

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450288

研究課題名(和文) 魚類の細胞内LPSセンサーの探査およびその認識機構の解明

研究課題名(英文) Research on the fish cytosolic LPS sensor and its mechanism

研究代表者

引間 順一 (Hikima, Junichi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：70708130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 魚類における初めての細胞内LPS認識センサーの発見を目的として、魚類細胞内における細胞内寄生性細菌LPS認識機構に関与するインフラマソーム関連遺伝子の同定およびその認識機構を解明することを計画した。トラフグのインフラマソーム関連遺伝子をクローン化した。トラフグの腎臓細胞ではLPS、ナイジェリシン、シリカ結晶およびアラムの刺激によって炎症性サイトカイン遺伝子の発現が強く誘導されることから、これらの誘導に何らかの形でインフラマソームが関与していると推察された。また、メダカにおいて、PYDドメインをもつNLR遺伝子、およびCaspase-1遺伝子をクローン化し、Caspase-1の活性を確認した。

研究成果の概要(英文)： To discover the first sensor to recognize LPS in the cytosol, the genes consisted of inflammasome were cloned in Fugu (Takifugu rubripes). These genes were significantly induced in the kidney cells stimulated with nigericin, silica and alum. Furthermore, medaka (*Oryzias latipes*) NLR-PYD and Caspase-1 genes were also cloned and the caspase-1 activity were demonstrated and confirmed. These suggest that there is probably an inflammasome-like activation system in fish.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：トラフグ NLR カスパーセ1 インフラマソーム メダカ LPS

1. 研究開始当初の背景

養殖場において魚介類の感染症が多発し、その経済的損失は甚大な額に及んでいる。養殖魚介類の微生物感染症への防除対策として、効果的なワクチンの開発や耐病性魚が必要である。特に、有効なワクチンの開発が困難な細胞内寄生性細菌においては、効果的な疾病対策が急務である。実際に、エドワジェラ症、ノカルジア症や類結節症等の細胞内寄生性の病原細菌は、養殖場において大きな問題となっているのが現状である。

病原細菌やウイルスが宿主へ侵入すると、これらの病原微生物が持つ特徴的な分子パターン（病原微生物関連分子パターン、PAMPs）を認識して、I型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生を促すような自然免疫メカニズムが存在することが知られている。それらのPAMPs認識受容体には、細胞膜上で働くToll様受容体（TLR）ファミリー、細胞質内で機能して膜貫通ドメインを持たないRIG-I様受容体（RLR）やNOD様受容体（NLR）ファミリーがあり、魚類においても多くの受容体に関する知見がある。しかし、グラム陰性細菌のPAMPsとしては最も重要な分子の1つ、LPSを認識する受容体は未だ魚類では同定されていない。哺乳類のTLR4はLPS認識受容体としてよく知られている。しかし、魚類では多くの魚種でTLR4遺伝子の欠損が見られるばかりか、TLR4遺伝子をもつコイ科のゼブラフィッシュではTLR4がLPSを認識せず、NF- κ Bも活性化しないことが報告されている（Sepulcre *et al.*, *J. Immunol.*, 182: 1836-45, 2009）。最近、哺乳類においてNLRの1つであるNLRP3（インフラマソームという複合分子を形成する）がTLR4に非依存的に細胞内のLPS認識機構を担っていることが明らかとなった（Kayagaki *et al.*, *Nat. Immunol.*, 341: 1246-9, 2013）。この発見は、TLR4が無くてもインフラマソームの働きにより、細胞内において病原性細菌由来のLPSが認識され、病原体排除が行われることを意味している。しかしながら、魚類においてNLRP3のホモログは特定されておらず、複数のNLRファミリー遺伝子が存在することが分かっているのみでその分類や機能は全く未知である。脊椎動物におけるLPS認識機構の起源を探り、魚類LPS認識センサーの探索する上でもNLRファミリー遺伝子の同定とLPS認識に関わる機能解明は非常に重要である

