

# 博士論文

## コイ科魚類を用いた抗体生産方法の開発

平成 29 年 3 月

三重大学大学院 生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻 水圏生物利用学教育研究分野

額田 夏生

## 目 次

緒 論 .....	1
<b>第 I 章 ゼブラフィッシュを利用した抗体作製 .....</b>	<b>10</b>
I-1. 実験方法 .....	10
I-1-1. 実験材料および試薬 .....	10
I-1-2. 抗原タンパク質 hLGR3 LRR 発現 .....	10
I-1-3. 免疫試験 .....	11
I-1-4. 検出用タンパク質 TF-hLGR3 LRR 発現 .....	11
I-1-5. ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出 .....	12
I-2. 実験結果 .....	13
I-2-1. 抗原タンパク質 hLGR3 LRR 発現確認 .....	13
I-2-2. 検出用タンパク質 TF-hLGR3 LRR 発現確認 .....	14
I-2-3. ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出 .....	15
I-3. 考察 .....	16
<b>第 II 章 キンギョを利用した抗体作製およびドットブロット法による検出 .....</b>	<b>21</b>
II-1 実験方法 .....	21
II-1-1 実験材料および試薬 .....	21
II-1-2 抗原タンパク質の作製 .....	22
II-1-2-1 pCold TEE- EGFP-His プラスミド作製 .....	22
II-1-2-2 抗原タンパク質 EGFP-His 発現 .....	23

II-1-3	アジュバントの調製.....	23
II-1-4	免疫試験.....	24
II-1-5	ドットブロット法による水泡液中の抗 EGFP-His 抗体検出.....	25
II-2	実験結果.....	27
II-2-1	ドットブロット法による免疫賦活効果の確認.....	27
II-3	考察.....	28
<b>第 III 章</b>	<b>キンギョを利用した抗体作製および ELISA 法による検出.....</b>	<b>29</b>
III-1	実験方法.....	29
III-1-1	実験材料および試薬.....	29
III-1-2	抗原タンパク質 EGFP 発現.....	30
III-1-3	免疫試験.....	31
III-1-4	ELISA 法による EGFP 特異的抗体の検出.....	32
III-2	実験結果.....	34
III-2-1	抗原タンパク質 EGFP 発現.....	34
III-2-2	ELISA 法による抗原特異的抗体の検出.....	36
III-3	考察.....	39
<b>第 IV 章</b>	<b>抗 gIgM 重鎖抗体の作製.....</b>	<b>41</b>
IV-1	実験方法.....	41
IV-1-1	実験材料および試薬.....	41
IV-1-2	キンギョ水泡液および血液中の細胞の観察.....	42
IV-1-3	gIg 重鎖のクローニング.....	42

IV-1-4	抗 gIgM 重鎖抗体の作製.....	49
IV-1-4-1	pET22b(+)-gIgH CH3 プラスミド作製 .....	49
IV-1-4-2	抗原 gIgH CH3-His タンパク質発現とウサギへの免疫.....	49
IV-1-5	水泡液および血清中の gIgM 検出.....	51
IV-1-6	ウサギ血清からの抗 gIgM 重鎖抗体の精製.....	51
IV-1-7	水泡液中 gIgM の精製.....	52
IV-1-7-1	硫酸分画 .....	52
IV-1-7-2	イオン交換クロマトグラフィー .....	53
IV-1-7-3	ゲル濾過クロマトグラフィー .....	54
IV-1-7-4	水泡液中 gIgM 量の定量的検出 .....	54
IV-2	実験結果.....	56
IV-2-1	キンギョ水泡液および血液中の細胞の観察 .....	56
IV-2-2	gIg 重鎖の解析 .....	56
IV-2-2-1	gIg 重鎖 V 領域.....	56
IV-2-2-2	gIg 重鎖 J 領域 .....	62
IV-2-2-3	gIg 重鎖定常領域.....	64
IV-2-3	抗 gIgM 抗体を用いた水泡液および血中 IgM の検出.....	70
IV-2-4	ウサギ血清からの抗 gIgM 抗体の精製.....	73
IV-2-5	水泡液中 gIgM の精製.....	74
IV-2-6	水泡液中 gIgM の定量的検出.....	78
IV-2-7	ELISA 法を用いた水泡液由来 gIgM の定量的検出 .....	80
IV-3	考察.....	81

第 V 章 キンギョを用いた抗 hLGR3 抗体の作製.....	84
V-1 実験方法 .....	84
V-1-1 実験材料および試薬.....	84
V-1-2 免疫抗原タンパク質 His-hLGR3 LRR 発現 .....	85
V-1-3 検出抗原タンパク質 TF-hLGR3 発現.....	88
V-1-4 免疫試験.....	90
V-1-5 ドットブロット法による特異的抗体の検出.....	90
V-2 実験結果 .....	93
V-2-1 免疫抗原タンパク質 His-hLGR3-LRR 発現 .....	93
V-2-2 検出抗原タンパク質 TF-hLGR3 発現.....	94
V-2-3 ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出.....	95
V-3 考察 .....	97
総 括.....	98
謝 辞.....	101
参考文献.....	102

## 省略記号

本論文では以下の省略記号を用いた。

bp : Base pair

BSA : Bovine serum albumin

CBB : Coomassie brilliant blue

cDNA : Complementary deoxyribonucleic acid

CDR : Complementarity determining region

Da : Dalton

DAB : Diaminobenzidine

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

EGFP : Enhanced green fluorescent protein

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

gIgH : Goldfish immunoglobulin M heavy chain

gIgM : Goldfish immunoglobulin M

GPCR : G-protein-coupled receptor

HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

HRP : Horseradish peroxidase

Ig : Immunoglobulin

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

LB : Luria broth

LRR : Leucine rich repeat

MES : 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid

ORF : Open reading frame

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PVDF : Polyvinylidene difluoride

RNA : Ribo nucleic acid

S.D. : Standard deviation

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TBS : Tris buffered saline

TEE : Translation enhancing element

TF : Trigger factor

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 緒 論

抗体 (Immunoglobulin : Ig) は、免疫系をつくる最も基本的な糖タンパク質である。B細胞表面の膜結合型受容体として、あるいはB細胞が分化した形質細胞によって産生される分泌型抗体として、血液中や体液中に存在している。その働きとしては、体内に侵入してきた微生物やウイルスなどの異物を抗原として認識して結合することや、補体やマクロファージ、好中球といった貪食細胞などを活性化することが挙げられ、主に中和作用やオプソニン化、細胞溶解、炎症の誘発などによる異物の除去に関与している。抗体はその高い特異性や親和性から、様々な分析試薬、診断薬や治療薬として幅広く利用され、医薬開発のみならず生物化学や分子生物学の研究ツールとしても必要不可欠な存在となっている[1]。

特に、モノクローナル抗体を利用した抗体医薬品は分子標的バイオ医薬品開発の中心となっており、1986年に臓器移植時の急性拒絶反応の緩和を目的としたヒトCD3に対するマウスモノクローナル抗体が初の抗体医薬として米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) に認可されて以降、これまでの低分子医薬品では抜本的な治療薬が存在せず、副作用の強い薬しか利用できなかったガンや自己免疫疾患のような致死率の高い難治性疾患に対しても多くの承認を得ており、その地位を確固たるものにしつつある[2]。このように、抗体医薬品開発が著しく発展を続けている理由としては、①抗原に対して高い特異性と親和性を持ち、抗原以外には作用しないため副作用が少なく高い効果が期待できる、②多様な標的分子をターゲットにすることができる、③遺伝子工学的手法により、改変・改良が可能である、④基本骨格に高い共通点があるため



製造経験や知識を幅広く応用できる、などの低分子化合物開発には見られない利点が挙げられる[3]。

抗体医薬品の歴史は、岡田らによって発見された細胞融合法[4]を利用して、1975年に Köhler と Milstein らがモノクローナル抗体の作製に必要なマウスのハイブリドーマ作製技術を確立したことにはじまる[5]。当時、数多くのモノクローナル抗体の臨床応用が試みられたが、マウス由来の抗体を患者に投与すると、ヒト抗マウス抗体 (human anti-mouse antibody : HAMA) が患者の体内に産生され、人体への重篤な副作用が懸念された。しかし、遺伝子組換え技術の発展に伴い、マウス可変領域とヒト定常領域を組み合わせた「ヒト-マウスキメラ抗体」や、マウスの抗原と直接結合する CDR 領域のみマウス由来で他の領域はヒト由来である「ヒト化抗体」の作製法が開発され、異種抗原に対する免疫応答の問題を回避できるようになったことで、抗体医薬の研究開発が一気に加速した。現在では、ヒト抗体を作製する遺伝子改変マウスへ免疫する方法[6]や、ファージディスプレイによりヒト抗体遺伝子を組み込んだファージライブラリーから標的の抗体遺伝子を単離する方法[7-10]を用いて「完全ヒト型抗体」も作製されるようになった。また、1989年に G.Winter らが報告した抗体の VH あるいは VL ドメインのみからなるドメイン抗体[11]を先駆けとして、近年では抗体工学技術の発展によって、抗体の一部あるいは抗体様の機能を持った scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub> などの低分子化抗体の研究が積極的に進められている。低分子化抗体を用いることで、大腸菌や酵母での生産が可能となり CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いた場合と比べて低コストで製造できることや、分子サイズが小さくなることで IgG と比べて組織への移行性が高めることが可能である。

しかしながら、上述のような技術を用いたとしても抗体作製が困難な分子が多数存在する。その原因の一つとして、生体の獲得免疫が保有する自己と非自

己を識別する免疫寛容と呼ばれる仕組みが挙げられる。進化的に近縁な生物種においては、種間でよく保存されたタンパク質抗原や糖質、脂質など、すでに宿主動物の生体内に存在する物質に対しては非自己と認識することができず、特異性や力価の高い抗体が得られにくい場合が多い。これを回避する方法としては、系統的に離れた動物種を利用すること、抗原投与法を工夫すること、免疫系に欠陥を持つマウス（SCID.MRL/lpr など）を利用すること、抗原相同タンパク質遺伝子をノックアウトした動物を利用すること[12]などが挙げられる。その中でも系統的に離れた動物種を利用することについて、一般的な抗体作製法では、免疫動物としてマウスやラット、ウサギ、ヤギなどの哺乳動物が主に用いられているが、世界中では他にも様々な動物種を免疫動物とした研究がなされている。例えば、ラクダやサメの抗体は、可変領域がH鎖だけからなるシングルドメイン抗体で約 15 kDa と低分子であるため、微生物での発現が容易であることや抗体改変が容易であるといった利点がある[13-15]。ニワトリやダチョウは、卵黄中に抗体が移行・蓄積されるため、卵 1 個から獲得できる抗体量がおよそニワトリでは 80 mg、ダチョウでは 4 g と非常に多く、生産性が高いといった利点がある[16, 17]。軟骨魚類であるサメや鳥類は、哺乳動物との交差性も低いといった利点も挙げられる。

そこで本研究では、免疫動物として哺乳類と類似の獲得免疫を保有し、進化的に遠縁な魚類に着目した。抗体の産生に関わる獲得免疫の中核をなす分子は脊椎動物のうち、魚類、両生類、爬虫類、鳥類および哺乳類を包括する顎口類においてのみ確認されている。一方、ヌタウナギ類およびナツメウナギ類を含む円口類（無顎類）ではリンパ球やリンパ球系転写因子など獲得免疫の特徴は備わっているものの、免疫グロブリンスーパーファミリーに類似する免疫応答

に直接関わるようなリンパ球表面受容体は同定されておらず、哺乳類と類似の獲得免疫は備わっていないと考えられている[18]。

抗体の基本構造は、2本の相同な重鎖（H鎖）と2本の相同な軽鎖（L鎖）が、鎖間ジスルフィド結合および非共有結合を介してH鎖とL鎖、およびH鎖とH鎖で結合したY字型の4本鎖構造である（Fig. 1）。C末端側の領域は比較的变化に乏しく、定常領域（C領域）と呼ばれ、H鎖の定常領域をC<sub>H</sub>、L鎖の定常領域をC<sub>L</sub>と呼ぶ。ヒトをはじめとする哺乳類のC<sub>H</sub>にはγ鎖、μ鎖、α鎖、ε鎖およびδ鎖の分子量、電荷、アミノ酸配列、糖含量などが互いに異なっている

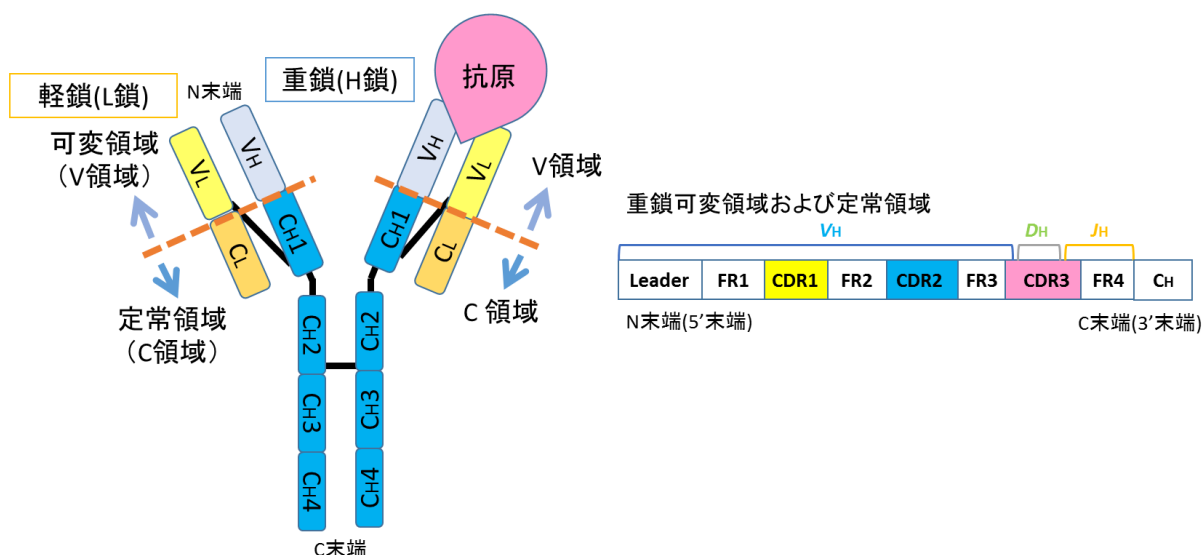


Fig. 1. 抗体の基本構造模式図

抗体の基本構造と重鎖可変領域および定常領域の模式図を示した。2本のH鎖と2本のL鎖がジスルフィド結合で結合した4本鎖構造をもつ。C末端側のC<sub>H</sub>およびC<sub>L</sub>は定常領域を示し、比較的变化に乏しい領域である。N末端側のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は可変領域を示し、変化に富む領域であり、V(D)J遺伝子断片の再編成により多様な可変領域配列が作り出される。重鎖可変領域および定常領域を示した右図において、Leaderは翻訳の開始に関与するLeader peptide領域、FRは比較的アミノ酸配列変化の少ないFramework Region、CDRは超可変領域であり抗原と直接結合して相補性を決定するComplementarity-Determining Regionをそれぞれ示した。

5種類の鎖が存在する。抗体はこのC<sub>H</sub>の違いによって5つのアイソタイプ、IgG、IgM、IgA、IgE および IgD に分類される。一方、硬骨魚類においては、IgM [19-22] と IgD [23-26]の2つのアイソタイプを有し、クラススイッチが生じないとされている[27]。さらに、IgM についてはヒトと軟骨魚類の IgM は主として5量体であるのに対して、硬骨魚類では4量体であると報告されている[28, 29]。また、硬骨魚類は IgM や IgD の他にも様々なアイソタイプが同定されてきており、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) では IgZ [30]、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) では IgT [31]、フグ (*Fugu rubripes*) では IgH [32]またはコイ (*Cyprinus carpio*) では IgM-IgZ キメラ抗体[33]などが確認されており、ユニークな免疫応答を持つ可能性があると考えられる。

本研究ではまず、モデル動物として世界中で広く研究が行われているゼブラフィッシュ (**Fig. 2**) を免疫動物とした抗体作製に取り組んだ。ゼブラフィッシュは発生が速いことや胚が透明であるため初期発生段階の観察が容易であること、動物愛護の点などから発生学や毒性学をはじめ、感染症やヒト疾患モデル、医薬品候補化合物のスクリーニング系など様々な研究に利用されている。



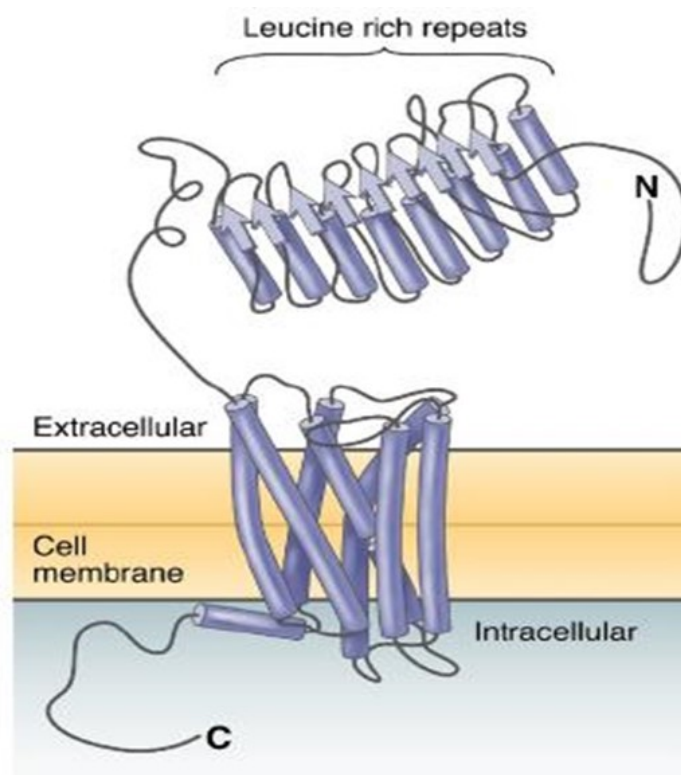
**Fig. 2. ゼブラフィッシュ成魚**

インド原産の体長5 cmほどのコイ科の小型魚類。脊椎動物のモデル生物として広く用いられている。

魚類抗体に関しては、抗体分子そのものに対する研究や増養殖のための水産用ワクチン開発は行われているが、抗体生産ホストとして利用する研究は行われていなかった。抗体生産のホストとして利用するには抗体の多様性が重要であり、ゼブラフィッシュの抗体の多様性については、次世代シーケンサーを用いた重鎖の抗原を認識する可変部の多様性解析によって、アミノ酸配列のユニークさだけでなく、B細胞の数はヒトやマウスと比較して少ないが、抗原との結合に関与する部位をコードする遺伝子セグメントの組換え (*gene rearrangement*) や遺伝子セグメントの組換えの際に起こる鋳型遺伝子に存在しない塩基の挿入 (*junctional diversity*)、または再構成された抗体遺伝子への変異の導入 (*somatic mutation*) といった多様性に関与する機構はヒトやマウスと共通しているため、ゼブラフィッシュも多様な抗体レパートリーを生み出す機構をもつという報告がなされている[34]。

したがって、本研究ではゼラフィッシュを抗体生産ホストとして利用し、Gタンパク質共役受容体 (*G-protein-coupled receptor* : GPCR) と称される7回膜貫通型のタンパク質のひとつであるヒト由来 LGR3 (*human Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 3* : hLGR3) に対する抗体作製に取り組んだ。GPCRはホルモンや神経伝達物質のセンサーとして細胞外からのシグナルを受容して細胞内へ情報を伝達する等、生体内で重要な機能を有することが示唆されており、現在使用されている治療薬の約50%がこのGPCRを標的としている。GPCRは複雑な立体構造を有すること (**Fig. 3**) [35]から、立体構造を保持したタンパク質の作製は難しく、従来のタンパク質を免疫する方法では得られない抗体も多く存在する。そこで、*in silico* で標識分子の免疫領域を選択し、得られたcDNAを組み込んだ発現ベクターを動物へ導入してハイブリドーマ細胞を作製するというDNA免疫法[36]が開発されたが、この方法は免疫領域の選択

やハイブリドーマ細胞の作製に手間や時間がかかるといった問題があった。したがって、ゼブラフィッシュに抗原となる GPCR の一部を発現する大腸菌を曝露するという簡便な方法で GPCR に対する抗体が取得できれば、魚類を用いてこれまでに哺乳免疫動物で作製できていない抗体を作製できる可能性が期待できると考えた。



**Fig. 3. LGR ファミリータンパク質の模式図[35]**

GPCR の一種である LGR ファミリータンパク質は、N 末端側の細胞外領域にロイシンリッチリピートを持ち、7 回膜貫通型という複雑な構造を有する。

しかしながら、ゼブラフィッシュは魚体が小さいために採取できる血液が少量なため、多数の個体を用いなければならず、継続したサンプリングも困難であった。そこで本研究では、ゼブラフィッシュと同じコイ科で観賞魚として古

来より親しまれているキングヨ (*Carassius auratus*) を免疫動物とした抗体作製法の検討を行った。キングヨの中でも特に、スイハウガン (水泡眼) という両眼の下に角膜が膨大化した水泡を持つ品種に着目した (**Fig. 4**)。すなわち、水泡の中はリンパ液 (以下、水泡液とする) で満たされおり、水泡液は採取後 1-2 週間で回復することも報告されている[37]。スイハウガンを抗体産生モデル動物とした理由として、①同じコイ科であるゼブラフィッシュの知見を応用できる可能性があることや、②ゼブラフィッシュよりも大きいためサンプル採取がしやすく、かつ研究室レベルで飼育し易いこと、③血液のかわりに水泡液を活用できる可能性があることが挙げられた。



**Fig. 4.** スイハウガン (水泡眼) 成魚

スイハウガンは両眼の下に角膜が膨大化した水泡を持つ品種のキングヨである。水泡の内部はリンパ液で満たされている。

この水泡を介して抗原投与や抗体採取が可能であるかどうか調べるため、EGFP を抗原として投与し、ドットブロット法にて特異的抗体産生の有無を確認した。さらに、抗原投与量を検討するため、1回あたりの抗原 EGFP 投与量を

それぞれ 1、10 および 100  $\mu\text{g}$  とした試験区を設け、免疫して得られた水泡液中の抗原特異的な抗体産生の有無を ELISA 法にて確認した。1 回当たりの抗原投与量が 100  $\mu\text{g}$  の試験区においては、経時的な抗体価の変化についても調べた。

スイホウガンを免疫動物として抗原特異的な抗体産生を確認できた一方で、これまでの検出には抗原に対する市販の抗体が必須であり、今後スイホウガンを用いて市販抗体の無い抗体作製に取り組んだ場合、キンギョ抗体を検出するための抗キンギョ Ig 抗体を作製する必要があると考えた。しかしながら、遺伝子情報について、同じコイ科に属するゼブラフィッシュをはじめ、ソウギョやコイにおいてはゲノム解読が進んでいるが[38-41]、キンギョ抗体の詳細については未解明であった。そこで本研究ではさらに、スイホウガン抗体生産ホストとして利用する基盤を構築するため、キンギョ抗体を認識する抗体取得を目指した。すなわち、キンギョの抗体遺伝子について知見を得るため、スイホウガンから Ig 重鎖のクローニングを行った。続いて、得られたキンギョ Ig 重鎖定常領域の Constant region 3 (CH3) 配列をもとにして、大腸菌で組換えタンパク質を作製してウサギに免疫することでキンギョ IgM 重鎖を認識する抗体の作製を行った。さらに、水泡液から IgM の精製を行い、作製した抗キンギョ IgM 重鎖抗体による精製 IgM の定量的な検出および水泡液に含まれる IgM 量の推定を試みた。

最後に、ゼブラフィッシュへ免疫実験を行った hLGR3 について、スイホウガンにも免疫実験を行い、同様に抗原特異的な抗体が産生されるか確認した。以上の研究を通して、スイホウガン新しい免疫動物とした場合の有用性や、抗体作製方法の基盤を整えることを本研究の目的とした。



## 第 I 章 ゼブラフィッシュを利用した抗体作製

本章では、ゼブラフィッシュを免疫ホスト動物として、GPCR の一種であるヒト LGR ファミリータンパク質 3 (hLGR3) の N 末端側のロイシンリッチリピート (LRR) 領域を発現した大腸菌を経口投与し、得られた血清を用いて抗原特異的抗体産生の有無を確認した。

### I-1. 実験方法

#### I-1-1. 実験材料および試薬

本実験では特に断りのない限り、試薬には和光純薬工業株式会社の製品を使用した。また、調製した試薬等は下記の通りである。

- **LB-アンピシリン培地** : LB 培地 Lennox (ナカライテスク)、終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリンナトリウム
- **PBS** : 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.4
- **PBST** : 0.1% [v/v] Tween20/ PBS

#### I-1-2. 抗原タンパク質 hLGR3 LRR 発現

hLGR3 の LRR 領域をタンパク質発現用 pET15b ベクター (Novagen) にサブクローニングして、hLGR3 の N 末端領域に His タグが付加した pET15b-hLGR3 LRR プラスミドを構築した。pET15b-hLGR3 LRR プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB-アンピシリン寒天培地に塗沫して 37°C で一晩培養した。生成したコロニーを LB-アンピシリン液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで IPTG を

終濃度が 1 mM となるよう添加し、さらに 25°C で 4 時間振盪しながら発現誘導を行った。誘導後、培養液を 4°C、2500×g で 10 分間遠心分離して菌体を回収した。

回収した大腸菌の湿重量 1 g に対して、2 ml の 100 mg/ml アンピシリンナトリウムおよび 4 g のテトラミンフレーク（テトラ）の割合になるように混合し、ペースト状にして 1 ml シリンジ（テルモ）で押し出して糸状にした後、約 2 mm の粒状に刻んだものを免疫用飼料とした。

### **I-1-3. 免疫試験**

免疫に使用したゼブラフィッシュは、水温 27.5±1°C、明期 14 時間、暗期 10 時間で飼育し、1 試験区 50 尾として合計 6 試験区を設けた。I-1-2 で調製した免疫用飼料をゼブラフィッシュに経口投与することで免疫を行った。初回免疫日（0 日目とする）から 10 日目に第 2 回目の経口投与を行い、16 日目に血液採取をした。

### **I-1-4. 検出用タンパク質 TF-hLGR3 LRR 発現**

経口投与による hLGR3 LRR に対する抗体産生の有無は、ドットブロット法を用いて確認した。検出用タンパク質として、hLGR3 の LRR 領域をタンパク質発現用ベクター pCold TF DNA（タカラバイオ）にサブクローニングし、pCold TF-hLGR3 LRR プラスミドを構築した。構築したプラスミドでタンパク質発現用大腸菌 BL21（DE3）株を形質転換し、得られたコロニーを LB-アンピシリン培地に接種して 37°C で振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、15°C で 24 時間振盪しながら TF-hLGR3 LRR の発現誘導を行った。誘導終了後は 4°C、2500×g、10 分

間遠心分離して菌体を回収した。TF-hLGR3 LRR の発現は SDS-PAGE に供した後、CBB 染色およびウェスタンブロットにより確認した。すなわち、タンパク質を転写した PVDF 膜を、5% [w/v] スキムミルク / PBST で 2 時間ブロッキングした後、PBST で 3000 倍に希釈した抗 His 抗体 (GE Healthcare) と 2 時間反応させた。続いて、PBST で 3000 倍に希釈した抗マウス IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) と 2 時間反応させ、DAB による発色確認を行った。

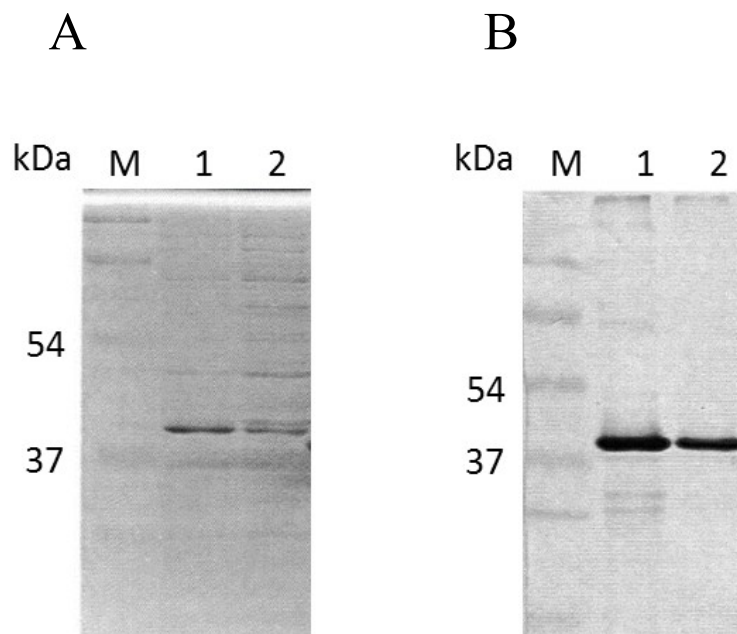
#### I-1-5. ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出

I-1-3 で採取したゼブラフィッシュ血清について、抗ゼブラフィッシュ IgM ウサギ抗体 (研究室所有) を用いてドットブロット法による抗体検出を行った。すなわち、検出用抗原 TF-hLGR3 を 1 スポットあたり 50–500 ng となるよう PVDF 膜上に固相化して一晩風乾した。乾燥させた PVDF 膜を、5% [w/v] スキムミルク / PBST で 2 時間ブロッキングした後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 100 倍希釈した 10  $\mu$ l マウス血清 (未免疫) あるいは 10  $\mu$ l ゼブラフィッシュ血清 (未免疫または免疫後) と 2 時間反応させた。次いで、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で 3000 倍に希釈した抗ゼブラフィッシュ IgM HRP 標識抗体と 1 時間反応させ、Chemi-Lumi One (ナカライテスク) を用いて化学発光させ、CCD カメラ (Light Capture II, ATTO) で検出した。

## I-2. 実験結果

### I-2-1. 抗原タンパク質 hLGR3 LRR 発現確認

SDS-PAGE によって分離したタンパク質を CBB 染色およびウェスタンブロットに供した。その結果を **Fig. I-1** に示した。タンパク質発現誘導をした画分において、CBB 染色によって hLGR3 LRR と推定される約 40 kDa の大きさにバンドを確認ができた (**Fig. I-1A**)。さらに、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、CBB 染色と同様に約 40 kDa の大きさにバンドが検出できた (**Fig. I-1B**)。

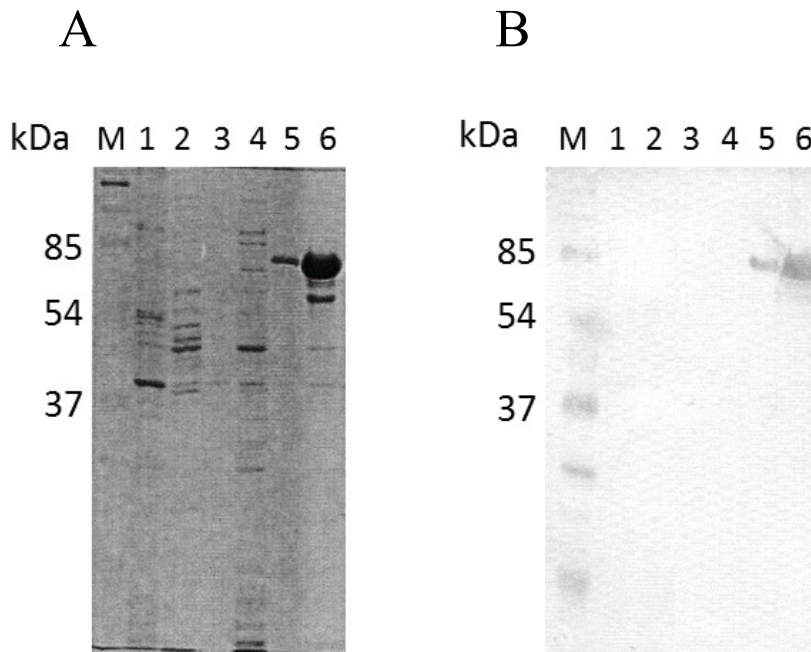


**Fig. I-1.** 抗原タンパク質 hLGR3 LRR の発現確認

(A) CBB 染色および(B) 抗 His 抗体によるウェスタンブロット。 レーン M, プレステインドマーカ; レーン 1, 1 mM IPTG 誘導大腸菌発現 hLGR3 LRR; レーン 2, IPTG 未誘導大腸菌発現 hLGR3 LRR (陰性対照)。

