

魚類の免疫学・補体学と水産養殖

中尾実樹

九州大学大学院農学研究院・生命機能科学部門

Fish immunology, complementology, and aquaculture.

Miki Nakao

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

1. はじめに

なぜ魚の免疫系を、それもよりによって補体を研究するのか？という質問がこれまでたくさん寄せられてきた。単純に表現すれば、理由の一つは免疫系・補体の進化を理解し、あわよくば哺乳類では見られないような新奇な免疫因子・免疫機構を魚類から見つけてみたい、というものである。もう一つの理由は、水産科学的立場から、魚類の病害防除法を開発して魚病（主に感染症）による養殖魚の大量死を免疫学的に防止するためである。医学的・基礎生物学的見地から補体系を研究する皆様とは、前者の興味は比較的容易に共有できるのではないかと考えられるが、特に本学会において、魚類免疫研究の応用的な側面をご紹介する機会は少なかった。本稿では、基礎・応用の両面から、魚類養殖におけるバイオテクノロジー技術の成果、魚類の免疫機構に関する最近の研究の目立った進展、そして主にコイ科魚類をモデルとした我々の研究室における補体、栓球、T細胞に関する研究例を概説したい。

2. 産業としての魚類養殖

国連食糧農業機関（FAO）の統計によれば、1990年代から天然魚を天然海域で獲る漁業（Capture fisheries）の漁獲高は横ばいであるのに対し、養殖（Aquaculture）による生産高は順調に伸び続け、今や天然魚漁獲高を超えている（図1）¹⁾。今後も養殖

業の隆盛は続くと期待されるが、潜在的な阻害要因として、養魚用の餌（特に魚粉などの動物性タンパク質）の不足、細菌・ウイルス・寄生虫感染のパンデミックによる養魚の大量損失や商品価値低下などが挙げられている。魚類の免疫系を正しく理解して病害防除に資することは、健全な養殖魚を安定的に生産し、人類に良質な動物性タンパク資源を供給するために重要である。

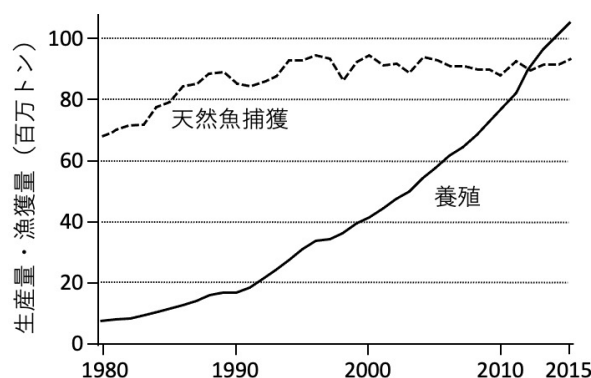


図1 世界の漁業生産量の経年変化

3. 魚類養殖のバイオテクノロジー

ゼブラフィッシュやメダカなどの小型モデル魚は、充実したゲノム情報や豊富なミュータントが利用可能であることから、魚類の発生や免疫機構の遺伝学的な解析に大きく貢献してきた。近年は、小型モデル魚から得られた知見を基に様々な技術が養殖対象魚にも応用され、近年の魚類養殖では、成長速度、

抗病性、性および性成熟の制御、味など、多様な表現型を指標とした育種が可能となっているほか、抗生物質などの薬剤に頼らない免疫学的な病害防除法の開発が進められている。この節では、近年養殖魚への応用が進んでいる主なバイオテクノロジーを概説する。

3-1. 染色体操作による性の制御

ほとんどの養殖魚種では、雄よりも雌が高い経済的価値を持つので、古くから全雌の生産が試みられてきた。たとえば、遺伝的な雌を雄性ホルモン投与によって人為的に雄に性転換させた「偽雄」と通常の雌を交配することにより、全雌の子どもが得られる。別法として、紫外線で遺伝能力を不活化させた精子で卵を受精させ、その第一卵割を高圧あるいは高温処理で阻害しても、卵由来の染色体のみを引き継いだ全雌二倍体魚を作り出せる²⁾。さらにサケ・マスでは、第一卵割阻止によって四倍体化させた雌と、二倍体の偽雄を交配させることによって全雌の三倍体魚の作出が可能となっている(図2)³⁾。全雌三倍体は不稔であるので、性成熟にエネルギーを使わないので高成長で肉質も良いことに加えて、環境中に逃げ出しても野生種との交雑によって生態系を攪乱するリスクが低い利点をもつ。