2. 研究の目的

魚類ではLPS刺激に対して炎症反応や貪食活性等の免疫応答があるにも関わらず、TLR4を介したLPS認識機構が欠損しているばかりか、細胞内のLPS認識機構も不明である。そこで申請者は、未だ不明な細胞内LPS認識機構に、魚類のLPS認識を担う受容体（センサー）が存在しているのではないかと考えた。

本研究事業では、魚類における最初のLPS認識センサーの発見を目的として、魚類細胞内における細胞内寄生性細菌のLPS認識センサー遺伝子の同定およびその認識機構を解明する。これらの研究成果は、魚類の自然免疫分野の進展に大きく貢献し、細胞内寄生性細菌に対する新しいワクチン開発への門戸を開くものである。

3. 研究の方法

魚類において細胞内LPS認識センサーとしての可能性の高いインフラマソーム複合体を標的として研究を進める。まずインフラマソームを構成する遺伝子群の網羅的同定を行う。次いで、LPS刺激に強く発現誘導される遺伝子をLPS認識センサー遺伝子の候補として特定し、LPS認識機構におけるIL-1活性化メカニズムについて解明する。さらに、魚類インフラマソーム（センサー分子）により細胞内寄生細菌を増殖抑制するか検討する。将来的に、魚類の細胞内寄生性病原体に対する効果的な新しい細胞内アジュバントを開発することを目標とする。

4. 研究成果

本研究事業では、魚類における初めての細胞内LPS認識センサーの発見を目的として、魚類細胞内における細胞内寄生性細菌LPS認識機構に関与するインフラマソーム関連遺伝子の同定およびその認識機構を解明することを計画している。H26およびH27年度で、トラフグのインフラマソーム関連遺伝子をクローン化し、NLRファミリー遺伝子はNLR-C10およびNLR-C12遺伝子が最も有力な候補であると考えられたが、これらの2つの遺伝子には、インフラマソームを形成するためのPYDドメインを持たないことが分かった。そこでトラフグゲノムを再度詳細に探査したが、PYDドメインをもつNLR分子は見つけることが出来なかった。また、LPS認識において実際に結合するCaspase-4/11について、魚類のゲノムを網羅的に探査したところ、哺乳類のCaspase-4/11遺伝子に相同な魚類の遺伝子は全く見つからず、Caspase-1のみがこのサブファミリーで確認できた。以上のことから魚類のインフラマソームを介した炎症反応誘導機構は、哺乳類のものとは異なっていることが示唆された。しかしながら、これまでの研究成果からトラフグの腎臓細胞ではLPS、ナイジェリシン、シリカ結晶およびアラムの刺激によって炎症性サイトカイン遺伝子の発現が強く誘導されることから、これらの誘導に何らかの形でインフラマソームが関与していると推察される。我々の解析では、メダカ等の他魚種において、PYDドメインをもつNLR遺伝子が発見されているため、これらの魚種を用いて、Caspase-1によるIL-1の活性化試験を行い、活性を確認

した。

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 13 件)

- (1) **Hikima J.**, Morita M, Kinoshita S, Basu M, Biswas G, Kono T, Sakai M. Molecular characterization and expression analysis of tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3/A20) gene from Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Fish Pathology*, 52(1):15-22 (2017) (査読有)
- (2) Kim YK, Lee JS, Jung JW, **Hikima J.**, Ohtani M, Jang HB, Nho SW, Cha IS, Park SB, Lee JH, Aoki T, Jung TS. Characterization of a specific monoclonal antibody against immunoglobulin light kappa/L1 chain in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 60:88-96 (2017) (査読有)
- (3) Biswas G, Nagamine R, **Hikima J.**, Sakai M, Kono T. Inductive immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) treated with recombinant IFN- γ , IFN- γ rel, IL-4/13A and IL-4/13B. *International Immunopharmacology*, 31: 50-56 (2016) (査読有)
- (4) Morimoto T, Biswas G, Kono T, Sakai M, **Hikima J.** Immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with particulate silica. *Fish and Shellfish Immunology*, 49: 84-90 (2016) (査読有)
- (5) Maekawa S, Chiang YA, **Hikima J.**, Sakai M, Lo CF, Wang HC, Aoki T. Expression and biological activity of two types of interferon genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48: 20-29 (2016) (査読有)
- (6) Biswas G, Bilen S, Kono T, Sakai M, **Hikima J.** Inflammatory immune response by lipopolysaccharide-responsive nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Developmental and Comparative Immunology*, 55: 21-31 (2016) (査読有)
- (7) Sakai M, Biswas G, Kono T, **Hikima J.**, Yokoyama H. Detection of *Kudoa amamiensis* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Fish Pathology*, 50(3): 119-122 (2015) (査読有)
- (8) Quynh NT, **Hikima J.**, Kim YR, Fagutao FF, Kim MS, Aoki T, Jung TS. The cytosolic sensor, DDX41, activates antiviral and inflammatory immunity in response to stimulation with double-stranded DNA adherent cells of the olive flounder,

