

マダイ仔稚魚の成長に伴う免疫関連遺伝子の発現解析

無津呂淳一¹, 家戸敬太郎^{1*}, 村田 修¹, 熊井英水^{1,2}

(種苗生産・養殖グループ)

¹近畿大学水産研究所, ²近畿大学大学院農学研究科

* kei67kato@nara.kindai.ac.jp

獲得免疫は、軟骨魚類以上の脊椎動物において観察される特異的な生体防御機構であり、一度病原体が感染することでその病原体を記憶し、再び同一の病原体が感染したときに効果的にそれを排除することができる。獲得免疫の担い手はT細胞とB細胞と呼ばれるリンパ球であり、これらの細胞は分化の段階で起こる遺伝子再編成により細胞ごとにすべてが異なったT細胞レセプター(TCR),あるいはB細胞レセプター(BCR)を持っており、病原体を特異的に認識することができる。このような獲得免疫機構を利用して疾病防除に利用されてきたのがワクチンであり、魚類養殖でもマダイイリドウイルスワクチンなどが開発され、効果を上げている。しかしながら、仔稚魚期におけるワクチン投与は、有効性が証明されているワクチンであるにもかかわらず、獲得免疫機能が発達していないために十分な効果が得られない場合があり、仔稚魚期におけるワクチンの最適投与時期を決定することは非常に重要であるといえる。これまでもコイ、ニジマス、カサゴなどの魚種を用いて抗原や魚病細菌の攻撃試験から仔稚魚の抗体産生の有無について検討した報告があるが¹⁾、機能的なT細胞やB細胞がいつ出現するのかということについては詳細には検討されていなかった。

本研究ではT細胞への分化を誘導するGATA-3, T細胞とB細胞の遺伝子再編に参与するRag-1, IgM抗体の重鎖(IgM-H), T細胞の細胞表面レセプターであるTCR α , および抗原ペプチドの生成に参与する免疫プロテアソームの構成成分であるLMP7²⁾といった免疫関連遺伝子を単離し、それらをマーカー分子に用いて遺伝子発現の変化

を解析することにより仔稚魚期における特異免疫の発達過程を明らかにすることを目的とした。

試料および方法

供試魚 マダイ免疫関連遺伝子のクローニングには白浜実験場にて500Lのパンライト水槽で約9ヶ月間飼育したマダイ稚魚を用いた。

2004年4月28日に白浜実験場の生簀にて人工授精より得たマダイ受精卵を水温22°Cの500Lのパンライト水槽で飼育した。サンプリングは孵化後-1, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 60日目に行い、Real Time PCRのサンプルとした。

1st strand cDNA 合成 マダイ稚魚から頭腎を摘出し、QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)を用いてTotal RNAを抽出した。これを鋳型としてOligo (dt)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen)およびM-MLV逆転写酵素(Promega)を用いた逆転写反応により1st strand cDNAを合成した。

マダイ免疫関連遺伝子のクローニング Fig.1にマダイ免疫関連遺伝子のクローニングに使用したプライマー部位とその配列を示した。これらのプライマー対と鋳型として前述の1st strand cDNAを用いてマダイIgM-HについてはD-J領域からCH4領域までの約1,050 bpを、GATA-3については中央付近からその約300 bp下流の部位までを、TCR- α についてはその中央付近の約200 bpを、Rag-1については開始コドンの約1,000 bp下流の部位から約1.7 kbpを、およびLMP7については中央付近の約200 bpをPCRによりそれぞれ増幅した。これらの遺

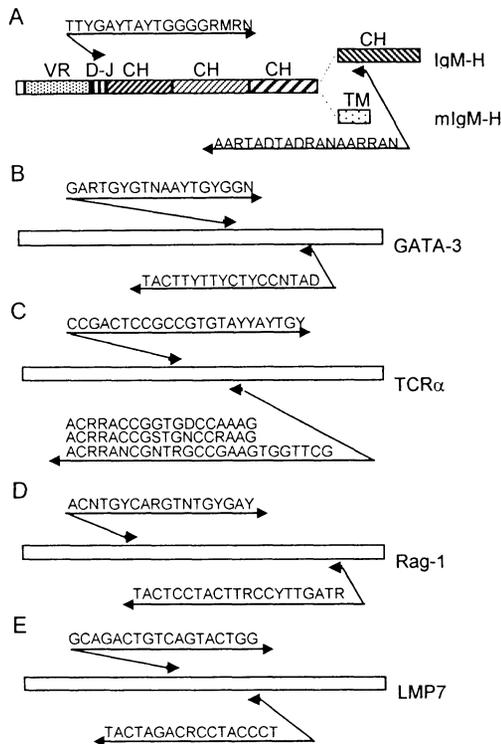


Figure 1. Primers for the isolation of cDNA fragments encoding red sea bream IgM-H (A), GATA-3 (B), TCRα (C), Rag-1 (D) and LMP7 (E). These primers were designated based on the following nucleotide sequences, Trout IgM-H (X83372), flounder IgM-H (AB052744 and AF226284), zebrafish IgM-H (AF406819 and AF281480), mouse GATA-3 (BC062915), human GATA-3 (BC003070), zebrafish GATA-3 (NM_131211), zebrafish TCRα (AAG31714, AF424545 and AF425590), *Takifugu rebripes* TCRα (AAF97794), flounder TCR (BAB82550 and BAB61895), channel catfish TCRα AAA99774 and AAB02652), *Tetraodon Nigroviridis* TCRα (CAC86241), trout TCRα (AAA98477), damselfish *sp.* TCRα (AAO88983 and AAO89007), mouse Rag-1 (NP_033045), human Rag-1 (NP_000439), chicken Rag-1 (AAA49051), *Xenopus* Rag-1 (AAA03068), trout Rag-1 (U15663), zebrafish Rag-1