一方、雄が雌より高い価値をもつ数少ない例がトラフグである。フグの卵巣はテトロドトキシンを蓄積して強毒となるが、精巣は毒化せず美味しい白子として珍重される。全雄トラフグ生産を達成するために、まず雌性ホルモン投与によって遺伝的な雌を偽雌に性転換させ、これを通常の雄と交配させる。理論上は、こうして生み出された卵の1/4は、YYの性染色体組成を持つ超雄である。超雄を育てて通常の雌(染色体組成XX)と交配させれば、全て雄のトラフグが生まれる。これを開発した東京大学は、2013年より超雄精子の有償分与を開始している。この技術開発を支えたのは、トラフグの性決定遺伝子を同定した基礎研究である。一般に魚類の性染色体(XY)

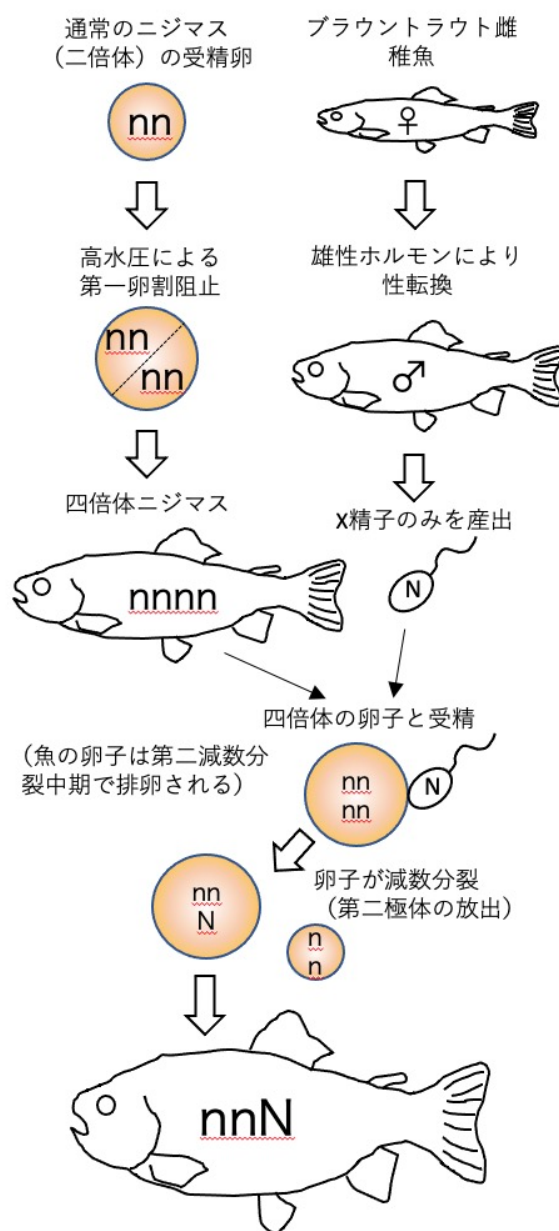


図2 信州サーモン™の作出（四倍体ニジマスとブラウントラウトとの交雑種）

はともに常染色体とほとんど同じサイズで顕微鏡下では判別不能である。魚種によって性決定遺伝子は異なるが、トラフグの性を決めるのは、抗ミューラー管ホルモンII型受容体遺伝子(Amhr2)上にある1塩基置換であることが解明され、そのSNP解析によって発生の早い段階で雌雄判別が可能となった⁴⁾。

3-2. 遺伝子組換えサケ

魚類でも外来の遺伝子を導入する遺伝子組換えは

実験的には可能であるが、食用魚における遺伝子組換えの実用化例は少ない。現在唯一、食用として米国 FDA に認可されている遺伝子組換え魚は、AquaBounty 社の AquaAdvantage Salmon である。これは、キングサーモンの成長ホルモン遺伝子を、冷水性魚種 Ocean Pout (ゲンゲの仲間) に由来する抗凍結タンパク遺伝子プロモーターに接続した遺伝子カセットを導入した、トランスジェニック大西洋サケである⁵⁾。野生型の 1.5 倍のスピードで出荷サイズ (約 4 kg) に成長する。ただし、このような組換え魚は日本では未承認・未流通である。