Paralichthys olivaceus. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2): 576-583 (2015) (査読有)

- (9) Biswas G, Kinoshita S, Kono T, **Hikima J.**, Sakai M. Evolutionary evidence of tumor necrosis factor super family members in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*): Comprehensive genomic identification and expression analysis. *Marine Genomics*. 22: 25-36 (2015) (査読有)
- (10) Takashi Aoki, Tomokazu Takano, Jun-ichi Hikima. DNA vaccine-mediated innate immune response triggered by PRRs in teleosts. *Fisheries Science* (review), 81: 205-217 (2015) (査読有)
- (11) Bilen S, Biswas G, Otsuyama S, Kono T, Sakai M, **Hikima J.** Inflammatory responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with an inflammasome-inducing agent, nigericin. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(2): 222-30 (2014) (査読有)
- (12) Adamek M, Steinhagen D, Irnazarow I, **Hikima J.**, Jung TS, Aoki T. Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2): 151-159 (2014) (査読有)
- (13) Kinoshita S, Biswas G, Kono T, **Hikima J.** and Sakai M. Presence of two tumor necrosis factor (tnf)- α homologs on different chromosomes of zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Genomics*, 13:1-9 (2014) (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 引間順一、池田大介、和泉幹久、森本和月、河野智哉、酒井正博、竹山春子、青木 宙、水澤奈々美、渡部終五、木下政人. メダカ腸管における IL-17 の役割を明らかにするための IL-17A/F1 変異体のトランスクリプトーム解析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学(東京、品川)、平成 29 年 3 月 26 日 ~ 30 日
2. Koshin Mihara, Shun Maekawa, Han-Ching Wang, Takashi Aoki, Tomoya Kono, Masahiro Sakai, Jun-ichi Hikima. Functional characterization of recombinant interleukin (IL)-17A/F1 in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*). The 10th IMT-GT UNINET Conference 2016, Prince of Songkla University (Hat Yai, Thailand), Desember 1-2, 2016.
3. Natsuki Morimoto, Tomoya Kono, Masakazu Kondo, Masahiro Sakai, Jun-ichi Hikima. A Molecular Adjuvant Based on the Pattern Recognition System Using Toll-Like Receptor 5 and Bacterial Flagellin Genes in Teleost Fish. The 10th IMT-GT UNINET

