

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の異なる臓器における抗ウイルス免疫応答に関する研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 吉川 堯希 |
| 学位名 | 修士(海洋科学) |
| 学位授与機関 | 東京海洋大学 |
| 学位授与年度 | 2016 |
| URL | http://id.nii.ac.jp/1342/00001509/ |

修士学位論文

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の
異なる臓器における
抗ウイルス免疫応答に関する研究

平成 28 年度

(2017 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋生命科学専攻

吉川 堯希

目次

| | |
|--|---|
| 第1章 序論 | 1 |
| 第1節 日本の海面養殖の現状..... | 1 |
| 第2節 養殖魚のウイルス感染症..... | 1 |
| 第3節 魚類の抗ウイルス応答..... | 2 |
| 第4節 魚類の IFN..... | 3 |
| 第5節 魚類のリンパ系組織..... | 5 |
| 第6節 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析..... | 5 |
| 第7節 本研究の目的..... | 6 |
| 第2章 材料および方法 | 7 |
| 第1節 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析..... | 7 |
| 1. サンプルリング | 7 |
| 2. 次世代シーケンサーによる網羅的な発現遺伝子解析 | 7 |
| 2-1. RNA 抽出..... | 7 |
| 2-2. cDNA ライブラリーの調製および次世代シーケンサーによる解析 | 7 |
| 第2節 各遺伝子の発現解析..... | 8 |
| 1. PCR を用いた発現解析..... | 8 |
| 1-1. RNA 抽出 2-1-2. 組織からの全 RNA 抽出 | 8 |
| 1-2. reverse transcript-PCR (RT-PCR) による mRNA 蓄積量の解析..... | 8 |
| 1-3. RT-定量 PCR (RT-quantitative PCR; RT-qPCR) による mRNA 蓄積量の解析 | 9 |
| 第3節 新規 IFN の構造解析 | 9 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1. 分子系統解析 | 9 |
| 第3章 結果 | 11 |
| 第1節 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析..... | 11 |
| 第2節 新規I型IFN様遺伝子..... | 12 |
| 第4章 考察 | 13 |
| 第1節 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析..... | 13 |
| 第2節 新規I型IFN様遺伝子..... | 14 |
| 第3節 総括..... | 15 |
| 謝辞..... | 16 |
| 参考文献..... | 17 |

第1章 序論

第1節 日本の海面養殖の現状

日本は四方を海に囲まれていることから水産業が盛んである。養殖生産量は平成26年現在100万トン程度と水産の総生産量（480万トン）の20%以上を占め（<http://www.fao.org/fishery/en>）、重要な産業となっている。中でも、海面魚類養殖は1960年代から行われるようになり、平成27年度には約25万トンが生産されている。現在の日本の主な海面養殖対象魚種は、ブリ類（約14万トン）およびマダイ *Pagrus major*（約6万4千トン）である。これらはいずれも温水性の魚種であり主に西日本を中心に養殖されている。北日本でもギンザケ *Oncorhynchus kisutch*（約1万4千トン）の生産が盛んである。近年、完全養殖が可能となったクロマグロ *Thunnus orientalis* も盛んに養殖されており、平成27年度の生産量はギンザケよりも多い約1万5千トンとなった。一方、本研究で対象とするヒラメ *Paralichthys olivaceus* は約2千5百トン生産されている⁽¹⁾。

第2節 養殖魚のウイルス感染症

養殖業が盛んに行われるようになるにつれ、高密度飼育環境の養殖場では種々の感染症が問題となってきた。養殖場では、細菌症、ウイルス症、真菌症および寄生虫症が発生しているが、とくに細菌症およびウイルス症は甚大な被害を引き起こすことから、様々な対策がなされている⁽²⁾。

細菌症については、水産用医薬品として多くの抗菌薬が認可されているが、近年の食の安全・安心に対する消費者の関心の高まりから抗菌薬の使用が敬遠されている。また、ウイルス感染症については現在効果的な治療薬は存在しない。これらのことから魚がもつ免疫系を利用したワクチンを用いた感染症防除への期待が高まっており、平成28年度には組み合わせの異なる17種類のワクチン

の使用が認可されている。

本研究で扱うヒラメの養殖は多くの場合、集約的な掛け流しによる陸上養殖によって行われており、高密度での飼育によるストレスや感染魚との接触などによって周年で感染症が発生している。国内域では細菌感染症ではエドワジェラ症⁽³⁾やレンサ球菌症⁽⁴⁾、ウイルス感染症ではヒラメラブドウイルス症⁽⁵⁾、ウイルス性出血性敗血症⁽⁶⁾などが被害を及ぼしている。

第3節 魚類の抗ウイルス応答

第2節で述べたように、水産養殖の現場において、より効果的なワクチンの開発が期待されているが、全ての感染症に対して実用的なワクチンは開発されていない。ワクチンは魚類の免疫系を応用していることから、より効果的なワクチンを開発するためには魚類の免疫系についての知見が必要となる。

水中は病原微生物の生存にも適した環境であることから、魚類は鱗や粘液など、体表に特別な生体防御機構を備えている⁽⁷⁾。一方、魚類は他の脊椎動物と同様、自然免疫系および獲得免疫系からなる免疫系を有している⁽⁸⁾。

魚類の自然免疫では哺乳類の場合と同様に、病原ウイルスが魚類体内に侵入し細胞に感染すると、宿主細胞はウイルスのゲノムである二本鎖 RNA などを病原体関連分子パターンとして認識し、細胞内の情報伝達分子を活性化する。これらの情報伝達分子は種々の転写因子の働きを活性化することで I 型インターフェロン (Interferon; IFN) の遺伝子発現を誘導し、細胞外への分泌を促進する⁽⁹⁾。

I 型 IFN は、I 型 IFN 受容体と結合し、Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) 回路などを介して様々な転写因子を活性化することで、種々の IFN 誘導遺伝子 (IFN stimulated gene; ISG) 群を誘導する⁽¹⁰⁾。ISG には、Mx タンパク質のように細胞内のウイルスの複製を阻害することにより、非

特異的な抗ウイルス作用を持つものがある⁽¹¹⁾。これらの遺伝子が協同的に働くことにより、個体は病原ウイルスの感染に対して抵抗性を示すようになる⁽¹²⁾。

一方、魚類の獲得免疫は脊椎動物のものと同様、液性免疫と細胞性免疫に分けられるが、ウイルスに対してはどちらの免疫も重要であると考えられている。とくに細胞性免疫はウイルスの感染防除に重要であると考えられる。I型 IFN は、細胞性獲得免疫の成立に重要な主要組織適合遺伝子複合体 I 遺伝子の発現を誘導することで、ウイルスに対する獲得免疫の成立を活性化する⁽¹³⁾。このような抗ウイルス応答は、ウイルスがもつ病原体関連分子パターンにより引き起こされることから、抗ウイルス応答の研究ではウイルスゲノムを模した分子が用いられる。その中でも、ポリイノシン酸ポリシチジル酸複合体 (polyinosinic-polycytidylic acid: poly I:C) は合成 2 本鎖 RNA であり、ウイルスの 2 本鎖 RNA を認識する toll 様受容体 3 によって認識される。したがって I 型 IFN の発現を強力に誘導する物質として様々な生物の免疫研究に広く利用されている。