3-3. 量的形質遺伝子座 (Quantitative trait loci) 解析による抗病性魚の育種

ニジマスやヒラメなど、高密度遺伝子地図 (物理的地図および連鎖地図) が利用可能な水産対象魚種で、伝染性脾臓壊死症 (IPN)⁶⁾、伝染性造血器壊死症 (IHN)⁷⁾、扁形動物ハダムシ寄生⁸⁾など、治療・予防が困難な感染症について、抵抗性の高さとよく連鎖する遺伝子マーカーが解明されている。特に、我が国の養殖ヒラメに重篤な被害を与えてきたリンホスチス病については、その原因ウイルスに耐性のヒラメが育種されており⁹⁾、広く養殖種苗として流通している。

3-4. ゲノム編集による付加価値付与

CRISPR-Cas9 を中心としたゲノム編集技術は、近年、魚類に広く応用されつつある。これまでは遺伝子破壊による新規表現型の付与が進められている。例えば、ミオスタチン遺伝子の破壊による肉厚 (Double Muscle) マダイ¹⁰⁾の生産はほぼ実用化の段階にこぎつけている。サバやマグロの養殖において、食欲抑制の解除や攻撃性 (共食いなど) の消去がゲノム編集で試みられるなど¹¹⁾、様々な表現型を狙った、ゲノム編集による養殖魚の育種研究が加速している。

4. そもそも魚類とは？

ここで、我々が魚として扱う分類群を改めて確認しておきたい。魚類は、脊索動物門・脊椎動物亜門 (脊索の周囲に脊椎を発達させたグループ) に属する動物のうち、四肢動物 (両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類の総称) を除くグループを指す。脊椎動物亜門は、無顎類 (ヤツメウナギのように顎のない原始的なグループ) と顎口類 (軟骨魚類と硬骨魚類) に大別されるが、魚類は両者にまたがって分布する。また、硬骨魚の祖先から肉鰭類と条鰭類が分かれ、肉鰭類から四肢動物が派生した。これら主な分類群の系統発生は図 3 のように表すことができる。タイ、ヒラメ、コイ、サケなど我々が海や川で、あるいは鮮魚店で目にする魚の殆どは分類学的には条鰭類の中で比較的新しく出現した真骨魚類 (Teleost) に属する。脊椎動物の進化の過程で、無顎類と顎口類の共通祖先から、全ゲノムの重複を経て顎口類が生まれ、さらに真骨魚類の祖先がもう 1 回全ゲノム重複を経験したと信じられている¹²⁾。この真骨魚特異的な全ゲノム重複は、現存する真骨魚類の形態・生理・生態に著しい多様性を生んだと考えられるが、同時に、免疫因子の遺伝子の多様性拡大にも大きく貢献したことも確実視されている。

5. 魚類免疫系の特徴を概観する

魚類は脊椎動物の系統で最も原始的な位置を占めるので、その免疫因子には、四肢動物で高度に分化・多様化しているものの祖先形とみなされる構造と機能が認められることが多い。一方で、魚類の各分類群が独自の進化を遂げたものもある。ここでは、私達がよく知る哺乳類の免疫系との比較を中心に、魚類免疫系の構造的・機能的特徴を、大まかな分類群ごとに概説する。