## I-2-2. 検出用タンパク質 TF-hLGR3 LRR 発現確認

SDS-PAGE によって分離したタンパク質を、CBB 染色およびウェスタンブロットした結果を **Fig. I-2** に示した。タンパク質発現誘導後の画分において TF-hLGR3 LRR と推定される約 80 kDa の大きさにバンドを検出することができた (**Fig. I-2A**)。さらに、抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットによっても同様にバンドを確認できた (**Fig. I-2B**)。



**Fig. I-2. 検出用抗原タンパク質 TF-hLGR3 LRR の発現確認**

(A) CBB 染色および (B) 抗 His 抗体を用いたウェスタンブロット。レーン 1 および 2 は形質転換していない大腸菌を用いた (陰性対照)。レーン 3-6 は pCold TF-hLGR3 LRR で形質転換した大腸菌を用いた。レーン M, プレステインドマーカ; レーン 1, 未形質転換大腸菌不溶性画分; レーン 2, 未形質転換大腸菌可溶性画分; レーン 3, 誘導前大腸菌不溶性画分; レーン 4, 誘導前大腸菌可溶性画分; レーン 5, 誘導後不溶性画分; レーン 6, 誘導後可溶性画分。

### I-2-3. ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出

ドットブロット法によって特異的抗体の有無を確認した。その結果、hLGR3 LRR を 100 ng 以上固相化したスポットにおいて、免疫したゼブラフィッシュ血清を反応させた場合に有意なシグナルが検出された (Fig. I-3A)。このシグナルを画像解析ソフト *ImageJ* (RSB) で数値化した結果、hLGR3 LRR が 250 ng 以上のスポットではシグナルが飽和していた (Fig. I-3B)。

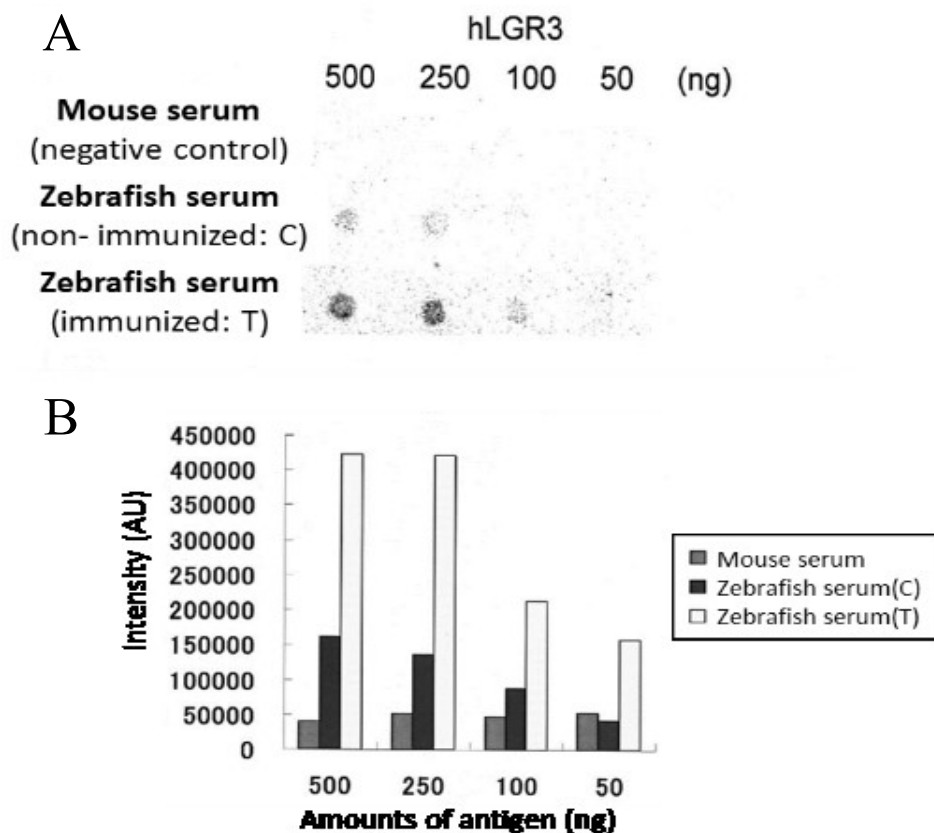


Fig. I-3. ドットブロット法による抗 hLGR3 抗体の検出

(A) ドットブロット法による検出。上段, 未免疫マウス血清; 中段, 未免疫ゼブラフィッシュ血清; 下段, 免疫後ゼブラフィッシュ血清。PVDF 膜に固相化した TF-hLGR3 LRR に各血清を反応させ、次いで抗ゼブラフィッシュ IgM HRP 標識抗体によって検出を行った。(B) ドットブロットの各スポットを *ImageJ* で数値化したものを示した。

### I-3. 考察

水中で生活する魚類は外的環境に触れる可能性が高いため免疫能を要求されやすい。魚類への免疫については、増養殖のための水産用ワクチン開発は行われているが、抗体生産ホスト動物として利用する研究は行われていなかった。そこで本研究では、ゼブラフィッシュを免疫動物とした抗体作製に取り組んだ。養殖魚へのワクチン投与方法は大きく分けて、注射法、浸漬法および経口法の3種類が適用されている。注射法は、1998年にマダイのイリドウイルス感染症ワクチンが我が国で最初の注射ワクチンとして承認されており、筋肉または腹腔内に直接ワクチンを接種するため最も効果が高いとされる。またアジュバントの賦活効果も期待できるが、その反面作業には多大な時間と労力が必要であり魚へのストレスも大きいといった問題もある。一方、浸漬法は魚体が小さいうちにまとめて多数の魚にワクチン投与をすることができ、淡水魚であるアユやサケ科魚類または海産魚であるブリのビブリオ病に対するワクチンでは標準法として承認されている。また一方、経口法は魚にストレスを与えない方法ではあるが、賦与される防御免疫は他の2つの方法と比較して低く、免疫が持続される期間が短いため、長期の効果を得るためには複数回のワクチン処理が必要である。このように、投与方法により抗原は異なるルートから体内へ取り込まれ、異なった組織・細胞を刺激するために、宿主は異なった免疫応答をする。現在も様々な魚種および魚病に適応したワクチン開発が続けられているが、ワクチン開発の基礎となる魚類の免疫系に関する詳細な知見や特異的免疫機構などは未だ深く解明されていない。

腸管免疫について、腸管内抗原に対する免疫応答の開始部位である腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphatic tissue : GALT）に存在するパイエル板で細

菌やウイルスを取り込み、腸管免疫細胞群に抗原情報を伝達するM細胞の存在は、哺乳類においては確認されているが、魚類においては確認されておらず、マクロファージや免疫細胞の凝集した箇所の確認はされている[42]。さらには、腸からのタンパク質吸収の際に、腸の上皮細胞に取り込まれたタンパク質は上皮細胞で消化されるが、その一部は細胞内あるいは細胞間を通過して腸内部に取り込まれ、基底膜側から放出されることが、多種にわたる魚類で共通して報告されている[43]。また、当研究室の大塚の修士論文[44]によると、抗ゼブラフィッシュ IgM 抗体を用いてゼブラフィッシュの臓器および組織における IgM の局在を調べたところ、血液だけでなく腸管においても多く局在していることが確認されており、魚類生体内においては腸で非常に高い抗体生産が行われていることが推測された (Fig. I-4)。

ゼブラフィッシュへの免疫方法を決定するにあたって、ゼブラフィッシュは体が小さく注射による投与は難しいため、経口投与か浸漬投与法が適していると考えられ、さらに前述の大塚による知見で、ゼブラフィッシュの腸管において IgM が多く局在していることが明らかとなっていたため、本研究では経口投与法による免疫実験を行った。経口免疫に関して、近年では腸管の免疫への関連性が注目されており[45]、腸管は常に食物の摂取などを通して外来抗原に接するうえに、多大な腸内細菌と共存するなど独特な環境にある。腸管と免疫反応の関連に関する研究の例として、農林水産省の委託事業により遺伝子組換え技術を応用したスギ花粉のタンパク質を人工的に取り込ませたスギ花粉症緩和米が挙げられる[46]。アレルゲンやアレルゲン由来のT細胞抗原決定基 (T細胞エピトープ) を注射や経鼻、経口投与すると、T細胞応答性の抑制・不応答やT細胞自身のアポトーシスによりアレルギー反応が軽減することが示唆されている。第二世代の抗原特異的免疫療法として、アレルゲン自体を用いず、T細胞

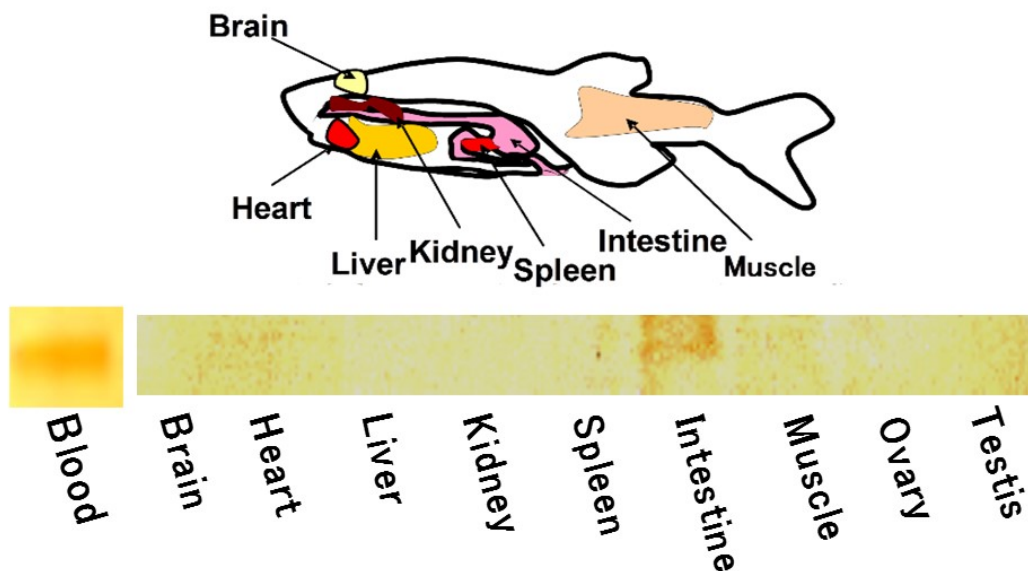


エピトープ部分に IgE 抗体や B 細胞抗原決定基を含まないようにして投与する免疫療法が注目されている。そこで、スギアレルゲンの T 細胞エピトープを毎日食べる米の中に蓄積させ、経口免疫寛容現象を引き起こすことによって、食べることで、すなわち腸管免疫を介してスギ花粉症を緩和するという研究開発が進められており、この花粉症緩和米をマウスに与える動物実験ではマウスのくしゃみの回数が 4 分の 1 に軽減されることが確認されている。また、自己免疫疾患を回避する役割を持つ制御性 T 細胞は、全身に存在するがその中でも特に腸粘膜に豊富に存在することが確認されている。この制御性 T 細胞を増殖させる能力が高く、さらに制御性 T 細胞にインターロイキン 10 (IL10) や誘導性 T 細胞共刺激因子 (ICOS) などの重要な抗炎症成分を誘導する能力の高い 17 株のクロストリジウム属の菌株をヒトに常在する腸内細菌叢から単離したという報告がある[47]。さらに、マウスの腸粘膜においてプロ B 細胞やプレ B 細胞および抗体の可変部の機能を決定する *VDJ* 領域の遺伝子再構成を示す *Rag* を発現した中間体が見られる B 細胞系細胞集団の存在が確認されたという報告[48]もあり、腸粘膜で腸内共生微生物からのシグナル調節を受けながら初期 B 細胞発生が起これ、抗体の多様性に影響を及ぼしていることが示唆されている。

本実験において、ゼブラフィッシュへ免疫を行い、採取した血清を用いてドットプロット法による解析を行った結果、血清中には hLGR3 に対する特異的な抗体が産生されていると考えられ、固相化した TF-hLGR3 LRR のタンパク質量 250 ng までは固相化量に応じてシグナルも増強されていた (**Fig. I-3**)。すなわち、ゼブラフィッシュへ大腸菌を用いて発現した組換えタンパク質を経口投与することによって、hLGR3 に対する抗体を作製できたことが示唆された。

また、経口免疫 2 回で抗体が取得できたが、これは目的タンパク質を発現した大腸菌を抗原として経口投与したため、大腸菌の細胞壁の構成成分であるリ

ポ多糖が免疫賦活剤として作用したと推察した。本実験でゼブラフィッシュを用いた抗体作製に成功したが、ゼブラフィッシュは1尾から採取できる血清量が少ないため、多数の個体を用いなければならない。また、継続したサンプリングも困難であるといった問題が挙げられた。そこで次章では、新規の免疫宿主動物として、ゼブラフィッシュと同じコイ科に属するキングョを用いて抗体作製を試みた。



**Fig. I-4.** 抗ゼブラフィッシュ抗体を用いたウェスタンブロットによる臓器別の IgM 局在確認[44]

成魚ゼブラフィッシュから生殖腺以外は雌雄関係なく脳、肝臓、腎臓、脾臓、腸、筋肉、精巣、および卵巣を摘出し、リン酸緩衝液 (pH 7.4) とホモジナイズして SDS-PAGE に供し、抗ゼブラフィッシュ IgM 抗体 (抗 zIgM300 ウサギ抗体) を用いてウェスタンブロットを行った結果を示した。血液と腸において IgM が多く局在していることが確認された。

## 第 II 章 キンギョを利用した抗体作製およびドットプロット法による検出

本章では、スイハウガンを免疫動物として、抗原タンパク質を水泡内に直接注入することで免疫を行い、抗原特異的抗体産生の有無を確認した。

### II-1. 実験方法

#### II-1-1. 実験材料および試薬

以下の各項目において、特に記載がない場合、試薬は全て和光純薬工業株式会社の製品を使用した。また、以下の試薬を調製した。

- **2×YT-アンピシリン培地**: 終濃度 50 µg/ml アンピシリンナトリウム、1.6% Bacto Tripton、1.0% 乾燥酵母エキス (ナカライテスク)、0.5% NaCl、pH 7.0
- **LB-アンピシリン培地**: LB 培地 Lennox (ナカライテクス)、終濃度 50 µg/ml アンピシリンナトリウム
- **PBS**: 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4
- **Ni カラム結合緩衝液**: 20 mM リン酸緩衝液、0.5 M NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.4
- **Ni カラム溶出緩衝液**: 20 mM リン酸緩衝液、0.5 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.4
- **DEAE カラム結合緩衝液**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、pH 8.0
- **DEAE カラム溶出緩衝液**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、1 M NaCl、pH 8.0
- **キンギョ用リンガー液**: 125 mM NaCl、10 mM KCl、10 mM HEPES、pH 7.4
- **TBS**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.5
- **TBST**: 0.05% [v/v] Tween20/ TBS

- **NET** : 150 mM NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス塩酸緩衝液、0.05% [v/v] Triton X-100

供試魚はスイホウガンを用いた。スイホウガンは愛知県弥富市の丸照養魚場より購入し、中和剤を加えて残留塩素を中和した水道水を用いて水温 20–25°C で飼育した体長約 6–10 cm、体重約 15–30 g、水泡の大きさが約 1–2 cm の個体を用いた。

## II-1-2. 抗原タンパク質の作製

### II-1-2-1. pCold TEE-EGFP-His プラスミド作製

pXI-EGFP ベクターを鋳型として、プライマーを用いて *egfp* 遺伝子の開始コドンが制限酵素 *Sma* I に認識配列に変換され、3'末端が His タグの配列に変換された断片を PCR によって増幅した。次にこの増幅産物を鋳型としてプライマーを用いて His タグの下流に制限酵素 *Sfi* I の認識配列が連結した *egfp-his6* 遺伝子断片を増幅した。一方、pCold TF DNA (タカラバイオ) を鋳型として、プライマーを用いて TEE (Translation enhancing element) 配列に *Sma* I の認識配列が連結し、pCold TF DNA の転写終結配列の上流に *Sfi* I の認識配列が連結する DNA 断片を増幅した。これらの遺伝子増幅断片を *Sma* I および *Sfi* I によって消化し、DNA Ligation Kit Mighty mix (タカラバイオ) を用いてライゲーションすることによって、pCold TEE-EGFP-His プラスミドを構築した。作製したプラスミドの塩基配列は、CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman) を用いて DNA シークエンシング反応を行い、塩基配列は GENETYX (ソフトウェア開発) によって確認した。

### II-1-2-2. 抗原タンパク質 EGFP-His 発現

II-1-2-1 で作製した pCold TEE-EGFP-His プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB-アンピシリン寒天培地に塗抹して 37°C で一晚培養した。生成したコロニーから LB-アンピシリン液体培地に植菌し、37°C で 12 時間振盪培養した。この培養液を 2×YT-アンピシリン液体培地に添加し、37°C で振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで 15°C で 30 分間静置し、IPTG を終濃度 0.1 μM となるよう添加して 15°C、24 時間振盪しながら EGFP-His の発現誘導をした。誘導後、4°C、3000×g、15 分間遠心分離して菌体を回収し、PBS で 2 回洗浄することで培地成分を除去した。続いて、40 ml の Ni カラム結合緩衝液を加え、微量超音波細胞破砕機を用いて菌体を破砕した後、4°C、12000×g、30 分間遠心分離して上清を回収し、0.20 μm フィルター濾過した画分を大腸菌発現タンパク質抽出液とした。大腸菌発現タンパク質抽出液を Ni カラム (GE Healthcare) に添加し、Ni カラム結合緩衝液および Ni カラム溶出緩衝液を用いて 20 mM から 500 mM イミダゾールの連続濃度勾配によって EGFP-His 画分を溶出した。この溶出画分を限外濾過膜 (ミリポア) によって DEAE カラム結合緩衝液へ置換した後、DEAE Sepharose Fast Flow 担体 (GE Healthcare) に AKTAprime plus (GE Healthcare) を用いて添加し、DEAE カラム結合緩衝液および DEAE カラム溶出緩衝液を用いた 0 M から 1.0 M NaCl の連続濃度勾配によって溶出した。溶出した EGFP-His 画分を、限外濾過膜を用いて 2 価イオンを含まないキングョ用リンガー液に置換したものを抗原 EGFP-His 溶液とした。

### II-1-3. アジュバントの調製

本実験では、オイルベースのみ、不活化結核菌混合オイルベース、不活化麴菌混合オイルベース、不活化大腸菌混合オイルベースの 4 種類をアジュバント

として使用した。オイルベースの作製は、REYNOLDS らの方法[49]を改変して行った。すなわち、10 g のグリセロールに 0.1 g の卵黄レシチンを添加し、60°C で保温しながらスターラーで攪拌し、続いて 10 g の落花生油 (ナカライテスク) を添加して均一になるまで同様に攪拌したものをオイルベースとした。不活化結核菌には、結核菌 H37 Ra、乾燥 (Difco Laboratories) を使用した。不活化麴菌には、OSI-1013 株を DPY 液体培地に接種し、28°C で 18–20 時間静置培養した後、回収した菌体をソニケーターで破碎したものを使用した。不活化大腸菌には DH5 $\alpha$  株を LB 液体培地に接種し、37°C で 16 時間振盪培養した後、回収した菌体をソニケーターで破碎したものを使用した。これらの不活化した菌体を、それぞれオイルベースに 0.5 mg/ml となるように添加し、初回抗原投与時にのみ菌体混合アジュバントとして使用した。抗原投与 2 回目以降はオイルベースのみアジュバントとして使用した。

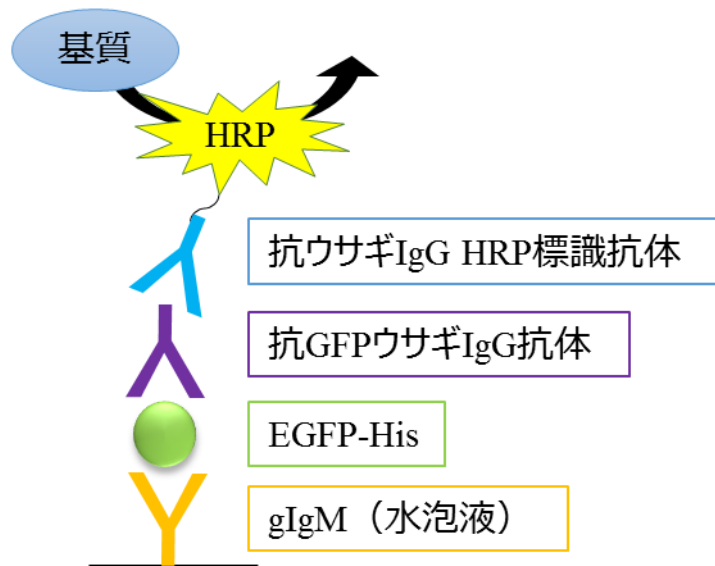
#### II-1-4. 免疫試験

1 試験区につきスイホウガンを 6 尾ずつ使用し、水泡中に直接抗原溶液を注入することによって免疫を行った。試験区 A は EGFP-His 抗原溶液のみ、試験区 B は EGFP-His とオイルベース、試験区 C は EGFP-His と不活化大貯金混合オイルベース、試験区 D は EGFP-His と不活化結核菌混合オイルベース、試験区 E は EGFP-His と不活化麴菌混合オイルベースおよび対照区 F はキンギョ用リンガー液とオイルベースを注入した。抗原の注入は 14 日毎に 100–200  $\mu$ g 投与を行った。水泡液の採取は、抗原投与前および追加抗原投与する直前に行い、70 日目まで継続して採取した。1 尾あたり 50–100  $\mu$ l の水泡液を採取し、4°C、1500 $\times$ g、10 分間遠心分離して上清を回収して–20°C で凍結保管した。

#### II-1-5. ドットブロット法による水泡液中の抗 EGFP-His 抗体検出

免疫したスイハウガン水泡液中の抗原特異的な抗体産生の有無を確認するため、サンドイッチドットブロット法による検出を行った (Fig. II-1)。まず、PVDF 膜 (ATTO) をメタノール、滅菌ミリQ水、PBS の順に浸漬してそれぞれ振盪しながらじませ置換した。プロワイプで余分な PBS を除去した PVDF 膜に採取した水泡液サンプルを 2  $\mu$ l ずつ滴下して一晩風乾した。乾燥させた PVDF 膜を 5% [w/v] スキムミルク/TBST でブロッキングした。TBST で 2 回洗浄後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 5  $\mu$ g/ml となるように希釈した抗原タンパク質 EGFP-His と 2 時間振盪しながら反応させた。TBST で 3 回洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で 3000 倍に希釈した抗 GFP 抗体 (MBL) に浸漬して 1 時間反応させた。続いて、TBST で 3 回洗浄した後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で 100000 倍に希釈した抗ウサギ IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) と 1 時間振盪しながら反応させた。抗体反応後、TBST で 3 回洗浄し、発光基質 Amersham ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) と 5 分間反応させ、CCD カメラによって化学発光を検出した。





**Fig. II-1. サンドイッチドットブロット法の概略図**

PVDF 膜に固相化抗体として免疫したスイホウガンの水泡液を滴下し、次に抗原となる EGFP-His、抗 GFP 抗体、抗ウサギ IgG HRP 標識抗体の順に反応させ、化学発光基質を用いて検出した。

## II-2. 実験結果

### II-2-1. ドットブロット法による免疫賦活効果の確認

初回免疫から 70 日後までの各試験区における死亡率は、抗原 EGFP-His のみ投与した試験区 A で 16.7%（6 尾中 1 尾：個体番号 A2 が 56 日後サンプル採取後に死亡）、その他の試験区では 0%（死魚なし）であった。免疫後の水泡液を採取してドットブロット法によって検出した（Fig. II-2）。抗原とオイルベースを投与した試験区 B では 2 尾（個体番号 C3 および C6）、抗原と大腸菌混合オイルベースを投与した試験区 C においても 2 尾（個体番号 C3 および C6）について、それぞれ 42 日目（3 回免疫後）から EGFP-His に対する抗体価の増加が見られた。

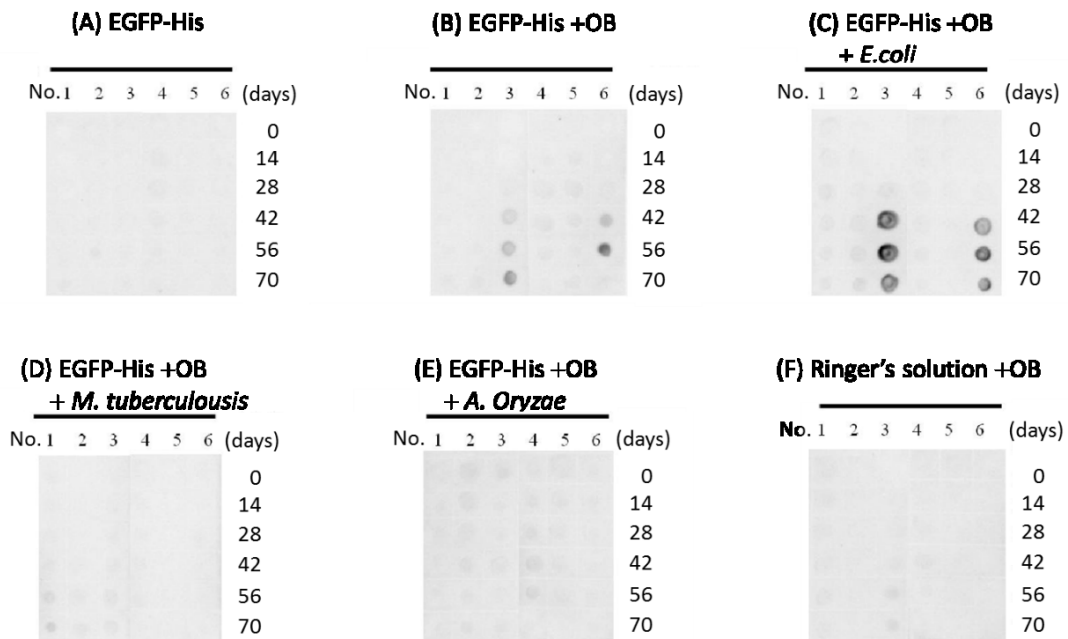


Fig. II-2. ドットブロット法による抗原 EGFP-His 特異的抗体の検出

図の上部に各試験区の免疫条件（OB：オイルベース）を示し、1 から 6 までの数字はスイハウガンの個体識別番号を示した。図の右側には水泡液採取日を示し、免疫前は 0 日目、その他は初回免疫から採取日までの日数とした。

### II-3. 考察

スイホウガンの水泡を介して抗原タンパク質の投与を行った結果、抗原タンパク質と混合したアジュバントがオイルベースもしくは不活化大腸菌混合オイルベースである試験区において、初回抗原投与から 42 日目以降で水泡液中に抗原特異的な抗体が産生されたことが確認された。不活化大腸菌を混合した試験区の方が高いシグナルが検出されたことから、I 章のゼブラフィッシュへの免疫と同様に大腸菌のリポ多糖による免疫賦活効果であると考えられた。不活化結核菌や麴菌と混合したアジュバントを用いた場合には、EGFP-His に対する抗体産生は確認することができなかった。これは結核菌や麴菌自体の抗原性が高く、EGFP-His ではなく菌体に対して抗体が産生されてしまったためではないかと推察した。その理由としては、元来、キンギョやゼブラフィッシュなどのコイ科魚類は淡水の池や川に生息する生物であり、体内や水中に生息する大腸菌に触れる機会が多いため、大腸菌に対してある程度寛容であり、免疫賦活効果が非常に発揮されたのではないかと考えた。組換えタンパク質発現宿主として利用しやすい大腸菌による免疫賦活効果が示唆されたことから、免疫する際に抗原タンパク質を大腸菌を用いて発現させ、粗精製したものが抗原にできると期待される。

また、初回抗原投与から 42 日目以降において抗体産生が確認されたことについては、養殖魚のワクチン開発での有効性を検討するための攻撃試験は 14 日程度から行われることが多いことから、スイホウガンにおいてももっと早期に抗体が産生されている可能性が高いが、水泡液に含まれる抗体量が少ないために検出できなかったのではないかと考えた。そこで次章では、検出方法として ELISA 法を用い、さらに抗体産生量の差異を調べるため抗原投与量の検討を行った。

### 第 III 章 キンギョを利用した抗体作製および ELISA 法による検出

本章では、抗原投与量の検討を行うため、スイホウガンへ EGFP (1、10、100  $\mu\text{g}/\text{回}$ ) を水泡内へ直接注入することにより免疫を行い、ELISA 法を用いて特異的抗体の検出を行った。

#### III-1. 実験方法

##### III-1-1. 実験材料および試薬

以下の各項目において、特に記載がない場合、試薬は全て和光純薬工業株式会社の製品を使用した。また、以下の試薬を調製した。

- **LB-アンピシリン培地** : LB 培地 Lennox (ナカライテスク)、終濃度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンナトリウム
- **Ni 結合緩衝液** : 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.5 M NaCl、5 mM イミダゾール、pH 7.4
- **Ni 溶出緩衝液** : 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.5 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.4
- **キンギョ用リンガー液** : 125 mM NaCl、2.6 mM KCl、10 mM HEPES、pH 7.4
- **50 mM 炭酸緩衝液** : 15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、35 mM  $\text{NaHCO}_3$ 、pH 9.6
- **反応停止液** : 1 N 塩酸、0.6 N 硫酸
- **NET** : 150 mM NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス塩酸緩衝液、0.05% [v/v] Triton X-100
- **NETG** : 0.25% [w/v]ゼラチン/NET

供試魚はスイホウガンを使用した。スイホウガンは愛知県弥富市の株式会社ミワより購入し、中和剤を加えて残留塩素を中和した水道水を用いて水温 20-

25°C で飼育した体長約 6–10 cm、体重約 15–30 g、水泡の大きさが約 1–2 cm の個体を用いた。

### III-1-2. 抗原タンパク質 EGFP 発現

当研究室で構築した pCold TF-HRV3C-EGFP プラスミドを用いて、TF-EGFP タンパク質の発現および精製を行い、さらに精製した TF-EGFP を HRV3C プロテアーゼ処理によって TF タグを切り離し、EGFP タンパク質を精製した。まず、タンパク質発現用大腸菌 *origami* 株を形質転換し、LB-アンピシリン寒天培地に塗抹して 37°C で一晩培養した。生成したコロニーから LB-アンピシリン液体培地に植菌し、37°C、130 rpm で振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで速やかに 15°C に急冷し、IPTG を終濃度 0.1 mM となるよう添加して 15°C、120 rpm、24 時間振盪培養して TF-EGFP タンパク質の発現を誘導した。誘導後、菌体を 4°C、5000×g、10 分間遠心分離して回収後、予冷した PBS を用いて 3 回洗浄することで、残留した液体培地成分を除去した。