魚類でも poly I:C によって I 型 IFN 系の応答が誘導されることが知られており、例えばヒラメにおいては poly I:C の筋肉内投与によってウイルス性出血性敗血症による死亡が抑制されることが知られている⁽¹⁴⁾。さらに poly I:C の投与によりマハタ *Epinephelus septemfasciatus* ではウイルス性神経壊死症⁽¹⁵⁾、大西洋サケ *Salmo salar*⁽¹⁶⁾ では伝染性脾臓壊死症、アメリカナマズ *Ictalurus punctatus* ではアメリカナマズウイルス症⁽¹⁷⁾ に対して抵抗性を示すことが明らかになっている。

第 4 節 魚類の IFN

哺乳類において IFN はその性状から I 型、II 型、III 型の 3 種のサブファミリーに分類される。I 型 IFN には IFN- α および IFN- β などがあり、ウイルス感染細

胞から分泌されて抗ウイルス免疫応答の中心的な役割を担っている⁽¹⁸⁾。II型 IFN は IFN- γ があり、主として抗原または分裂促進因子によって活性化されたナチュラルキラー細胞や T リンパ球などの免疫細胞によって分泌され、B 細胞やマクロファージを活性化する⁽¹⁹⁾。III型は IFN- λ があり、抗ウイルス活性や主要組織適合遺伝子複合体の発現を誘導し、I型 IFN と重複する生物活性を示す⁽²⁰⁾。

I型 IFN は魚類においても抗ウイルス応答において中心的に働く。魚類ではゼブラフィッシュ *Danio rerio*⁽²¹⁾、大西洋サケ⁽²²⁾およびトラフグ *Takifugu rubripes*⁽²³⁾などから複数種類の I型 IFN 遺伝子が同定されている。特にサケ科魚類では、大きく分類して4種類のサブタイプの I型 IFN 遺伝子が同定され各遺伝子の機能についても解析が進められており、太平洋サケの異なるサブタイプの I型 IFN は異なる発現動態および異なる ISG 誘導能を持つことが知られている^(24, 25)。

また魚類の I型 IFN はシグナルペプチドを除いた成熟ペプチド領域のシステイン残基数によってさらに二つのグループに分類されている。ゼブラフィッシュにおいてはシステイン残基数が2のグループは IFN alpha beta receptor 1/ Cytokine receptor family member b5 (IFNAR1/CRFB5) および IFN alpha beta receptor 2-1/ Cytokine receptor family member b1 (IFNAR2-1/CRFB1) の複合体の受容体と結合し、システイン残基数が4のグループは IFNAR1/CRFB5 および IFNAR2-2/CRFB2 の複合体の受容体に結合することから、それぞれの I型 IFN が異なる役割を担っていることが示唆されている⁽²⁶⁾。近年、イシビラメ *Scophthalmus maximus* においても2種類の I型 IFN 遺伝子が同定されており、それぞれ異なる発現動態を示し、異なる ISG を発現誘導することが報告されている⁽²⁷⁾。

私は、卒業研究でヒラメの新規 I型 IFN (jfIFN_2) の構造を決定し、poly I:C 投与後の遺伝子発現動態を解析した。その結果、jfIFN_2 はイシビラメの I型 IFN-

1 と高いアミノ酸同一性を示し、IFN ドメインおよびシステイン残基が保存されていることからイシビラメの IFN-1 と類似の機能を持つこと予想された。また、定量的 RT-PCR による発現解析により jfIFN_2 は poly I:C 投与により既報のヒラメ I 型 IFN (jfIFN_1) と比較して mRNA 蓄積量が顕著に上昇しており、抗ウイルス免疫応答の初期段階で重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

第 5 節 魚類のリンパ系組織

腎臓および脾臓は、いずれも魚類の重要なリンパ系器官として知られている。硬骨魚類の腎臓は頭腎と体腎二つの部位に大別され、そのうち頭腎は多くの魚で、ほ乳類の骨髄に対応する一次リンパ器官として働き、血球細胞の増殖・分化の場となると考えられている。また、貪食、抗原認識、抗体産生および免疫記憶といった、二次リンパ器官としての機能も有することが報告されている⁽²⁸⁾。

一方、硬骨魚類の脾臓は顎口動物に普遍的な二次リンパ器官として知られ、血中に進入してきた抗原や病原体に対して効率的に成熟した免疫担当細胞群が働くための場となる⁽²⁹⁾。

腎臓および脾臓は機能的に異なる臓器であるものの、魚類における機能的な違いについては不明な点が多いのが現状である。

第 6 節 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析

近年、生物の体内で起こる現象を網羅的に解析するための手法として、次世代シーケンサーを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析に注目が集まっている。次世代シーケンサーを用いることで、遺伝子配列情報が乏しい非モデル生物を対象とした研究であっても、大量の遺伝子配列情報が得ることが可能となるのみならず、異なるサンプル由来のライブラリーから得られた情報を比

較することで、サンプル間で発現変動する遺伝子についても解析することが可能である⁽³⁰⁾。

当研究室では、上記のような臓器間の違いを明らかにする目的で次世代シーケンサーを用いて腎臓、脾臓および末梢血由来の白血球で発現する遺伝子を網羅的に解析した。しかしながら、異なる臓器由来の白血球間で顕著な発現差異のある遺伝子はみつかったものの、病原体関連分子パターンの投与など免疫刺激をしていない白血球では臓器間で mRNA 蓄積量に差異のある免疫に関わる遺伝子は見いだされなかった⁽³¹⁾。

第7節 本研究の目的

魚類でも、poly I:C を投与すると腎臓および脾臓で抗ウイルス免疫応答が起こることが知られている。ヒラメにおいて poly I:C の投与により腎臓および脾臓において種々の IFN 関連遺伝子群の発現が上昇し、イリドウイルスの増殖を抑制することも確認されている⁽³²⁾。筆者は卒業研究において、ヒラメの jfIFN_2 が poly I:C の投与により、腎臓および脾臓で発現上昇することを示したが、本遺伝子がそれぞれの臓器において同様の作用を示すかどうかについては不明なままである。

そこで本研究では、poly I:C を筋肉内投与後に、腎臓および脾臓で発現する遺伝子を次世代シーケンサーにより網羅的に解析し、各臓器で発現パターンに差異のある遺伝子を同定することにより、二つの臓器の自然免疫応答における働きの違いを詳細に解析することを目的とした。

第2章 材料および方法

第1節 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析

1. サンプリング

全長約 12 cm のヒラメを、200 L の循環式水槽で 20 °C で飼育し馴致させた。次に、1 mg/ml に調製した poly I:C をヒラメ背側筋肉中に 100 μ l 注射した。注射前および注射後 3 および 24 時間後の個体から脾臓を採取し、RNA later 中 -20°C で保存した。