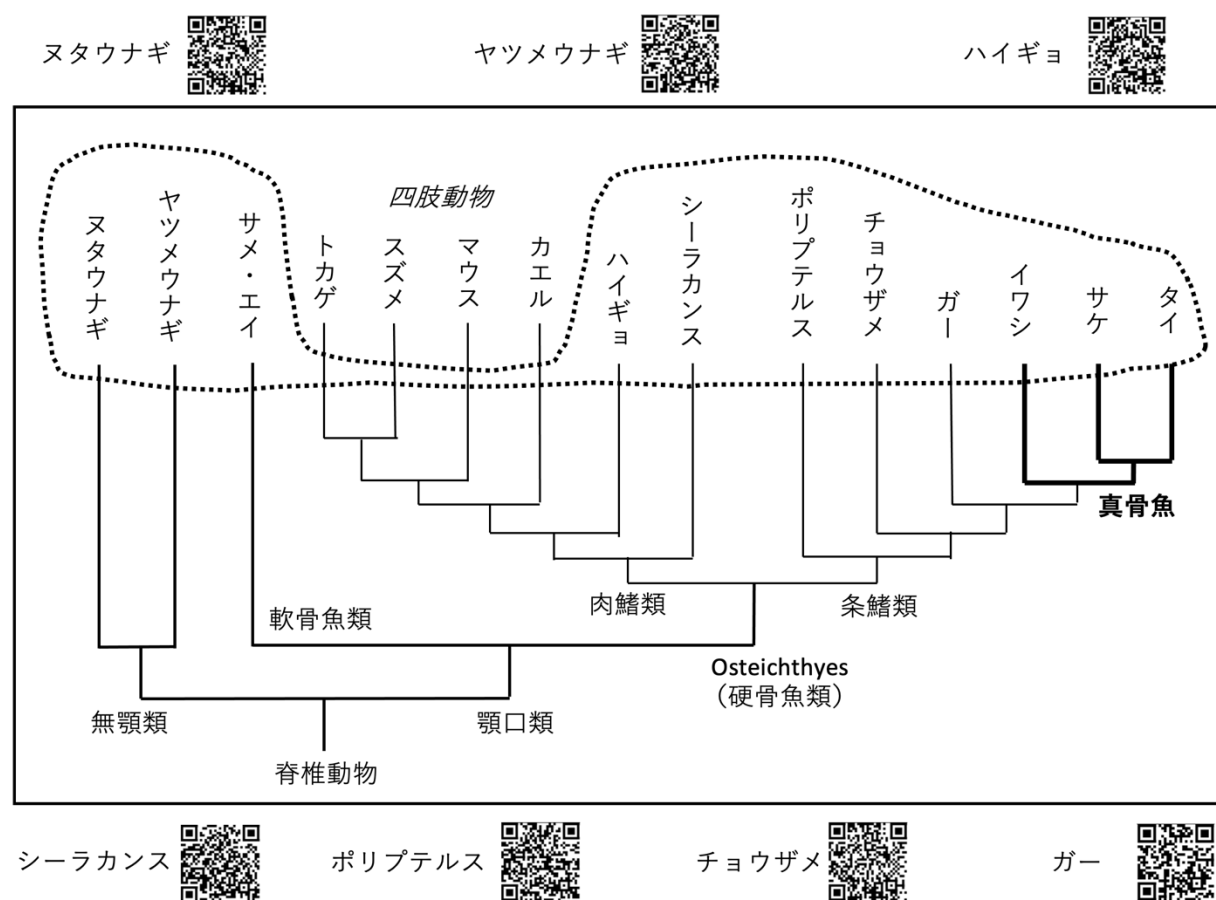


図3 脊椎動物の大まかな系統樹。点線で囲んだ範囲が魚類。太線の系統は真骨魚。一般にはなじみの薄い魚種について、Wikipedia（写真あり）へのリンクをQRコードで示す。

5-1. 無顎類

無顎類にもリンパ球に似た血球が観察されたことから、免疫グロブリン（Ig）を代表とする獲得免疫因子の進化的起源を求める研究は 1960 年代から行われていたが^{13,14}、無顎類血清から精製された Ig 様タンパク質の部分配列を基に単離された cDNA が、実は補体 C3 をコードすることが報告され¹⁵、以後、無顎類には抗体すなわち獲得免疫は未発達であると信じられてきた。しかしながら、遺伝子変換によって後天的に高度な多様化を遂げる新奇抗原受容体 Variable lymphocyte receptor (VLR) が 2004 年にヤツメウナギで発見されて以来、無顎類には Ig とは異なる独自の抗原受容体からなる獲得免疫が備わっていることが明らかとなっている¹⁶。VLR は Toll や

Toll-like receptor と同じく Leucine-rich repeats で構成される。そのサブタイプ VLR-A、VLR-B、VLR-C は、それぞれ機能的には有顎脊椎動物の $\alpha\beta$ 型 T 細胞受容体（TCR）、B 細胞受容体（BCR, Ig）、 $\gamma\delta$ 型 TCR に相当すると考えられる¹⁷。VLR-B による補体活性化を示唆する報告もあり¹⁸、Ig・VLR と全く異なるタンパク質ファミリーを抗原受容体として利用した獲得免疫系が、機能的にはよく保存されている点は、免疫系の進化を理解する上で極めて興味深い。ちなみに、無顎類の補体系には、哺乳類の補体系に見られる溶解経路を構成する成分は存在せず、レクチン経路と第二経路を介したオプソニン化が、補体系の主要な生体防御機能であると考えられる¹⁹。ただし、近年、これら活性化経路依存的な血清