続いて、Ni 結合バッファーを加え、微量超音波細胞破砕機 (MICROSON XL 2000、MISONIX) を用いて OUT PUT 2.5 の条件で 1 時間、氷上で菌体を破砕した。この菌体破砕液を 4°C、15000×g、30 分間遠心分離して上清を回収し、再び 4°C、15000×g、20 分間遠心した。遠心後の上清を 0.45 μm フィルター (ADVANTEC) を用いて夾雑物を除去して大腸菌発現 TF-EGFP 抽出液とした。

得られた大腸菌発現 TF-EGFP 抽出液を、ペリスタポンプ (Bio Rad) を用いて His Trap HP カラム (5 ml、GE Healthcare) に供し、Ni 結合バッファーを用いて洗浄および平衡化した。次に、低圧クロマトグラフィー (AKTAprime plus) を使用して、Ni 結合バッファーおよび Ni 溶出バッファーにより、Ni 結合タン

パク質の溶出を行った。この溶出画分を 100K 限外濾過膜（アミコン）を用いて濃縮した後 SDS-PAGE に供し、CBB 染色および抗 His 抗体 (GE Healthcare) を用いたウェスタンブロットを行い、TF-EGFP の精製を確認した。すなわち、SDS-PAGE に供した後、iBlot Gel Transfer system (Invitrogen) を用いて PVDF 膜に転写し、NETG で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 GFP 抗体 (MBL) を NETG で 10000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して、あるいは 4°C で一晩静置して一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、NET を用いて 5 分間振盪して洗浄を 3 回を行い、抗マウス IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) を NET で 20000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、NET を用いて 15 分間の洗浄を 3 回行った。Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo scientific) を用いて化学発光させ、CCD カメラ (Light Capture II、ATTO) で検出した。

さらに、精製した TF-EGFP タンパク質を HRV3C プロテアーゼで 4°C、2 日間処理した。HRV3C 処理後、Hi Trap HP (1 ml、GE Healthcare) に供し、Ni 結合バッファーで洗浄しながら Ni カラム非吸着画分を回収した。次いで Ni 溶出バッファーで Ni カラム吸着画分の溶出を行った。このカラム非吸着画分を SDS-PAGE に供し、CBB 染色および抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットによる EGFP の精製確認をした。

### III-1-3. 免疫試験

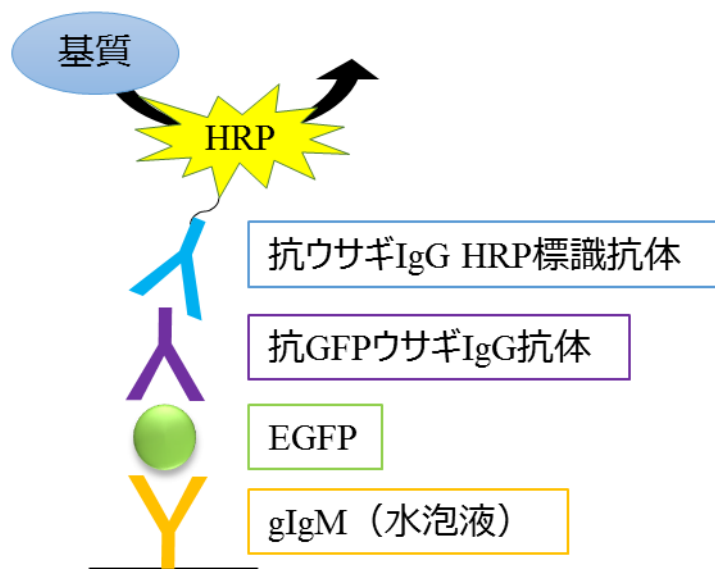
免疫試験については、抗原 EGFP の代わりにキングョ用リンガー液を投与する対照区 A (個体番号 : ctl-1、ctl-2、ctl-3) と、1 回あたりの EGFP 投与量が 100  $\mu\text{g}$  である試験区 B (個体番号 : g100-1、g100-2、g100-3)、10  $\mu\text{g}$  である試験区 C (個体番号 : g10-1、g10-2) および 1  $\mu\text{g}$  である試験区 D (個体番号 : g1-1、g1-2、

g1-3) の 4 試験区を設けた。抗原の投与および水泡液採取には、27 G 注射針 (テルモ) および 1 ml シリンジ (テルモ) を用いた。抗原投与は、初回投与 (0 日目とする) から 7 日後および 14 日後に行い、合計 3 回免疫を行った。初回投与時のみ 1 ml シリンジおよび 18 G の試薬混合針 (三商) を用いてオイルベースをアジュバントとして抗原 EGFP 溶液と体積比 1 : 1 で混合し、油中水型エマルジョン化したものを接種し、2 回目以降はタンパク質溶液のみを注入した。水泡液の採取は、抗原投与前、各抗原投与 3 日後 (初回抗原投与から 3 日後、10 日後、17 日後) および 7 日後 (初回抗原投与から 7 日後、14 日後、21 日後) に行った。水泡液は、採取直後に 4°C、1500×g、10 分間遠心分離して上清を回収し、-80°C で凍結保管した。

#### III-1-4. ELISA 法による EGFP 特異的抗体の検出

免疫したスイハウガンの水泡液中の抗原特異的な抗体産生の有無を確認するため、サンドイッチ ELISA 法による検出を行った (Fig. III-1)。すなわち、96 穴プレート (MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE) に炭酸緩衝液で 100 倍希釈した水泡液サンプルを 100  $\mu$ l/well 分注し、4°C で一晩静置して固相化した。固相化後、PBST 200  $\mu$ l/well で 2 回洗浄した後、1% [w/v] BSA/PBS を 200  $\mu$ l/well 分注し、25°C で 2 時間静置してブロッキングを行った。ブロッキング後、PBST 200  $\mu$ l/well で 2 回洗浄し、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 10 ng/well となるように希釈した抗原タンパク質 EGFP を 100  $\mu$ l/well 分注し、25°C で 2 時間静置した。PBST 200  $\mu$ l/well で 2 回洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で 5000 倍に希釈した抗 GFP ウサギ IgG 抗体を一次抗体として 100  $\mu$ l/well 分注し、25°C で 2 時間静置した。PBST 200  $\mu$ l/well で 2 回洗浄後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で 20000 倍に希釈した抗 rabbit IgG HRP

標識抗体を二次抗体として 100  $\mu\text{l/well}$  分注し、25°C で 1 時間静置した。PBST 200  $\mu\text{l/well}$  で 4 回洗浄した後、室温に戻した TMB 基質 (SurModics) を 100  $\mu\text{l/well}$  分注し、室温で 30 分静置して反応させた。反応停止液を 100  $\mu\text{l/well}$  加えて反応を停止させ、プレートリーダーで波長 450 nm の吸光度を測定した。



**Fig. III-1. サンドイッチ ELISA 法の概略図**

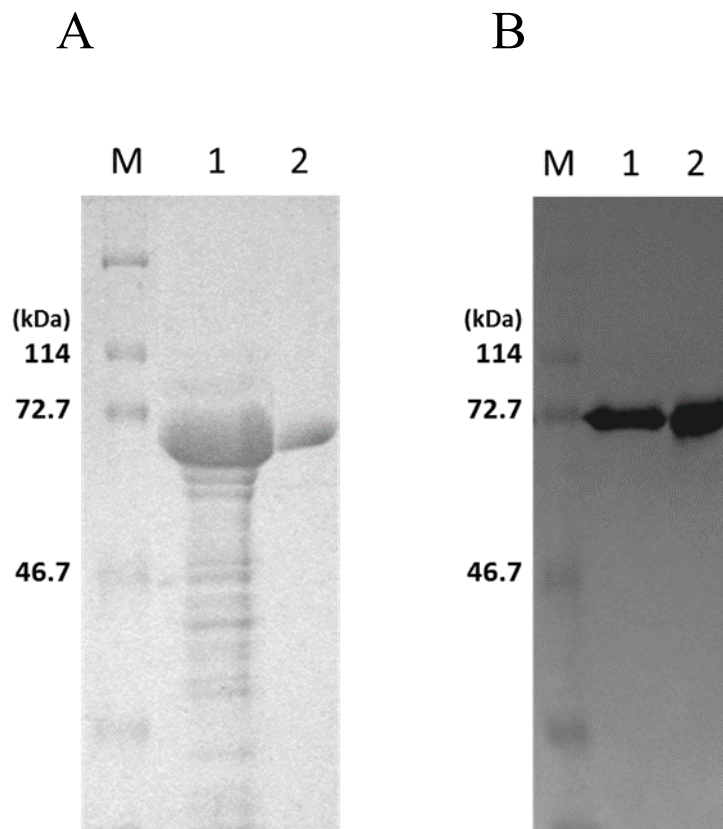
ELISA 用プレートに固相化抗体として免疫したスイホウガンの水泡液を固相化し、次に抗原となる EGFP、抗 GFP 抗体、抗ウサギ IgG HRP 標識抗体、TMB 基質の順に反応させた。



## III-2. 実験結果

### III-2-1. 抗原タンパク質 EGFP 発現

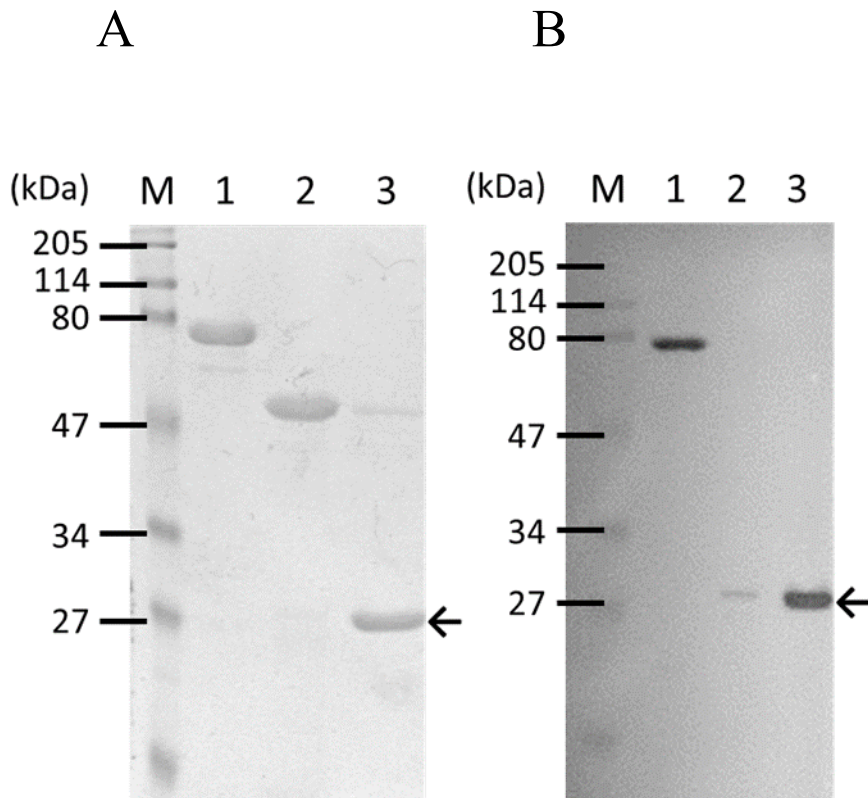
TF-EGFP の大部分は可溶性画分に発現していたため、可溶性画分を Ni カラムにて精製を行った。溶出した Ni カラム吸着画分を SDS-PAGE に供してタンパク質を分離し、CBB 染色およびウェスタンブロットにて精製確認をした結果を **Fig. III-2** に示した。



**Fig. III-2. 抗原タンパク質 TF-EGFP の発現および精製確認**

(A) CBB 染色および(B) 抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット。レーン M, プレステインドマーカ；レーン 1, Ni カラム精製前可溶性画分；レーン 2, Ni カラム吸着画分。TF-EGFP の推定分子量は約 75 kDa。

次いで、精製した TF-EGFP を HRV 3C プロテアーゼ処理後、再度 Ni カラムを用いて精製し、Ni 非結合タンパク質画分および Ni 結合タンパク質画分に分離した。両画分を SDS-PAGE に供し、CBB 染色およびウェスタンブロットを行った結果を Fig. III-3 に示した。HRV3C 処理後の Ni カラム非吸着画分において EGFP が精製されたことが確認できたため、抗原タンパク質溶液として III-1-3 免疫実験に使用した。



**Fig. III-3. 抗原タンパク質 EGFP 精製確認**

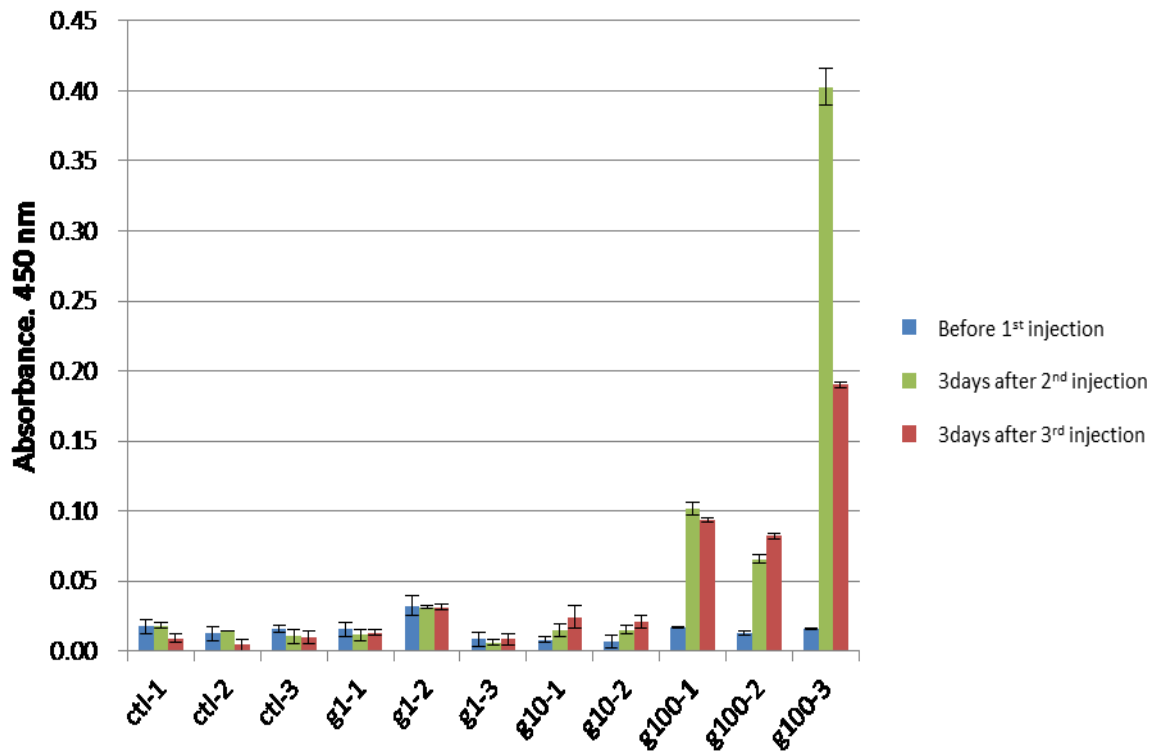
(A) CBB 染色および (B) 抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット。目的タンパク質 EGFP の分子量の位置 (約 27 kDa) を黒矢印で示した。レーン M, プレステインドマーカ; レーン 1, HRV3C 処理前 TF-EGFP; レーン 2, HRV3C 処理後 Ni カラム吸着画分; レーン 3, HRV3C 処理後 Ni カラム非吸着画分。

### III-2-2. ELISA 法による抗原特異的抗体の検出

初回抗原投与から 21 日目までの個体死亡率は、対照区 A で 33% (3 尾中 1 尾死亡)、試験区 B (EGFP 100  $\mu$ g 免疫区) は 33% (3 尾中 1 尾死亡)、試験区 C (EGFP 10  $\mu$ g 免疫区) は 0% (2 尾共に生存)、試験区 D (EGFP 100  $\mu$ g 免疫区) は 0% (3 尾すべて生存) となった。対照区 A および試験区 B の死亡個体は 3 回免疫後に死亡した。

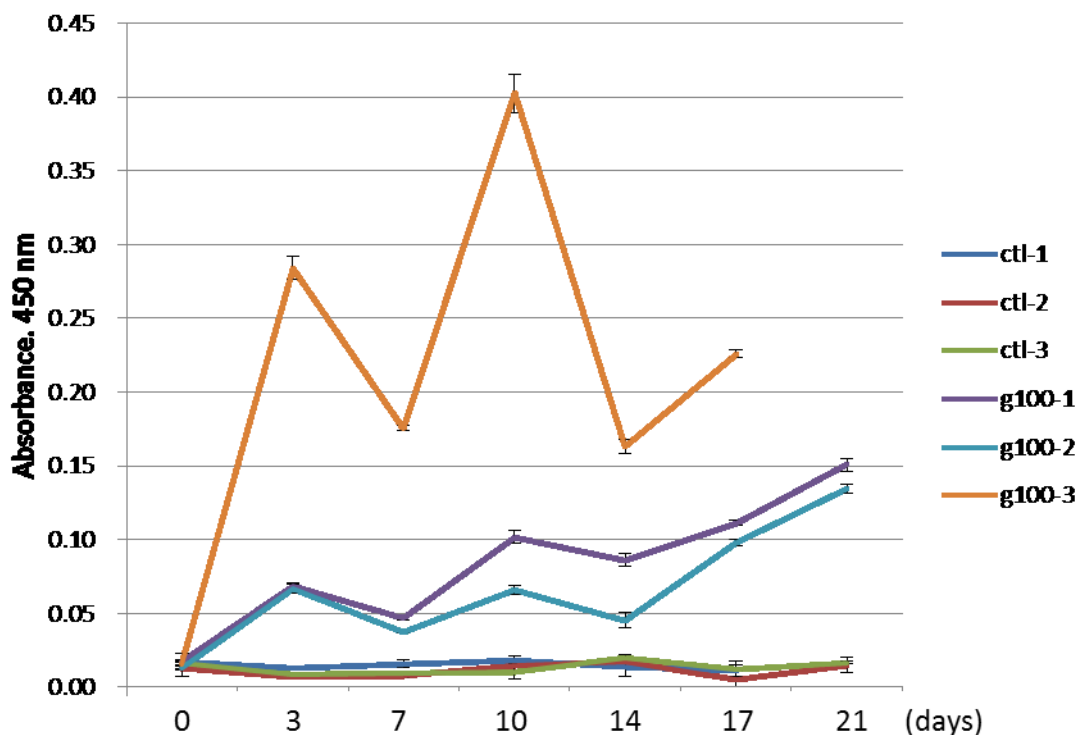
全ての試験区において抗原投与前、免疫 2 回目 3 日後および免疫 3 回目 3 日後に採取した水泡液をサンプルとして、サンドイッチ ELISA 法による EGFP 特異的抗体の検出を行った結果を **Fig. III-4** に示した。抗原 EGFP を 100  $\mu$ g/回投与した試験区 B では、全ての個体において免疫前と比較して免疫後の全ての水泡液で顕著に値の増加が確認された。試験区 C (EGFP 10  $\mu$ g/回投与) では、抗原投与前と比較して免疫回数を重ねるごとに値の微弱な増加が見られたが、試験区 D (EGFP 1  $\mu$ g/回投与) と対照区 A では有意な値の増加は見られなかった。

また、対照区 A および試験区 B において、抗原投与前、各抗原投与から 3 日後および 7 日後に採取した水泡液をサンプルとして、サンドイッチ ELISA 法を用いて経時的な抗体量の変化について調べた結果を **Fig. III-5** に示した。EGFP を 100  $\mu$ g/回投与した試験区 B において、免疫回数を重ねるごとに徐々に抗体価の増強が確認された。特に個体 g100-3 においては、免疫後の水泡液において他の 2 尾に比べて高い値が検出されたが、死亡により免疫 3 回目 7 日後の水泡液は得られなかった。また、免疫 1 回目および免疫 2 回目の 3 日後サンプルの値よりも、7 日後サンプルの値が低くなる傾向が見られた。



**Fig. III-4. サンドイッチ ELISA 法による EGFP 特異的抗体の検出**

リンガー液を接種した対照区A（個体番号：ctl-1–ctl-3）、精製EGFPを1回あたり100 μg接種した試験区B（個体番号：g100-1–g100-3）、10 μg接種した試験区C（個体番号：g10-1–g10-3）および1 μg接種した試験区D（個体番号：g1-1–g1-3）における測定値を示した。青色バーは初回免疫前、緑色バーは免疫2回目3日後、赤色バーは免疫3回目3日後に採取した水泡液を使用した。エラーバーは標準偏差を示した。



**Fig. III-5. サンドイッチ ELISA 法による経時的な抗体生産量の検出**  
 リンガー液を接種した対照区A（個体番号：ctl-1-ctl-3）および精製 EGFP 100  $\mu\text{g}/\text{回}$ を接種した試験区B（個体番号：g100-1-g100-3）における測定値を示した。エラーバーは標準偏差を示した。図の下部には初回抗原投与からの日数を示した。0日目サンプルは初回抗原投与前に採取した水泡液を用いた。初回抗原投与（0日）から7日後および14日後に追加免疫を行った。

### III-3. 考察

サンドイッチ ELISA 法を用いて抗原特異的な抗体の検出を行った結果、EGFP を 100  $\mu\text{g}$ /回接種した試験区 B（個体番号：g100-1–g100-3）の全ての個体において免疫前に比べ免疫後に顕著な値の増加が見られたことから、試験区 B の個体において個体差はあるものの抗原 EGFP 特異的な抗体が産生されていることが確認された（Fig. III-4）。試験区 B では、個体差はあるが 1 回目の免疫後よりも、2 回目、3 回目の免疫を行うことで抗原特異的な抗体の生産量が増強される傾向が見られた。第 II 章の実験では、100–200  $\mu\text{g}$  の EGFP-His をオイルベースのアジュバントと混合して 14 日間隔で免疫したサンプルを用いて、ドットプロット法を用いた検出により、初回免疫から 42 日後の一部の個体の水泡液において抗原特異的な抗体の産生が確認されている。本研究では、100  $\mu\text{g}$  精製 EGFP を 7 日間隔で免疫した試験区 B において、最短で初回抗原投与から 3 日後という短期間で抗原特異的な抗体が産生されることを ELISA 法による検出を用いて確認できたことから、サンドイッチ ELISA 法は極めて高い感度で抗原特異的な抗体の検出が可能であることが明らかとなった。EGFP を 10  $\mu\text{g}$ /回接種した試験区 C については免疫による測定値の増加が微弱であるため、抗原特異的な抗体ができている可能性はあるがその量は非常に少ないと推定された。抗原特異的な抗体の産生の有無を明確にするには、追加の免疫を行うか、1 回あたりの免疫抗原量を増やす必要がある。以上のことから、本実験で行った検出方法を用いた場合、2–3 週間で抗原 EGFP に特異的な抗体を得るために必要な抗原投与量は、2 回あたり 10–100  $\mu\text{g}$  の間にあると推定された。

本章において、ELISA 法を用いることで検出感度の向上はできたが、水泡液を固相化するサンドイッチ法では、検出するために抗原に対する市販抗体が必

要である。しかしながら、スイハウガン免疫動物として用いた研究の最終目標は、有用な市販抗体の無い分子に対する抗体作製であり、そのためにはスイハウガンの産生した抗体そのものを直接検出する抗体が必要不可欠である。したがって次章では、まずキングヨ Ig のクローニングを行い、得られた遺伝子配列情報を参考にして抗キングヨ IgM 抗体の作製を行った。

## 第IV章 抗gIgM重鎖抗体の作製

本章では、キングヨ抗体の詳細について今まで解明されていなかったため、スイハウガンからgIgM重鎖（gIgH）遺伝子のクローニングを行った。次いで、得られた配列情報をもとにウサギを用いて抗gIgH抗体の作製を行った。さらに、水泡液から精製したgIgMを使用して、水泡液中のgIgM量についても調べた。

### IV-1. 実験方法

#### IV-1-1. 実験材料および試薬

以下の各項目において、特に記載がない場合、試薬は全て和光純薬工業株式会社の製品を使用した。また、実験を行うにあたり以下の試薬を調製した。

- **LB-アンピシリン培地**：LB培地 Lennox（ナカライテスク）、終濃度 100 µg/ml アンピシリンナトリウム
- **PBS**： 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4
- **PBST**： 0.1% [v/v] Tween20/ PBS
- **Ni 結合緩衝液**： 20 mM リン酸緩衝液、8 M 尿素、1 M NaCl、20 mM イミダゾール、pH7.4
- **Ni 溶出緩衝液**： 20 mM リン酸緩衝液、8 M 尿素、1 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH7.4
- **NET**： 150 mM NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス塩酸緩衝液、0.05% Triton X-100
- **NETG**： 0.25% [w/v]ゼラチン/ NET
- **50 mM 炭酸緩衝液**： 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、35 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 9.6
- **反応停止液**： 1 N 塩酸、0.6 N 硫酸



- **MES 結合緩衝液**：50 mM MES、pH 6.0
- **MES 溶出緩衝液**：50 mM MES、1.0 M NaCl、pH 6.0
- **ゲル濾過用緩衝液**：50 mM リン酸緩衝液、0.15 M NaCl、pH 7.8

供試魚はスイホウガンを用いた。スイホウガンは愛知県弥富市の株式会社ミワより購入し、中和剤を加えて残留塩素を中和した水道水を用いて水温 20–25°C で飼育した体長約 6–10 cm、体重約 15–30 g、水泡の大きさが約 1–2 cm の個体を用いた。

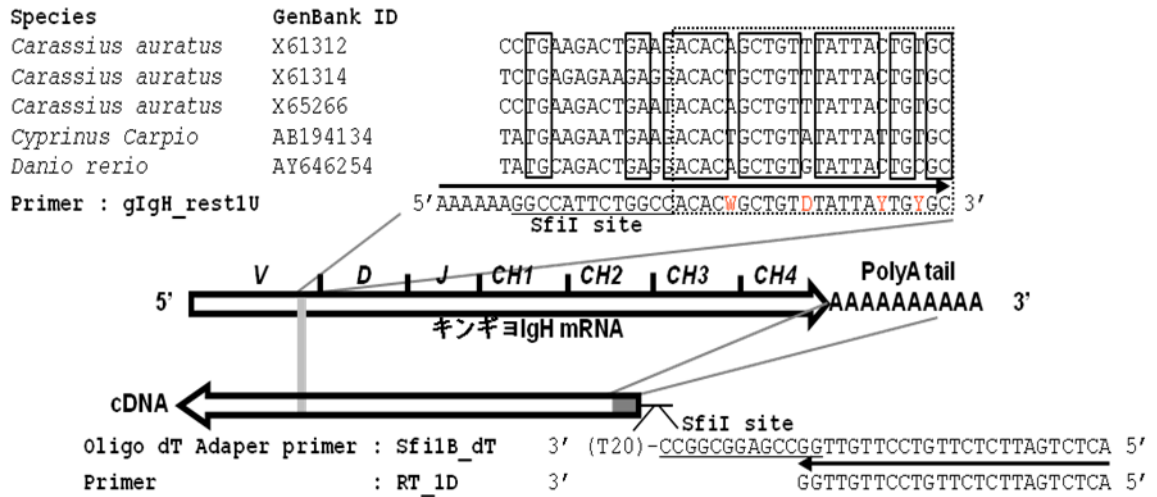
#### **IV-1-2. キンギョ水泡液および血液中の細胞の観察**

スイホウガンの水泡より、1 ml シリンジ（テルモ）および 27 G 注射針（テルモ）を用いて水泡液を 1 ml 採取した後、4°C、1000×g で 10 分間遠心分離して上清を回収し、沈殿を回収した上清 10 μl で再懸濁した。これをスライドガラスに滴下して乾燥固定した標本作製した。また、30 mg/ml ヘパリンナトリウムでヘパリン処理した器具を用いて血液を採取し、これをスライドガラスに滴下して塗抹して乾燥固定した標本作製した。これらの標本をメイグリュンワルド染色液に 3 分間浸し、次いで 1/15 M リン酸緩衝液（pH 6.4）に 3 分間浸した後、ギムザ染色希釈液に 20 分間浸した。水道水の溜まり水で洗浄して風乾燥後、顕微鏡で観察した。

#### **IV-1-3. gIg 重鎖のクローニング**

スイホウガンの脾臓および腎臓を切り出し、QIAzol Lysis Reagent（QIAGEN）を用いて全 RNA を抽出した。これを DNase I（タカラバイオ）処理してゲノム DNA を分解し、QIAzol Lysis Reagent を用いて精製した。精製した全 RNA は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit（ロシュ）を用いて逆転写して cDNA

を合成し、gIgH をクローニングするための鋳型として用いた。cDNA 合成に使用したプライマーはキット付属のものではなく、オリゴ dT アダプタープライマーを使用した(Fig. IV-1, Table IV-1)。スイハウガンの脾臓および腎臓から合成した 4 種類の cDNA を鋳型として、3'RACE を行った。まず、DNA ポリメラーゼに KOD plus ver.2 (TOYOBO) を用いて PCR を行い、gIgH の一部をコードしている遺伝子断片を増幅した (Table IV-2)。プライマーは、センス鎖縮重プライマーおよびオリゴ dT アダプタープライマーと相同なアンチセンス鎖プライマーを用いた。縮重プライマーは IgH 可変領域の FR でキングョおよびゼブラフィッシュ、コイのコイ科 3 種間においてよく保存されている配列と相同なプライマーを用いた (Fig. IV-1)。増幅した遺伝子断片は 1.5%アガロース (Agarose S) ゲル電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色して確認した。PCR 産物のうち約 1600 bp を Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を用いて精製した。精製した遺伝子は *Sfi* I (タカラバイオ) を用いて制限酵素処理し、pCold TF DNA (タカラバイオ) から作製した pCold-EGFP (*Sfi* I CB) の *Sfi* I サイトに DNA Ligation Kit (タカラバイオ) を用いて組込んだ。作製したプラスミドの塩基配列は、CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman) を用いた DNA シークエンシング反応および GENETYX (ソフトウェア開発) によって確認した。PCR およびシークエンス解読に用いたプライマーは Table IV-1 に示した。



**Fig. IV-1. cDNA 合成用および 3'RACE 用プライマー**

cDNA 合成用オリゴ dT アダプタープライマー (*Sfi* IB\_dT) およびこれと相同な 3'RACE 用アンチセンス鎖プライマー (RT\_1D)、3'RACE 用センス鎖縮重プライマー (gIgH\_rest1U) のアニーリング位置を模式図に示した。キングヨおよびゼブラフィッシュ、コイの IgH 可変領域の FR の配列を相同性検索し、よく保存されていた配列を上を示した。黒枠は相同な塩基配列を示した。これと相同な塩基配列を 3'RACE 用センス鎖プライマーとして用いた。W=A or T、D=T or A or G、Y=C or T

**Table IV-1. cDNA 合成および 3'RACE、シーケンス用プライマー**

用途	プライマー名	5'	配列	3'	Tm 値
cDNA 合成	<i>Sfi</i> IB_dT	ACTCTGATTCTCTTGCCTTGTTGG	cgcgagcgcc(t <sub>20</sub> )		58.8
3'RACE	RT_1D	ACTCTGATTCTCTTGCCTTGTTGG			58.8
	gIgH_rest1U	aaaaaaggccattctggcc	ACACWGCTGTDATTAYTGYGC		60.4
シーケンス	gIgH_1U	CAACGTGCAACCGTACTTAAC			58.7
	gIgH_2U	TGATAAGAACAACATCGCAGAGAC			57.1
	gIgH_3U	CAGTGTTTCAGTTGTGTCGTGTATC			58.8
	gIgH_1D	CATTCTTCCACTTGGAAATCATTAAC			55.6
	gIgH_2D	AAGGGAGGGAGGCACTATTTG			58.5
	gIgH_3D	ACGGTTGCACGTTGATCTGG			58.4
	gIgH_4D	ATTTGAAGCTTCGCACTTGTATGG			57.1
	gIgH_5D	TGACATACCCAGAAGAATCAGGAG			58.8