2. 次世代シーケンサーによる網羅的な発現遺伝子解析

2-1. RNA 抽出

採取したヒラメ脾臓に 500 μ l の RNAiso plus (Takara Bio, Japan) を加え、ポリトロンホモジナイザーを用いて組織を破碎した。組織破碎液に 100 μ l のクロロホルムを加えよく混合し、4 °C で 13,500 rpm、10 分間の遠心分離に供した。上清を回収し、当量のイソプロパノールを加えよく混合した後、4 °C で 15,000 rpm、15 分間の遠心分離に供した。得られたペレットを 100 μ l の RNase-free water (QIAGEN, Germany) に溶解し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて精製した。

2-2. cDNA ライブラリーの調製および次世代シーケンサーによる解析

精製した全 RNA 2 μ g を鋳型として、TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (Illumina, USA) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。作製した cDNA ライブラリーは MiSeq reagent kit version 2 300 cycles (Illumina, USA) および Illumina MiSeq (Illumina, USA) を用いて塩基配列を決定した。得られた配列データは Chung⁽³¹⁾により得られたものと併せて Trinity v2.1.1⁽³³⁾を用いてトリミン

グおよびアセンブルを行った。得られたコンティグについて、NCBI データベースに納められている魚類のタンパク質のアミノ酸配列と Blastx プログラム⁽³⁴⁾を用いて相同性検索を行った。また、各サンプル由来の配列データを用い、Trinity に付随する Differentially expressed genes 解析のためのプログラムを用いて解析し、各サンプル間で $p < 1e-3$ の信頼度で 4 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子について抽出した。

第 2 節 各遺伝子の発現解析

1. PCR を用いた発現解析

1-1. RNA 抽出

本章 2-2-1 で得られた全 RNA を鋳型として、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem、USA) を用いて cDNA を合成した。すなわち、0.5 μg の全 RNA に 2 μl 10 \times RT buffer、0.8 μl 25 \times dNTP mix、2 μl 10 \times RT random primers、1 μl MultiScribe reverse transcriptase、1 μl RNase inhibitor および 3.2 μl DEPC 処理水を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分、37 $^{\circ}\text{C}$ で 120 分および 85 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の反応に供した。反応後、反応液に滅菌蒸留水を加え 100 μl とした。

1-2. reverse transcript-PCR (RT-PCR) による mRNA 蓄積量の解析

次世代シーケンサーによる解析で、poly I:C 接種後発現変動していた遺伝子について、RT-qPCR により相対 mRNA 量を調べた。

全 RNA からの cDNA 合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems、USA) を用いた。抽出した 1 μg の全 RNA を PCR チューブに分注し、そこに 10 \times buffer を 2 μl 、25 \times dNTP Mix を 0.8 μl 、10 \times RT Random Primers を 2 μl 、MultiScribe Reverse Transcriptase を 1 μl および RNase inhibitor を 1 μl 加

え、DEPC 処理水で 20 μ l に調製した。その後、MyCycler (BioRad、USA) を用いて 25 $^{\circ}$ C で 10 分間、37 $^{\circ}$ C で 120 分間、85 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。ここに 80 μ l の DEPC 処理水を加えて希釈し、-30 $^{\circ}$ C で保存した。

作製した 1 μ l の cDNA 溶液に rTaq DNA ポリメラーゼを 0.2 μ l、10 \times PCR buffer を 2 μ l、2 mM dNTP mix を 2 μ l および 10 μ M に調製した各種プライマーを 0.4 μ l ずつ PCR チューブに分注し、滅菌蒸留水で 20 μ l に調製して PCR 反応液とした。MyCycler を用いて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間、続いて 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間 および 72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。反応終了後、PCR 産物を 1% のアガロースゲルを用いて電気泳動 (100 V、15 分間) し、増幅を確認した。なお、内在性コントロールとして elongation factor-1 α (EF-1 α) を使用した。用いたプライマーは表 1 に示した。

1-3. RT-定量 PCR (RT-quantitative PCR; RT-qPCR) による mRNA 蓄積量の解析

次世代シーケンサーによる解析で、poly I:C 接種後発現変動していた遺伝子について、RT-qPCR により相対 mRNA 量を調べた。定量 PCR 法による発現解析には、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo、Japan) を使用した。本章 1-2 で作製した cDNA を 2 μ l ずつ 96 穴プレート (Applied Biosystems、USA) へ分注し、qPCR Mix を 10 μ l、50 \times ROX reference dye を 0.4 μ l および 10 μ M に調整した各種プライマーセット (表 1) をそれぞれ 0.4 μ l 加え、滅菌蒸留水で 20 μ l にメスアップした。サンプルおよび各試薬を分注した後、96 穴プレートをシールし、7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems、USA) にセットした。50 $^{\circ}$ C で 20 分間、95 $^{\circ}$ C で 10 分間の変性の後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒、60 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとする反応を 40 サイクル行った後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間からなる Dissociation stage を加えた。また、データ解析は 7300 system

software version 1.3.1 (Applied Biosystems、USA) を用いて行った。また、各臓器 poly I:C 投与前の 0 h における mRNA 蓄積量を 1 として相対値を求め、poly I:C 投与後について有意水準 1% で t 検定を行った。

第 3 節 新規 IFN の構造解析

1. 分子系統解析

分子系統解析には DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の clustalw プログラムを用いた。NCBI データベースより魚類の I 型 IFN のアミノ酸配列を取得し、ヒラメの新規 IFN の EST 配列から演繹したアミノ酸配列とともにアライメントを行った。近接結合法により分子系統解析を行い、各ノードの信頼度はブートストラップ法 1,000 回の試行により評価した。

第3章 結果

第1節 次世代シーケンサーによる網羅的配列解析

次世代シーケンサーによる解析の結果、1 試験区当たり平均約 370 万リード、合計約 2,200 万リードの配列が得られた (表 2)。当研究室で過去に行われた各種臓器由来白血球の次世代シーケンサーデータ約 2,200 万リードと合わせ、約 4,400 万リードを用いてアセンブルを行った。アセンブルにより約 16 万配列のコンティグが得られ、約 13 万配列の遺伝子が予測された。平均コンティグ長は 986 bp となり、N50 値は 2,087 bp であった (表 3、表 4)。

これらの遺伝子について、NCBI データベース上の硬骨魚のタンパク質をコードするアミノ酸配列に対して相同性検索を行った結果、71,578 配列が相同性を示した。さらに、ゼブラフィッシュの全予測遺伝子に対して双方向 BLAST 検索を行った結果、13,343 配列がゼブラフィッシュの遺伝子のホモログとなることが予測された (表 5)。

第2節 次世代シーケンサーによる網羅的発現解析

得られたリード数をもとに遺伝子発現解析を行った結果、腎臓で 152 個、脾臓で 220 個の遺伝子で poly I:C 接種後に 0 時間後と比較して発現量に優位な差がみられた。これらの遺伝子のうち、2つの臓器いずれにおいても発現変動するものは 121 個であった。