の細胞障害活性も報告されており¹⁸⁾、無顎類補体の機能には解明すべき点が多く残されている。

5-2. 軟骨魚類

軟骨魚類は、Ig, TCR, MHC を備えた獲得免疫系を確立している²⁰⁾。Ig には IgNAR (Novel Antigen Receptor, H 鎖のみからなる) といった軟骨魚類特異的なアイソタイプが含まれる。また、それらの抗原結合部位の多様性は、Rag (Recombination activating genes) による VDJ 組換えでなく、哺乳類 Ig の L 鎖 (λ) の J/C クラスタと同様に、高度に多重化した VDJ カセットのクラスタから 1 組を選択して得られる²¹⁾。また、補体系は古典経路、第二経路、レクチン経路、溶解経路を完備する²²⁾。ただし、遺伝的に C5 を欠損し、細胞障害活性をまったく示さない種 (ドチザメ) が存在する点²³⁾は、C5a アナフィラトキシンを欠損することを意味し、補体に依存しない炎症反応機構がどのように機能しているのかなど、興味深い研究テーマを提示している。

5-3. 硬骨魚類

硬骨魚類の中でもっとも研究が進んでいるのは真骨魚類である。これは、真骨魚類が多く養殖対象種を含み産業的に高い価値を持つこと、遺伝子地図や全ゲノム情報などが整備された小型モデル魚種を含むことに起因する。1960 年代から硬骨魚の Ig が同定され、続いて TCR、MHC、各種サイトカインの同定も進み、現在は、硬骨魚類は哺乳類に匹敵するほどに発達した獲得免疫機構を備えていることが明らかとなっている。ただし、哺乳類と比較して、硬骨魚類に特徴的な因子や機能が明らかとなっている。次節では真骨魚類に焦点を絞り、近年明らかになってきた、このグループの免疫系が持つユニークな特徴を紹介する。

6. 真骨魚類免疫系に見る祖先形質と派生形質

6-1. 補体成分の多重化

前述した真骨魚類特異的な全ゲノム重複により、補体成分遺伝子を含む多くの遺伝子が真骨魚では倍加している²⁴⁾。魚種によっては、全ゲノム重複による倍加から更にコピー数を増やした成分もある²⁵⁾。そのような補体成分遺伝子の多重化が真骨魚類の生体防御において果たす役割は、原始的な脊椎動物における自然免疫と獲得免疫の役割分担を理解する上で非常に興味深い。著者らは、コイなどの数種の真骨魚類について補体溶血活性を測定したところ、古典経路補体価はヒトと同等かやや低いのに対し、第二経路補体価はヒトの 5~50 倍高いことを認めた²⁶⁾。この結果から、魚類の補体による生体防御は、抗体依存的な獲得免疫よりも、抗体非依存的な自然免疫により大きく依存しているという仮説を提唱した。

また、ニジマスの補体成分 C3 にはアイソタイプが存在し、これらが溶血活性や赤血球・酵母に対する結合特異性において異なる挙動を示すことが報告された^{27,28)}。これ以後、様々な魚種から C3 遺伝子の多重化や C3 アイソタイプタンパク質の機能的多様性が報告されている²⁴⁾。さらに、C4、B 因子、C7 など様々な真骨魚で重複しており^{29,30)}、補体成分の多重化によって補体の異物認識能や活性化能が強化された可能性が示唆されている。

6-2. 真骨魚類特異的な抗体クラス IgZ/IgT

真骨魚類の Ig クラスとしては、IgM と IgD が知られていたが、2005 年に、ゼブラフィッシュ全ゲノムシーケンスデータを活用して、真骨魚類特異的な Ig クラスとして IgZ (Zebrafish に因んだ命名) が発見された³¹⁾。図 4 に示すように、IgZ 重鎖 (ζ 鎖) の可変部は、IgM と共通の V 断片と IgZ 専用の D 断片 (Dζ) および J 断片 (Jζ) を、Rag によって組み換えて多様化する。Dζ クラスタ、Jζ クラスタおよび ζ 鎖定常域遺伝子 (Cζ) は、Germ Line のゲノム中では IgM・IgZ 共通の V 断片クラスタ