RT : 逆転写 (Reverse Transcription)、rest : 制限酵素 (restriction enzyme)

U : Up side ; D : Down side

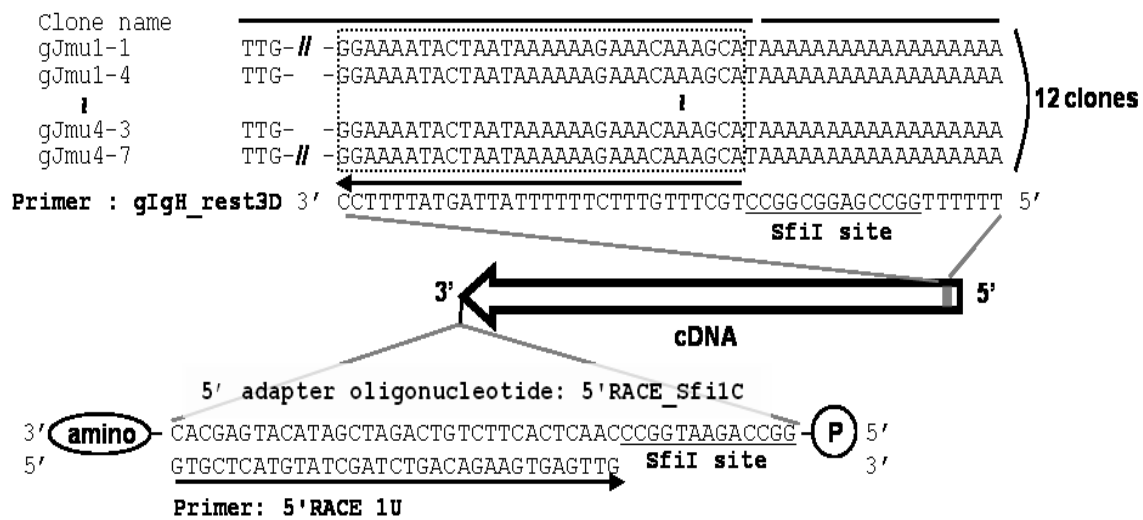
**Table IV-2. 3'RACE PCR 反応条件**

KOD Plus ver.2 (TOYOBO)	5 本分 (μl)	温度	時間	Cycle 数
10×KOD Plus ver.2 Buffer	5.0			
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3.0			
2.0 mM each dNTP mix	5.0			
10 μM PrimerF	1.5	95°C	2 min	40 Cycles
10 μM PrimerR	1.5	98°C	10 sec	
0.1 μg/μl cDNA	5.0	58°C	30 sec	
KOD Plus ver.2 (1 U/μl)	1.0	68°C	2.5 min	
H <sub>2</sub> O	28.0	68°C	10 min	
Total	50.0	4°C	∞	

PrimerF には gIgH\_rest1U、PrimerR には RT\_1D を用いた。

5 本分を調整後、10 μl ずつに分注して PCR 反応を行った。F : Forward、R : Reverse

次いで、スイハウガンの腎臓から合成した1種類のcDNAを用いて5'RACEを行った。まず、cDNAをIllustra™ MicroSpin S-400 HR Column (GE Healthcare)を用いて精製した。精製したcDNAは3'末端に、5'末端がリン酸化、3'末端がアミノ化されたアダプターオリゴヌクレオチド (Fig. IV-2, Table IV-3) をT4 RNA ligase (タカラバイオ)を用いて15°Cで18時間反応させて結合した。これをフェノール/クロロホルム抽出により反応停止させ、アダプターを結合したcDNAはさらにIllustra™ MicroSpin S-400 HR Columnを用いて精製した。得られたアダプター付加cDNAを鋳型として、DNAポリメラーゼにKOD plus ver.2 (TOYOBO)を用いてPCRを行い、キンギョIgH全長をコードしている遺伝子断片を増幅した (Table IV-4)。プライマーは、アダプターオリゴヌクレオチド配列と相補的なセンス鎖プライマーおよびgIgHの3'UTRと相補的なアンチセンス鎖プライマーを用いた (Fig. IV-2)。増幅した遺伝子断片は1.5%アガロース (Agarose S) ゲル電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色して確認した。PCR産物のうち約2000 bpをWizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて精製した。精製した遺伝子はSfi Iを用いて制限酵素処理し、pXI-EGFPプラスミドから作製したpzef1a0.5kproIn-EGFP(Sfi I CB)(i)ベクターのSfi IサイトにDNA Ligation Kitを用いて組込んだ。作製したプラスミドの塩基配列は、CEQ2000 DNA Analysis Systemを用いたDNAシーケンシング反応およびGENETYXによって確認した。PCRに用いたプライマーはTable IV-3に示した。また、塩基配列の決定には3'RACEと同様のプライマーを用いた。



**Fig. IV-2. アダプターおよび5'RACE用プライマー**

アダプターオリゴヌクレオチド (5'RACE\_Sfi IC) の結合部およびこれと相補的な5'RACE用センス鎖プライマー (5'RACE\_1U)、5'RACE用アンチセンス鎖プライマー (gIgH\_rest3D) のアニーリング位置を模式図に示した。“P”はリン酸基、“amino”はアミノ基を示した。3'RACEによって得られた gIgH 3'UTR の配列を相同性検索し、よく保存されていた配列を上を示した。黒点枠は相同な配列を示した。これと相補的な配列を 5'RACE 用アンチセンス鎖プライマーとして用いた。

**Table IV-3. アダプターおよび 5'RACE 用プライマー**

用途	プライマー名	5'	配列	3'	Tm 値
アダプター	5'RACE_5fi IC	P-GGCCAGAATGGCCCAACTCACTTCTGTCAGATC	GATACATGAGCAC-amino		
5'RACE	5'RACE_1U	GTGCTCATGTATCGATCTGACAGAAGTGAGTTG			64.3
	gIgH_rest3D	tttttggccgaggcggccTGCTTTGTTTCTTTTTTATTAGT	ATTTTCC		53.7

**Table IV-4. 5'RACE PCR 反応条件**

KOD Plus ver.2 (TOYOBO)	5 本分 (μl)	温度	時間	Cycle 数
10×KOD Plus ver.2 Buffer	5.0			
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3.0			
2.0 mM each dNTP mix	5.0			
10 μM PrimerF	1.5	95°C	2 min	40 Cycles
10 μM PrimerR	1.5	98°C	10 sec	
0.1 μg/μl cDNA+アダプター	5.0	54°C	30 sec	
KOD Plus ver.2 (1 U/μl)	1.0	68°C	2.5 min	
H <sub>2</sub> O	28.0	68°C	10 min	
Total	50.0	4°C	∞	

PrimerF には 5'RACE\_1U、PrimerR には gIgH\_rest3D を用いた。

5 本分を調整後、10 μl ずつに分注して PCR 反応を行った。

#### IV-1-4. 抗 gIgM 重鎖抗体の作製

##### IV-1-4-1. pET22b(+)-gIgH CH3 プラスミド作製

キンギョ腎臓から cDNA を作製した gIgM 重鎖 (gIgH) CH3 ドメイン (**Fig. IV-10 赤枠部分**) を pET22b(+)ベクター (Novagen) にサブクローニングして、pET22b(+)-gIgH CH3 プラスミドを構築した。すなわち、gIgH CH3 遺伝子領域を増幅するために、制限酵素 *Nco* I および *Xho* I 認識配列を持つプライマー (NcoI\_gIgH CH3\_F プライマー : 5'- aaaaaccatggatGATATTGATGTTCAAAT AGTGCC-3'および gIgH CH3\_XhoI\_R プライマー : 5'- ttttctcgagATTTTCTCT GACGAACTTGGTC-3') を用いて PCR を行った。pET22b(+) (Novagen) ベクターと精製した増幅産物を制限酵素処理に供し、DNA Ligation Kit を用いて gIgH CH3 遺伝子を pET22b(+) ベクターにサブクローニングし、pET22b(+)-gIgH CH3 プラスミドを構築した。作製したプラスミドの塩基配列は、CEQ2000 DNA Analysis System を用いて DNA シークエンシング反応を行い、塩基配列は GENETYX によって確認した。

##### IV-1-4-2. 抗原 gIgH CH3-His タンパク質発現とウサギへの免疫

IV-1-4-1 で構築した pET22b(+)-gIgH CH3 のタンパク質発現用プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB-アンピシリン寒天培地に塗抹し、37°C で一晩培養した。プレ培養として生成したコロニーを LB-アンピシリン液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。次に、プレ培養液を LB-アンピシリン液体培地にそれぞれ添加し、37°C で振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで IPTG を終濃度 100  $\mu$ M となるように添加し、さらに 37°C で時間振盪しながら発現誘導した。誘導終了後、4°C、5000 $\times$ g で 10 分間遠心して菌体を回収し、PBS を加え微量超音波細胞破碎機 (MICROSON XL 2000 ;



MISONIX) を用いて OUT PUT 4 の条件で 30 分間、氷上で菌体を破碎した。菌体破碎後、4°C、1000×g で 3 分間遠心し、上清のみをさらに 4°C、15000×g、40 分間遠心した。上清を捨て、沈殿に 20 ml の Ni 結合緩衝液を加え、氷上でソニケーションして懸濁させ、4°C で一晩反応させて不溶性タンパク質を可溶化した。次に、4°C、15000×g、40 分間遠心分離して上清を採取した。大腸菌培養液から抽出した可溶化したタンパク質を 0.45 μm フィルターでろ過した後、Ni 結合緩衝液によって平衡化した Ni Sepharose HP column (GE Healthcare) に流速 1 ml/min で供した。5% Ni 溶出緩衝液/ Ni 結合緩衝液で洗浄および平衡化後、Ni カラムに結合したタンパク質を 100% Ni 溶出緩衝液によって溶出させた。溶出したタンパク質を Amicon Ultra (10 k, Merck Millipore) によって 4°C、5000×g、1 時間の条件で限外濾過し濃縮した。限外濾過後のタンパク質を、リン酸緩衝液で平衡化した Hi Load 16/600 Superdex 200 pg (GE Helthcare) に流速 0.1 ml/min で分画した。分画後のタンパク質を Amicon Ultra 10K によって 4°C、5000×g、1 時間の条件で限外濾過して濃縮した後、Bradford 法を用いてタンパク濃度を測定した。その後、SDS-PAGE (17.5%ゲル) に供し、CBB 染色とウェスタンブロットを行って精製した gIgH CH3-His タンパク質の確認を行った。すなわち、SDS-PAGE 後、iBlot Gel Transfer system (Invitrogen) を用いて PVDF 膜に転写し、NETG で 1 時間ブロッキングした。その後、抗 His 抗体 (GE Healthcare) を NETG で 5000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して一次抗体反応を行った。NET を用いて 5 分間振盪して洗浄を 3 回行い、抗マウス IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) を NET で 15000 倍希釈し、室温にて 45 分間振盪して二次抗体反応を行った。NET を用いて 15 分間の洗浄を 3 回行った。Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Scientific) を用いて化学発光させ、CCD カメラ (Light Capture II, ATTO) で検出した。

精製した gIgH CH3-His タンパク質を株式会社バイオシーラムに送付し、ウサギに免疫した。免疫方法は、ウサギの皮内に 0.3 mg の精製 gIgH CH3-His タンパク質を FCA (Freund's Complete Adjuvant) とともに 2 週間間隔で合計 5 回免疫した。血清のサンプリングは免疫前、免疫 4 回目 1 週間後 (試採血)、免疫 5 回目 1 週間後の合計 3 回行った。

#### IV-1-5. 水泡液および血清中の gIgM 検出

IV-1-4 で作製した抗体の反応性を調べるために、キンギョ水泡液、キンギョ血清、コイ血清、ゼブラフィッシュ血清を SDS-PAGE (12.5%ゲル) に供し、CBB 染色と免疫したウサギ血清を用いたウェスタンブロットを行った。すなわち、SDS-PAGE 後、iBlot Gel Transfer system (Invitrogen) を用いて PVDF 膜に転写し、NETG で 1 時間ブロッキングした。その後、ウサギ血清を NETG で 5000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して一次抗体反応を行った。NET を用いて 5 分間振盪して洗浄を 3 回行い、抗ウサギ IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) を NET で 15000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して二次抗体反応を行った。NET を用いて 15 分間の洗浄を 3 回行った。Pierce Western Blotting Substrate Plus を用いて化学発光させ、CCD カメラで検出した。

#### IV-1-6. ウサギ血清からの抗 gIgM 抗体の精製

IV-1-4 の免疫で得られた gIgH CH3-His 免疫後のウサギ血清から抗 gIgM ウサギ IgG ポリクローナル抗体の精製を試みた。PBS で平衡化した HiTrap protein A HP (1 ml、GE Helthcare) カラムに 1 ml のウサギ血清を添加した。次いで、5 ml の PBS でカラムの非吸着分子を一次洗浄した。また同様に、二次洗浄液 (50 mM リン酸緩衝液、1.5 M NaCl、0.4 M アルギニン、pH 7.0) をカラムに通して洗浄

し、再び PBS で三次洗浄した。洗浄後、5 ml の溶出液 {0.4 M アルギニン (free base)、0.1 M NaCl、pH 3.8 (1M 酢酸で pH 調製)} でウサギ IgG 抗体を溶出した。溶出液の酸による IgG の変性を防ぐため、溶出画分には 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) を加えて pH 7.0 前後に調製した。カラム精製したサンプルを SDS-PAGE に供し、CBB 染色およびウェスタンブロットにより検出を行い、抗体の精製を確認した。すなわち、SDS-PAGE 後、iBlot Gel Transfer system を用いて PVDF 膜に転写し、NETG で 1 時間ブロッキングした。その後、抗ウサギ IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) を NET で 18000 倍希釈し、室温にて 1 時間振盪して抗体反応を行った。抗体反応後、NET を用いて 15 分間振盪洗浄を 3 回行った。Pierce Western Blotting Substrate Plus を用いて化学発光させ、CCD カメラで検出した。

#### **IV-1-7. 水泡液中 IgM の精製**

##### **IV-1-7-1. 硫酸分画**

水泡液を 4°C で 1000×g、10 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清に終濃度が 20、30、40、50、および 60% になるようにそれぞれ飽和硫酸を加え、4°C で一晩塩析した。その後、4°C、15000×g、40 分間遠心分離を行った。沈殿には MES 結合緩衝液を加えて溶解した。上清には終濃度が 90% となるように硫酸アンモニウムを加え、氷上で 1 時間塩析した後、4°C、15000×g、40 分間遠心分離して上清を回収した。沈殿は MES 結合緩衝液を加えて溶解した。これらの画分を SDS-PAGE (10%ゲル) に供してタンパク質を分離した。飽和硫酸を加える前の水泡液上清はコントロールとして用いた。分離したタンパク質は CBB 染色およびウェスタンブロットで確認した。ウェスタンブロットは、ゲル中のタンパク質を iBlot Gel Transfer system (Invitrogen) を用いて PVDF 膜に転写し、5 %

[w/v]スキムミルク/PBST で5分間ブロッキングした。次いで、Western BLoT Rapid Detect (タカラバイオ) を用いて、5% [w/v]スキムミルク/PBST で20×Dillution Buffer (タカラバイオ) を20倍希釈、Primary AB polyclonal (anti-gIgM rabbit IgG ; 2.94 µg/µl) を4000倍希釈、IgG Detector Solution (タカラバイオ) を2000倍希釈したものをを用いて30分間反応させた。PBST で5分間振盪洗浄を5回行った後、Pierce Western Blotting Substrate Plus に室温で5分間反応させ、CCDカメラで化学発光を検出した。SDS-PAGE およびウェスタンブロットについては以降も同様の手順で行った。

#### IV-1-7-2. イオン交換クロマトグラフィー

サンプル中の残留硫酸による塩濃度の影響を押さえるために、gIgMを含む硫酸沈殿産物を Amicon Ultra 50K (1 ml ; Merck Millipore) によって、14000×g で遠心して限外濾過により濃縮し、MES 結合緩衝液を加えて緩衝液を置換した。得られたサンプルを低圧クロマトグラフィーシステム (AKTAprime plus) を使用して MES 結合緩衝液で平衡化した SP Sepharose FF カラム (5 ml ; GE Healthcare) に供した。MES 結合緩衝液でカラムを洗浄して非吸着画分を回収後、MES 溶出緩衝液を 0-50%まで最終溶出量 100 ml になるようにリニアグラジエントで溶出した。その後、MES 溶出緩衝液を 100%に引き上げて残りのタンパク質を溶出した。各ピーク付近を Amicon Ultra 50K (15 ml ; Merck Millipore) によって 5000×g で遠心して限外濾過により濃縮した。これを SDS-PAGE (12.5%ゲル) に供してタンパク質を分離した。得られたゲル中のタンパク質は CBB 染色およびウェスタンブロットで確認した。

#### IV-1-7-3. ゲル濾過クロマトグラフィー

濃縮した gIgM を含むピーク付近のイオン交換画分をゲル濾過用緩衝液で希釈して 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (Merck Millipore) に供した。得られたサンプルを低圧クロマトグラフィーシステム (AKTApriime plus) を使用してゲル濾過用緩衝液で平衡化した Hiroad 16/60 Superdex (200 pg ; GE Healthcare) に供した。流速 0.2 ml/min にて 1.0 ml ずつ分画し、ピークが見られた画分を Amicon Ultra 50K (1 ml ; Merck Millipore) を用いて 14000 $\times$ g で遠心して限外濾過を行った。SDS-PAGE (10%ゲル) に供してタンパク質を分離した後、CBB 染色およびウェスタンブロットで確認した。

#### IV-1-7-4. 水泡液中 gIgM 量の定量的検出

ゲル濾過精製後、gIgM を標準溶液として、未精製水泡液中の IgM 量の測定を行った。精製 gIgM および未精製水泡液のタンパク質濃度を Qubit 2.0 フルオロメーター (Invitrogen) を用いて測定した。精製 IgM は 50、75、100、150、300 および 400 ng、未精製水泡液は 1.5、2、3、4 および 6  $\mu\text{g}$  をそれぞれ SDS-PAGE (7.5%ゲル) に供し、IV-1-6 で精製した抗 gIgM ウサギポリクローナル抗体によるウェスタンブロットを行い、画像解析ソフト *Image J* (RSB) を用いて数値化した。

また、ELISA 法による定量的検出の検討も行った。すなわち、96 穴プレート (MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE) に 0.2、0.4、0.8、2、4、8、16  $\mu\text{g}/\text{well}$  となるように 50 mM 炭酸緩衝液で希釈した水泡液、あるいは 0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 ng/well となるように 50 mM 炭酸緩衝液で希釈した水泡液由来精製 IgM あるいは BSA (陰性対照) をそれぞれ 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  分注し、4 $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置して固相化した。固相化反応後、PBST 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  で 3 回洗浄し

た。洗浄後、1% [w/v] BSA/PBS を 200  $\mu\text{l/well}$  分注して 25°C で 2 時間静置してブロッキングを行った。ブロッキング後、PBST 200  $\mu\text{l/well}$  で 3 回洗浄し、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 4000 倍希釈した抗 gIgM ウサギ抗体 (2.94  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を 100  $\mu\text{l/well}$  分注し、25°C で 2 時間静置して一次抗体反応を行った。PBST 200  $\mu\text{l/well}$  で 3 回洗浄し、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で 18000 倍希釈した抗ウサギ IgG HRP 標識抗体を 100  $\mu\text{l/well}$  分注し、25°C で 1 時間静置して二次抗体反応を行った。PBST 200  $\mu\text{l/well}$  で 5 回洗浄し、室温に戻した TMB 基質 (SurModics) を 100  $\mu\text{l/well}$  分注し、室温で 5 分静置して反応させた。反応停止液を 100  $\mu\text{l/well}$  加え反応を停止させ、プレートリーダーで波長 450 nm の吸光度を測定した。

## IV-2. 実験結果

### IV-2-1. キンギョ水泡液および血液中の細胞の観察

ゼブラフィッシュの細胞を参考[50]にしてキンギョの細胞の観察を行った結果、キンギョ水泡液中には、血液中の細胞のうち赤血球以外の細胞が確認され、抗体生産細胞であるB細胞を含むリンパ球の存在が確認された (Fig. IV-3)

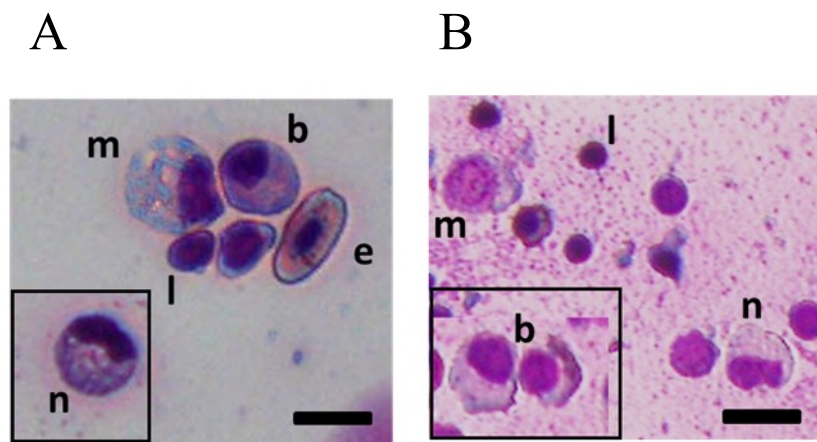


Fig. IV-3. メイギムザ染色

(A) スイホウガンから採取した血液および(B) 水泡液に含まれる細胞の観察を行った。e, 赤血球; n, 好中球; b, 好塩基球; m, 単球; l, リンパ球。スケールバーは 10 μm を示した。

### IV-2-2. gIg 重鎖の解析

#### IV-2-2-1. gIg 重鎖 V 領域

ゼブラフィッシュの V 領域の配列情報と比較して、得られた遺伝子を分類した結果を Fig. IV-4 に示した。各領域は Danilova らの論文を参考にした[51]。今回得られた配列はそれぞれ  $V_{H1}$  から  $V_{H6}$  の 6 サブグループに分けることができると考えられた。ただし、 $V_{H6}$  に分類した gf4-4 については Leader peptide が得られなかった。各サブグループ内での相同性は約 90%と高い値を示した。

	< Leader peptide >	< FR1 >	< CDR1 >	
<b>Vi1</b>	zf_vh114	-MMDVLQFGVLLMIVSTVRGQSLTSSDS-VVKRPGESVTLSCTIVSGISM	---	SYMHWIR
	gf_1-9	...E..LHL...L.I.S.S.....K.....F.....	---	W.D...
<b>Vi2</b>	zf_vh101	-MKNALCLLLLSFCLQRIKQSMESIESSVQRKPGETLTLSCRGSGFSF	---	SYMHWIR
	gf1-2	...T.....S.....TTVK.....	---	WN...M.
	gf1-6	...T.....S.....TTVK.....V.....	---	CCS.....
	gf2-2	...T.....S.....TTVK.....	---	CCS.....
	gf3-1	...T.....S.....TTVK.....	---	WN...M.
<b>Vi3</b>	zf_vh_zeta1	MIASSLCLFLLLAAVSRVHCVELTQTDS-IVLRPGQVLTLSCKISGYSV	---	DSSYCTDFIR
	gf1-3	..S...W.L.....-M..S.....L..T..S.....G...	---	
	gf3-2	..S...W.L.....I...-L..S.....L..T..S..R..W..H..	---	
<b>Vi4</b>	zf_vh_mu2	MDCI--SVLLLLATAHCYFCIIELDQPLV-TVVKPGETFTIIPCKITGYS	---	SGGG-YTNWIR
	gf4-6	.YFR--LL.MI.S..PSVN...N..AL-M.I...S.S.G.....-C.....	---	
<b>Vi5</b>	zf_vh_mu3	-MFFLKLFLQLAVAHSVYSQIVLTQSEQSVSVSPSGSVKLTCCACSGFTL	---	SYRMHWIR
	gf1-7	...S...VL..AV.....V.....V...GT.Y.....V...--N.....	---	
	gf4-5	...S...VL..AV.....V.....V...GA.Y.....V...--N.....	---	
<b>Vi6</b>	zf_12-1	-----CNIIILTQPNIS-IILQPGNSLTLTCEVSGYSVFDNDYATAWIR	---	
	gf4-4	-----V...T...-V...H.....S.....	---	

	FR2	< CDR2 >	< FR3 >	similarity
<b>Vi1</b>	zf_vh114	QKPGKGLEWIGRIDG-GTGINFAQSLQGFITITKDTSKNMLYLEVKQLKSE	DAVYYCAR	
	gf_1-9	....A....Y..T-.STVYYS.....S.....I.H...S..T.....T.		
<b>Vi2</b>	zf_vh101	QQAGKPLVWIG----GTGYGYVESFKGRGEITRDNSKSMTYLKLSGLT	VEDSAVYYCAR	
	gf1-2	.KV.....M.----S...S.....T.....V.....A.....		
	gf1-6	....A....M..RVHSG.S..D.S...A..T.....V.....A.....K		
	gf2-2	....M...RVYDSSR.E.S.....T.....V.....A.E.....K		
	gf3-1	.KV.....M.----S...S.....T.....V.....A.....		89.2%
<b>Vi3</b>	zf_vh_zeta1	QAAGKALEWVGEICG-SGNTYYSDKLKSRTFVSRDSSSSSVTLSGQNM	QTEDTAVYYCAR	
	gf1-3	.P.....L..S-D.T.....Q.T...INT...Q.....S.....S		
	gf3-2	.P.....GS-D...N.N.....QIA..I..NT..R.....S.....		86.3%
<b>Vi4</b>	zf_vh_mu2	HSAGKPEWIGWFQS-SSSNGVKDSLKNKISFSSESSNAVILTGKNFNTE	DTAVYYCAR	
	gf4-6	....AL.....C.-.GNT.TS.TM.....TA.T.C.T.F.R.Q..Q.....		
<b>Vi5</b>	zf_vh_mu3	QAPGKLEWIIHFYS-NSDNGAAQSVQGRFTASKDSSN--FYLHMNQLKTE	DTAVYYCAR	
	gf1-7	.....Y.T-D..K.S.....T.T...--L...S.....		
	gf4-5	.....Y.T-D..K.S...L.....T...--L...S.....		97.4%
<b>Vi6</b>	zf_12-1	QPAGKALEWIVHIWG-GGGITKDLLANKFSICKSDSSNRVTLQGS-KTE	DTAAYCAR	
	gf4-4	H....V...-.....R.Y..ES.S...S.....T...K..NLQ....V....		

Fig. IV-4. gIgH V領域のアミノ酸配列比較

得られた gIgH V領域アミノ酸配列の相同性を比較した。ドットはゼブラフィッシュのアミノ酸配列 zf\_vh114、zf\_vh101、zf\_vh\_zeta1、ze\_vh\_mu2、zf\_vh\_mu3、zf\_12-1 とそれぞれ相同な配列を示し、ハイフンはギャップを示した。赤枠は鎖内ジスルフィド結合を形成すると考えられる Cys、青枠は架橋を形成すると考えられる Trp、緑枠は FR2 の C 末端側に存在する特徴的な Trp を示した。また、黄色で塗りつぶした配列は FR3 の C 末端側に存在するよく保存された配列 ( $_{93}$ YYCAR $_{97}$ ) を示した。また、各サブグループ内での相同性の平均値をパーセント表示で示した。GenBank アクセス番号：zebrafish; zf\_vh114 (AAK20223); zf\_vh101 (AAK20219); zf\_vh\_zeta1, ze\_vh\_mu2 (AAU06721); zf\_vh\_mu3 (AAU06722) ; zf\_12-1 (BX510335)。



次いで、6サブグループ間でのアミノ酸配列のアライメント解析の結果を **Fig. IV-5** に示した。V<sub>H</sub>6 の gf4-4 を除いた V<sub>H</sub>1 から V<sub>H</sub>5 で比較すると、V<sub>H</sub>2 の CDR2 が明らかに短くなっており V 領域全長としても最も短くなっていた。サブグループ間での相同性は約 40%と低い値を示した (**Table IV-5**)。ドメイン内ジスルフィド架橋を形成する Cys22 や Cys92、FR2 の上流に位置する Trp36 や末端付近に位置する Trp47 は、Ig の構造タンパク質の主要な残基であり、よく保存されていた。また、FR3 の末端に存在する <sub>93</sub>YYCAR<sub>97</sub> 配列は、サブグループの違いに関わらずよく保存されていた。さらに、今回得られた V 領域 FR2 の C 末端には <sub>42</sub>GKXLE (or V) <sub>46</sub> のよく保存された配列が確認できた。

	< Leader peptide >	>< FR1 >	>< CDR1 >
VH1 gf1-9	-MMEVLLHLVLLLISSVSG	QSLTSSDS-VVKKPGESVILS	CTVSGFSMS--SYWMDWIR
VH2 gf1-2	-.KNT.CL.L.SFSLQRIKC.	ME.IE.TT.....TL....	RG....F.--.WN.H.M.
VH3 gf1-3	MISSS.WL.L..AAV.R.HC	VE..QT.-M.LS..QVL....	KL..YTV.DS..CTGF..
VH4 gf4-6	MYFR--.L.MI.STAP..NC	IE.NQPAL-M.I.....FS	IG.KIT.Y.A.GGG-CTN...
VH5 gf1-7	-.FSLK.FVL.AAVH.VY.Q	VV..Q.EQS..VS..T.YK.T	.AC...TV.--N.R.H...
VH6 gf4-4	-----	IV..QTN.-I.LQ..H.L..	T.E...Y.VTDD..ATA...

	FR2 ><	CDR2 ><	FR3 >
VH1 gf1-9	QKPGKALEWIGYIDTGSTV	VYYSQS	LQGFISITKDTSKNILHLEV
VH2 gf1-2	..V..P.V.M.----	..GYG..E.FK.RTE..R.N.	SMVY.KLSG.TA..S....A.
VH3 gf1-3	.PA.....V.L.CSDG.T...	DK.KSR.QV.R.S.I.TVT.	QGQNMQ....S...AS
VH4 gf4-6	HSA.....WFCSSGNTGT.	DTMKNKI.F.AE..C.TVF.	RGQNFQ.....A.
VH5 gf1-7	.A...G...LHYY.D.DKGS	A..V..R.TTST.S.N--.Y.	HMSQ.....A.
VH6 gf4-4	HPA..V...VH.WG.GRI.K	KE...SNK...S.SD.S.T	VT.KGQN.Q.....A.

