抗原特異的な分子の開発に重要であると考えた。そこで本研究では、免疫魚類からの抗原特異的なB細胞単離法およびB細胞からの抗体遺伝子断片増幅法を開発するとともに、抗原特異的な魚類B細胞の試験管内成熟法を開発するための端緒として魚類の獲得免疫成立機構を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 魚類抗体の効果的な誘導法の開発および抗体価測定法の検討

ヒラメおよびニジマスを対象に病原微生物、スカシガイヘモシアニン(KLH)あるいは生殖腺刺激ホルモン組換えタンパク質を用いて免疫を行った。その際、フロイントアジュバントの添加や抗原タンパク質遺伝子を用いたDNAワクチンが抗体価に影響を及ぼすかを解析した。さらに、ヒラメを対象に免疫に伴う抗体重鎖遺伝子の多様性を解析するとともに、抗体遺伝子を用いた一本鎖抗体多様性鎖(scFv)を調製し抗原特異的な抗体遺伝子

の単離を試みた。

様々な魚類抗体価を測定するため、魚類IgM重鎖および軽鎖についてアミノ酸配列を比較し、保存された領域を対象にペプチドあるいは組換えタンパク質を調製し、これらを用いてウサギを免疫して抗血清を得た。

### 3-2. 魚類特異的な抗体産生細胞の単離および一細胞からの抗体遺伝子の増幅

ヒラメおよびチョウザメを対象に、抹消白血球中の抗体産生細胞を標識し、その中から抗原を特異的に認識する細胞の単離を試みた。さらに、少数の細胞から抽出したRNAを鋳型としてPCRにより目的遺伝子を増幅するための手法の開発を試みた。

### 3-3. 魚類の液性獲得免疫に関わる分子の同定および種々の条件下における発現動態の解析

ヒラメを対象に、異なる抗原で免疫した場合や、異なる水温下で免疫した場合に発現変動する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。さらに、発現変動したいくつかの遺伝子についてcDNAクローニングを行い詳細な構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 魚類抗体の多様性解析および抗体価測定法の検討

ヒラメを魚類病原微生物である*Edwardsiella tarda*および*Streptococcus iniae*のホルマリン不活化菌体、あるいはKLHを用いて免疫し、抗体価の変化をELISA法により解析した。ヒラメでは、抗原の種類や個体によって免疫をしても抗体価があまり上がらない場合があった。ニジマスでも、病原微生物を用いた場合は抗体価が顕著に上昇したが、生殖腺刺激ホルモン組換えタンパク質を用いて免疫した場合は抗体価の顕著な上昇はみられなかった。

ヒラメを対象に、免疫後の抗体重鎖遺伝子の多様性を解析した。各サンプル100弱の配列を解析し比較したところ、免疫後も配列の多様性は高いままであり、末梢白血球における抗体価の上昇に伴うB細胞クローンの偏りは観察されなかった。さらに、各抗原で免疫した個体の白血球由来の抗体遺伝子を用いてscFvを調製し、ファージディスプレイ法により抗原特異的なscFv断片の単離を試みたが、抗原特異的なクローンは単離できなかった。

また、様々な魚種由来のIgMを検出するための抗体を作製するため、魚類IgMに保存されたアミノ酸配列領域をコードするペプチドおよび組換えタンパク質を用いてウサギを免疫し抗血清を得た。これらの本抗血清はいずれもウエスタンブロット解析で魚類IgMを検出可能であったが、ELISA法では魚類IgMを検出できなかった。

さらに、ほ乳類においてDNAワクチンの抗

原提示能を促進することが報告されている Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) 遺伝子をヒラメで同定し、本遺伝子を用いた DNA ワクチンを開発した。抗原遺伝子を LAMP-1 遺伝子と融合し発現用プラスミドに組み込むことにより、抗原遺伝子のみを組み込んだ場合と比べて有意に抗原に対する抗体価が上昇した。

これらの成果は、魚類を免疫した際、より効果的に免疫を付与する手法を開発する上で役立つものである。

#### 4-2. 魚類特異的抗体産生細胞の分離および一細胞からの抗体遺伝子の増幅

ヒラメ血中の白血球を対象にヒラメ抗体に対するウサギ抗血清およびマウスモノクローナル抗体を用いて標識を試みた。ヒラメ血中の抗体陽性白血球は全白血球の10%未満であり、その中から抗原特異的な B 細胞を単離することが困難であるため、目的とする抗体遺伝子を解析することが難しいことが示された。

本研究でいくつかの魚種を対象に抗体の性状を解析したところ、種々の魚類のうちチョウザメは血中に様々な抗原に対して特異的な抗体を多く含み、血中の抗体産生細胞数も多いことをみいだした。そこで、抗原特異的な抗体を産生する1細胞から RNA を抽出し、免疫グロブリン遺伝子断片を増幅するため、チョウザメ末梢血白血球を対象とした。チョウザメ抹消白血球に対して蛍光標識した病原細菌を反応させ、蛍光がみられた細胞をマイクロキャピラリーで採取した。蛍光がみられた5つの細胞から cDNA を合成したところ、1つのサンプルから免疫グロブリン遺伝子の増幅が確認された。