アセンブルの結果で数塩基の違いから異なるものと認識された遺伝子を統合し mRNA 量が上昇していたもののみを抽出したところ、腎臓で 91 個、脾臓で 140 個の遺伝子がみいだされた。このうち、どちらの臓器でも上昇がみられた遺伝子は 79 個であった。

発現上昇が認められた遺伝子のうち、他魚種のサイトカイン遺伝子と相同性

を示した 18 配列に着目した。これらは、ヒラメの新規 I 型 IFN (jfIFN_3) を始めとしたヒラメにおける新規遺伝子 5 個を含んでいた。これらの遺伝子の発現動態は、poly I:C 投与 3 時間後に mRNA 蓄積量が増大する場合と 24 時間後に増大する場合に分類された (図 1)。各サイトカイン遺伝子の発現動態について、平均化した出現リード数を比較したところ、腎臓において発現差異がみられなかった遺伝子についてもサンプル間で poly I:C 投与後に上昇している傾向がみられた (表 6)。

また、上記のサイトカイン遺伝子以外で poly I:C 投与後に顕著に発現上昇がみられた遺伝子のうち、腎臓あるいは脾臓のみで発現上昇していた遺伝子について解析したところ、腎臓で 5 個、脾臓で 3 個の遺伝子について臓器特異的な発現上昇がみられた (表 7)。その中でも腎臓特異的な発現上昇がみられた Stanniocalcin-like 遺伝子および脾臓特異的な発現上昇がみられた Chymotrypsin-like 遺伝子について RT-PCR を行った結果、mRNA 蓄積量の個体差が大きかった (図 2)。他の遺伝子においても非特異的な増幅が確認されたことから、顕著な臓器間の発現動態の差異は確認できなかった。

第 3 節 新規 I 型 IFN 様遺伝子

ヒラメにおける新規サイトカイン遺伝子 5 個のうち jfIFN_3 について、出現リード数を既報のヒラメ I 型 IFN と比較した結果、mRNA 蓄積量が顕著に上昇していた (表 8)。また、jfIFN_3 についての RT-qPCR を行ったところ、腎臓、脾臓ともに poly I:C 投与 3 時間後に mRNA 蓄積量が最も多かった (図 2)。近接合法を用いた分子系統解析の結果、jfIFN_3 はイシビラメの IFN-2 と同一のクラスターに分類された (図 3)。

第4章 考察

第1節 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析

次世代シーケンサーによって得られた配列について Trinity を用いて解析を行った結果、161,391 本のコンティグおよび 131,773 個の遺伝子が予測された。これらの遺伝子について NCBI データベース上の硬骨魚由来のタンパク質アミノ酸配列に対して相同性検索を行った結果、71,578 配列が相同性を示した。しかし、魚類の総遺伝子数と比較して数が多いことから Trinity による解析で統合されなかった同一遺伝子由来のアイソフォームが残っている可能性が示唆されたため、ゼブラフィッシュの遺伝子について双方向 BLAST 検索によりホモログ数を予測したところ、13,343 配列がゼブラフィッシュの遺伝子のホモログとなることが予測された。ゼブラフィッシュの総遺伝子数がおおよそ 26,000 遺伝子⁽³⁵⁾であることから、硬骨魚類の遺伝子の約半数が網羅されていることが推測された。

本研究で発現上昇が認められた 152 個の遺伝子のうち、18 個の遺伝子はサイトカイン遺伝子であり、5 個の遺伝子は本研究で見つかった新規のものであった。18 個のサイトカイン遺伝子には主に白血球の走性に関与しているケモカインやその発現を誘導する IFN や腫瘍壊死因子、インターロイキン 1 などの炎症誘導性サイトカインなどがあった⁽³⁶⁾。経時的な発現動態を比較した結果、いずれの臓器においても、poly I:C 投与 3 時間後に mRNA 蓄積量が増大する遺伝子と、24 時間後に増大する遺伝子があることが示された。前者には、本研究で新規に見つかった jIFN_3 や炎症系サイトカインが含まれ、後者には炎症抑制系サイトカインであるインターロイキン 10⁽³⁷⁾が含まれていた。インターロイキン 10 については poly I:C によって誘導された炎症反応の抑制のために誘導されたと考えられる。

また、poly I:C 接種後に 121 個の遺伝子が両方の臓器で発現変動し、腎臓では

31、脾臓では 99 の遺伝子が臓器特異的に発現量に有意な差を示した。さらに詳細な解析を行うため、数塩基の差異で異なる遺伝子として分類されていた遺伝子を統合した上で poly I:C 接種後にリード数が増加した遺伝子のみに着目して比較を行った結果、79 個の遺伝子が両方の臓器で発現上昇を示したのに対し腎臓において 12 個、脾臓において 61 個の遺伝子で臓器特異的に発現変動がみられ、脾臓特異的に発現変動を示す遺伝子が多い傾向がみられた。しかしながら、サンプル間で平均化したリード数を用いて一方の臓器でのみ発現変動することが示された遺伝子について詳細な比較を行ったところ、脾臓でのみ発現上昇がみられた 4 つのサイトカイン遺伝子を含む多くの遺伝子が両方の臓器で類似した発現動態を示していた。また、腎臓および脾臓で発現量が顕著に異なる発現動態を示した遺伝子について RT-PCR によるより詳細な解析を行ったところ、個体差が大きく poly I:C 接種前後で顕著な差がみられなかった。特に腎臓で高い発現量を示した Stanniocalcin-like は血中のカルシウムイオン濃度を調節するホルモンであるが、腎臓に付着するスタニウス体で分泌される性質を持つ⁽³⁸⁾ことから、腎臓の採取時に含まれるスタニウス体の量によって個体差が生じ、それに伴う発現量の差が poly I:C による発現誘導と誤って解析されてしまったと考えられる。

第 2 節 新規 I 型 IFN 様遺伝子

本研究においてヒラメの新規 I 型 IFN である jfIFN_3 が同定された。RT-qPCR により mRNA 蓄積量を確認したところ、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析の結果と同様、poly I:C 接種後 3 時間に mRNA 蓄積量が上昇していた。jfIFN_3 は既報の jfIFN_1 および筆者が卒業研究で同定した jfIFN_2 と比較してリード数が多く、抗ウイルス免疫応答において重要な役割を担ってい

る可能性が示された。また分子系統解析の結果 jfIFN_3 はイシビラメの IFN-2 に相同性を持つことが示唆された。筆者が卒業研究で同定したヒラメの jfIFN_2 が相同性を示したイシビラメの IFN-1 は主として Mx タンパク質や ISG15 の誘導に関与しているのに対し、イシビラメの IFN-2 はイシビラメの IFN-1 より早期に発現量が上昇し、炎症誘導性サイトカインや主要組織適合遺伝子複合体の誘導に関与することが示唆されていることから⁽²⁷⁾、jfIFN_3 についても同様に抗ウイルス免疫応答の初期段階における白血球の遊走や抗原提示の活性化に関与する IFN である可能性が示唆された。I 型 IFN は抗ウイルス免疫応答において中心的な働きをもつことから、今後これら 3 種類のヒラメ I 型 IFN について詳細な機能解析を行うことによりヒラメの抗ウイルス免疫応答の新たな知見が得られることが期待される。