- Conference 2016, Prince of Songkla University (Hat Yai, Thailand), Desember 1-2, 2016.
4. Jun-ichi Hikima. Cytosolic pattern recognition system in fish. The Third Symposium for Different Field Exchange by Tenure Track Researchers in Tokyo University of Marine Science and Technology (The Front Line in Fisheries Science: Biosciences and Environmental Sciences in Fisheries), Tokyo University of Marine Science and Technology (Shinagawa campus, Tokyo), November 11, 2016.(招待講演)
 5. 引間順一、森本和月、河野智哉、酒井正博、竹山春子、青木 宙、木下政人 . インターロイキン 17A/F1 遺伝子変異メダカの構築 . 平成 28 年度日本魚病学会秋季大会、近畿大学農学部 (奈良キャンパス) 平成 28 年 9 月 7 日 ~ 8 日 .
 6. Nastuki Morimoto, Shun Maekawa, Han-Ching Wang, Takashi Aoki, Kono Tomoya, Masaniro Sakai, Jun-ichi Hikima. Establishment of ASC-knockout medaka using CRISPR/Cas system. The 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (NBRP Medaka and Zebrafish Joint International Meeting), NBRP (Okazaki, Aichi), August 20 – 21, 2016.
 7. Masahiro Sakai, Takashi Morimoto, Gouranga Biswas, Tomoya Kono, Jun-ichi Hikima. Immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) stimulated with particulate silica and alum. International Conference on Fish and Shellfish Immunology 2016, University of Maine (Portland, Maine, USA), June 26-30, 2016.
 8. Goshi Nishi, Jun-ichi Hikima, Masahiro Sakai, Tomoya Kono. The expression analysis of *perl* gene in Fugu, *Takifugu rubripes* administrated with immunostimulants. International Conference on Fish and Shellfish Immunology 2016, University of Maine (Portland, Maine, USA), June 26-30, 2016.
 9. Jun-ichi Hikima, Koshin Mihara, Shun Maekawa, Han-Ching Wang, Takashi Aoki, Tomoya Kono, Masahiro Sakai. Functional characterization of recombinant interleukin (IL)-17A/F1 in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*). International Conference on Fish and Shellfish Immunology 2016, University of Maine (Portland, Maine, USA), June 26-30, 2016.
 10. Masahiro Sakai, Gouranga Biswas, Koshin Mihara, Jun-ichi Hikima, Tomoya Kono. Immune regulation in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) treated with recombinant cytokines; IFN- γ , IL-4/13 and IL-17. The 7th World Fisheries Congress in Busan, Busan Bexco (Busan, Korea), 23-27 May, 2016.
 11. Jun-ichi Hikima, Koji Ebisu, Tomoya Kono, Masahiro Sakai. Cytosolic CpGs induce DHX9 and DHX36 pathway mediated through MyD88 in teleosts. The 7th World Fisheries Congress in Busan, Busan Bexco (Busan, Korea), 23-27 May, 2016.
 12. 引間順一、三原耕心、前川 峻、王 涵青、青木 宙、竹山春子、河野智哉、酒井正博 . トラフグ頭腎細胞における組換え IL-17A/F1 による免疫応答 . 第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、北海道大学函館キャンパス (函館、北海道)、平成 28 年 5 月 28 日 ~ 29 日 .
- 〔図書〕(計 3 件)
1. Aoki T, Hikima J. Prevention And Treatment Of Diseases, Section 2.2. Diagnosis – PCR Detection. In: Fish Diseases (Ed. Takashi Aoki), Food and Agricultural Sciences, Engineering and Technology Resources, Eolss Publishers/UNESCO, Co. Ltd., UK (ISBN- 978-1-78021-040-7), pp 42-50, 2016.
 2. Aoki T, Hikima J. Fish And Shellfish Bio-Defense, Section 1. Innate Immunity In Fish. In: Fish Diseases (Ed. Takashi Aoki), Food and Agricultural Sciences, Engineering and Technology Resources, Eolss Publishers/UNESCO, Co. Ltd., UK (ISBN- 978-1-78021-040-7), pp 84-95, 2016.
 3. Takahashi Y, Hikima J. Diseases Caused By Bacterial Pathogens In Saltwater, Section 5. Vibriosis. In: Fish Diseases (Ed. Takashi Aoki), Food and Agricultural Sciences, Engineering and Technology Resources, Eolss Publishers/UNESCO, Co. Ltd., UK (ISBN- 978-1-78021-040-7), pp 228-237, 2016.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/staff/hikima.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

引間 順一 (Hikima, Jun-ichi)
宮崎大学・農学部。准教授

研究者番号： 70708130

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()