**Fig. IV-5. gIgH V 領域のサブグループ間でのアミノ酸配列比較**

得られた gIgH V 領域サブグループ間でのアミノ酸配列の相同性を比較した。ドットは V<sub>H</sub>1 の gf1-9 と相同な配列を示し、ハイフンはギャップを示した。赤枠は鎖内ジスルフィド結合を形成すると考えられる Cys、青枠は架橋を形成すると考えられる Trp、緑枠は FR2 の C 末端側に存在する特徴的な Trp を示した。また、黄色で塗りつぶした配列は FR3 の C 末端側に存在するよく保存された配列 (<sub>93</sub>YYCAR<sub>97</sub>) を示した。

**Table IV-5. gIgH V領域遺伝子のアミノ酸配列のサブグループ間相同性**

	サブグループ					
	$V_{H1}$	$V_{H2}$	$V_{H3}$	$V_{H4}$	$V_{H5}$	$V_{H6}$
(%)	gf1-9	gf1-2	gf1-3	gf4-6	gf1-7	gf4-4
gf1-9	100					
gf1-2	47.41	100				
gf1-3	46.15	37.29	100			
gf4-6	39.64	31.53	50	100		
gf1-7	48.28	37.72	43.48	33.33	100	
gf4-4	50.00	40.22	55.67	47.96	43.43	100

さらに、Danilova らの論文を参考[51]にして作製したサブグループ別の分子系統樹を **Fig. IV-6** に示した。 $V_H$  領域は主に哺乳類に存在するグループ A および B、魚類から哺乳類まで幅広く存在するグループ C、硬骨魚類に存在するグループ D、軟骨魚類に存在するグループ E の 6 グループに分かれている。今回得られた 6 サブグループのうち  $V_{H5}$  以外はグループ D に、 $V_{H5}$  はグループ E に分類された。また、 $V_{H1}$  は zebrafish  $V_{H1}$ 、trout  $V_{H9}$ 、catfish  $V_{H1}$ 、cod 1 とクラスターを形成しており、cod 1 との相同性は 57.7% と低かったが、これ以外の 3 種類との相同性は 74.1–76.5% と比較的高い値を示した。これは、キングョ内の別のサブグループとの相同性よりも高い値であった。同様に、 $V_{H2}$  は zebrafish  $V_{H4}$ 、trout  $V_{H2a}$ 、char、trout  $V_{H2b}$  (相同性 60.7–84.8%) と、 $V_{H3}$  は zebrafish  $V_{H5}$ 、catfish  $V_{H6}$  (相同性 66.7–82.1%) と、 $V_{H4}$  は zebrafish  $V_{H6}$ 、trout  $V_{H10}$  (相同性 54.4–67.3%) と、 $V_{H5}$  は zebrafish  $V_{H7}$ 、trout  $V_{H8}$  (相同性 64.0–81.6%) と、 $V_{H6}$  は catfish  $V_{H4}$ 、trout  $V_{H6}$ 、cod 2 (相同性 54.2–73.5%) とクラスターを形成していた。

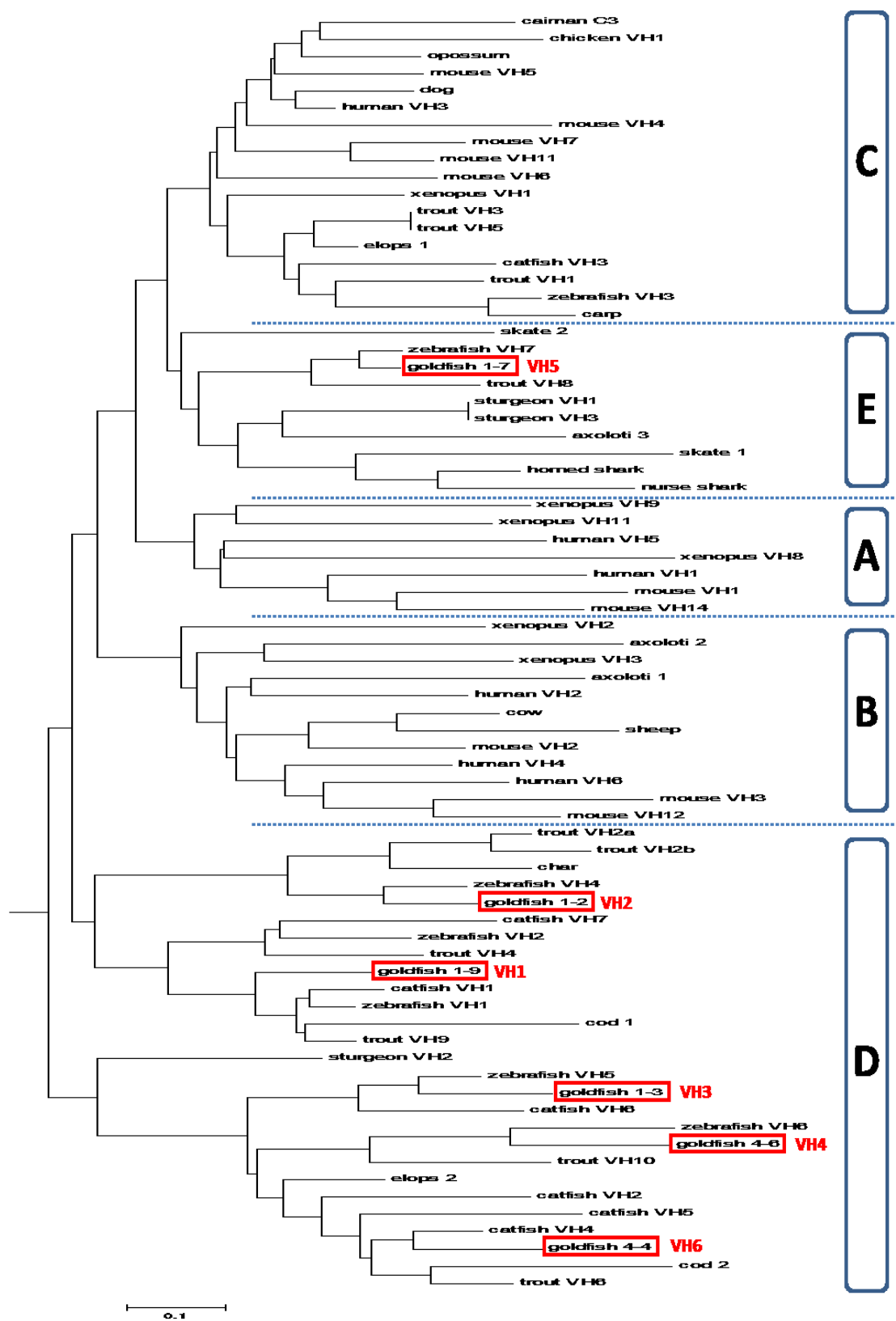


Fig. IV-6. 各種 IgH 鎖 V 領域遺伝子のサブグループ別の系統樹

ソフトウェア MEGA5 を用いて今回得られた  $V$  領域を含むサブグループ別の分子系統樹を作成した。赤枠はキンギョを示した。goldfish 1-9= $V_{H1}$ 、1-2= $V_{H2}$ 、1-3= $V_{H3}$ 、4-6= $V_{H4}$ 、1-7= $V_{H5}$ 、4-4= $V_{H6}$

GenBank アクセス番号 : axolotl 1 (CAA51951) ; axolotl 2 (AAA16829) ; axolotl 3 (CAA51954) ; caiman C3 (AAA49192) ; carp (BAD69715) ; catfish VH1 (AAA56682) ; catfish VH2 (AAA49332) ; catfish VH3 (AAA56683) ; catfish VH4 (AAA56684) ; catfish VH5 (AAA49336) ; catfish VH6 (AAA56685) ; catfish VH7 (AAC60142) ; char (CAA04035) ; chicken VH1 (AAA50805) ; cod 1 (X76510) ; cod 2 (X76507) ; cow (AAB00200) ; dog (P01784) ; elops 1 (AAA49238) ; elops 2 (AAA49240) ; horned shark (AAA49326) ; human VH1 (CAA78173) ; human VH2 (CAA78198) ; human VH3 (Z96969) ; human VH4 (CAA78234) ; human VH5 (AAD00056) ; human VH6 (CAA78244) ; mouse VH1 (D14634) ; mouse VH2 (AAA98612) ; mouse VH3 (AAA38075) ; mouse VH4 (X55984) ; mouse VH5 (AAC04323) ; mouse VH6 (AAA16370) ; mouse VH7 (J00499) ; mouse VH11 (AAB03593) ; mouse VH12 (AAB07381) ; mouse VH14 (CAA39399) ; nurse shark (AAA50817) ; opossum (AAC48815) ; sheep (CAA42611) ; skate 1 (AAA49547) ; skate 2 (AAA49546) ; sturgeon VH1 (CAA73715) ; sturgeon VH2 (CAA11055) ; sturgeon VH3 (CAA73715) ; trout VH1 (X92501) ; trout VH2a (X81509) ; trout VH2b (X81512) ; trout VH3 (X81513) ; trout VH4 (AAA61754) ; trout VH5 (X81513) ; trout VH6 (X81481) ; trout VH8 (X81482) ; trout VH9 (X81504) ; trout VH10 (X81508) ; xenopus VH1 (AAA49792) ; xenopus VH2 (E47624) ; xenopus VH3 (AAA49851) ; xenopus VH8 (CAA40188) ; xenopus VH9 (CAA40189) ; xenopus VH11 (CAA40191) ; zebrafish VH1 (AAK20223) ; zebrafish VH2 (AAK20222) ; zebrafish VH3 (AAK20226) ; zebrafish VH4 (AAK20219) ; zebrafish VH5 (AAU06730) ; zebrafish VH6 (AAU06721) ; zebrafish VH7 (AAU06722)。

#### IV-2-2-2. gIg 重鎖 *J* 領域

*D*領域と *J*領域の境界は最も変化に富んだ CDR3 に存在し、gIgH *D* 領域および *J*領域のゲノム情報は解読されていないため、今回得られた遺伝子だけでは *J*領域の特定はできなかった。そこで、ゼブラフィッシュのゲノム情報の IgH *J* 領域遺伝子配列をもとに gIgH *J* 領域を特定した[51, 52]。その結果、今回得られた遺伝子は *J*領域において4ファミリーに分けることができると考え、それぞれ  $J_{H1}$  から  $J_{H4}$  に分類した。各ファミリー内での塩基配列のアライメント解析の結果を **Fig. IV-7** に示した。最初の6塩基の相同性は0-100%と変化に富んでいたが、残りの配列は80.0-93.3%と比較的安定であった。これらの遺伝子において、各ファミリー内の相同性は約90%と高い値を示した。一方、別々のファミリー間の相同性は約75%となっていた (**Table IV-6**)。

	CDR3	FR4	similarity
<b>JH1</b>			
zJmu1_gen	22095:ACTACTACTTTGACTACTGGGGGAAAGGAACCAAGTGACAGTTTCCTCAG		
zJmu1_cd3	267:.....T.....		
zJmu1_cd6	261:C.....T.....T.....		
zJmu1_cd9	264:.....GCT.....		
zJmu1_cd10	270:GTGG.....		
gJmu1-1	30:.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-2	360:..TA.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-3	368:GGGC.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-4	30:GGGG.....T.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-5	30:GGCGA.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-6	375:GGG.G.....A.....G.....C.....C.....A...T		
gJmu1-7	361:GT.C.....A.....G.....C.....C.....A.T..		
gJmu1-8	30:CTGTAG.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-9	396:GTGG.G.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-10	30:..TA...T.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-11	30:TAACTG.GC.....A.....G.....C.....C.....A.....		
gJmu1-12	30:..TA..GCTC.....A.....G.....C.....C.....A.....		90.6%
<b>JH2</b>			
zJmu2_gen	22394:ACGGTGCCTTTGACTACTGGGGGAAAGGGAACAATGGTCACTGTCACATCAG		
zJmu2_VH115	406:.....		
zJmu2_VH34	120:....T.....		
zJmu2_VH5r13	395:..A.T.....		
zJmu2_VH114	385:..ACTT.....		
gJmu2-1	30:.....T.....A.....G.....C.....A.....		
gJmu2-2	375:G.....T.....A.....G.....C.....A.....		98.0%
<b>JH3</b>			
zJmu3_gen	22658:ACAATGCTGCCTTTGACTACTGGGGGAAAAGGCACGATGGTCACAGTGACATCAG		
zJmu3_VH103	367:.....T.....		
gJmu3-1	360:..AT.C.....G.....TTC.....T.....		
gJmu3-2	378:G.G.G.GG.....G.....TTC.....T.....		88.9%
<b>JH4</b>			
zJmu4_gen	22961:ACAATGCTTTTGGACTACTGGGGGAAAGGAAGTATGGTCACCGTCTCGTCAG		
zJmu4_VH3	389:..G.C.....		
zJmu4_VH88	361:GGG.C.....		
zJmu4_VH82	140:..ACGGA.....		
gJmu4-1	33:.....C.....T.....T.....		
gJmu4-2	30:T.....C.....T.....T.....		
gJmu4-3	30:GGT.....G.....C.....T.....T.....		
gJmu4-4	299:..T.....C.....T.....T.....		
gJmu4-5	361:G.T.....A.T.....C.....T.....T.....		
gJmu4-6	373:G.G.....C.....T.....T.....		
gJmu4-7	30:CGCGG.....C.....T.....T.....		94.5%

**Fig. IV-7. gIgH J領域の塩基配列比較**

得られたJ領域遺伝子塩基配列についてゼブラフィッシュとの相同性を解析した。ドットはゼブラフィッシュのゲノム配列 zJmu1\_gen、zJmu2\_gen、zJmu3\_gen、zJmu4\_gen とそれぞれ相同な配列を示し、ハイフンはギャップを示した。また、各ファミリー内の相同性の平均値をパーセント表示で示した。GenBank アクセス番号： zebrafish

(BX510335) ; zJmu1\_cd3 (AF273902) ; zJmu1\_cd6 (AF273900) ; zJmu1\_cd9 (AF273901) ; zJmu1\_cd10 (AF273891) ; zJmu2\_VH115 (AF273879) ; zJmu2\_VH34 (AF273881) ; zJmu2\_VH5r13 (AF273887) ; zJmu2\_VH114 (AF273880) ; zJmu3\_VH103 (AF273877) ; zJmu4\_VH3 (AF273883) ; zJmu4\_VH88 (AF273885) ; zJmu4\_VH82 (AF273888)。

**Table IV-6. gIgH J 領域遺伝子の塩基配列のファミリー間相同性**

	Family			
	$J_{H1}$	$J_{H2}$	$J_{H3}$	$J_{H4}$
(%)	gJmu1-1	gJmu2-1	gJmu3-1	gJmu4-1
gJmu1-1	100			
gJmu2-1	70.6	100		
gJmu3-1	63.0	72.2	100	
gJmu4-1	78.4	78.4	72.2	100

**IV-2-2-3. gIg 重鎖定常領域**

今回得られた遺伝子のうち gJmu1-9 の定常領域のアミノ酸配列と真骨類の IgM 重鎖定常領域のアミノ酸配列の相同性比較を行った結果を **Fig. IV-8** に示した。gJmu1-9 の定常領域の C<sub>H1</sub> から C<sub>H4</sub> および C 末端鎖の領域の特定は、IgM 重鎖について以前に報告されていたアミノ酸配列のアライメントおよびタイセイヨウダラ (AJ871288)、ゼブラフィッシュ (BAX510335) およびソウギョ (GQ480796) のゲノム配列から予測されるアミノ酸配列の相同性比較をもとに行った[47-59]。その結果、gJmu1-9 の定常領域のアミノ酸配列の長さは 436 基で、他の魚類と近い値を示した。また、種間でよく保存されている IgM 重鎖定常領域を構造的に支える鎖内ジスルフィド結合や架橋のような特徴的な Cys はよく保存されていた。一方、N-結合型糖鎖修飾サイトには種が離れると変化するものが存在し、種の分化と同様に分子進化している部分も存在すると考えられた。これらを踏まえた gJmu1-9 の定常領域全体のアミノ酸配列の相同性はコイト 82.9%、ソウギョと 65.8%、ゼブラフィッシュと 62.8%であった。相同性比較の結果をもとに作成した系統樹を **Fig. IV-9** に示した。また、今回得られた遺伝子のうちキンギョ IgH 全長をコードしている遺伝子の 1 つは 1725 塩基から成り、575 アミノ酸をコードしていた (**Fig. IV-10**)。

## I Intrachain disulphide linkage

**C<sub>H</sub>1**

*C. auratus* AQS SRPKSIFAKS--QCTPDSGGYVV GCHRGEPEDSLTEKWDTKTQKEL--SDFVQYPAF GSSGGQYTKI SHI RVKASDLDPKPKP YKCEASMSNGK--LVS DITAP ---  
*C. carpio* RES SPPKSIERAKS--QCTPDSGTAVTI GCHTREGSPADSLTEKWDYTWKEL--SDFVQYPAF GSSGGTETKVSHEVRAQ SDDLQKPK YKCEASMSKGGKDIKIVLPLFP ---  
*C. ide 2la* -EP SPPKSIERALS--QCSSDSE-FLTI GCVSREGSPADSLTEKWDPAKKEV--TDFVQYPAF GSDGDYTKI SHI RVKASDMMW QMP YKCEASMSKGGKERELPPTPP ---  
*D. rerio* AQP SRPQSVFGLS--QCSSGSDSITL GCLAKGSPADSLNEKWDPAKGLD--SDFVQYPAF GHEGDYTKI SHI RVKASDMMI DTKYTI CEASMSVQAP--KTA SLAPLP ---  
*I. punctatus* AVQ SRPKSLFVW--QCGASDGLVTL GCVT EOLA SADGLSET WKDA SGGAL--TDVVQYPAV QAT GGT SVSRVREKASDMM GHHKFT CEVKMGLGSK--DA SLQKPP ---  
*O. mykiss* ASSTRP-TLEPLA--QCGS GTGDHRTL GCLATGETPA-SLTERWDE GGNLS--TDFVQYPAV TGGSTHGESQL RVEKADWD--SKKEECARVEHSAGSK--KVPVKKQ ---  
*S. salar* ASSTRP-TLEPLA--QCGS GTGDHRTL GCLATGETPA-SLTERWDE GGNLS--TDFVQYPAV TGGSTHGESQL RVEKADWD--SKI FECAVEHSAGSK--TVPLKKQ ---  
*G. morhua* -AVQAP-TVEPLV--QCGS GT-BEVTI GCHRTGETPA-SLTERWEEF-GGESEL--ANAVQYPTT KCDNHYTGVSOI RVERQDWARPKP FT CSREHRAGETE--KVDFLKQ ---  
*E. coioides* ATPMAP-TVEPLM--QCGS GTGHTVTL GCLATSETPS-SLTYWMIWNGAL--TDFI QYPPV LKMDLTYTGISQVKVSKQDWDARKSFRCDVTRLAGHQ--HVLIITKP ---  
*F. rubripes* ATPMAP-TVEPLI--QCGS GTGHTVTL GCLADFTPS-DLTYWRK-DGVDL--KDFI QYPTT HNGNFYTKISQI QVKEQDWD GSPNFT CAAATHSTGML--WT PFRPKPE ---  
*E. saurus* GEQASP-TVEPLV--SCG-ATSGYVTH GGIKGYLPD-SLTERWS-KDSTDL--TDYLQYPSVLSGGKYDRVSRARVTE GDEKSKAEFKCT TELGCKKT--PVVLPKP ---  
*A. anguilla* GTKSPF-SVEPLI--SCGP GSSGYVV GCHAKDFTPD-LLTERWNEKGGALADT DELQYPSVQSGEVTA VSRVVKADMM QKQAYE CSAREYD GKST--TVEIKHPE ---  
*A. sinensis* -TP SPP-TVEPLMQS CCLADVTGALAT GCLATELPT-PATESWTDQTKA FQTDKSLQYPPVQPGGTYTSTGLAL SDAREWOPREYFYCT VEVRS GKK--HA QVWK ---  
*N. huso* -TP SPP-TVEPLMQS CCLADVTGPSAT GCLATELPT-PATESWTDQTKA FQTDKSLQYPPVQPGGTYTSTGLAL SDAREWOPREYFYCT VEVRS GKK--TVKVRK ---  
*A. guenidestae dtii* -TP SLP-TVEPLMERA CCLSDISGPVAT GCLATELPT-PATESWTDQTKA FQTDKSLQYPPVQPGGTYTSTGLAL SDAREWOPREYFYCT VEVRS GKK--KVKVRK ---  
*A. baerzi* -TP SPP-TVEPLMQA CCSVVDTGPSAT GCLATELPT-PATESWTDQTKA FQTDKSLQYPPVQSGGTYTSTGLAL SDAREWOPREYFYCT VEVRS GKK--KVKVRK ---

## Intrachain disulphide linkage

**C<sub>H</sub>2**

*C. auratus* -SPPDQDRAVYLVPTKT ELR-META TFHC LARRE SPNKYTE EWS--LNGQ--KVVRIIDKYBKSEKNGSVT-EYSAT SILQTKRE EWKSESKVKCFERKAGNEIEREYA ---  
*C. carpio* -PPPDVRAVYLVPTKHDLE-META TFHC LAQRE SPKALYTE KWS--LDDK--EVKET IE SYDKSEKNGSVT-EYSAT SILQTKREA WVKQTSKVKCFEVRKAGNEIEREYA ---  
*C. ide 2la* -PPPDQDRAVYLVPTOKDLE-MGTATFLC LAQRE SPKAYSE KWF--KDGH--QVRMT INTYDTSEKNGSVT-LYSAT SLLQISAREWVTA-AKIKCFEHEKT GKEVERRAYT ---  
*D. rerio* -APPPDLRAVYLVPTAKHELE-GGSA TFHC LARRE SPKQYEE KQY--QMDQ--DVVRAVDNE FKDEKNGSVT-EYSAT SILKINRE TWQKARESKVKCFEHNKCKD SREI QYK ---  
*I. punctatus* --VERELHRSLLTPTQT EID-MGTATFVC LATPE SPKSNTE KWT--LEKT--DISMKVKNIVSQMKG---METAI SVLELSAS EWT S STSPVKCFE QQKMDVFKER SYA ---  
*O. mykiss* --PEYLQPSLYVNTPSKE EHS E MKA TAPAC FANDE SPRTNLIKWRHEKGTQE VVSDFKSS CESEKASETT-LYSTT SYLRVNES E WKS E E V T FT CVFENKAGNRETV GTTS SD ---  
*S. salar* --VEYLQPSLYVNTPSKE EHS E MKA TAPAC FANDE SPRTNLIKWRHEKGTQE VVSDFKSS CESEKASETT-LYSTT SYLRVNES E WKS E E V T FT CVFENKAGNRETV GTTS SD ---  
*G. morhua* -----VVVHKL PAL SILIS ETEG SQHV SE GC FAADA E SPKDYTI TWLE -NGK KIDP SESSTSS-----EGKMEITGTF YMAA SYIQVKNHWKDDGPNIT CEFANGKEPVDARHLYG66GC ---  
*E. coioides* -----KOLYQL PTLK VNTS SGGG-TET TLSC FAKOF SPKDFEER KWK-MEAKITT GITNIKTPEDE -KCGENGL YSAA SELT VP SSEWET -WT FT CFT GK GE -Q GPTY VNS S S AT KE HCN ---  
*F. rubripes* -----YHLPTRVRSASP SKG-EEI HEFC FVKDEPKNYL KWK-MDK E V T S K I S E S N T L L K B E R A T A D G L Y S V R S E L T V K S T E W V S N -F N E T C Q F E G R G E D K R P V Y K S A S A V T E E R I ---  
*E. saurus* EPPKPPRQPVLSIHTPSQBELI MKA TAPAC LATPE YPKGNSE KWL--RDGK--EVTDGIALT E C Q KKGDKS--FTR S S E L Q A S E S Q W K R L D G T F T C Q F I Q E G E I T E Q T V K Y S S A R E C S ---  
*A. anguilla* --RAPPQ SARL YTHAPSD ELK MKA TAPAC FASEE SPKDNSE VWR--WRGE--EISKGITLPAVE TQAD KKT VYSAT SILHALPES QVRE SEYV S CEFKWR GGNVQNTA HYVSPGCI ---  
*A. sinensis* CURENTI PPHVFIIPPSSE ELR MKA TAPAC LATPE VARG EAP KDYTE KWF--TDS KEEDA SHYINTDAVED SBG---YLMAS SLLT VKERA E V K G S N -H I K C E L A N G R V T V W E M I S S S R A P D C S ---  
*N. huso* CPHDPTF HPVFIIPPSSE EIR MKA TAPAC LATPE VARG E SPKTWSE KWS--KOA TAPDAKKE INTARAVED SDG---HF S A Y S L L T A T K E W L E S ---E I K C E V I N G S E T V I R T I N S I S -I M D ---  
*A. guenidestae dtii* CDPDVT-HPVFIIPPSSE EIR MKA TAPAC LATPE VARG E SPKTWSE KWS--KOA VAFDAKKE INTARAVED SDK---HF S A Y S I L L T A T E E W L G S ---E I K C E V T F G S A K V E R T I N S I S E P G D ---  
*A. baerzi* CDPDVT-HPVFIIPPSSE EIR MKA TAPAC LATPE VARG E SPKTWSE KWS--KOA VAFDAKKE INTARAVED SDK---HF S A Y S I L L T A T E E W L G S ---E I K C E V T F G S A K V E R T I N S I S E P G D ---



# Intrachain disulphide linkage

H

C<sub>H3</sub>

```

C. auratus      -AP IQDC SD-- IDVQ I VPP SLEAHLAKWET GVLKAKALAE -NTGF--AKITITADKWNIAE---TBVK--GT YKYVLRAP IGYEBSNGTEFTCT VERHELAAP-KSTKEVREN
C. carpio       -VPI QDC SD-- IAVD I VPP SLEAHLAKWET GVLKAKALAE -NPGF--GKITTAMWNIAE---KQIK--GHEKRVLRAP IGYEBSNGTEFTCT VERHELAAP-KSTKEVREN
C. ide lla      DDMHDC TN-- VRAV I VPP SLEAHLAKWEGT LTKASGR -NPGF--TKIEIKAMNFVIAE---ASERAFKAKVLEKPIGYEBSNGTVFTCT VERTKLPQ-HEITTKVREN
D. rerio        -DT HQDC IDDMVHD I IFF TPFEDHLKWKVGLKAKAG -NPGF--TKEIKIEIKAMNFVIAE---KEEP---L TWEELRDP IYQWBSNGTVFKIAENS GKTL P-EEKTFVREN
I. punctatus    ---P GDT KQ-- P QVKITGP STEDILIKRAGLE RABG -DTGF--K SIKWLIQNEI S---L SML S--SKITV SLQTNI GFBWNTGTEFEI CR VERHEAFTQYEVKTFKREN
O. mykiss       ---G PVHGS VVIT I IEP SLEAHLAKWEGKAL -GVNSHN SVPGF--L SVKWEHDK GKTL T---SRKG-----VTDKRAL DITYEDWNGETVFCY CA VDRHEML GDLVKAZYKRET
S. salar        ---A GPFVHNS VVIN I IFF SLEAHLAKWEGKAL VKEI -VTGF--H SVKWEHDK GKTL T---SRHG-----VTDKRAL DITYEDWNGETVFCY CA VDRHEML GDLVKAZYKRET
G. morhua       ---D EPSTKLEID I LPI SLEAHLAKWEGKAL VKEI -VLESPS--SMTYI AKT KITYDEWSKGRKWE CEASIKD SIE VPTREKTFVKNK
E. coisoides    --G QGC VRAD VEV T I IEP THED FVLM GKG VQVKIN -KFSV--Q KIFWETHD GHD I PRAVTPP PAKVY VALL PTFEWRQGEKEI CI VEREDWIEP -RKEIYKREI
T. rubripes     -L GSG-CPTAD VTI V I IFF K I E I F D E K A Q I I Q V T E R -T F S V--K R I W E D E D K O E L -----A T S P D--G S L S L A D I T Y D E W S Q G K R A C F V E N T L W L E P -Q S K T Y E R S V
E. saurus       -----P E R Q I D A K I S P P T P E L E L Q V T E T L O K T I G D -V D G V R -N U T W -----E V G--S V E V U G Q D E Q W H S K L I D Y B E W K E T E Y T C K V E N S D -L P S P L A T S Y E R C
A. anguilla     -----P A M P V E V S I I P P S N E I E L N E V E L H C N I T G K -L E N I D -S V E W A N -----E B G T L V S T K E S V G G S E I N K L Y I D I A L W S N G T I T C I V K E R D -S P D P I K V T Y E R E N
A. sirenzi s    ---Q C S V T V D V R V E I L P P T P E I L T Q K A T G L -A S Q N S I K A W S S P T V Q E L A S G P V T V W E G -Y T A V Y K Y K A I C K W A S G K E I C T V H D E S L P S P K S I E T H R V I
K. huso         -----O P A M V R V G I S P P S V E I E L R K E A T L T C K V T G L -V S K D H L E I K W A S -E T K E E T G T P E L S V W E G -Y T A V S K L K V T L B E W A R G D K E E C T V K Q T D S L P S P R V A A Y H R E L
A. gne ldenstae dtzii ---O P S K C S V G I S P P S V E I E L R K E A T L T C K A T G L -V S E D H L E I K W A S -E T K E E T G T P E L I S V W E G -Y T A V S K L K V T L B E W A R G D K E E C T V K Q T D S L P S P R V A A Y H R E L
A. baerzi       -----O P A M V R V G I S P P S V E I E L R K E A T L T C K A T G L -V S E D H L E I K W A S -E T K E E T G T P E L I S V W E G -Y T A V S K L K V T L B E W A R G D K E E C T V K Q T D S L P S P R V A A Y H R E L
    
```