第 3 節 総括

本研究において、遺伝子発現解析により 251 遺伝子が poly I:C 投与後に発現変動することが示された。発現変動していた遺伝子には各臓器特異的に発現変動していたものもみられたが、詳細な解析を行った結果これらの遺伝子においても有意な差は確認されなかった臓器でも発現変動の傾向は同一であるか個体差によるものであり、各臓器間で顕著に発現動態に違いのある遺伝子を見いだされなかった。一方、18 個のサイトカイン遺伝子が poly I:C 投与後に発現変動するものとして同定された。そのうち 5 つは、新規 I 型インターフェロン遺伝子を含む新規サイトカイン遺伝子であった。サイトカインは免疫応答を調節する重要な因子であることから、今後、これらの遺伝子について詳細な機能を明らかにすることによりヒラメの抗ウイルス応答の全容を明らかにすることが可能となるものと期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導、ご助言を頂いた東京海洋大学ゲノム科学研究室の近藤秀裕准教授に心より御礼申し上げます。

本研究において適切なお助言、ご指導を頂いた同研究室の廣野育生教授に心より御礼申し上げます。

また、実験を遂行するにあたり数々のご指導、ご鞭撻を頂きました同研究室の野崎玲子研究員に厚く御礼申し上げます。

最後に数々のご指導、ご助言を頂きました同研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) 農林水産省, 平成 27 年漁業・養殖業生産統計, 2016.
- (2) 農林水産省, 水産用医薬品の使用について第 29 報, 2016.
- (3) 中津川俊雄. ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, 1983; 18: 99-101.
- (4) Nakatsugawa T. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*, 1983; 17: 281-285.
- (5) Kimura T, Yoshimizu M, GORIE S. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1986; 1: 209-217.
- (6) Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, Miyazaki T. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001; 47: 87-99.
- (7) 鈴木讓. 魚類の生体防御機構. 日本水産学会誌 2000; 66: 372-375
- (8) Levraud P, Boudinot, P. *The immune system of teleost fish*. Medecine Sciences, France. 2009
- (9) Zhang Y, Gui J. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012; 38: 193-202.
- (10) Oates A, Wollberg P, Pratt S, Paw H, Johnson S, Ho R, Wilks A. Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1 deficient human cell line. *Developmental Dynamics*, 1999; 215: 352-370.

- (11) Larsen R, Torunn P, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 2004; 78: 7938-7944.
- (12) Robertsen B. The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006; 20: 172-191.
- (13) Samuel C. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001; 14: 778-809.
- (14) Takami I, Kwon S, Nishizawa T, Yoshimizu M. Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by Poly (I: C) immunization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2010; 89: 109-115.
- (15) 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 Immunology*, 2014; 40: 441-445.
- (16) Jensen I, Albuquerque A, Sommer A, Robertsen B. Effect of poly I: C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002; 13: 311-326.
- (17) Plant K, Harbottle H, Thune R. Poly I: C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 2005; 29: 627-635.
- (18) Samuel C. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001; 14: 778-809.

- (19) Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004; 75: 163-189.
- (20) Kotenko S, Gallagher G, Baurin V, Lewis-Antes A, Shen M, Shah N, Langer J, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly R. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, 2002; 4: 69 - 77
- (21) Altmann S, Mellon M, Distel D, Kim C. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Virology*, 2003; 77: 1992-2002.
- (22) Robertsen B, Bergan V, Røkenes T, Larsen R, Albuquerque A. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2003; 23: 601-612.
- (23) Lutfalla G, Crollius H, Stange-thomann N, Jaillon O, Mogensen K, Monneron D. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics*, 2003; 4.1: 29.
- (24) Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009; 33: 547-558.
- (25) Svingerud T, Solstad T, Sun B, Nyrud M, Kileng Ø, Greiner-Tollersrud L, Robertsen, B. Atlantic Salmon Type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFN β /IFN γ -producing cells in fish lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 2012; 189: 5912-5923.

- (26) Zou J, Tafalla C, Truckle J, Secombes C. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *The Journal of Immunology*, 2007; 179: 3859-3871.
- (27) Pereiro P, Costa M, Díaz-Rosales P, Dios S, Figueras A, Novoa B. The first characterization of two type I interferons in turbot (*Scophthalmus maximus*) reveals their differential role, expression pattern and gene induction. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014; 45: 233-244.
- (28) Brattgjerd S, Evensen Ø. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Pathology Online*, 1996; 33: 55-65.
- (29) Espenes A, Press C, Dannevig B, Landsverk T. Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 1995; 279: 469-474.
- (30) Mutz K, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter J, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013; 24: 22-30.
- (31) Chung S. Identification and characterization of Thrombospondin-1a found from transcriptome sequencing of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Master thesis, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo. 2015
- (32) Zhou Z, Zhang B, Sun L. Poly (I: C) induces antiviral immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) that require TLR3 and MDA5 and is negatively regulated by Myd88. *PloS One*, 2014; 9: e112918.

- (33) Grabherr G, Haas J, Yassour M, Levin Z, Thompson A, Amit I. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 644-652.
- (34) Altschul F, Madden L, Schäffer A., Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman, J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 3389-3402.
- (35) Collins E, White S, Searle M, Stemple L. Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome Research*, 2012, 22.: 2067-2078.
- (36) Aoki T, Takano T, Santos M, Kondo H, Hirono I. *Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In: Fisheries for Global Welfare and Environment*, Memorial Book of the 5th World Fisheries Congress. Terrapub: Tokyo, Japan, 2008; 263-276.
- (37) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine*, 1991, 174: 1549-1555.
- (38) Tseng D, Chou M, Tseng Y, Hsiao C, Huang C, Kaneko T, Hwang P. Effects of stanniocalcin 1 on calcium uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009; 296: 549-557.

表 1 実験に使用した PCR プライマー

| 配列名 | 配列 (5' – 3') |
|------------------------------|----------------------|
| JfEF1a qPCR F | CTCGGGCATAGACTCGTGGT |
| JfEF1a qPCR R | CATGGTCGTGACCTTCGCTC |
| Chymotrypsin-like elastase F | GTGGTCAATGGAGTCGATGC |
| Chymotrypsin-like elastase R | AGCTTGGTGTTGATGCAGTG |
| Stanniocalcin-like F | GTGCAGGTACCAGCTCACTT |
| Stanniocalcin-like R | CAGCTGGACGGGTTGTTGTA |
| jfIFN-3 qPCR F | ACACAAGTACGACACCGCAA |
| jfIFN-3 qPCR R | TTGCTAGTCGGCACACATGT |

表 2 次世代シーケンサーによるトランスクリプトームで得られた配列リード

| 試験区 | リード数 |
|---------|------------|
| 腎臓 0 h | 3,975,094 |
| 腎臓 3 h | 3,534,734 |
| 腎臓 24 h | 3,507,416 |
| 脾臓 0 h | 4,053,317 |
| 脾臓 3 h | 3,672,318 |
| 脾臓 24 h | 3,388,575 |
| 計 | 22,131,454 |