伝子断片を Topo TA cloning kit (Invitrogen) 用いてプラスミドベクターにサブクローニングした後, QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを精製し, インサートの塩基配列を CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter)を用いて決定した。

Real Time PCR のための鋳型DNAの調製
 サプリングしたマダイ仔稚魚から QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)を用いて全魚体から Total RNA を抽出した。さらに混入するゲノムDNAを可能な限り除去するために DNase I で処理し, これを鋳型として Random 6 mers と M-MLV 逆転写酵素を

用いた逆転写反応により 1st strand cDNA を合成し, Real Time PCR の鋳型DNAとした。

Real-time PCR 用のプライマー作成
 cDNA クローニングから得られたマダイ IgM-H, GATA-3, Rag-1, LMP7 および NCBI から得たマダイβ-actin (AB036756)の塩基配列を基に Real-Time PCR 法に用いるプライマーを設計した(Table 1)。プライマー配列の決定は, Primer 3 ソフトウェアを用いて行った。

検量線の作成 Real Time PCR 法により 1st strand cDNA 中のマダイ IgM-H, GATA-3, Rag-1, LMP7 およびβ-actin のコピー数を測定するためにそれぞれの検量線を作成した。Real Time PCR 法による測定は SYBR[®] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara), 及び Smart Cycler[®] II System (Takara)を用いて行い, 各プラスミドクローン(10³-10¹⁰ コピー)を鋳型として Table 1 に示したプライマー対を用いた Real Time PCR (反応条件: 95°C-10 秒, 55°C-20 秒, 72°C-15 秒)によりサイクルタイム(Ct: x) 値を測定した。検量線の作成は, 3 ラウンドの測定で得られた Ct の平均値に対するプラスミドクロンのコピー数(乗数: y)として算出した。なお, その他の条件に関してはマニュアルに従って設定した。近似式は, 以下のとおりである。

$$\text{IgM-H: } y = -0.3096x + 14.237 \quad (R^2 = 0.9988)$$

$$\text{Gata-3: } y = -0.2558x + 13.724 \quad (R^2 = 0.9999)$$

$$\text{Rag-1: } y = -0.2874x + 13.85 \quad (R^2 = 0.9971)$$

$$\text{LMP7: } y = -0.2679x + 13.359 \quad (R^2 = 0.9988)$$

$$\beta\text{-actin: } y = -0.2805x + 13.344 \quad (R^2 = 0.9980)$$

Real Time PCR マダイ IgM-H, GATA-3, Rag-1 および LMP7 の発現量は, マダイβ-actin に対する相対的発現量として算出した。まず, 1st strand cDNA を鋳型として検量線作成の場合と同様の条件にて Real Time PCR を行い, マダイ IgM-H, GATA-3, Rag-1, LMP7 およびβ-actin の Ct 値を測定した。次いで, 得られた Ct 値と前述の検量

Table 1. Nucleotide sequences of primers for Real Time PCR

gene name	sence	anti-sence
IgM-H	CACCTGCGTTGTTACACATTCA	GACGCTGAAGTTTTCTCCTCAA
GATA-3	CAGAATCGCCCTCTCATCAA	AGCGTCGTCGTTGTCGTTT
Rag-1	ACCATCACTCGGCGCTTT	TGTCTTCCATCCCATTTCTCTCTC
LMP7	GGAGAGACTCCTGGCCAAA	TGCCTCTGTAACCCAGCATC
β -actin	TGGACTTCGAGCAGGAGATG	TTCATGATGCTGTTGTAAGT

線から 1st strand cDNA 中に含まれる IgM-H, GATA-3, Rag-1 および LMP7 のコピー数を算出し, β -actin の 10⁴ コピーに対するそれぞれのコピー数を相対的な発現量とした (Fig. 2)。