# Intrachain disulphide linkage

C<sub>H4</sub>

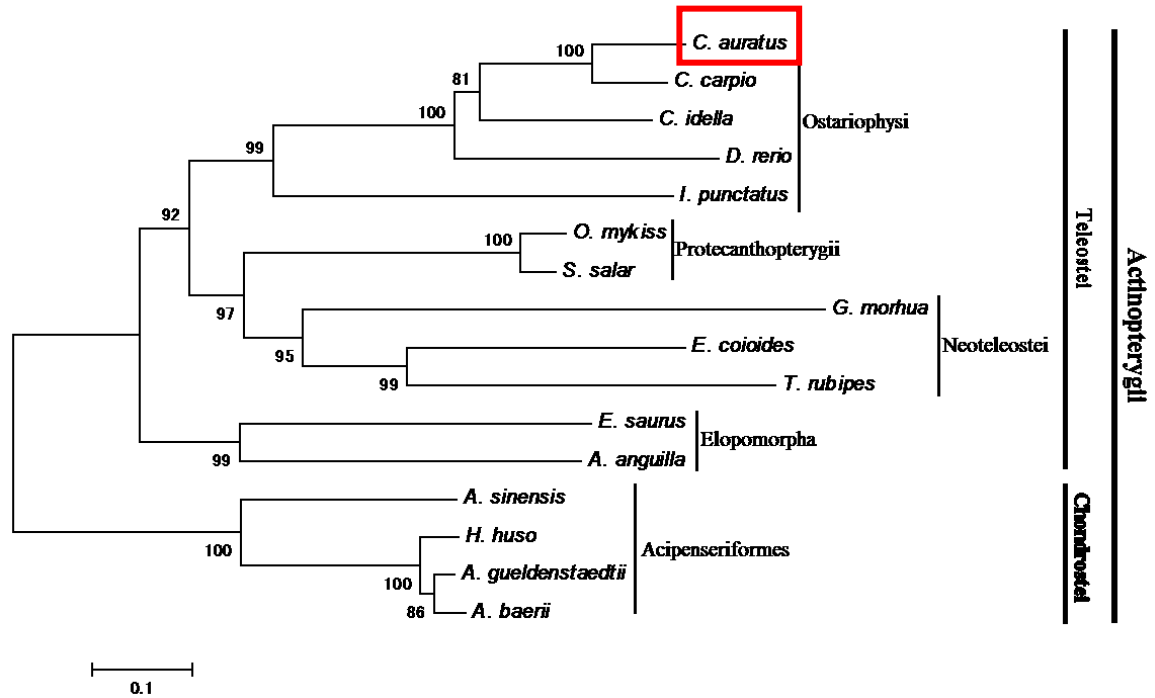
C<sub>H3</sub>

```

C. auratus      GKP K P K P T V F V L A P P E H K P G E P ---H T L T C Y V K D F Y P K E V F V S W L A D D E P V T ---S K Y S T S L P I Q K D Q ---T E S V Y S Q L T V M D S K W A G -T V E S C V V Y H E I D E K -H E V L T A S I -I D M I D K A G V T M L S H M T P A S C H P ---
C. carpio       GKP K P K P T V F V L A P P E H K P G E P ---H T L T C Y V K D F Y P K E V F V S W L A D D E P V T ---S K Y S T S L P I Q K D Q ---T E S V Y S Q L T V M D S K W A G -T V E S C V V Y H E I D E K -H E V L T A S I -T D M I E K A G V T M L S H M T P A F C H P ---
C. ide lla      GAK P K P S V Y L L A P P E H K E G E T ---H T L T C Y V K D F Y P K E V F V S W L A D D E P V I ---E K S K T S L P V O O D E ---T E S V Y S Q L T V S Y S E W A S G -I V Y S C V V E H E S I D E K -H E V L T A S I -D D M I D K P G V I M L S H M T P A S C H D ---
D. rerio        GK--KEP S V Y V L A P P E M K A M E A ---H T L T C Y V K E L P K E V F V T W L V D E P A Y G ---Y E M S T S E P V E M D D ---S E S H Y S Q L T V V E N S E W T G G -K V Y T V I Y H E S I D E K -L L V L T A S I -T D M H D K S S I I M L S H M T P A P C H A ---
I. punctatus    -G N P E P K V Y L L A P P E -S S G E S ---V T L T C Y V K D F Y P K E V A V S W L V M D K Q V E R V V G ---Y E Q N T T A V I D E R N -----L E S V Y S Q L T E S M L W K K E P V Y S C V V Y H E S H I K S -T K I L H A T I -D E T S M Q P M L V M L S L M V P Q R C H A Q ---
O. mykiss       G G P Q R P S V E L L A P A E R T S D M T ---V T L T C Y V K D F Y P K E V L A V W L V D D E P V E R T S S S A L Y Q E N T I S Q I Q S G R ---T Y S V Y S Q L T E S M L W K K E P V Y S C V V Y H E S H I K S -T K I L H A T I -D E T S M Q P M L V M L S L M V P Q R C H A Q ---
S. salar        G G P Q R P S V E L L A P A E R T S D M T ---V T L T C Y V K D F Y P K E V L A V W L D D E P V E R T S S S A L Y Q E N T I S Q I Q S G R ---L E S T Y G Q L T E S S G W K D G -R V E R E V Y H S H D S K -N O P I V K L I T E K S S E N V M I I W H E L G -P S T G L P Q ---
G. morhua       G E N P P P S V Y L L P P V D L S G T H ---H T L T C E V K D F P E R V F V S W L V D D E R A D S K ---Y E N H T T P V E M D G ---S T S A Y G Q L T L Q Q W K D O T V E S A V H E S V M V T -T E A L V A S I G E R T E K T R V M L M M I P E T C H A Q ---
E. coisoides    G G P Q R P S V E M L P P E H K I Z E T ---V T L T C Y V K D F P E R V F V S W L V D D E R A D S K ---S S H T T S P L A T G ---A Y W A Y G H V L P L O W K E T D V Y S L V H E S H M V T -T E M I V A S I G F R S V H T M L I M D L K I P D K C K A K ---
T. rubripes     -G E I Q R P S V E M L S P T E H T S T M K ---V A L S C Y V K D F P E L E V F V S W L V D D E E L T Q E ---S S H T T S P L A T G ---D V P -T T E V W K T E G ---T Y S V E S Q L T I P A S D W S G -W Y S A V H E T V H E S V V K T I V R T T -D S V S K E P T V S L D L M V P Q T C K V ---
E. saurus       G G K W Q S P T V F I L A P A E R M L S T ---V T L T C Y A K D F Y P E Q V L S W L V D D O P V E T ---D V P -T T E V W K T E G ---T Y S V E S Q L S I S R A S D W N G -I A Y S C V V H E A R F D K L S K T I V R T I -D S V S K E S T T V S L D L C R P Q N C H A ---
A. Anguilla     G M D P R P P S V E L M T T A K O N G H D ---V T L T C Y A K G F Y P K E V L E S W E A R D K P V M R -----A M E Q T T Q V K T E R -----N Y S V Y S Q L S I S R A S D W N G ---D V Y T V W V H E T I Q T L -F K T I T E M T --D S R A K P T L I K V S L T L P D K A M P Q S Y
A. sirenzi s    K G M E K P P A V E L F S P P Q E T T M E N S E V T V C Y K E F Y E R V I T S W L K S D N S V P Q -----D O P T S T M L P K E M G A S S S V S K L T H P L Q S W D G -G Y T V V Y H E T I O P P -F E M I T E R A --D S T G K Q T L V W V G L T L P D K A M P Q S N
K. huso         D O P S H E P A V E L L S P P Q E S T N G N G E V S L T C E V K D F Y E R V I T W L K S D N S V P Q -----T T V T T M L I P K E K N --G K P L E S V S K T V P T A Q W D G -G I Y T V Y H E T I O P P -F E M I T E R A --D S T G K Q T L V W V G L T L P D K A M P Q S N
A. gne ldenstae dtzii D O P S H E P A V E L L S P P Q E S T N G N G E V S L T C E V K D F Y E R V I T W L K S D N S V P Q -----T F T T T M L I P K E K N --G K P L E S V S K T V P T A Q W D G -G I Y T V Y H E T I O P P -F E M I T E R A --D S T G K Q T L V W V G L T L P D K A M P Q S N
A. baerzi       D O P S H E P A V E L L S P P Q E S S N G N G E V S L T C E V K D F Y E R V I T W L K S D N S V P Q -----T F T T T M Q E S Q E K -R A P L E S V S K L T V P T A E W D G -G I Y T V Y H E T I O P P -F E M I T E R A --D S T G K Q T L V W V G L T L P D K A M P Q S N
    
```

Fig. IV-8. IgH 定常領域遺伝子のアミノ酸配列比較

今回得られた遺伝子のうち gJmu1-9 の定常領域と真骨類 IgH 定常領域のアミノ酸配列との相同性を比較した。上からキンギョ (*Carassius auratus*, gJmu1-9)、コイ (*Cyprinus carpio*, BAA34728)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*, ACV21057)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*, CAI11475)、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*, AAA79003)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*, AAB27359)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*, ACN10898)、タイセイヨウダラ (*Gadus morhua*, A46538)、チャイロマルハタ (*Epinephelus coioides*, AAX78206)、トラフグ (*Takifugu rubripes*, BAD26619)、タイセイヨウカライワシ (*Elops saurus*, A34891)、ヨーロッパウナギ (*Anguilla Anguilla*, ABM87939)、カラチョウザメ (*Acipenser sinensis*, ABB76105)、オオチョウザメ (*Huso huso*, ABB76146)、ロシアチョウザメ (*Acipenser gueldenstaedtii*, ABB76147)、シベリアチョウザメ (*Acipenser baerii*, CAA73702)。ハイフンはギャップを示した。青字は Cys、赤字はすべての種において保存されているアミノ酸を示した。また、黒枠は C 末端鎖 (C-terminal tail)、下線は N 結合型糖鎖修飾サイトを示した。“L”は L 鎖と架橋を形成する Cys、“H”は H 鎖同士の架橋を形成する Cys、“J”は IgM 特有の J 鎖を形成する Cys を示した。加えて、鎖内ジスルフィド結合の位置を角括弧で示した。



**Fig. IV-9. IgH 定常領域遺伝子のアミノ酸配列の分子系統樹**

Fig. IV-8 のアミノ酸配列をもとにソフトウェア MEGA4 を用いて分子系統樹を作成した。赤枠はキンギョを示した。

A

```

1 cagagctctctggttaactagagaaccactgcttactggcttatcgaaaattaatcagactcactatagggagaccgaagctggctagcg 90
91 tttaaacttaagcttggtagccaccatggcttccctaaagctctttgtgtgtgtggcagctgtacacagtggtttactcagcaggtt 180
    Kozak sequence /Leader peptide /FR1
    M A S L K L F V L L A A V H S V Y S Q V
181 GTGCTCACACAGTCTGAACAGTCAGTAGTGTCTCCAGTACTTCTCAAACTGACCTGTGCCTGCAGTGGTTTACTGTTAGTAAC 270
    V L T Q S E Q S V V V S P G T S Y K L T C A C S G F T V S N /CDR1
271 TATCGCATGCACTGGATCCGTCAGGCACCTGGAAAGGACTGGAATGGATCTTACACTATTATACAGACTCTGACAAAGGCTCAGCTCAG 360
    /FR2 /CDR2 /FR3
    Y R M H W I R Q A P G K G L E W I L H Y Y T D S D K G S A Q
361 TCAGTTCAGGCGAGATTACAAACATCCACAGACAGCTCTAATCTCTATCTGACATGAGTCAGTTAAAGACTGAAGACACTGCAGTGTAT 450
    S V Q G R F T T S T D S S N L Y L H M S Q L K T E D T A V Y
451 TACTGTGCAAGGACCGTAGTTCCTACTTTGACTACTGGGAAAAGGACCAAAAGTCAACCGTTTCATTAGCTCAATCATCTGCACCAAG 540
    /CDR3 /FR4 /CH1
    Y C A R D R S S Y F D Y W G K G T K V T V S L A Q S S A P K
541 TCAATCTTCCGATGTCGCCAGTACTCTGATCTCTCTGGGTATGTCACCGTGGCTGCATGGCAAGAGGTTTCGCACCTGAGGACTCG 630
    S I F A M S Q C T P D S S G Y V T V G C M A R G F A P E D S
631 CTTACTTTTAAATGGACGATAAACTCAGAAGGAGCTGAGTGTGTTGTGTCAGTATCCAGCATTCGGAGTTCGGTGGACAATACACCAAA 720
    L T F K T Q K E L S D F V Q Y P A F G S G G Q Y T K
721 ATCAGCCATATTCGGGTAATAAAGCGATTGGATCCAAAAAACATACAAGTCCGAAGCTTCAAATCTCAACGAAAATTAGTATCT 810
    I S H I R V K K S D L D P K K P Y K C E A S N S N G K L V S
811 GATATTACTGCACCATCCCCACTCCAGATCAACGTGCAACCGTGTACTTAAACAGTACCTACAAAAACGGAGTTAGAAAATGAAACAGCA 900
    D I T A P S P P D Q R A T V Y L T V P T K T E L E N E T A /CH2
901 ACCTTCATGTGTTAGCCCGCGGTTTCGCCTAACAAATACACGTTTGTAGTGGTCTCTGAATGGTGCAGAAAGTGCACATGTGATAGAC 990
    T F M C L A R R F S P N K Y T F E W S L N G Q K V T H V I D
991 AAATATGAAAAAGTGAAGAATGGCTCAGTAAACCGAATATAGTGCACGAGCATTTCGCAATCAAAGCCGAAGAGTGAAGAATCA 1080
    K Y E K S E K N G S V T E Y S A T S I L Q I K A E E W K K S
1081 GAGAGCAAAGTTAAGTSTAAGTTTCGAGCACAAGGCGGGAATGAAGAAATAGAGGCCAATATGCAGCTCCTATTCAAGATTGCAGCAGT 1170
    E S K V K C K F E H K A G N E E I E A E Y A A P I Q D C S D /Hinge /CH3
1171 ATTGATGTTCAAATAGTGCCTCCCTCCCTTGAAGCCATGCTGAAAAATAGAACAGGAGTGTGAAAGTGCAAAGCTTTAGCAGAAAATACA 1260
    I D V Q I V P P S L E A M L K N R T G V L K C K A L A E N T
1261 GGATTTGCCAAAATAACAAATACAGCTGATAAGAACAACTCGCAGAGACAGAAGTAAAGGGCACCTACAATAATGTTGGAACTTGTATGCC 1350
    G F A K I T I T A D K N N I A E T E V K G T Y K Y V E L D A
1351 CCAATAGGCTATGAAGAATGGAGCAACGGCACTGAATTTACCTGACACCGTTGAGCACAACGACTAGCAGTCCCAAGTTCGACCAAGTTC 1440
    P I G Y E E W S N G T E F T C T V E H N E L A A P K S T K F /CH4
1441 GTCAGAGAAAATGGTAAAAACCCCAAGAAACCCACTGTTTTCGATATAGCACCCCCAGAGCACAAGCCGGGTGAACCGATGACCCCTGACA 1530
    V R E N S K N P K K P T V F V L A P P E H K P G E P M T L T
1531 TGTATGTGAAGACTTCTACCCCAAGAGGTGTTGTGTCTGGCTTGTGATGATGAACCTGTGACTTCTAAATACAGCACTAGCCCTG 1620
    C Y V K D F Y P K E V F V S W L A D D E P V T S K Y S T S L
1621 CCAATTCAGAAAGATCAAACCTTCTCAGTCTACAGTCACTGATTAATGATCCAAAGTGGAAAGTGGTACAGTGTTCAGTTGTGTGTC 1710
    P I Q K D Q T F S V Y S Q L T V N D S K W K N G T V F S C V
1711 GTGTATCAAGAGCATTGATGAAAAAATGCGCGTACTGACGAGATCTATATTGATAACATTGATAAGGCAAGTGAATTAATCTAAGT 1800
    V Y H E G I D E K M R V L T R S I I D N I D K A G V I N L S
1801 ATGAATACCCCTGCATCTTGCATGCCCAACCAACCAACCAACCACTAAAtctagagggcccggtttaaaccgctgatcagcctcgactgtgc 1890
    M N T P A S C M P H H H H H H *
    Histidine tag

```

B

```

          /TM
901 ACCAAGTTCGTGAGGAAAATGCAITGATGTGTGGATAGAGCATCTCCAGTACGAAGCCATTGATACAGATGATAGTGCATTGCAAAAC 990
    T K F V R E N A L I V W I E H L Q Y E A I D T D D S G I A N
991 ACCGCTGTAACCTTTGTTTCCGTGTCCTCATCACCTTGTCTACAGCAITGGGGCTACTTTTGTTAAGGTGAAATGATTCCTTTAAGGA 1080
    T A V T F V F L F L I T L F Y S I G A T F V K V K *
1081 TGTGCAAGATCTTCCGAAAAACATGCTTTCTTTTTCATTATGTAATACGIGATTGTGATGTTTGTGTTTACATTTTACTT 1170
1171 TATAAAGAGAGGAACTAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAA 1214

```

Fig. IV-10. gIgH 全長配列

(A) 分泌型 IgM、(B) 膜型 IgM の塩基配列。今回得られた gIgH 全長をコードしているクローン gf1-7 の遺伝子配列を示した。紫丸は S-S 結合サイト、青枠は推定 N 結合型糖鎖修飾サイトを示した。赤枠は抗 gIgH 抗体作製の際に抗原としてウサギに免疫したペプチド領域を示した。上段に塩基配列、下段に一字表記アミノ酸配列、終始コドンは\*で示した。

### IV-2-3. 抗 gIgM 抗体を用いた水泡液および血中 IgM の検出

クローニングにより得られた gIgH 配列 (Fig. IV-10、赤枠部分) を鋳型として、gIgM の重鎖 CH3 領域を pET22b(+)ベクターにサブクローニングして、pET22b(+)-gIgH CH3 プラスミドを構築した。構築した pET22b(+)-gIgH CH3 を用いて、大腸菌による gIgH CH3-His タンパク質の発現条件を検討した結果、gIgH CH3-His の大部分は可溶性画分に発現した。この可溶性画分を Ni カラムにて精製し、溶出画分 (Ni 結合画分) を限外濾過後、ゲル濾過アフィニティーカラムに供してサイズ排除により精製した。ゲル濾過アフィニティーカラム精製後のサンプルを SDS-PAGE に供し、CBB 染色およびウェスタンブロットを行った。その結果、pET22b(+)ベクターへサブクローニングした CH3 ドメインの推定分子量である約 10 kDa にバンドを確認することができた (Fig. IV-11)。

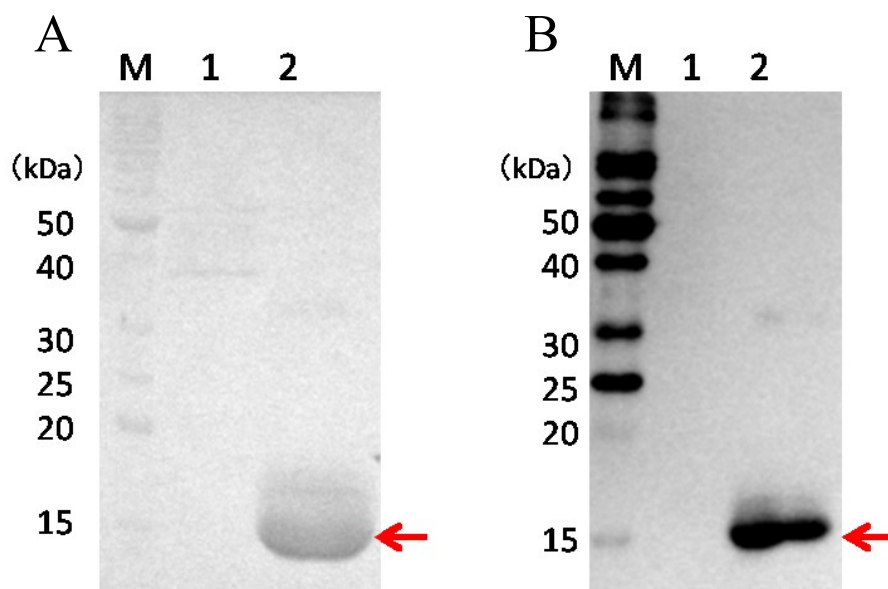
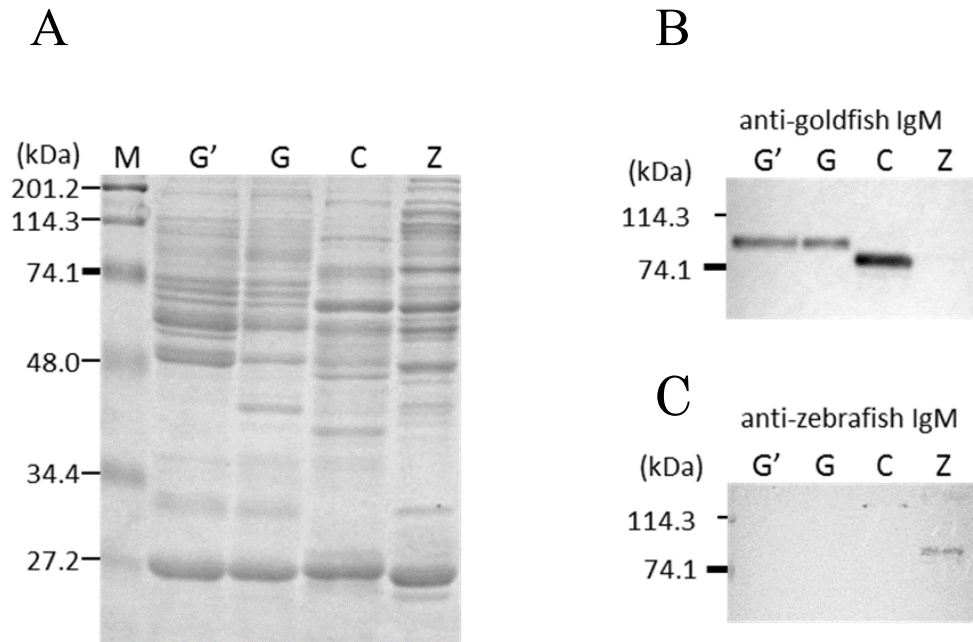


Fig. IV-11. gIgH CH3-His タンパク質の精製確認

(A) CBB 染色および (B) 抗 His 抗体を用いたウェスタンブロット。赤矢印は目的タンパク質の分子量 (推定約 11.7 kDa) を示した。レーン M, Bench Mark Protein Ladder; レーン 1, 未形質転換大腸菌培養後の可溶性画分; レーン 2: 遺伝子導入大腸菌培養後の可溶性画分を Ni 精製およびゲル濾過アフィニティー精製した gIgH CH3 画分。

作製した抗 gIgM ウサギポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行い、スイホウガンの水泡液、血清、コイの血清およびゼブラフィッシュ血清中の IgM の検出を行った (Fig. IV-12)。その結果、スイホウガンの水泡液またはキングョ、コイ、ゼブラフィッシュ血清中の IgH と推定される大きさにバンドを確認することができた (Fig. IV-12A および B)。さらに、コイの血清においても交差反応することも確認された。一方、ゼブラフィッシュの血清においては交差反応を示さなかった。また、抗ゼブラフィッシュ IgH 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、スイホウガンおよびコイの血清とは交差反応を示さなかった (Fig. IV-12C)。

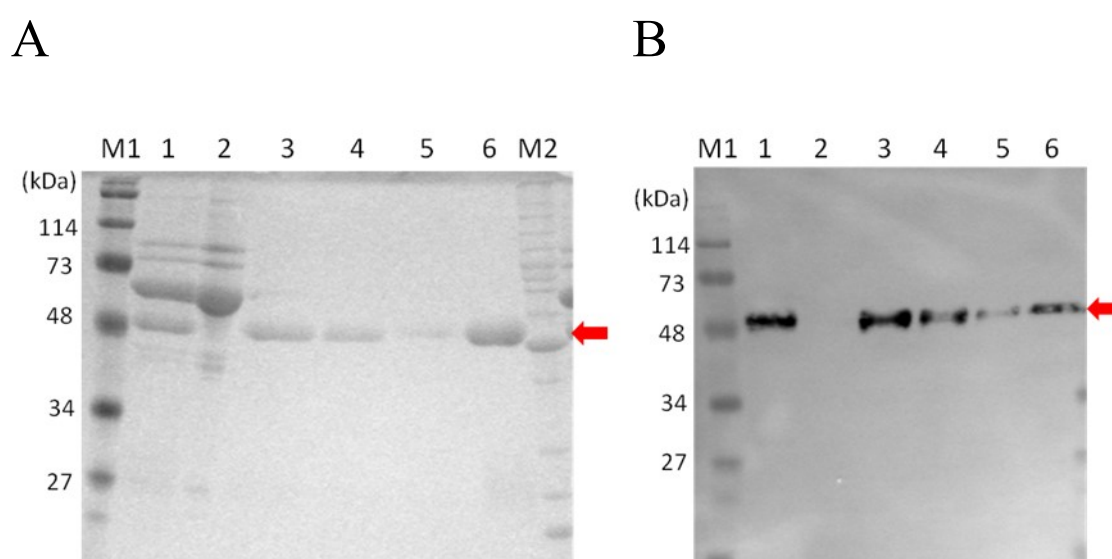


**Fig. IV-12.** 各種魚類血清の SDS-PAGE および抗 gIgM 抗体による  
ウェスタンプロット

(A) CBB 染色、(B) 抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンプロット、および(C) 抗ゼブラフィッシュ IgM 抗体を用いたウェスタンプロット。レーン M, プレスティインドマーカ; レーン G', キンギョ水泡液 (15  $\mu$ g); レーン G, キンギョ血清(15  $\mu$ g); レーン C, コイ血清(15  $\mu$ g); レーン Z, ゼブラフィッシュ血清(15  $\mu$ g)。

#### IV-2-4. ウサギ血清からの抗 gIgM 抗体の精製

gIgH CH3 組換えタンパク質を免疫したウサギ血清から、Protein A カラムを用いて抗 gIgM ウサギ IgG ポリクローナル抗体を精製して SDS-PAGE に供し、CBB 染色およびウェスタンブロットを行った。その結果を Fig. IV-13 に示した。なお、以降の実験ではこの精製した画分を抗 gIgM 抗体として用いることとした。



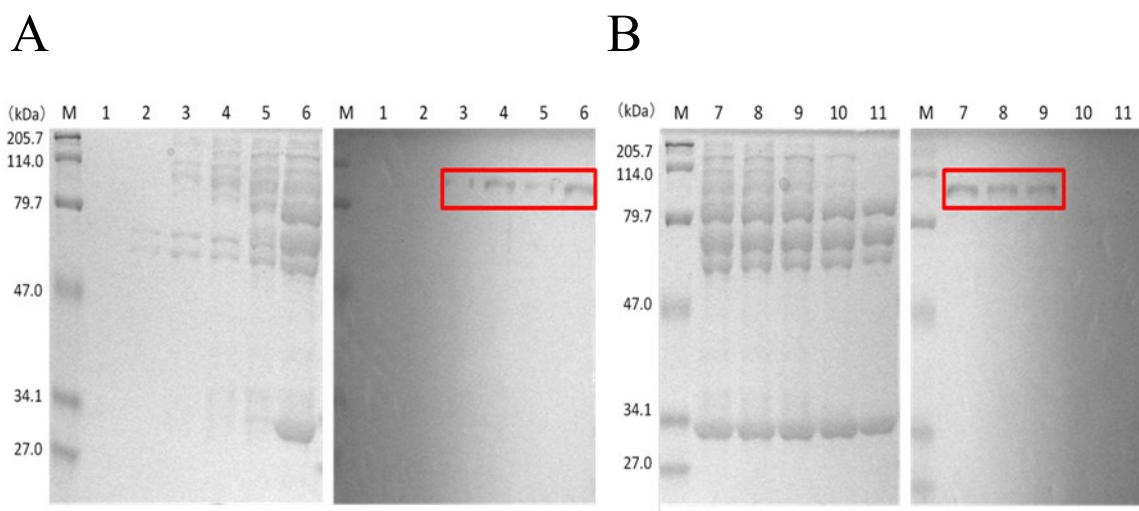
**Fig. IV-13. Protein A カラムによる血清からの抗 gIgM 抗体精製**

(A) CBB 染色および (B) 抗ウサギ IgG HRP 標識抗体を用いたウェスタンブロット。赤矢印はウサギ IgG の推定分子量を示した。レーン M1, プレスティンドマーカー; レーン M2, Bench Mark Protein Ladder; レーン 1, Protein A カラム精製前; レーン 2, カラム非結合画分; レーン 3, 1次洗浄後画分; レーン 4, 2次洗浄後画分; レーン 5, 3次洗浄後画分; レーン 6, 溶出画分。



#### IV-2-5. 水泡液中 gIgM の精製

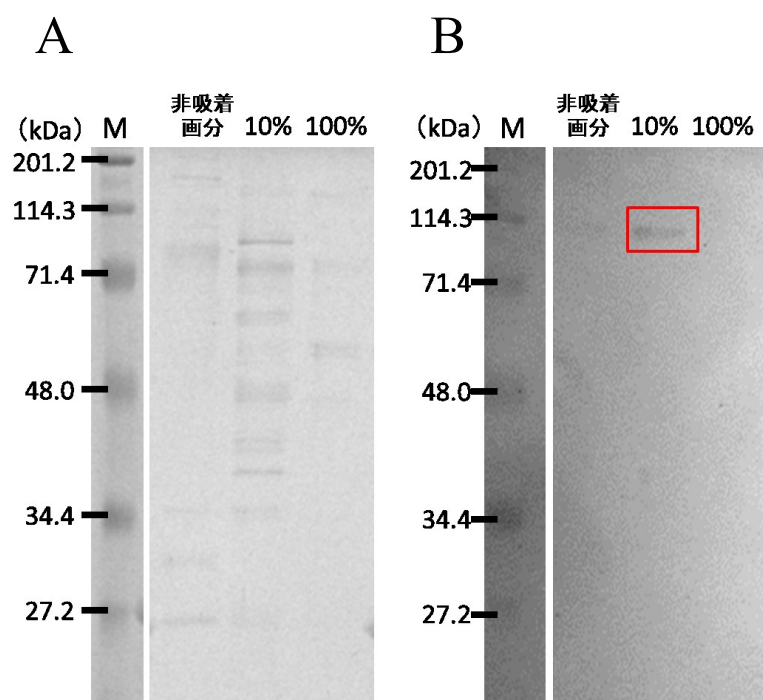
硫酸分画の結果、水泡液由来の gIgM は 40%以上の硫酸濃度で沈殿が確認され、50%の硫酸濃度でほぼすべてのタンパク質が沈殿していた (Fig. IV-14)。次いで、50%硫酸分画をイオン交換クロマトグラフィーで精製した結果、塩濃度 10–20%付近に幅のあるピークが 1 つ検出された。このピーク分画を CBB 染色およびウェスタンブロットに供したところ、gIgM が含まれておていた (Fig. IV-15)。また、非吸着分画および塩濃度 100%溶出分画には gIgM が含まれなかった。さらに、塩濃度 20%溶出分画をゲル濾過クロマトグラフィーで精製した結果、大きく分けて 5 つのピークが確認され、このうち、No.54 のピークに精製された gIgM が含まれていることが確認された (Fig. IV-16)。



**Fig. IV-14. 水泡液硫酸沈殿後画分における gIgM 検出**

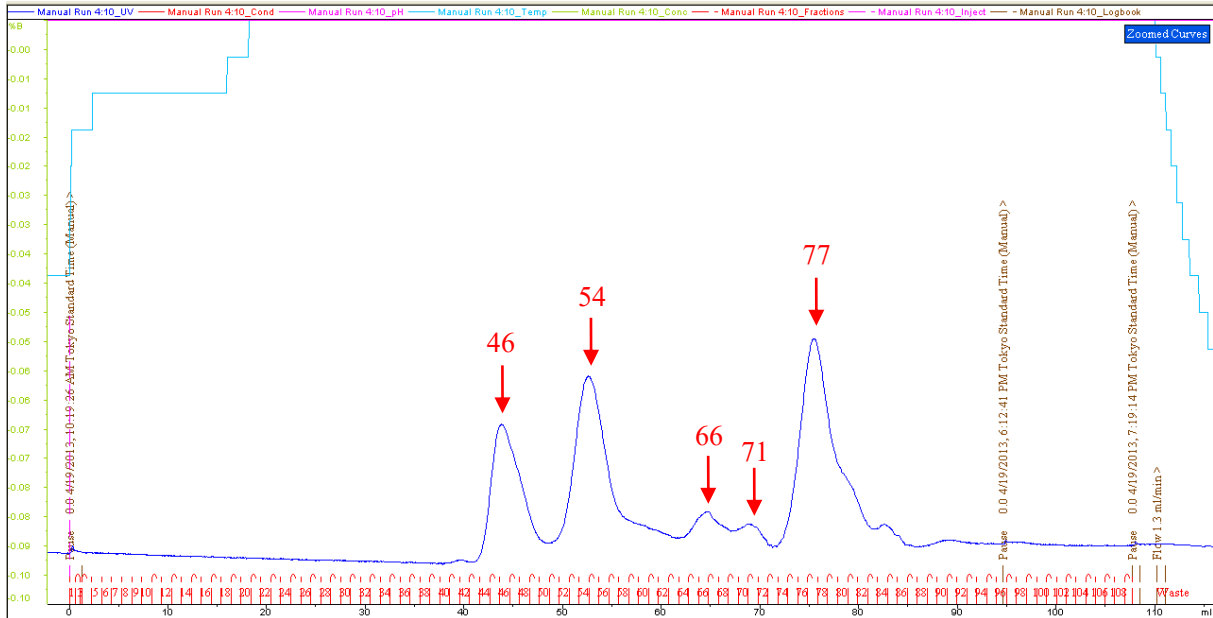
**(A)** 硫酸沈殿 1 回目。左図, CBB 染色; 右図, 抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンブロット。レーン 1, 20%硫酸沈殿産物; レーン 2, 30%硫酸沈殿産物; レーン 3, 40%硫酸沈殿産物; レーン 4, 50%硫酸沈殿産物; レーン 5, 60%硫酸沈殿産物; レーン 6, 硫酸沈殿未処理水泡液。

**(B)** 硫酸沈殿 2 回目。左図, CBB 染色; 右図, 抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンブロット。レーン 7, 20%→90%硫酸沈殿産物; レーン 8, 30%→90%硫酸沈殿産物; レーン 9, 40%→90%硫酸沈殿産物; レーン 10, 50%→90%硫酸沈殿産物; レーン 11, 60%→90%硫酸沈殿産物。それぞれ CBB 染色は水泡液中タンパク質量 20  $\mu\text{g}$ 、ウェスタンブロットは水泡液中タンパク質 10  $\mu\text{g}$  を供与した。キングヨ IgH であると考えられるバンドを赤枠で示した。レーン M, プレスティンドマーカ。