本研究により、抗原と結合する白血球細胞を単離し cDNA 合成する手法が開発された。今後、本手法を発展し他の魚種にも応用することにより、魚類においても抗原特異的な抗体遺伝子を増幅し人工的に組換え抗体分子を作出することが可能となると期待される。

#### 4-3. 魚類の液性獲得免疫に関わる分子の同定および種々の条件下における発現動態の解析

異なる水温で飼育したヒラメを *E. tarda* 死菌で免疫した際に脾臓で発現変動する遺伝子を調べるため、マイクロアレイ解析を行った。*E. tarda* 死菌の投与に伴い、多くの遺伝子で mRNA 量の変化がみられた。とくに、インターフェロン (IFN)  $\gamma$  で発現が誘導されることがほ乳類で報告されている遺伝子において、発現動態への水温の影響がみられた。抗原投与による特異抗体の成立は水温に大きく影響を受けることから、IFN $\gamma$  により制御される遺伝子群が特異抗体の成立に深く関わる可能性が考えられた。

アジュバントを用いて免疫した際の免疫応答についてヒラメを用いて解析した。アジュ

バントとしてフロイントコンプリートアジュバントを用い、ヒラメを細菌のホルマリン死菌で免疫したところ、菌体に対する抗体価が顕著に上昇した。マイクロアレイを用いた解析により、アジュバントの添加により IFN $\gamma$  遺伝子および IFN $\gamma$  応答遺伝子の発現上昇が抑えられることが示された。

さらに、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子解析により、新規の I 型 IFN 遺伝子も含め64種類の主要なサイトカイン遺伝子を同定したほか、情報伝達因子遺伝子群についても cDNA クローニングを行い塩基配列を決定した。

これらの成果は未だに不明な点の多い魚類免疫機構について、新たな知見を付与するものである。

#### 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12件)

1. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Molecular cloning and expression analysis of NOD-like receptor 5 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) after injection with two different formalin-killed pathogenic bacteria and poly (I:C), *Dev Comp Immunol* (査読有) 2017, 67:481-484.
2. Jirapongpaioj W, Hirono I, Kondo H, Development and evaluation of polyclonal antisera for detection of the IgM heavy chain of multiple fish species, *J Immunol Methods* (査読有) 2017, 449:71-75.
3. Rondón-Barragán I, Nozaki R, Hirono I, Kondo H, LAMP-1-chimeric DNA vaccines enhance the antibody response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Fish Shellfish Immunol* (査読有) 2017, 67:546-553.
4. Hu Y, Yoshikawa T, Chung S, Hirono I, Kondo H, Identification of 2 novel type I IFN genes in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Fish Shellfish Immunol* (査読有) 2017, 67:7-10.
5. Lyu ZZ, Zhao BB, Koiwai K, Hirono I, Kondo H, Identification of endonuclease domain-containing 1 gene in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fish Shellfish Immunol* (査読有) 2016, 50:43-9.
6. Kaneshige N, Jirapongpaioj W, Hirono I, Kondo H, Temperature-dependent regulation of gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney after *Edwardsiella tarda* formalin-killed cells, *Fish Shellfish Immunol* (査読有) 2016, 59:298-304.
7. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Identification and expression analysis of suppressors of cytokine signaling (SOCS)