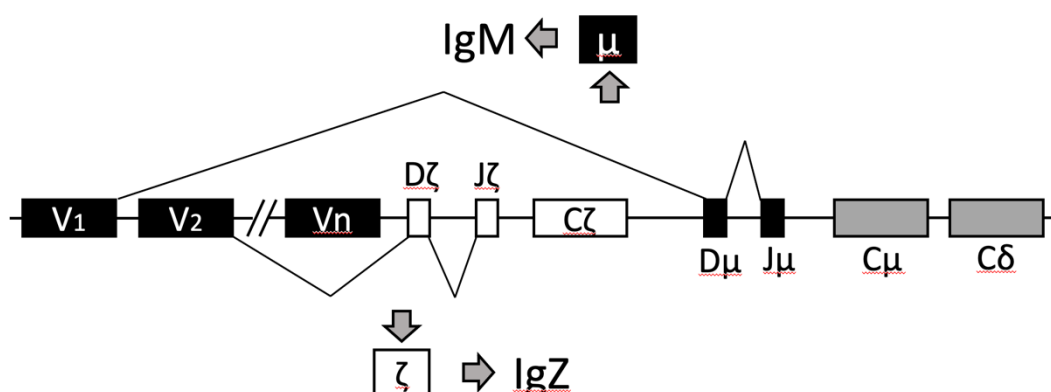


図4 ゼブラフィッシュ Germ Line の Ig 重鎖遺伝子座から IgM/IgD または IgZ のいずれかを生む仕組み。ζ、μ、δ はそれぞれ IgZ、IgM、IgD の重鎖をコードする。

と μ 鎖の D 断片 (Dμ) クラスターの間に配置されている。そのために、一つの B 細胞は Rag による VDJ 組換え時に μ 鎖か ζ 鎖のいずれかを選択することになり、IgM から IgZ へのクラススイッチは起こらない。IgZ の発見後、同様の抗体がニジマスやコイなど他の真骨魚類でも次々に発見され、現在、この IgZ に相当するクラスは、より一般的な名称として IgT (teleost に由来) と呼ばれている。IgT は、血清中では主に単量体として存在するが、消化管や体表の粘液中には IgM と同様に四量体として分泌される。近年の機能解析によって、IgT は哺乳類の IgA と相同の機能を担い、特に消化管などの外界との境界部における寄生虫感染において主要な防御を担うことが明らかとなっている³²⁾。

6-3. B 細胞による食作用

2000 年代初頭に、ペンシルベニア大学においてニジマス補体系の機能解明を進めていた Sunyer 博士は、補体活性化で生じるアナフィラトキシン様ペプチドがニジマス食細胞の異物取り込みを著しく促進することを報告した³³⁾。その実験中に、彼らは通常 of 食細胞 (好中球・マクロファージ) よりも遥かに小型の白血球までもが食作用を示すことに気づき、詳細な解析を加えた結果、それらが B 細胞であるこ

とを突き止め、Nature Immunology の表紙を飾る論文として発表した³⁴⁾。B 細胞 1 細胞あたりの異物取り込み量は単球・マクロファージに及ばないが、魚類血液中の B 細胞数は、哺乳類よりも遥かに多く、B 細胞の食作用が生体防御に有意な役割を果たすことが明らかとなった。この知見は、B 細胞とマクロファージの系統発生学的な近さを示唆したが、河本宏博士らが新たに提唱した血球分化モデル³⁵⁾ともよく一致し、原始的な脊椎動物では B 細胞が食細胞としてのマクロファージの性質を色濃く残していることが明らかとなった。

6-4. 栓球による食作用

哺乳類以外の脊椎動物では、血小板でなく栓球という有核細胞が血液凝固反応を開始させる。古くから魚類や鳥類の栓球が食作用を示すのではないかと疑われてきたが、技術的な問題から、観察された食食像の真偽には議論が残されていた³⁶⁾。著者らのグループは、コイ、ギンブナ、ヒラメの栓球に特異的なモノクローナル抗体を活用し、栓球の高純度精製と遺伝子発現解析、および精度の高いフローサイトメトリーなどの解析を進めた。その結果、これら真骨魚の栓球は、IL-1β、iNOS、MHC class II、CR3 などを発現すること、蛍光ラテックスビーズや細菌、