**Fig. IV-15. イオン交換クロマトグラフィー後画分における gIgM 検出**  
**(A)** CBB 染色および**(B)** 抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンブロット。gIgH と推定されるバンドを赤枠で示した。レーン M, プレステインドマーカ；非吸着画分, カラム非吸着画分; 10%, 10%MES 溶出緩衝液で溶出画分: 100%, 100%MES 溶出緩衝液で溶出画分。

A



B

C

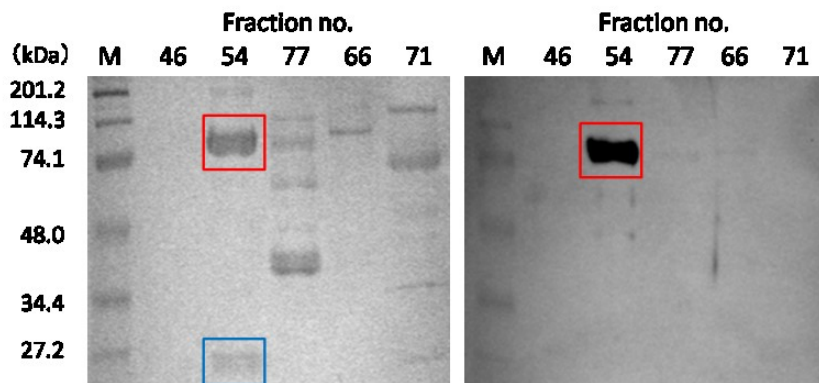


Fig. IV-16. ゲル濾過クロマトグラフィー後水泡液中の gIgM の検出

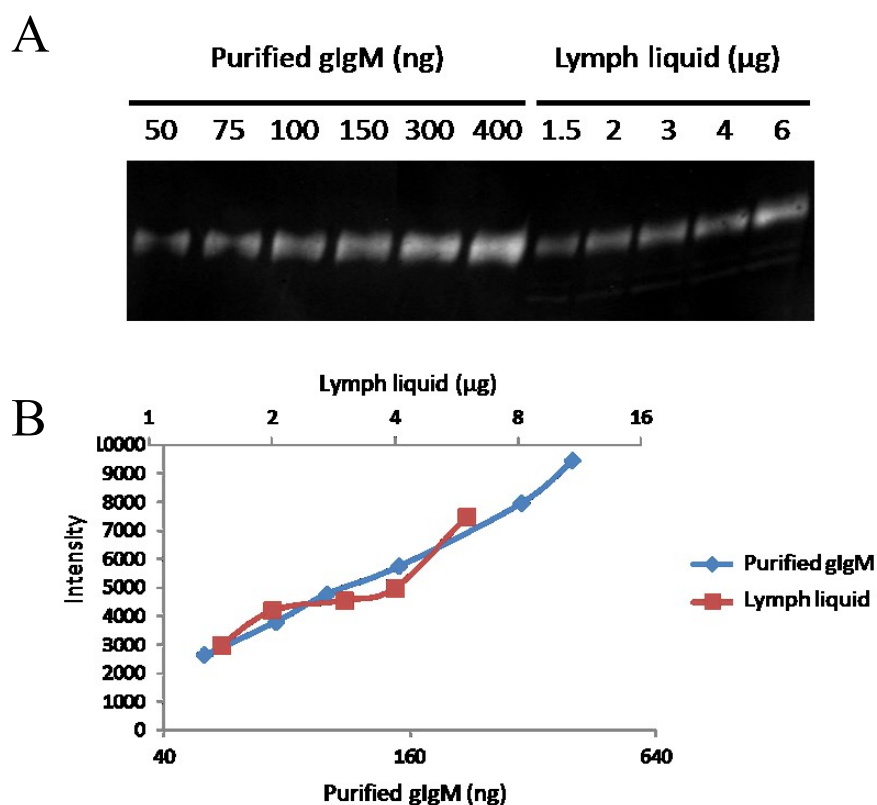
(A)クロマトグラフ。ピークの最大値を示すフラクション no.を赤矢印で示した。青線は UV (測定値)。(B) CBB 染色および(C) 抗 gIgM 抗体によるウェスタンブロット。gIgM 重鎖であると考えられるバンドを赤枠、軽鎖であると考えられるバンドを青枠で示した。フラクション no. : 46、54、77、66、71。レーン M, プレスティンドマーカ。

#### IV-2-6. 水泡液中 gIgM 量の定量的検出

ゲル濾過クロマトグラフィー後の水泡液由来の精製 gIgM および未精製水泡液を供与したウェスタンブロットの結果を **Fig. IV-17A** に示し、さらに *Image J* (RSB) を用いて数値化した値を **Table IV-7** に示した。水泡液由来の精製 gIgM において、タンパク質量に応じた光強度の変化を示した。この結果をもとに近似曲線を算出したところ、

$$y = 3178.2 \log_e(x) - 9926.8 \quad (R^2 = 0.9926)$$

となり検量線として用いた。水泡液の近似曲線については、きれいな直線にはならなかったが、精製 IgM と同様にタンパク質量の増加に伴って光強度の増加が見られた (**Fig. IV-17B**)。この水泡液の光強度を上記検量線の計算式をもとにして、水泡液中に含まれる gIgM 量を推定した結果を **Table IV-7** に示した。



**Fig. IV-17.** ウェスタンブロットによる水泡液中の gIgM の定量的検出

(A) 抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンブロット。各レーンに 50、75、100、150、300、400 ng の水泡液由来の精製 IgM および 1.5、2、3、4、6  $\mu$ g の水泡液を、抗 gIgM 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した結果を示した。(B) *Image J* (RSB) を用いて(A)を数値化した。横軸は対数値で示した。

**Table IV-7.** 水泡液中の gIgM 量の推定

	amount of purified gIgM (ng)						amount of protein in lymph liquid ( $\mu$ g)				
	50	75	100	150	300	400	1.5	2	3	4	6
intensity	2617	3799	4773	5737	7961	9438	2921	4191	4518	4945	7454
estimate of gIgM (ng)	51.8	75.1	102.0	138.2	278.2	442.7	57.0	83.8	94.2	107.7	238.7

**Fig. IV-17** で得られた近似曲線を元に推定された水泡液中の gIgM 量を示した。

#### IV-2-7. ELISA 法を用いた水泡液由来 gIgM の定量的検出

ELISA 法を用いて水泡液および精製 gIgM の定量の検出を行った結果を Fig. IV-18 に示した。水泡液を固相化した場合、固相化タンパク質量が 2  $\mu\text{g}$  以下では固相化量の上昇に伴って吸光度の上昇が見られたが、2  $\mu\text{g}$  以上では固相化タンパク質量の上昇に対して吸光度は低下しはじめ 8  $\mu\text{g}$  以上で一定となり、水泡液中の IgM の定量的検出は行うことができなかった。一方、精製 IgM を固相化した場合では、固相化タンパク質量が 1.25 ng から 80 ng の間で、近似曲線

$$y = 0.1742 \log_e(x) + 0.0981 \quad (R^2 = 0.99)$$

が算出され、定量的に検出することができた。

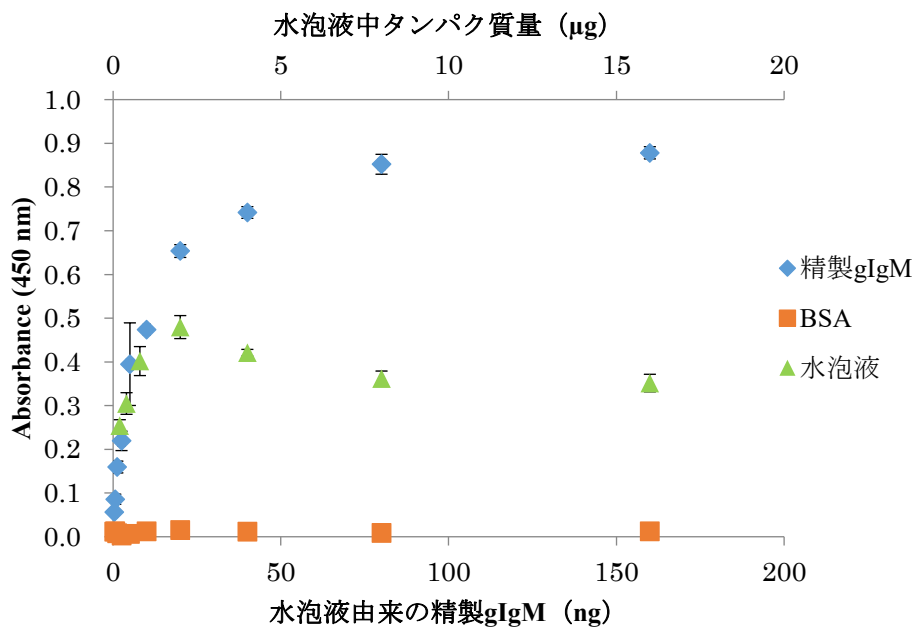


Fig. IV-18. ELISA 法を用いた水泡液由来の精製 gIgM の定量的検出

水泡液は 0.2、0.4、0.8、2、4、8、16  $\mu\text{g}/\text{well}$ 、精製 gIgM または BSA は 0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 ng/well となるよう固相化して検出した測定値を示した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を示した。

### IV-3 考察

今回得られた gIgH 遺伝子は、可変領域の *V* 領域、*J* 領域ともに同一のサブグループまたはファミリー内では高い相同性を示したのに対し、サブグループまたはファミリー間での相同性は低い値を示した (Fig. IV-4 および Table IV-5、Fig. IV-7 および Table IV-6)。このことから、gIgH *V* 領域は少なくとも 6 サブグループ、*J* 領域は少なくとも 4 ファミリーに分かれていると考えられた。*V* 領域のアライメント解析の結果、種間でよく保存されており gIgH *V* 領域において特徴的な Cys22、Cys92、Trp36、Trp47 および <sub>90</sub>YYCAR<sub>94</sub> の配列は、キンギョ *V* 領域においてサブグループの違いに関わらずよく保存されていた (Fig. IV-5)。このことから、他の種と同様に gIgH *V* 領域においても Cys22 および Cys95 は鎖内ジスルフィド結合、Trp36 は架橋を形成していると考えられ、Trp47 および <sub>93</sub>YYCAR<sub>97</sub> の配列はそれぞれ FR2 および FR3 の C 末端の構造を支える重要な役割を担っていると考えられた。また、キンギョにおける別々のファミリー間のアライメント解析の結果、*V* 領域 FR2 の C 末端は Trp47 だけではなく、<sub>42</sub>GKXLE (or V) <sub>46</sub> のよく保存された配列区間が確認できた (Fig. IV-5)。このことから、この配列区間も FR2 の C 末端の構造を支える重要な役割を担っている可能性があると考えられた。

*V* 領域のサブグループ別の分子系統樹を作成した結果、今回得られたキンギョ *V* 領域の 6 サブグループは、*V*<sub>H</sub>5 以外はグループ D に、*V*<sub>H</sub>5 はグループ E に分類された (Fig. IV-6)。これらは系統の近いものとクラスターを形成しており、クラスター内ではキンギョ内の別のファミリーとの相同性よりも高い相同性を示した。このことから、IgH *V* 領域に存在するサブグループ間の相違は、現在までの種の分化によって生じた塩基配列の変化に勝るほど非常に大きいと考えられた。また、グループ C には硬骨魚類から哺乳類まで幅広い種が存在し、その配



列情報は幅広い種における相同性の高さから、プローブなど多くのものに活用されている。この幅広い種における相同性の高さは抗体生産においても有用であると考えられた。しかし、今回得られた遺伝子にはグループCに分類されるサブグループは存在しなかった。ただし、同じコイ科のゼブラフィッシュにおいてはグループCに分類されるサブグループが存在することから、キンギョにおいても存在する可能性があると考えられた。

J領域のアライメント解析の結果、C末端側に比べてN末端側6塩基は変化に富んでいた (Fig. IV-7)。このことから、キンギョ IgH J鎖において少なくともC末端側6塩基はCDR3であると考えられた。また、この6塩基を除いたJ領域のC末端側の配列はV領域のFRの配列と比べて比較的变化が少なかった (Fig. IV-4、5 および 7)。これは、V領域のFRが可変領域の球状ドメイン内に位置するのに対し、J領域のC末端側は球状ドメインの外の定常領域とのつなぎ目に位置し、IgH可変領域を構造的に支える役割を担っているからであると考えられた。

作製した gIgM 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、同じコイ科でもより系統の近いコイとは抗原抗体反応の交差反応が起きたのに対し、ゼブラフィッシュとは交差反応を示さなかった (Fig. IV-12)。これは Fig. IV-9 に示した系統樹の種の分子進化と類似した結果となった。さらに、水泡液から gIgM を精製し、ほとんど夾雑タンパク質の存在しない gIgM サンプルを得ることができた (Fig. IV-16)。これは、今後の解析に用いる際に上述のような夾雑タンパク質による阻害やバックグラウンドの影響を抑え、定量的検出を行うために有用であると考えられた。実際に、今回確立した方法で精製した水泡液由来の精製 gIgM を供したウェスタンブロット法および ELISA 法において、gIgM を定量的に検出することができた (Fig. IV-17 および 18)。一方、精製前の水泡液中 gIgM の検出につ

いては、ウェスタンブロット法では濃度依存的に検出可能であったが、ELISA法では濃度依存的に検出することができなかった (Fig. IV-18)。これは、ウェスタンブロット法において、水泡液を SDS-PAGE に供することにより夾雑タンパク質が分離され、抗原抗体反応の阻害作用が抑えられたためであると考えられた。この結果から、夾雑タンパク質を多く含むサンプル中の特定のタンパク質を定量的に検出する場合には、ELISA 法よりもウェスタンブロット法が向いていると考えられた。ただし、ウェスタンブロット法を用いて定量的検出を行う場合、同一条件の反応に一度に使用できるウェルの数が限られているため、検出可能なサンプル数が限られ、標準偏差を求めることは難しいという点が弱点となると考えられる。

また、今回ウェスタンブロットによって推定された水泡液中の IgM 量 (Table IV-7) を元に試算すると、水泡液のタンパク質量あたりの IgM 含有率はおよそ 2.7-4.2% となった。水泡液のタンパク質濃度はおよそ 2-12 mg/ml と個体差が大きいが、今回精製に用いた個体の水泡液タンパク濃度である 4 mg/ml を元にして算出すると、水泡液に含まれる IgM 量は 0.108-0.168 mg/ml と考えられた。IgM 濃度はヒト血清中で 0.4-2.0 mg/ml、サクラマス血清中では 0.6-2.7 mg/ml であるという報告がなされており [65]、血清と比較すると水泡液中の濃度は低くなっているが、最も低い値で比較すると 4 から 6 分の 1 程度であり、水泡液は採取できる量も多く回復もすることから、IgM を取得するにあたって問題はないと考えられた。

## 第 V 章 キンギョを用いた抗 hLGR3 抗体の作製

本章では、スイホウガンを免疫動物として、第 I 章で抗原として用いた hLGR3 LRR タンパク質についてゼブラフィッシュと同様に特異的な抗体が産生されるかどうか検討を行った。

### V-1. 実験方法

#### V-1-1. 実験材料および試薬

以下の各項目において、特に記載がない場合、試薬は全て和光純薬工業株式会社の製品を使用した。また、以下の試薬を調製した。

- **2×YT-アンピシリン培地**: 終濃度 50 µg/ml アンピシリンナトリウム、1.6% Bacto Tripton、1 % 乾燥酵母エキス (ナカライテスク)、0.5% [w/v] NaCl、pH 7.0
- **LB-アンピシリン培地**: LB 培地 Lennox (ナカライテクス)、終濃度 50 µg/ml アンピシリンナトリウム
- **PBS**: 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4
- **Ni カラム結合緩衝液**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、1.5 M NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.4
- **Ni カラム溶出緩衝液**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、0.5 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH 7.4
- **キンギョ用リンガー液**: 125 mM NaCl、10 mM KCl、10 mM HEPES、pH 7.4
- **TBS**: 20 mM トリス塩酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.5
- **TBST**: 0.05% [v/v] Tween20/ TBS

供試魚はスイホウガンを用いた。スイホウガンは、愛知県弥富市の株式会社ミワより購入し、中和剤を加えて残留塩素を中和した水道水を用いて水温 20–25°C で飼育した体長約 6–10 cm、体重約 15–30 g、水泡の大きさが約 1–2 cm の個体を用いた。

#### V-1-2. 免疫抗原タンパク質 His-hLGR3 LRR 発現

pCold TF DNA (タカラバイオ) を鋳型として、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I 認識配列を持つプライマーを用いて PCR を行い、TF 領域を除いた pCold TEE ベクターを増幅した。同様にして、pCR4-TOPO-hLGR3 を鋳型とし、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I 認識配列を持つプライマーを用いて PCR を行い、hLGR3 遺伝子の leucine-rich region (LRR) 部分の増幅をした (Fig. V-1, Table V-1)。これらの PCR 増幅産物を精製後、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I によって消化し、DNA Ligation Kit Mighty mix (タカラバイオ) を用いてライゲーションすることによって、免疫抗原タンパク質発現用ベクター pCold TEE-His-hLGR3 LRR を構築した。作製したプラスミドの塩基配列は、CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman) を用いて DNA シークエンシング反応を行い、塩基配列は GENETYX (ソフトウェア開発) によって確認した。また、シークエンス解析に用いたプライマーを Table V-2 に示した。

```

1  atgaggccggcgggacttgctgcagctgggtgctgctgctgcacctgccagggaacctgggcggaatggggtgtcgctctccacctgcgag 90
   M R P A D L L Q L V L L L D L P R D L G G M G C S S P P C E
91  tgccatcaggaggaggacttcagagtcacctgcaaggatatccaacgcatcccagcttacggcccagtagcagactctgaagcttatt 180
   C H Q E E D F R V T C K D I Q R I P S L P P S T Q T L K L I
181 gagactcacctgagaactattccaagtcatgcattttctaactgccaatatttccagaatctacgtatctatagatgtgactctgcag 270
   E T H L R T I P S H A F S N L P N I S R I Y V S I D V T L Q
271 cagctggaatcacactccttctacaatttgagtaaagtgactcacatagaattcggaataccaggaacttaacttacatagaccctgat 360
   Q L E S H S F Y N L S K V T H I E I R N T R N L T Y I D P D
361 gccctcaagagetccccctcctaaagtccctggcattttcaacactggacttaaatgttccctgacctgaccaaagtttattccact 450
   A L K E L P L L K F L G I F N T G L K M F P D L T K V Y S T
451 gatatactctttatacttgaattacagacaacccctcatagcgtcaatccctgtgaatgcttttcagggactatgcaatgaaaccttg 540
   D I F F I L E I T D N P Y M T S I P V N A F Q G L C N E T L
541 acaactgaagctgtacaacaacggcttacttcagtcgaagtagcttttcaatgggacaaagctggatgctgtttacctaacaagaat 630
   T L K L Y N N G F T S V Q G Y A F N G T K L D A V Y L N K N
631 aaatacctgacagttattgacaaagatgcatttggaggagtatacagtggaacagcttgctggacgtgtctcaaccagtgctactgcc 720
   K Y L T V I D K D A F G G V Y S G P S L L D V S Q T S V T A
721 cttccatccaaggcctggagcacctggaaggaactgatagcaagaacacactggactcttaagaaacttccactttccttgagtttcctt 810
   L P S K E H L K E H L K E I G T W T L K K L P L S L S L S
811 cacctcacagggctgacctttcttaccocaaagcactgctgcttcaagaatcagaagaaaatcagaggaatccttgagctccttgatg 900
   H L T R A D L S Y P S H C C A F K N Q K K I R G I L E S L M
901 tgtaatgagagcagtagtcagagcttgogccagagaaaatctgtgaatgcttgaatgccccctccaccaggaatatgagagaatctg 990
   C N E S S M Q S L R Q R K S V N A L N S P L H Q E Y E E N L
991 ggtgacagcattgtgggtacaaggaaaagtccaagtccaggatctcaacaacgctcattattacgtcttcttgaagaacaagag 1080
   G D S I V G Y K E K S K F Q A D T H N N A H Y Y V F T E E Q E
1081 gatgagatcattggtttggccaggagctcaaaaacccccaggaagagactctacaagcttttgacagccattatgactacacatatgt 1170
   D E I I G F G Q E L K N P Q E E T L Q A F D S H Y D Y T I C
1171 ggggacagtagaacatgggtgttacccccaaagtcogtaggttcaaccogtgtgaagacataatgggctacaagttcctgagaattgtg 1260
   G D S E D M V C T P K S D E F N P C E D I M G Y K F L R I V
1261 gtgtggttcgttagctgctgctgctcctcctgggcaatgtcctttgctcctgcttattctcctcaccagccactacaactgaacgtccccgc 1350
   V W F V S L L A L L G N V F V L L I L L T S H Y K L N V P R
1351 tttctcatgtgcaacctggcctttgoggattttctgcatggggatgtacctgctcctcatgcctctgtagacctctacactcactctgag 1440
   F L M C N L A F A D F C M G M Y L L L I A S V D L Y T H S E
1441 tactacaacctgccaatcgactggcagacagggcctgggtgcaacacggctgggtttctcactgtctttgcaagcgagttatcgggtgat 1530
   Y Y N H A I D W Q T G P G C N T A G F F T V F A S E L S V Y
1531 acgtgacggtcatcaccctggagcgtggtatgccatcaccttcgccatgcccctggaccggaagatccgcctcaggcagcagatgtgcc 1620
   T L T V I T L E R W Y A I T F A M R L D R K I R L R H A C A
1621 atcattggtgggggctgggtttgctgcttctcctcctcctgctcctttgggtgggaataagtagctatgccaaagttagtatctgctg 1710
   I M V G G W V C C F L L A L L P L V G I S S Y A K V S I C L
1711 cccatggacaccgacctccttctgctgctgcatatattgtttttgttgcagctcaacatagttgcttctgctcatgctgctgctgtg 1800
   P M D T F A L A Y I V F V L T L N I V A F V I T V C C C
1801 tatgtgaagatctacatcacagtcgcaaatccgcagtagcaacccaggggacaaagataccaaaattgccaagaggatggctgtgtgatc 1890
   Y V K I Y I T V R N P Q Y N P G D K D T K I A K R M A V L I
1891 ttaccgacttcatcgatggccccaatctcattctatgctctgtcagcaattctgaaacagcctctcatcactgttagcaactccaaa 1980
   F T D F I C M A P I S F Y A L S A I L N K P L I T V S N S K
1981 atcttgctggtaactcttctatccacttaactcctgtgccaatccattcctctatgctattttcaccagggcctccagagggatgtgttc 2070
   I L L V L F Y P L N S C A N P F L Y A I F T K A F Q R D V F
2071 atcctactcagcaagtttggcatctgtaaacggcaggctcaggcataccggggcagaggggtcctccaaagaacagcactgatattcag 2160
   I L L S K F G I C K R Q A Q A Y R G Q R V P P K N S T D I Q
2161 gttcaaaaggttaccacgagatgaggcagggtctccacaacatggaagatgtctatgaaactgattgaaaagtccttcaaccccaag 2250
   V Q K V T H E M R Q G L H N M E D V Y E L I E K S H L T P K
2251 aagcaaggccaaatctcagaagagtatatgcaaacgggttttgtaa 2295
   K Q G Q I S E E Y M Q T V L *

```

**Fig. V-1. pCold TEE-His-hLGR3 LRR 導入領域**

上段に hLGR3 の塩基配列、下段に一字表記でアミノ酸配列を示した。赤枠部分は pCold ベクターへ導入した hLGR3 LRR 領域 (172 アミノ酸、19.3 kDa) を示した。青文字部分は LRR-5 領域、緑文字部分は 7 回膜貫通受容体領域を示した。

**Table V-1. pCold TEE-His-hLGR3 LRR ベクター作製用プライマー**

プライマー名	5'	配列	3'
pColdTF_rest1U		aaaaaaggccgcctcgccGTAATCTCTGCTTAAAAGCACAGAATC	
pColdTF_rest7D		tttttcccgggGTGATGATGATGATGATGCACTTTGTGATTCATG	
hLGR3_LRR_rest2U		aaaaaacccgggTTGAGTAAAGTGA CT CACATAGAAATTCG	
hLGR3_LRR_rest1D		tttttgccgagcggcctcaGTGAAGGAAACTCAAGGAAAGTG	

**Table V-2. シークエンス確認用プライマー**

プライマー名	5'	配列	3'
pCold_1U		CATATCGCCGAAAGGCACAC	
pColdR		GGCAGGGATCTTAGATTCTG	
hLGR3 F416		AAATGTTCCCTGACCTGACC	
hLGR3_F715		ACTGCCCTTCCATCCAAAG	

次に、作製した pCold TEE-His-hLGR3 LRR プラスミドを用いて、タンパク質発現用大腸菌 *origami* 株を形質転換し、LB-アンピシリン寒天培地に塗抹して 37°C で一晩培養した。生成したコロニーから LB-アンピシリン液体培地に植菌し、37°C、180 rpm で 6 時間振盪しながら前培養した。この前培養液 1 ml をあらかじめ作製した 250 ml の 2×YT-アンピシリン液体培地に添加し 37°C、130 rpm で振盪培養した。波長 600 nm の吸光度が 0.4–0.5 に達したところで、速やかに 15°C に急冷して 30 分間保冷した後、IPTG を終濃度が 0.1 mM となるよう添加して 15°C、130 rpm、24 時間振盪しながら His-hLGR3 LRR の発現誘導をした。誘導後、菌体を 4°C、3000×g、15 分間遠心分離して菌体を回収し、PBS で 2 回洗浄することで培地成分を除去した。続いて、Ni カラム結合緩衝液加え、菌微量

超音波細胞破碎機（MICROSON XL 2000、MISONIX）を用いて菌体を破碎した後、4°C、20000×g、30 分間遠心分離して上清を回収し、0.45 μm フィルター（ADVANTEC）を用いて夾雑物を除去した画分を大腸菌発現タンパク質抽出液とした。

この大腸菌発現タンパク質抽出液を、ペリスタポンプ（Bio Rad）を用いて Ni Sepharose 担体（GE Healthcare）を充填した Ni カラム（GE Healthcare）に供し、Ni カラム結合緩衝液を用いて洗浄した。次に、低圧クロマトグラフィー（AKTAprime plus）を使用して、Ni カラム結合緩衝液および Ni カラム溶出緩衝液を用いて、まず 25 mM イミダゾール条件下で洗浄し、次いで 200 mM イミダゾール条件下で Ni カラム吸着タンパク質の溶出を行った。この溶出画分を 10K 限外濾過膜（アミコン）を用いて濃縮して SDS-PAGE に供し、CBB 染色および抗 His 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

### V-1-3. 検出抗原タンパク質 TF-hLGR3 発現

当研究室で構築した pCold TF-hLGR3 プラスミドを用いて、検出抗原タンパク質 TF-hLGR3 の発現および精製を行った。すなわち、hLGR3 LRR 遺伝子を pCold TF DNA（タカラバイオ）にサブクローニングして構築したプラスミド（**Fig. V-2**）を用いて、**V-1-2** と同様の方法で発現および精製を行った。

```

1  atgaggccgggggacttgcagctgggtgctgctgctgcagcctgccagggacctggggggaatgggggtgtcgcttccaccctgcgag 90
   M R P A D L L Q L V L L L D L F R D L G G M G C S S P F C E
91  tgccatcaggaggacttcagagtcacctgcaaggatattcaacgcacccccagcttacogcccagtaacgcagactctgaagcttatt 180
   C H Q E E D F R V T C K D I Q R I P S L P P S T Q T L K L I
181  gagactcacctgagaactattccaagtcagcattttctaatctgcccattatccagaatctacgtatctatagatgtgactctgcag 270
   E T H L R T I P S H A F S N L P N I S R I Y V S I D V T L Q
271  cagctggaatcacactccttctacaatttgagtaaagtactcacatagaaattcggaaataccaggaacttaacttacaatagaccctgat 360
   Q L E S H S F Y N L S K V T H I E I R N T R N L T Y I D P D
361  gccctcaaaagagctccccctctaaagtccctggcattttcaacactggacttaaaatgtccctgacctgaccaaaagtattattccact 450
   A L K E L P L L K F L G I F N T G L K M F P D L T K V Y S T
451  gatatactctttatacttgaattacagacaacccctacatgacgtcaatccctgtgaatgcttttcaggagactatgcaatgaaaccttg 540
   D I F F I L E I T D N P Y M T S I P V N A F Q G L C N E T L
541  acaactgaagctgtacaacaacggctttacttccagtcaggatgtctttcaatgggacaaagctggatgctgtttacctaacaagaat 630
   T L N G F T S V Q G Y A F N G T K L D A V Y L S N F N
631  aaatacctgacagttattgacaagatgcatctggaggagtatacagtggaacaaagcttctgctggcgtgtctcaaacagctgacactgccc 720
   K Y L T V I D K D A F G G V Y S G P S L L D V S Q T S V T A
721  ctccatcaaaagcctggagcacctgaaagaaactgatgcaagaaacacctggactcttaagaaactccactttccttgagtttcctt 810
   L P S K G L E H L K E L I A R N T W T L K K L P L S L S F L
811  cacctcacagggctgacctttcttaccgaagccactgctgtcctttaaagaatcagaagaaaatcagaggaaatccttgagtccttgatg 900
   H L T R A D L S Y P S H C C A F K N Q K K I R G I L E S L M
901  tgtaatgagagcagatgacagagcttgccagagagaaaatctgtgaaatgccttgaatagccccctccaccaggaatataagagaaatctg 990
   C N E S S M Q S L R Q R K S V N A L N S P L H Q E Y E E N L
991  ggtgacagcttgtgggtacaaggaagtcctcagcttaccagatactatacaaacgctcattattacgtctcttfttgaagaacaagag 1080
   G D S I V G Y K E K S K F Q D T H N N A H Y Y V F I R D Q E
1081  gatgagatcattgtgtttggccaggagctcaaaaaccccggaagagactctacaagcttttgacagccattatgactacaccatattgt 1170
   D E I I G F G Q E L K N P Q E E T L Q A F D S H Y D Y T I C
1171  ggggacagtgaaagacatggtgtgtaccocaaagtcagtgatgtaacccgtgtaagacataaatgggctacaagttcctgagaattgtg 1260
   G D S E D M V C T P K S D E F N P C E D I M G Y K L R I V
1261  gtgtggttcgtagtctgctgctctcctgggcaatgtctttgtcctgcttattctcctcaccagccactacaactgaaagctccccgc 1350
   V W F V S L L A L L G N V F V L L I L L T S H Y K L N V P R
1351  tttctatgtgcaacctggcctttgcgattctgcatggggatgtaacctgctcctcatcgctctgtagacctctacactcaactctgag 1440
   F L M C N L A F A D F C M G M Y L L L I A S V D L Y T H S E
1441  tactacaacctgcaactgactggcagacagggccctgggtgcaaacagggctgggtttcttcaactgtctttgcaagcgagttatcggtgtat 1530
   Y Y N H A I N D W Q T G P G C N T A G F F T V F A S E L S V Y
1531  acgctgacggtcatcacccctggagcgtggtatgccatcaccttcgcatgcccctggaccggaagatccgctcagggcagcagatgtgcc 1620
   T L T V I T L E R W Y A I T F A M R L D R K I R L R H A C A
1621  atcatggttgggggctggtttgctcttccttctgcctgcttcccttgggggaataagtagctatgcccgaagtcagtatctgacctg 1710
   I M V G G V C F L L A L L P L V G I S S Y A K V S I C L
1711  cccatggacaccgagaccctctgctctggcatatattgttttggcttgacgctcaacatagttgcctctgctcatcgtctgctgctgt 1800
   P M D T E T P L A L A Y I V F V L T L N I V A F V I V C C C
1801  tatgtgaagatctacatcacagtcgaaatccgcagtcacaacccaggggacaaagataccaaaattgccaagaggatggctgtgtggtatc 1890
   Y V K I Y I T V R N P Q Y N P G D K D T K I A K R M A V L I
1891  ttcaccgacttcatgcatggcccccaatctctatgctgtcagcaattctgaacaagcctctcatcaactgttagcaacctccaaa 1980
   F T D F I V G Y K E K S K F Q D T H N N A H Y Y V F I R D Q E
1981  atcttgcctggtactcttctatccaacttaactcctgtgccaatccattcctctatgctattttccaaaggcctccagagggatgtgttc 2070
   I L L V L F Y P L N S C A N P F L Y A I F T K A F Q R D V F
2071  atcctactcagcaagtttggcatctgtaaacgcccaggtcaggcataccgggggacaggggttccctccaaagaacagcactgatattcag 2160
   I L L S K F G I C K R Q A Q A Y R G Q R V P P K N S T D I Q
2161  gttcaaaagttaccacagagatgaggcaggtctccacaacatggaagatgtctatgaaactgattgaaaagtcaccatctaaccoccaaag 2250
   V Q K V T H E M R Q G L H N M E D V Y E L I E K S H L T P K
2251  aagcaagccaaatctcagaagagtatatgcaaacggtttgttaa 2295
   K Q G Q I S E E Y M Q T V L *