- of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, Fish Shellfish Immunol (査読有) 2016、58:145-152.
8. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Temperature-dependent regulation of gene expression in poly (I:C)-treated Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Fish Shellfish Immunol (査読有) 2015、45(2):835-40.
  9. Zhao B, Katagiri T, Kondo H, Hirono I, Comparative analysis of two types of CXCL8 from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Dev Comp Immunol (査読有) 2015、52(1):37-47.
  10. Zou GG, Nozaki R, Kondo H, Hirono I, Cloning and expression analysis of three novel CC chemokine genes from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Fish Shellfish Immunol (査読有) 2014、40(2):507-13.
  11. Thanasaksiri K, Sakai N, Yamashita H, Hirono I, Kondo H, Influence of temperature on Mx gene expression profiles and the protection of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, against red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection after poly (I:C) injection, Fish Shellfish Immunol(査読有) 2014、40(2):441-5.
  12. Kondo H, Kawana Y, Suzuki Y, Hirono I, Comprehensive gene expression profiling in Japanese flounder kidney after injection with two different formalin-killed pathogenic bacteria, Fish Shellfish Immunol (査読有) 2014、41(2):437-40.
- [学会発表](計25件)
1. Jirapongpairoj W, Hirono I, Kondo H, Identification and characterization of Fc receptor-like proteins in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, 平成30年度日本水産学会春季大会、2018年3月、東京海洋大学、品川区
  2. 高瀬研志、安倍裕喜、野崎玲子、原川昭宏、横田昌樹、廣野育生、近藤秀裕、抗濾胞刺激ホルモン抗体の誘導によるニジマスの成熟阻害、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年3月、東京海洋大学、品川区
  3. 安本玖太郎、小祝敬一郎、平岡潔、廣野育生、近藤秀裕、非免疫チヨウザメ血清からの抗原特異抗体の精製および性状解析、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年3月、東京海洋大学、品川区
  4. Kondo H, Kaneshige N, Chung S, Hirono I, Application of gene expression profiling in vaccine developments、Biotechnology Havana 2017、2017年12月、Havana、Cuba
  5. Jirapongpairoj W, Hirono I, Kondo H, Development of a novel peptide antibodies for immunoglobulin M heavy chain detection in various fish species、日本水産学会85周年記念シンポジウム、2017年9月、東京海洋大学、品川
  6. Takase K, Nozaki R, Harakawa A, Yokota M, Hirono I, Kondo H, Induction of autoantibody against follicle stimulating hormone (FSH) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by injection of recombinant FSH protein、日本水産学会85周年記念シンポジウム、2017年9月、東京海洋大学、品川
  7. 廣澤英里子、廣野育生、近藤秀裕、LPS接種によるインターフェロン 発現誘導に及ぼすフロイントコンプリートアジュバントの影響、平成29年度日本魚病学会秋季大会、2017年9月、宮崎市、宮崎
  8. Kondo H, Freund's adjuvants enhance antibody responses and suppress the upregulation of IFN and IL-12 mRNA levels in Japanese flounder、18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish、2017年9月、Belfast、Ireland
  9. Jirapongpairoj W, Hirono I, Kondo H, Development of peptide antibody for immunoglobulin detection in fish、10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture、2017年9月、Bali、Indonesia
  10. Kondo H, Yoshikawa T, Nozaki R, Hirono I, NGS analysis of cytokine gene expression profiles revealed the changes of absolute mRNA levels after poly(I:C) treatment in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*、11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference、2017年6月、Honolulu、Hawaii
  11. 高瀬研志、野崎玲子、廣野育生、近藤秀裕、ニジマス FSH 組換えタンパクの接種による抗 FSH 自己抗体の誘導、第19回マリンバイオテクノロジー学会、2017年5月、東北大学、仙台
  12. Chung S, Hirono I, Kondo H, Effects of FCA on the FKC vaccine efficiency against *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder、平成29年度日本魚病学会春季大会、2017年3月、日本大学、藤沢市
  13. Rondón-Barragán I, Nozaki R, Hirono I, Kondo H, Enhancement of antibody response by LAMP1 chimeric antigen in a DNA vaccine、2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology、2016年6月、Portland、Maine
  14. Lyu Z, Zhao B, Koiwai K, Hirono I, Kondo H, Identification and characterization of Endonuclease domain-containing 1, a novel non-specific nuclease in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*、平成27年度日本魚病学会秋季大会、2015年9月、東京大

- 学、東京
15. Chung S, Kondo H, Hirono I, Identification and characterization of Thrombospondin-1a of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, 平成 27 年度日本魚病学会秋季大会、2015 年 9 月、東京大学、東京
  16. Kondo H, Aoka S, Kaneshige N, Hirono I, Identification of the genes involved in antigen presentation and T-cell development in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to evaluate the vaccine efficacy, 17th EAAP Conference, 2015 年 9 月、Las Palmas, Spain
  17. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Identification and expression analysis of suppressor of cytokine signaling (SOCS) in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, 13th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2015 年 6 月、Murcia, Spain
  18. Kondo H, Thanasaksiri K, Kaneshige N, Hirono I, Different rearing temperatures strongly influence on both type I and II interferon signaling, 13th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2015 年 6 月、Murcia, Spain
  19. Zhao B, Katagiri T, Kondo H, Hirono I, Function analysis of two type of IL-8 from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, 平成 27 年度日本魚病学会春季大会、2015 年 3 月、東京海洋大学、品川区
  20. 吉川堯希、Thanasaksiri K、近藤秀裕、廣野育生、ヒラメよりクローン化した新規 I 型インターフェロン(I 型 IFN-3)の解析、平成 27 年度日本魚病学会春季大会、2015 年 03 月 28 日、東京海洋大学、品川区
  21. Kaneshige N, Kondo H, Hirono I, Effect of temperature on innate immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), 7th International Symposium on Aquatic Animal Health, 2014 年 9 月、Portland, Oregon
  22. 兼重慶恵、近藤秀裕、廣野育生、ヒラメ T-bet および GATA 遺伝子の構造および発現解析、平成 26 年度日本魚病学会秋季大会、2014 年 9 月、九州大学、福岡
  23. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Identification of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, 平成 26 年度日本魚病学会秋季大会、2014 年 9 月、九州大学、福岡
  24. 兼重慶恵、近藤秀裕、廣野育生、病原微生物に対するヒラメの初期免疫応答に及ぼす水温の影響、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月、北海道大学、函館
  25. Thanasaksiri K, Hirono I, Kondo H, Effects of temperatures on global gene expression

of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* treated with poly (I:C)、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月、北海道大学、函館

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~h-kondo/genome/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

近藤 秀裕 (KONDO, Hidehiro)  
東京海洋大学・学術研究院・准教授  
研究者番号：20314635

### (2)研究分担者

廣野 育生 (HIRONO, Ikuo)  
東京海洋大学・学術研究院・教授  
研究者番号：00270926