結 果

Fig. 3 にマダイ仔稚魚の成長に伴う

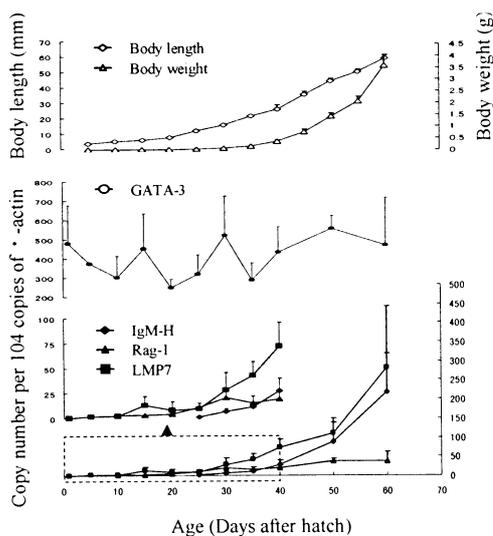


Figure 2. Quantitative expression profiles of IgM-H, Rag-1, LMP7 and GATA3 from red sea bream aged from 1-60 day after hatch generated from Smart cyclor II system. Total RNA from whole body of red sea bream was digested with DNase I and reverse transcribed using a random hexamers as primer, then equivalent aliquots of 1st strand cDNA were applied to measurement of copy number with Real Time PCR. Quantitative results are presented as mean (\pm standard deviation) copies of target gene per 104 copies of β -actin after normalization. Alteration of body length and weight during the study period is presented by upper graph.

IgM-H, GATA-3, Rag-1 および LMP7 の発現変化を示した。

Real Time PCR 法による測定では, 検出限界以下のため孵化後 15 日目までは

IgM-H の発現を確認することができず, 20 日目において初めてその発現が確認された。IgM-H の発現は, 40 日目まで徐々に上昇し, 40 日目以降は急激に上昇した。

Rag-1 の遺伝子発現は孵化後 10 日目から観察されており, 孵化後 20 日目から 30 日目まで緩やかに上昇した後, 40 日目までは同様のレベルで推移し, その後再び緩やかに上昇した。

LMP7 の遺伝子発現は孵化後 1 日目からすでに観察されており, 試験終了時まで上昇傾向にあった。また孵化後 15 日目をピークに一過的な発現上昇を示していた。

GATA-3 の遺伝子発現は, 15 日目および 30 日目に発現上昇の傾向が観察されたが, 試験終了までほぼ同様のレベルで推移していた。

考 察

Rag-1 の遺伝子発現は, ゼブラフィッシュを用いた解析では T 細胞の分化・成熟の場合である胸腺でもっと早く確認されており³⁾, マダイでももっとも早くその発現が確認される 10 日目前後から胸腺における T 細胞の遺伝子再編が始まっているものと考えられる。また, その時期から LMP7 の一過性の発現上昇が観察されることから, T 細胞の遺伝子再編後に起こる T 細胞の選択に関連して免疫プロテアソームによる抗原ペプチドの生成が活性化されている可能性が考えられる。しかしながら T 細胞における分化・成熟がいつご

ろ完結するかについては、今回のマーカー遺伝子の解析だけでは明らかではなく、TCR α などの他のマーカー遺伝子を用いてさらに詳細に解析していく必要があると思われる。リンパ球からのT細胞の分化に関与するGATA-3については15日目および30日目に発現上昇が観察されているが、それらがT細胞の分化に関連したものであるかどうかははっきりしておらず *in situ* ハイブリダイゼーションなどにより発現レベルだけでなく、発現部位などをさらに調査していく必要があると思われる。

一方、B細胞の分化・成熟に関しては、IgM-Hの発現が25日目以降に観察されることからそれまでに抗体産生が可能な成熟したB細胞が出現している可能性がある。また、20日目ごろからRag-1の発現上昇が観察されているが、それがB細胞における抗体分子の遺伝子再編と関連した発現変動であるかは、さらに詳細な解析が必要であると思われる。今後、膜型のIgM-HやIgMの軽鎖の遺伝子発現を解析することで明らかになっていくと思われる。

本研究における遺伝子発現解析の結果からマダイ仔稚魚におけるワクチンの接種開始時期を推定するならば、おそらく細胞性免疫を誘導する目的ならば20日目(BW=4.25 \pm 0.41 mg, BL=7.44 \pm 0.53 mm)以降、抗体産生を誘導する目的ならば30日目(BW=58.25 \pm 6.16 mg, BL=15.56 \pm 0.64 mm)以降にワクチンを接種するのが望ましいと結論することができる。しかしながら、仔稚魚期における抗体産生は、抗原の種類によ

り時期的なずれがあることが報告されており^{1,4)}、ワクチンを接種する時期を誤れば免疫寛容を引き起こす可能性があるなどマイナスに作用してしまうことが推測される。今後、遺伝子発現ばかりでなくタンパク質レベルでワクチン接種における免疫応答を解析していくことにより、これらの危険性をどれだけ回避できるようになるかを検討していく必要があると思われる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご協力、ご指導いただきました近畿大学水産研究所の皆様にご心から深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tatner MF. Natural changes in the immune system. In: The Fish Immune System, Organism, Pathogen, and Environment. G. Iwana and T. Nakanishi (eds) *Fish Physiology series*, 1996, **15**: 255-87.
- 2) Tanaka K, Kasahara M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.*, 1998, **163**: 161-76.
- 3) Willet CE, Cherry JJ, Steiner LA. Expression of zebrafish rag genes during early development identified the thymus. *Dev. Biol.* 1997; **182**: 331-41.
- 4) S. H. Lam, H. L. Chua, Z. Gong, T. J. Lam, and Y. M. Sin : Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol*, 2004, **28**, 9-28.