```

Fig. V-2. pCold TF-hLGR3 導入領域

上段に hLGR3 の塩基配列、下段に一字表記でアミノ酸配列を示した。  
 橙枠は pCold TF-hLGR3 ベクターに導入した領域を示した（160 アミノ酸、17.9 kDa）。青文字部分は LRR-5 領域、緑文字部分は 7 回膜貫通受容体領域を示した。



#### V-1-4. 免疫試験

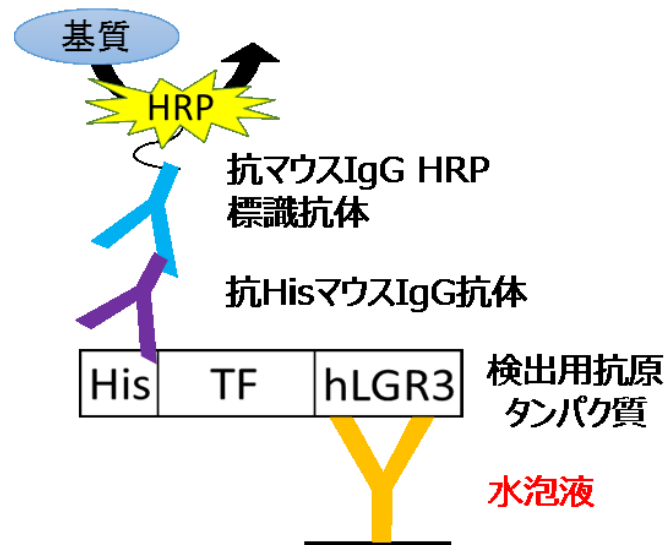
His-hLGR3 LRR を抗原として投与する試験区Aと、キンギョリンガー液を投与する対照区Bを設けた。1 試験区にスイハウガンを各 5 匹用い、II-1-4 や III-1-3 と同様の方法でオイルベースのアジュバントと抗原溶液を混合したものを水泡内に注入することによって免疫を行った。抗原投与量については、初回は抗原タンパク質 50  $\mu$ g、初回投与から 7 日後に 2 回目の免疫として 15  $\mu$ g をそれぞれ投与した。水泡液サンプル採取は、抗原投与前、初回抗原投与から 7 日、14 日および 21 日後に行った。水泡液は、採取直後に 4°C、1500 $\times$ g、10 分間遠心分離して上清を回収して-20°C で凍結保管した。

#### V-1-5. ドットブロット法による特異的抗体の検出

免疫したスイハウガンの水泡液中の抗原特異的な抗体産生の有無を確認するため、サンドイッチドットブロット法による検出を行った (**Fig. V-3**)。採取した水泡液は、50%硫酸アンモニウム沈殿法によって精製を行った。すなわち、4°C、10000 $\times$ g、10 分間遠心分離して沈殿を除去した水泡液と飽和硫酸アンモニウム水溶液を 1 : 1 となるように加え、均一になるように vortex mixer で攪拌した後、4°C で 1 時間静置した。4°C、15000 $\times$ g、40 分間遠心分離を行って上清を除去した後、沈殿を最初に硫酸アンモニウムに供した水泡液と同量の PBS で懸濁した。これを水泡液サンプルとして抗原特異的抗体の検出に適宜希釈して用いた。検出方法における陽性対照には抗 TF 抗体 (GenScript) を用い、陰性対照としては抗 AIF 抗体 (PromoKine) を用いた。両抗体をそれぞれ PBS で 100 倍から 5000 倍の範囲に希釈した。次に、PVDF 膜 (ATTO) をメタノールに浸漬して 5 分間振盪しながら置換した後、ミリ Q 水に浸漬して 10 分間 $\times$ 2 回振盪しながら置換し、最後に PBS に浸漬して 10 分間以上振盪しながら置換して平衡化した。サンプルを

滴下する直前に、PVDF 膜をプロワイプ（エリエール）に挟み込むことで余分な PBS を除去し、パラフィルム上の PVDF 膜へサンプルを 2  $\mu$ l ずつ滴下して 6 時間以上風乾した。乾燥させた PVDF 膜を 5%スキムミルク溶液で 3 時間平衡化およびブロッキングした。続いて、PVDF 膜を 0.05%TBST を用いて 10 分間振盪しながら洗浄し、さらに 5 分間×2 回振盪しながら洗浄することで余分なスキムミルク溶液を除去した。

次に、検出用抗原となる精製 TF-hLGR3 が 5 ng となるように Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO)に混合した。この検出用 TF-hLGR3 溶液に、PVDF 膜を浸漬して室温で 2 時間振盪させながら反応させた。反応後の PVDF 膜を TBST で 10 分×3 回洗浄し、余分な抗原溶液を除去した。続いて、抗 His 抗体を Can Get Signal Solution 1 を用いて 3000 倍に希釈した溶液に、PVDF 膜を浸漬して室温で 1 時間振盪しながら反応させた。反応後の PVDF 膜を TBST で 10 分×3 回洗浄し、余分な抗体溶液を除去した。さらに、抗マウス IgG HRP 標識抗体を Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO)を用いて 25000 倍に希釈した溶液に PVDF 膜を浸漬して室温で 1 時間振盪させながら反応させた。反応後の PVDF 膜を TBST で 10 分×3 回洗浄し、余分な抗体溶液を除去した。洗浄後の PVDF 膜を発光基質液（Pierce Western Blotting Substrate Plus、Thermo）に浸漬して室温で 5 分間反応させた後、CCD カメラによって化学発光を検出した。



**Fig. V-3.** サンドイッチドットブロット法の概略図

PVDF 膜に固相化抗体として免疫したスイホウガンの水泡液を固相化し、次に抗原となる TF-hLGR3、抗 His 抗体、抗マウス IgG HRP 標識抗体の順に反応させ、化学発光基質を用いて検出した。

## V-2. 実験結果

### V-2-1. 免疫抗原タンパク質 His-hLGR3-LRR 発現

免疫抗原 His-hLGR3LRR は可溶性および不溶性画分に発現していたため、可溶性画分を Ni カラムにて精製し、Ni カラム吸着画分を SDS-PAGE に供してタンパク質を分離し、CBB 染色およびウェスタンブロットにて精製確認した結果を Fig. V-4 に示した。ウェスタンブロットは一次抗体に 10000 倍希釈した抗 His 抗体、二次抗体に 25000 倍希釈した抗マウス IgG HRP 標識抗体 (Cell Signaling) を使用した。Fig. V-4 において、約 20 kDa の大きさに目的のタンパク質である His-hLGR3 LRR と推定されるバンドが検出されたことから、抗原タンパク質として V-1-4 免疫実験に使用した。

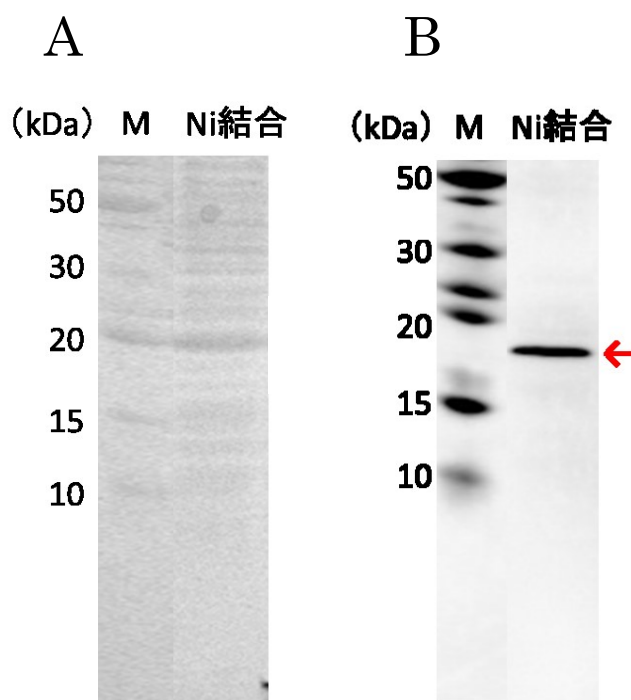
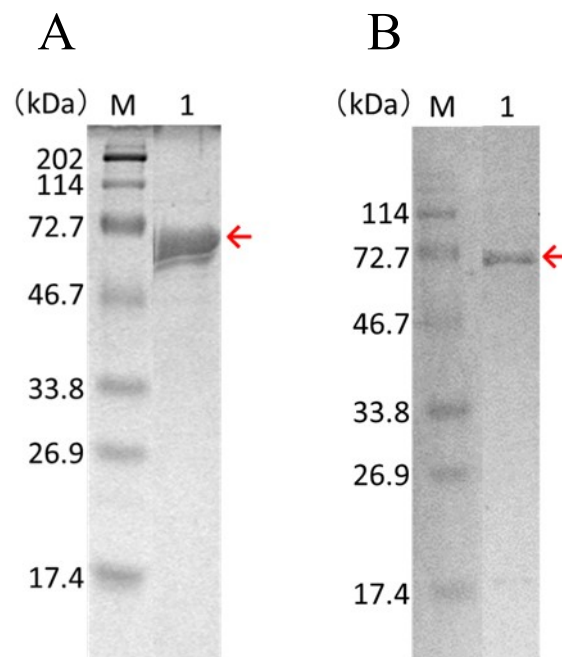


Fig. V-4. 免疫抗原 His-hLGR3 LRR の発現

(A) CBB 染色および(B) 抗 His 抗体を用いたウェスタンブロット。  
M, マーカー (Bench Mark) ; Ni 結合, Ni カラム吸着タンパク質画分。目的タンパク質 His-hLGR3 LRR の分子量の位置は赤矢印で示した。

### V-2-2. 検出抗原タンパク質 TF-hLGR3 発現

検出抗原 TF-hLGR3 の大部分は可溶性画分に発現していたため、可溶性画分を Ni カラムにて精製を行った。溶出した Ni カラム吸着画分を SDS-PAGE に供し、CBB 染色およびウェスタンブロットにて精製確認をした結果を **Fig. V-5** に示した。ウェスタンブロットは一次抗体に 10000 倍希釈した抗 His 抗体、二次抗体に 25000 倍希釈した抗マウス IgG HRP 標識抗体を使用した。**Fig. V-5** において、約 70 kDa の大きさに目的の TF-hLGR3 と推定されるバンドが検出されたため、検出抗原タンパク質として次の実験に使用した。



**Fig. V-5. 検出抗原 TF-hLGR3 の発現**

**(A)** CBB 染色および**(B)** 抗 His 抗体を用いたウェスタンブロット。M, マーカー (BIO RAD) ; レーン 1, Ni カラム吸着タンパク質画分。目的タンパク質 TF-hLGR3 の分子量の位置は赤矢印で示した。

### V-2-3. ドットブロット法による抗原特異的抗体の検出

初回抗原投与から 21 日目までの個体死亡率は、両試験区ともに 0 % (死魚なし) であった。水泡については、採取側的水泡は 1 週間程度で回復が見られたが、抗原注入側的水泡は抗原投与後 2-3 日経つと萎縮が見られた。

His-hLGR3 LRR を抗原として投与した試験区 A において、抗原投与前 (0 日目) と 21 日目の水泡液とを比較すると、個体識別番号 A2 および A4 の水泡液 100 倍および 200 倍希釈において、免疫前よりも初回抗原投与から 21 日目の水泡液において強いシグナルが検出された (Fig. V-6)。また、一方で対照区 B では、0 日目と 21 日目のサンプルとで比較すると、バックグラウンドが高かったものの顕著な差は見られなかった (Fig. V-7)。

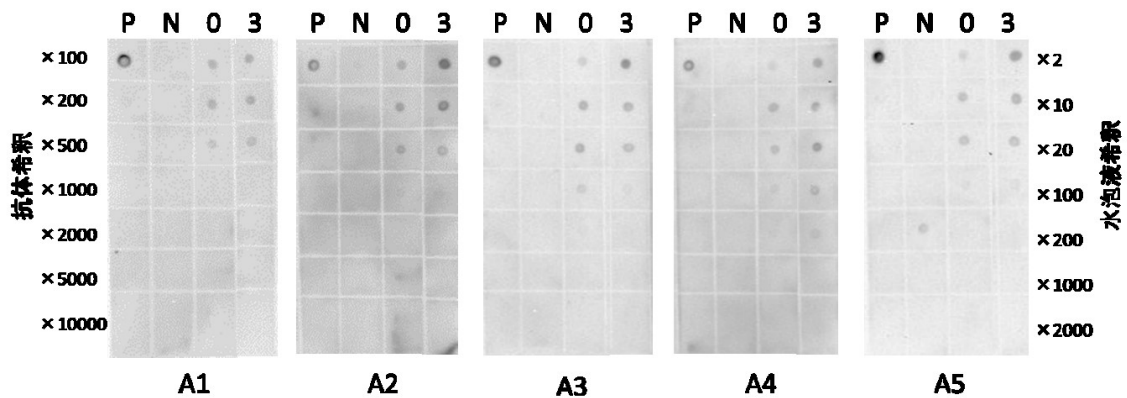


Fig. V-6. His-hLGR3 LRR 抗原に対する特異的抗体を検出

His-hLGR3 LRR を接種した試験区Aの水疱液を用いた検出。P, 検出における陽性対照 (抗 TF 抗体) ; N, 検出における陰性対照 (抗 AIF 抗体) ; レーン0, 抗原投与前 (0 日目) に採取した水疱液 ; 3, 初回抗原投与から3週間後 (21 日目) に採取した水疱液。図左側には対照に用いた抗体の希釈倍率を示し、図右側には硫酸精製水疱液サンプルの希釈倍率を示した。また、A1 から A5 は個体識別番号を示した。

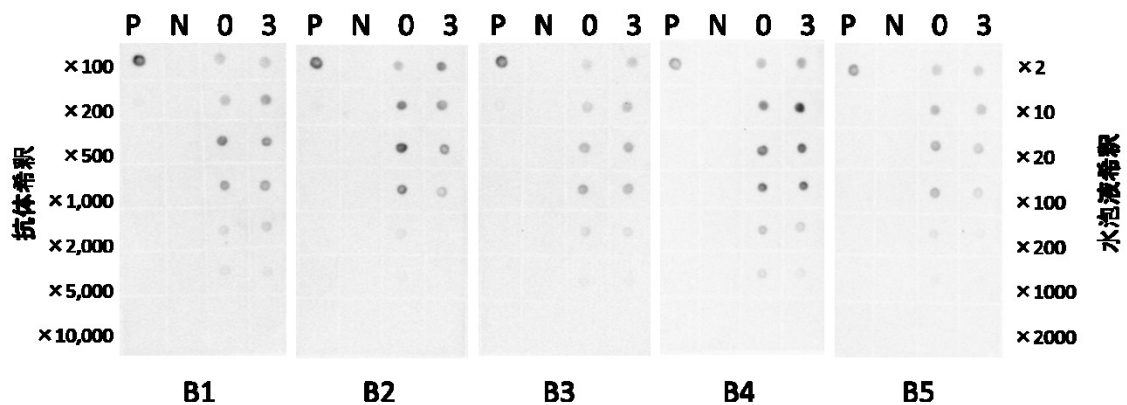


Fig. V-7. His-hLGR3-LRR 抗原に対する特異的抗体検出の対照実験

キンギョリンガー液を接種した対照区Bの水疱液を用いた検出。P, 検出における陽性対照 (抗 TF 抗体) ; N, 検出における陰性対照 (抗 AIF 抗体) ; 0, キンギョリンガー液投与前 (0 日目) に採取した水疱液、3 : 初回投与から3週間後 (21 日目) に採取した水疱液。図左側には対照に用いた抗体の希釈倍率を示し、図右側には硫酸精製水疱液サンプルの希釈倍率を示した。また、B1 から B5 は個体識別番号を示した。

### V-3. 考察

サンドイッチドットブロット法を用いて抗原 hLGR3 特異的抗体の検出を行ったところ、すべての水泡液精製サンプル試験区でシグナルが検出された。このことから、水泡液中に非特異的に抗体と反応する分子が多く含まれていると考えられた。また His-hLGR LRR を接種した試験区 A で、個体番号 A2 および A4 において抗原投与前よりも初回抗原投与 3 週間後の水泡液に強いシグナルが検出され、特に A4 では水泡液を 100 倍または 200 倍に希釈したドットにおいて顕著な差が認められた。さらに、リンガー液を接種した対照区 B においては抗原投与前と初回投与 3 週間後水泡液で比較すると、バックグラウンドは高かったものの顕著な差が見られなかった。以上のことから、ドットブロットによる検出において非特異的な結合のバックグラウンドはあるものの、hLGR3 を免疫した試験区で特に A2 や A4 個体では水泡液中に hLGR3 に特異的な抗体が含まれている可能性が示唆された。したがって、さらなる条件検討として、hLGR3 の抗原投与量を増やすことや ELISA 法での検出を行うことで、より差異の明確なシグナルが検出できることが期待できる。



## 総 括

本研究は、生化学や分子生物学分野における研究試薬だけでなく、様々な分析試薬、検査診断薬、さらには医薬品としての分子標的薬など幅広い分野に利用されている抗体について、有用な抗体を作製するための免疫動物としてゼブラフィッシュやスイホウガンというコイ科の小型魚類の利用可能性を検討することを目標としたものである。

第 I 章では、ゼブラフィッシュを免疫動物とした抗体作製について記載した。GPCR の一種である hLGR3 の組換えタンパク質を、大腸菌を用いて発現させ、ゼブラフィッシュへ経口免疫することによって標的タンパク質に対する抗体産生を確認することができた。標的タンパク質発現大腸菌を精製せずに餌と混合して投与するという簡易な方法で抗体が産生されたことが利点として挙げられた。

第 II 章では、スイホウガンというキンギョを免疫動物とした抗体作製について記載した。第 I 章で用いたゼブラフィッシュは、採取できる血清の量が少なく個体ごとで継続したサンプリングが困難であったため、第 II 章では同じコイ科に属するキンギョを新たに免疫動物として利用した。種が近いことゼブラフィッシュについての知見を利用できる可能性がある。スイホウガンは、抗体を含むリンパ液で満たされた水泡を持つため、この水泡を介して抗原 EGFP を水泡内に直接注入することにより免疫を行った。その結果、初回抗原投与から 42 日目以降、すなわち抗原投与 3 回目以降において抗原特異的抗体産生を確認することができた。

第 III 章では、第 II 章でのドットブロット法による検出では微量な抗体について検出できていない可能性が考えられたため、ELISA 法による検出を行った結

果について記載した。EGFP を抗原として用いた場合の必要抗原投与量や、経時的な抗体量の変化について調べた結果、1 回あたりに必要な抗原投与量は 10–100  $\mu\text{g}$  であり、さらに 100  $\mu\text{g}$  投与した試験区では、最短で初回抗原投与から 3 日後の水泡液において特異的抗体を検出することに成功した。

第 IV 章では、抗キンギョ抗体の作製と、水泡液からの gIgM 精製について記載した。キンギョ抗体については詳細が明らかにされていなかったため、まずキンギョ抗体重鎖の遺伝子解析を行った。その結果、キンギョ抗体が機能的に多くの種と同様の特徴を持っていることが示唆された。配列全体としては種の分化と同様に分子進化していることが示唆され、コイ科において高い相同性を示したことから、キンギョは免疫系の研究モデルとしても有用であるゼブラフィッシュに代わる宿主動物としての利用が可能であると考えられた。また、得られたキンギョ gIgM 重鎖定常部の遺伝子配列を元にして抗 gIgM 抗体を作製した。さらに、水泡液から gIgM を精製することにも成功し、水泡液中に含まれる gIgM 量についても明らかにした。

第 V 章では、第 I 章でゼブラフィッシュが産生できた抗原 hLGR3 に対して、スイハウガンも抗体を産生することができるかどうかの検討を行った。ドットブロットでの検出ではあるが特異的抗体の産生が示唆されたことから、ゼブラフィッシュで作製できる抗体をキンギョにおいても作製できる可能性が高いことが期待できた。今後は、抗体の抗原特異的な領域の配列情報を取得することで力価の高い可変領域の配列情報の取得や特性評価を行い、モノクローナル抗体を取得することが課題であると考えられる。

本研究において、スイハウガンを利用した抗体作製方法の基盤を整えることができた。免疫動物としてスイハウガンを利用した場合、①水泡を介して抗原投与や抗体採取を簡便に行うことができること、②水泡液は 1–2 週間程度で回

復するため継続的にサンプル採取が可能であること、③個体毎に経時的な変化を観察できること、④手頃な大きさと飼育も比較的容易であること、といった免疫動物としての利点が明らかとなり、スイハウガンは少量多品種の抗体生産をするのに適したモデル動物と成り得ると考えられた。今後、これまで抗体作製が困難とされてきた、哺乳類間で高度に保存されている GPCR などの高難度タンパク質に対する特異的抗体の情報を取得して抗原認識の特性評価を行い、モノクローナル抗体の取得が可能となれば、スイハウガンは今までの抗体生産を担ってきた哺乳類に代わる免疫動物と成り得ると期待できる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を賜り、常に最先端の研究ステージを与えていただきました三重大学大学院生物資源学研究科水圏生物利用学教育研究分野の田丸浩教授に深く感謝申し上げます。また、本論文を審査していただきました三重大学大学院生物資源学研究科分子細胞生物学教育研究分野の奥村克純教授、海洋生物化学教育研究分野の幹渉教授に心から御礼申し上げます。また、研究を行うにあたり常に適切なお指導や励ましの言葉をくださいましたアヴシャル・坂恵利子博士、ならびに山本康介博士、論文執筆にあたり適切なお指導をくださいました岡崎文美先生、常に好意的にご協力いただいた中井沙織さん、ならびに都築祥子さん、水圏生物利用学研究室の皆様心から感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Clark M. 2005. Empowering the inventor- the case of monoclonal antibodies. *Nat Biotechnol.* 23(9): 1047-1049.
- [2] Adams GP, Weiner LM. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* 23(9): 1147-1157.
- [3] 西島正弘, 川崎ナナ編. 2013. バイオ医薬品 開発の基礎から次世代医薬品まで. 化学同人: p. 4.
- [4] Okada Y, Tadokoro J. 1963. The distribution of cell fusion capacity among several cell strains or cells caused by HVJ. *Exp Cell Res.* 32: 417-430.
- [5] Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256(5517): 495-497.
- [6] Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, et al. 1994. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.* 7(1): 13-21.
- [7] Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81: 6851-6855.
- [8] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 222(3): 581-597.
- [9] Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, et al. 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol.* 296(1): 57-86.

- [10] Lee CV, Liang WC, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. 2004. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol.* 340(5): 1073-1093.
- [11] Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 341(6242): 544-546.
- [12] White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, et al. 2003. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature.* 422(6927): 80-83.
- [13] De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol.* 30(1-2): 187-198.
- [14] Dooley H, Flajnik M. 2006. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol.* 30(1-2): 43-56.
- [15] Hoogenboom HR. 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 23(9): 1105-1116.
- [16] Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4(8): 2528-2532.
- [17] Adachi K, Handharyani E, Sari DK, Takama K, Fukuda K, Endo I, Yamamoto R, Sawa M, Tanaka M, Konishi I, Tsukamoto Y. 2008. Development of neutralization antibodies against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus using ostrich (*Struthio camelus*) yolk. *Mol Med Rep.* 1(2): 203-209.
- [18] 小安重夫, 野本明男, 光山正雄, 谷口 克, 笹原正典. 2011. 浅島誠, 黒岩常祥, 小原雄治編. 現代生物化学入門 5 免疫・感染生物学. 岩波書店: pp. 159-196.
- [19] Bengtén E, Leanderson T, Pilström L. 1991. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): nucleotide sequences of secretory and membrane form show an unusual splicing pattern. *Eur J Immunol.* 21(12): 3027-3033.

- [20] Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossøy B. 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand J Immunol.* 50(2): 202-210.
- [21] Warr GW. 1995. The immunoglobulin genes of fish. *Dev Comp Immunol.* 19(1): 1-12.
- [22] Nakao M, Morimoto T, Tomana M, Fujiki K, Yano T. 1998. Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8: 425-434.
- [23] Wilson M, Bengtén E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW. 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9): 4593-4597.
- [24] Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Bastani N, Krossøy B. 1999. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand J Immunol.* 50(2): 202-210.
- [25] Stenvik J, Jørgensen TO. 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics.* 51(6): 452-461.
- [26] Hirono I, Nam BH, Enomoto J, Uchino K, Aoki T. 2003. Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.* 15(1): 63-70.
- [27] Cannon JP, Haire RN, Rast JP, Litman GW. 2004. The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunol Rev.* 200: 12-22.
- [28] Kokubu F, Hinds K, Litman R, Shablott MJ, Litman GW. 1988. Complete structure and organization of immunoglobulin heavy chain constant region genes in a phylogenetically primitive vertebrate. *EMBO J.* 7(7): 1979-1988.

- [29] Wilson MR, Marcuz A, van Ginkel F, Miller NW, Clem LW, Middleton D, Warr GW. 1990. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. *Nucleic Acids Res.* 18(17): 5227-5233.
- [30] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol.* 6(3): 295-302.
- [31] Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(19): 6919-6924.
- [32] Savan R, Aman A, Sato K, Yamaguchi R, Sakai M. 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur J Immunol.* 35(11): 3320-3331.
- [33] Savan R, Aman A, Nakao M, Watanuki H, Sakai M. 2005. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics.* 57(6): 458-463.
- [34] Weinstein JA, Jiang N, White RA 3rd, Fisher DS, Quake SR. 2009. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. *Science.* 324(5928): 807-810.
- [35] Barker N, Clevers H. 2010. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology.* 138(5): 1681-1699.
- [36] Tang DC, DeVit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356(6365): 152-154.
- [37] 岩田靖宏, 松村貴晴. 2012. スイホウガンの水疱内液の成分. 愛知県水産試験場研究報告. 第 17 号.



- [38] Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446): 498-503.
- [39] Wang Y, Lu Y, Zhang Y, Ning Z, Li Y, et al. 2015. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. *Nat Genet*. 47(6): 625-631.
- [40] Xu P, Zhang X, Wang X, Li J, Liu G, et al. 2014. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat Genet*. 46(11): 1212-1219.
- [41] Kuang YY, Zheng XH, Li CY, Li XM, Cao DC, Tong GX, Lv WH, Xu W, Zhou Y, Zhang XF, Sun ZP, Mahboob S, Al-Ghanim KA, Li JT, Sun XW. 2016. The genetic map of goldfish (*Carassius auratus*) provided insights to the divergent genome evolutions in the Cyprinidae family. *Sci Rep*. 6: 34849
- [42] 中村修. 2003. 魚類の粘膜免疫系. 渡辺翼編. 魚類の免疫系. 恒星社厚生閣刊: pp. 62-74.
- [43] Rombout JW, Van Der Berg AA. 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J Fish Biol*. 35: 13-22.
- [44] 大塚正規. 2006. ゼブラフィッシュ B 細胞系免疫機構とその応用に関する研究. 三重大学大学院修士論文: pp. 43-66.
- [45] Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, et al. 2014. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitated diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity*. 41(1): 152-165.
- [46] Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, et al. 2005. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(48): 17525-17530.

- [47] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, et al. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 500(7461): 232-236.
- [48] Wesemann DR, Portuguese AJ, Meyers RM, Gallagher MP, Cluff-Jones K, et al. 2013. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature*. 501(7465): 112-115.
- [49] Reynolds JA, Harrington DG, Crabbs CL, Peters CJ, Di Luzio NR. 1980. Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines. *Infect Immun*. 28(3): 937-943.
- [50] Lieschke GJ, Trede NS. 2009. Fish immunology. *Curr Opin Chem Biol*. 19(16): R678-682.
- [51] Danilova N, Hohman VS, Kim EH, Steiner LA. 2000. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. *Immunogenetics*. 52(1-2): 81-91.
- [52] Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol*. 6(3): 295-302.
- [53] Nakao M, Moritomo T, Tomana M, Fujiki K, Yano T. 1988. Isolation of cDNA encoding the constant region of the immunoglobulin heavy-chain from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 8(6): 425-434.
- [54] Ghaffari SH, Lobb CJ. 1989. Nucleotide sequence of channel catfish heavy chain cDNA and genomic blot analyses. Implications for the phylogeny of Ig heavy chains. *J Immunol*. 143(8): 2730-2739.
- [55] Andersson E, Matsunaga T. 1993. Complete cDNA sequence of a rainbow trout IgM gene and evolution of vertebrate IgM constant domains. *Immunogenetics*. 38(4): 243-250.

- [56] Andersson E, Peixoto B, Törmänen V, Matsunaga T. 1995. Evolution of the immunoglobulin M constant region genes of salmonid fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): implications concerning divergence time of species. *Immunogenetics*. 41(5): 312-315.
- [57] Hordvik I, De Vries Lindstrøm C, Voie AM, Lilybert A, Jacob J, Endresen C. 1979. Structure and organization of the immunoglobulin m heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Mol Immunol*. 34(8-9): 631-639.
- [58] Stenvik J, Lundbäck AS, Jørgensen TO, Pilström L. 2000. Variable region diversity of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) immunoglobulin heavy chain. *Immunogenetics*. 51(8-9): 670-680.
- [59] Cheng CA, John JA, Wu MS, Lee CY, Lin CH, Lin CH, Chang CY. 2006. Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. *Vet Immunol Immunopathol*. 109(3-4): 255-265.
- [60] Saha NR, Suetake H, Suzuki Y. 2005. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Mol Immunol*. 42(1): 113-124.
- [61] Amemiya CT, Litman GW. 1990. Complete nucleotide sequence of an immunoglobulin heavy-chain gene and analysis of immunoglobulin gene organization in a primitive teleost species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(2): 811-815.
- [62] Feng J, Guan R, Lin P, Guo S. 2009. Molecular cloning and characterization analysis of immunoglobulin M heavy chain gene in European eel (*Anguilla anguilla*). *Vet Immunol Immunopathol*. 127(1-2): 144-147.
- [63] Wang D, Liu HB. 2007. Immunoglobulin heavy chain constant region of five Acipenseridae: cDNA sequence and evolutionary relationship. *Fish Shellfish Immunol*. 23(1): 46-51.
- [64] Lundqvist ML, Stromberg S, Pilström L. 1998. Ig heavy chain of the sturgeon *Acipenser baeri*: cDNA sequence and diversity. *Immunogenetics*. 48(6): 372-382.

[65] Fuda H, Hara A, Yamazaki F. 1989. Purification and Quantification of Immunoglobulin M (IgM) in Serum of Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*). *Bull Fac Fish Hokkaido Univ.* 40(4): 292-306.