酵母を活発に貪食してファゴリソゾームを形成し、活性酸素による殺菌反応を起動することが明らかとなった³⁷⁾。ただし、高純度に精製した栓球単独では食作用を示さず、標的異物によって刺激を受けた他の白血球から分泌される液性成分によって栓球による貪食が活性化する³⁸⁾。栓球が貪食と血液凝固という2つの異なる機能にどのようにコミットされるのかなど、その分子機構に興味尽きない。

6-5. CD8⁺ T 細胞による寄生虫感染防御

金魚、コイ、フナなどの淡水魚にとって白点病は頻発する病気の一つで、白点虫と呼ばれる繊毛虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) が体表に感染して発病し、特に観賞魚には甚大な被害を与える。著者らの研究室では、ギンブナの体表における白点虫に対する細胞性防御機構の解析を進め、CD8⁺ T 細胞が、MHC 非拘束的に直接白点虫を認識し、パーフォリンおよびグランザイム様セリンプロテアーゼ依存的に殺すことを見出した³⁹⁾。これらの結果から、魚類では、T 細胞が TCR に依存しない異物のパターン認識能も保持していると考えられ、原始 T 細胞としての多面的な機能を垣間見ることができた。

6-6. Rag1 欠損ゼブラフィッシュの免疫応答

Rag1 は Ig や TCR の可変部遺伝子の VDJ セグメントを組換える酵素である。ヒトで機能的な Rag1 を遺伝的に欠損すると著しく易感染性の重症複合免疫不全症となり、根治的治療には造血幹細胞移植を要する。この酵素を欠損するゼブラフィッシュ突然変異体が、Tilling (Target-Selected Mutagenesis) によって樹立された⁴⁰⁾。この *rag1*^{-/-} ゼブラフィッシュは、ヒトのように重篤な免疫不全には陥らず、病原菌の人為的感染に対しては野生型より弱いものの、無菌でも SPF でもない通常の飼育環境で生育し、世代交代も可能である。これは、真骨魚類の感染防御は、哺乳類ほどには獲得免疫に依存せず、むしろ自然免疫への依存度が高いことを示唆している。ただ

し、前述のように真骨魚類では様々な遺伝子の重複があり、*rag1*^{-/-} 系統が本当に獲得免疫機能を欠損しているのかは未検証であった。

この点を確認するために、著者らのグループは *rag1*^{-/-} ゼブラフィッシュの分与を受け、血清 IgM が検出されないこと、魚病菌 *Vibrio anguillarum* の不活化ワクチンを投与しても血清の凝集抗体価が全く上がらず、*V. anguillarum* 生菌による感染試験でワクチン効果が無いこと、さらに同種異系 (allogeneic) 移植赤血球を排除できないことを確認した。これにより、*rag1*^{-/-} ゼブラフィッシュにおいては液性および細胞性の獲得免疫応答能が欠損しているという表現型を確定することができた⁴¹⁾。興味深いことに、感染刺激に対するいくつかのサイトカイン発現応答と発現臓器が、野生型と *rag1*^{-/-} ゼブラフィッシュの間で異なることが判明した。これは、Rag1 の欠損に対するゼブラフィッシュの適応変化の一種とも解釈されるが、獲得免疫出現以前のサイトカインの原始的な機能を表現しているのかもしれない。

7. モデル魚・非モデル魚を用いた補体研究 : CD46 を例に

魚類を免疫学の基礎研究に用いるには、マウスやラットに匹敵するモデル魚種の確立が望まれるが、現状では実験の目的に応じて適した魚種を使い分けが必要である。筆者らの研究室では、ゼブラフィッシュ、ギンブナ、およびコイを実験動物モデルとして利用している。これらはすべてコイ科 (Cyprinid) に属する近縁種である。ここでは、これらコイ科3魚種を組み合わせることによって効果を上げることができた、CD46 ホモログの同定、機能解析の研究例を紹介する (図5)。

7-1. ゼブラフィッシュからコイへ⁴²⁾

C3 や C4 の活性化を制御する Regulators of complement activation (RCA) の系統発生をたどる目的で、ゼブラフィッシュの全ゲノム配列データベ