表 3 先行研究におけるヒラメの臓器由来白血球の次世代シーケンサーデータ

| 組織 | リード数 |
|---------|------------|
| 血液由来白血球 | 7,183,305 |
| 腎臓由来白血球 | 7,604,634 |
| 脾臓由来白血球 | 7,114,523 |
| 計 | 21,902,462 |

表 4 次世代シーケンサーによるトランスクリプトームで得られたアセンブル結果

| | |
|----------------|---------|
| コンティグ数 | 161,391 |
| 遺伝子数 | 131,773 |
| 平均コンティグ長 (bp) | 986 |
| コンティグ N50 (bp) | 2,087 |

表 5 次世代シーケンサーにより得られた配列と既知硬骨魚類遺伝子の相同性解析

| | |
|--|--------|
| 対硬骨魚類タンパク質 相同性検索 (evalue:1e-3) | 71,578 |
| 対ゼブラフィッシュ遺伝子 双方向 BLAST 検索 (reciprocal top hit) | 13,343 |

表 6 poly I:C 投与後において発現量が増加していたサイトカイン遺伝子の各サンプルにおける出現リード数

| | 腎臓 | | | 脾臓 | | |
|---------------------------------|-----|-------|------|-----|-------|-------|
| | 0 h | 3 h | 24 h | 0 h | 3 h | 24 h |
| Tumor necrosis factor alpha | 7 | 79 | 2 | 11 | 237 | 5 |
| CC chemokine, Paol-SCYA105-like | 0 | 12 | 0 | 2 | 45 | 1 |
| Interleukin 11 alpha | 0 | 2 | 0 | 0 | 35 | 1 |
| CC chemokine, Paol-SCYA105 | 16 | 444 | 24 | 49 | 1,333 | 61 |
| CXC chemokine | 15 | 514 | 21 | 42 | 1,279 | 51 |
| Interleukin 12 p40 | 1 | 53 | 3 | 2 | 140 | 2 |
| Interleukin 1 beta | 0 | 38 | 0 | 1 | 72 | 0 |
| C-X-C motif chemokine 11-like | 24 | 286 | 25 | 23 | 537 | 55 |
| M17 homologue | 1 | 37 | 1 | 1 | 44 | 6 |
| C-X-C motif chemokine 9-like | 30 | 545 | 54 | 147 | 1,835 | 497 |
| Interleukin 27 beta subunit | 1 | 226 | 1 | 0 | 337 | 4 |
| Interleukin 8-like protein | 9 | 1,002 | 25 | 12 | 2,102 | 87 |
| CC chemokine-like molecule | 2 | 392 | 28 | 2 | 975 | 58 |
| Interferon-2 | 0 | 53 | 0 | 0 | 93 | 1 |
| CC chemokine | 2 | 38 | 96 | 3 | 46 | 99 |
| CXC chemokine | 1 | 1 | 119 | 1 | 5 | 74 |
| CC chemokine, Paol-SCYA106 | 7 | 82 | 829 | 63 | 108 | 1,924 |
| Interleukin 10 | 0 | 11 | 3 | 0 | 0 | 54 |

表 7 poly I:C 投与後により臓器特異的な発現上昇を示した遺伝子の各サンプルにおける出現リード数

| | 腎臓 | | | 脾臓 | | |
|--|-----|-------|-------|-----|-----|-------|
| | 0 h | 3 h | 24 h | 0 h | 3 h | 24 h |
| Stanniocalcin-like | 18 | 2,826 | 8,763 | 1 | 1 | 1 |
| Tissue alpha-L-fucosidase | 0 | 28 | 18 | 23 | 23 | 7 |
| E3 ubiquitin- ligase TRIM39-like | 5 | 2 | 40 | 6 | 5 | 58 |
| ADM-like | 1 | 6 | 32 | 4 | 3 | 7 |
| Proheparin-binding EGF-like growth factor isoform X2 | 1 | 75 | 202 | 1 | 0 | 1 |
| Cytochrome P450 26B1 | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 13 |
| Nuclear factor of activated T- cytoplasmic 2-like | 1 | 0 | 0 | 0 | 13 | 2 |
| Chymotrypsin-like elastase family member 2A | 1 | 0 | 0 | 0 | 953 | 4,522 |

表 8 ヒラメ I 型 IFN 遺伝子の各サンプルにおける出現リード数

| | 腎臓 | | | 脾臓 | | |
|---|--------------|----|-----|----|----|-----|
| | 0h | 3h | 24h | 0h | 3h | 24h |
| Novel interferon (jfIFN_3) | 0 | 53 | 0 | 0 | 93 | 1 |
| Interferon identified by previous study (jfIFN_2) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Interferon in the public databases(jfIFN_1) | Not detected | | | | | |

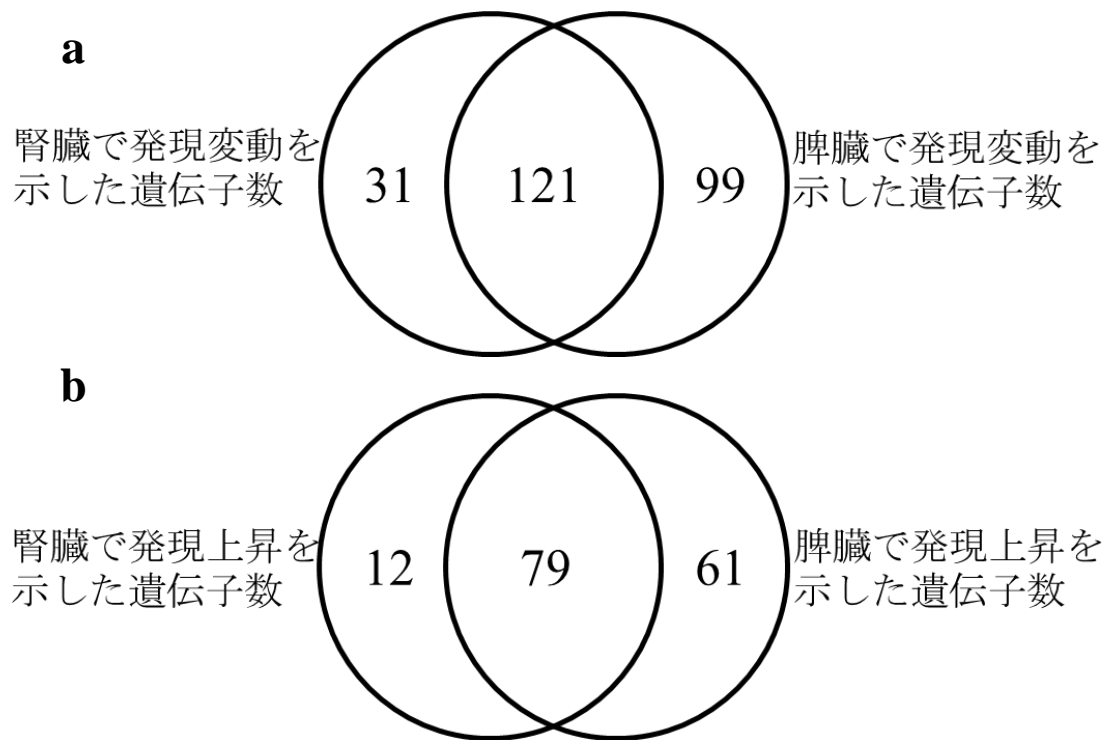


図 1 poly I:C 投与後のヒラメ腎臓および脾臓で mRNA 蓄積量に差のみられた遺伝子数

- a. 腎臓および脾臓で mRNA 蓄積量に変化がみられたトランスクリプト数
- b. 腎臓および脾臓で mRNA 蓄積量が上昇していた遺伝子数

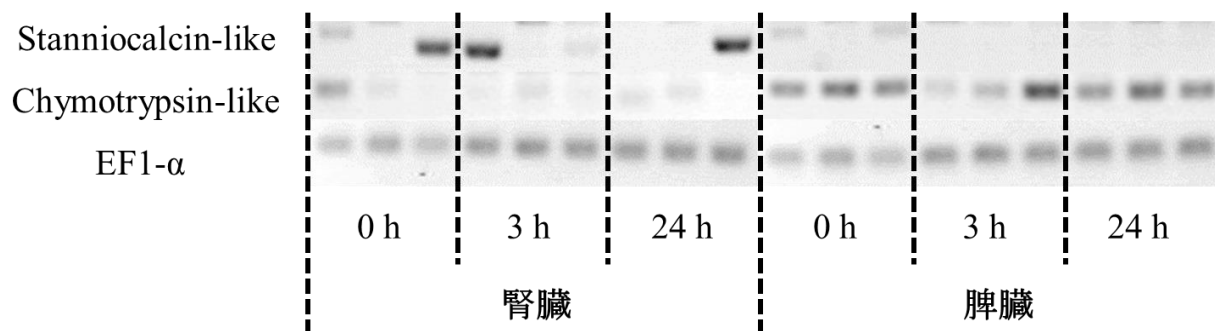


図 2 次世代シーケンサーによる発現解析においてそれぞれ腎臓および脾臓で顕著に mRNA 蓄積量が増加していた遺伝子についての RT-PCR 解析

次世代シーケンサーによる解析で臓器特異的な発現動態を示した遺伝子および EF-1 α における mRNA 蓄積量を RT-PCR によって定量した。全ての遺伝子は 30 サイクル分 PCR 反応を行った。

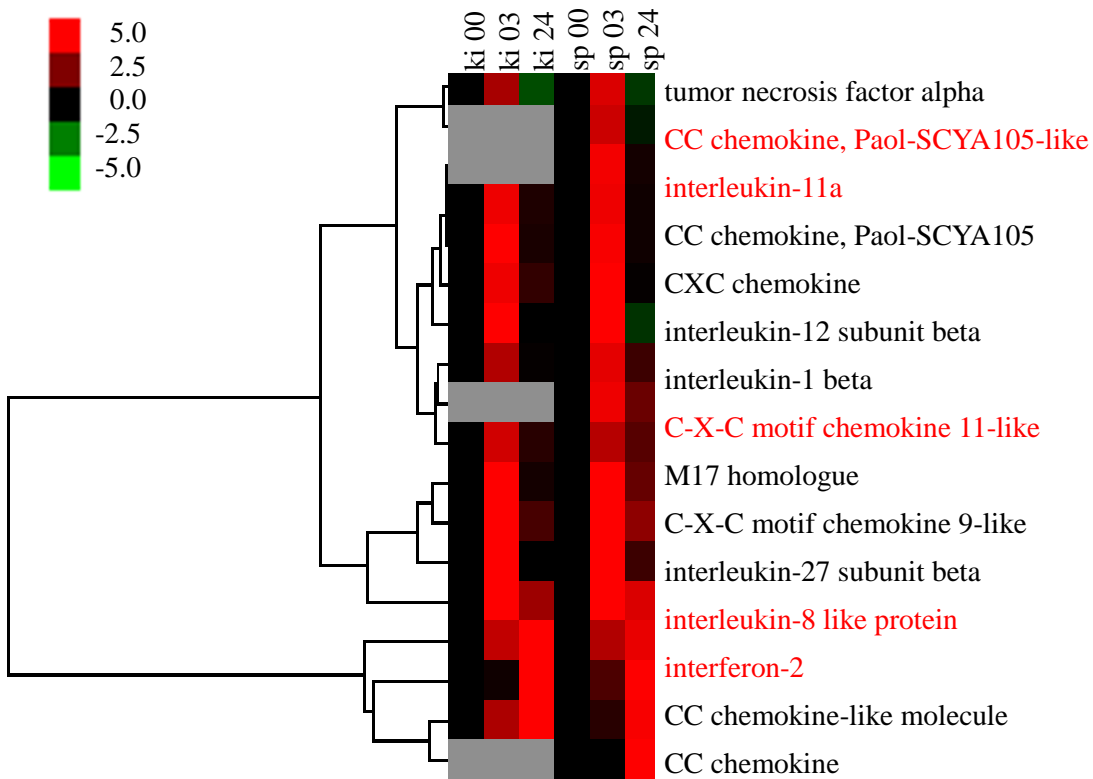


図 3 poly I:C 投与後において発現量の増加を示した 18 のサイトカイン遺伝子における発現解析

本研究で新規に同定された遺伝子は赤字で示した。また、各臓器の 0 時間と比較して発現量が上昇していた区画は赤色、減少していた区画は緑色、有意差が認められなかった区画は灰色で表示している。

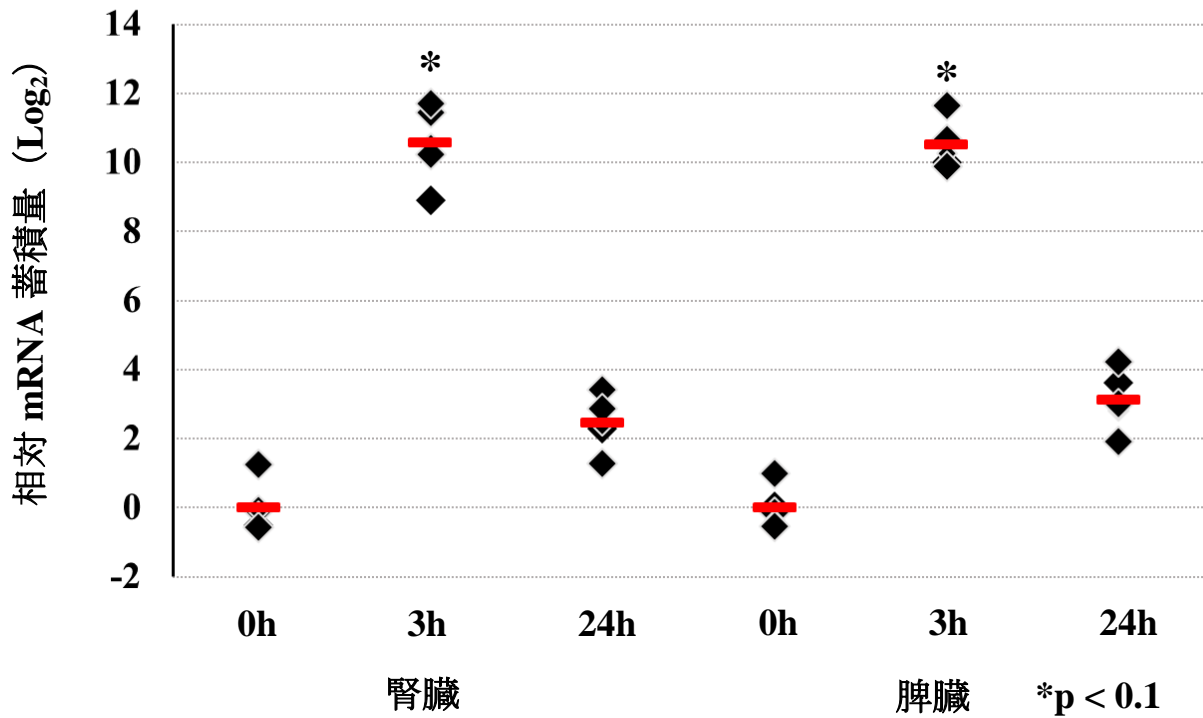


図 4 poly I:C 投与後の異なる臓器におけるヒラメ新規 I 型 IFN の mRNA 蓄積量
 各試験区における mRNA 蓄積量は EF-1 α の mRNA の相対値であり、腎臓および脾臓それぞれの 0 時間後の mRNA 蓄積量で基準化している。また、各臓器の 0 時間後の mRNA 蓄積量と比較し t 検定を行い、p 値を 0.01 として有意差が認められた区については*を付している。

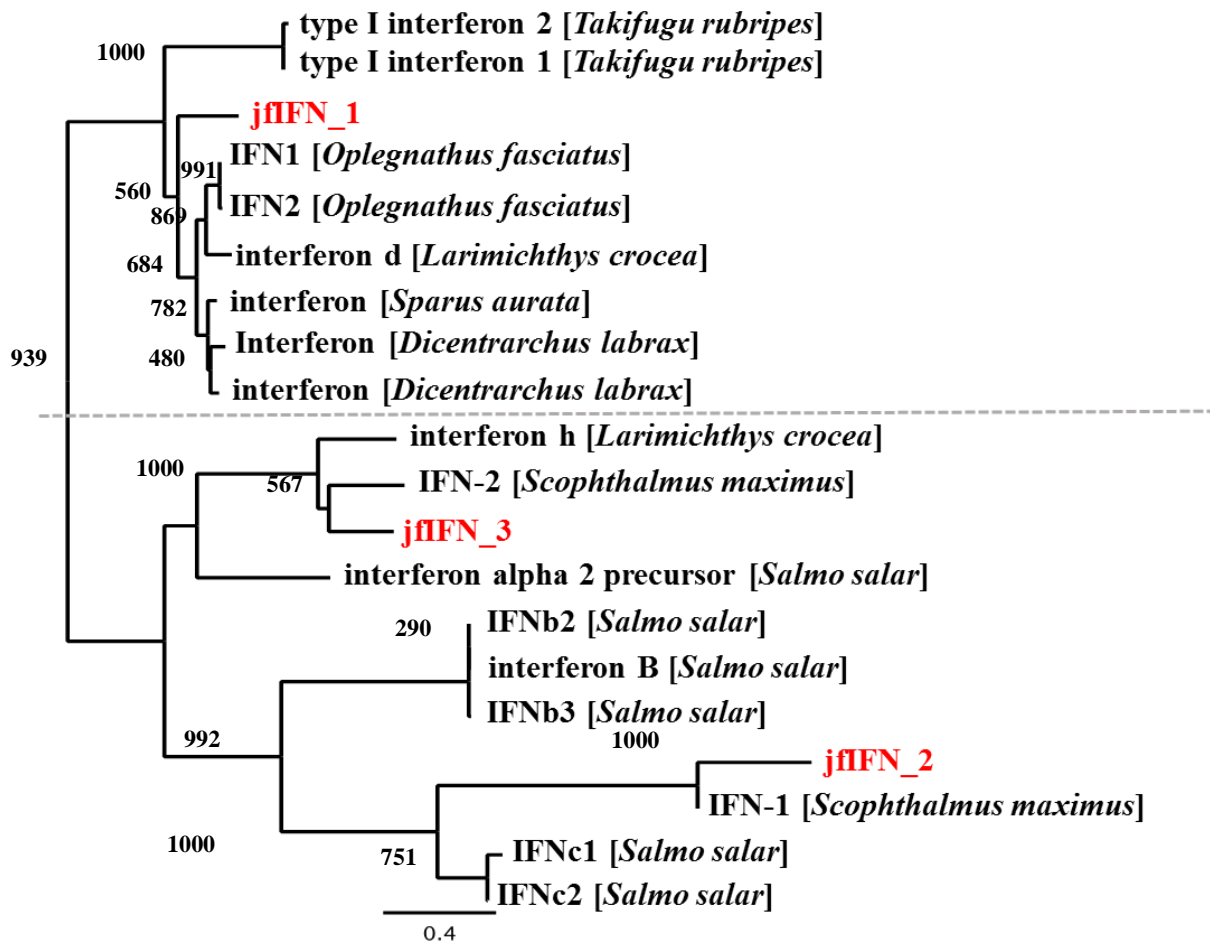


図 5 魚類 I 型 IFN の分子系統解析

新規ヒラメ I 型 IFN を含む硬骨魚類の I 型 IFN のアミノ酸配列を用いて、系統解析を行った。

解析に用いた各遺伝子のアクセッション番号を以下に示す。

Interferon [*Dicentrarchus labrax*] (CBN81667.1)、interferon [*Dicentrarchus labrax*] (CBN81666.1)、interferon h [*Larimichthys crocea*] (API68650.1)、interferon d [*Larimichthys crocea*] (API68651.1)、IFN1 [*Oplegnathus fasciatus*] (AFP94213.1) IFN2 [*Oplegnathus fasciatus*] (AFP94214.1)、jfIFN_1 (BAH84776.1)、interferon alpha 2 precursor [*Salmo salar*] (NP_001117042.1)、interferon B [*Salmo salar*] (ACI47369.1) IFNb2 [*Salmo salar*] (ACE75693.1)、IFNb3 [*Salmo salar*] (ACE75689.1)、IFNc1 [*Salmo*

salar] (ACE75692.1)、IFNc2 [*Salmo salar*] (ACE75694.1)、IFN-1 [*Scophthalmus maximus*] (AID59461.1)、IFN-2 [*Scophthalmus maximus*] (AID59462.1)、interferon [*Sparus aurata*] (CAT03224.1)、type I interferon 1 [*Takifugu rubripes*] (CAM82750.1)、type I interferon 2 [*Takifugu rubripes*] (CAM82751.1)