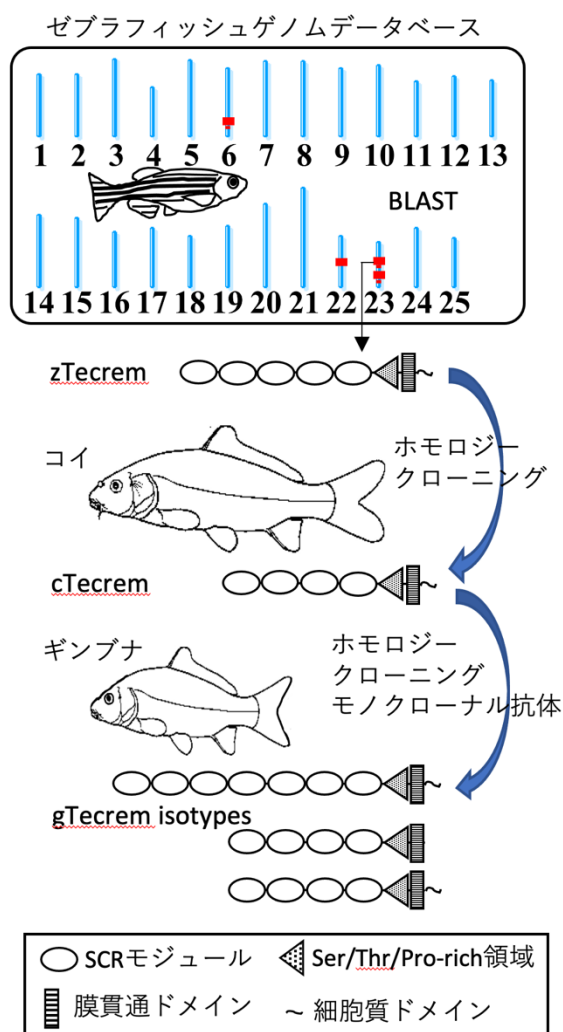


図5 コイ科3魚種を用いた、CD46様補体制御因子のクローニングと構造・機能解析. ゼブラフィッシュゲノムデータベースのBLAST検索で4箇所のRCA様遺伝子座が見つかり、そのうちの一つ (zTecrem) がCD46様ドメイン構造を保持していた。zTecremの配列を基に、コイとギンブナからTecremをホモロジークローニングした。

ースの BLAST 検索によって、RCA 遺伝子群を網羅的に検索した。発見された RCA 様遺伝子群の中に、それまで魚類では報告のなかった CD46 様の I 型膜タンパク質をコードする遺伝子を見つけ、Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) と名付けた。次に、この配列を元に設計したプライマーを用いた RT-PCR でコイからホモログ

をクローニングした。コイ Tecrem の補体活性化制御能をタンパク質・細胞レベルで調べるために、組換えコイ Tecrem を発現する CHO 細胞を樹立し、これを標的としたコイ血清の細胞障害反応の系を立ち上げた。また、コイ Tecrem による自己の C3b および C4b の沈着阻害活性を測定するために、コイ赤血球で近縁種ギンブナを免疫して抗体を作成した。ギンブナ IgM はコイの補体古典経路を活性化できるので、ギンブナ IgM を介してコイ赤血球をコイ補体で溶血する系が確立され、別途作成していた抗コイ C3 および抗コイ C4 を用いたフローサイトメトリーにより、コイ Tecrem が C4b および C3b の沈着を阻害することを証明できた。また、コイ Tecrem 発現 CHO 細胞を免疫原として用い、抗コイ Tecrem モノクローナル抗体 (1F12) を樹立した。

7-2. コイからギンブナへ

筆者らの研究室では、天然にクローン繁殖していた雌性発生三倍体ギンブナに由来する 2 クローン (OB1、S3N) と、S3N にキンギョを交雑させて生じた四倍体クローン (S4N) をモデル魚として維持している。これらギンブナクローンは、同種異系間の細胞性獲得免疫応答の実験に供することができる点で、近交系マウス・ラットに匹敵する実験魚である。

哺乳類において CD46 による T 細胞の分化や活性化への関与が報告されていたが⁴³⁾、このような補体制御因子による獲得免疫制御機能の系統発生を調べるために、筆者らはクローンギンブナを用いた解析を開始した⁴⁴⁾。幸運だったのは、上述のモノクローナル抗体 1F12 がギンブナ Tecrem にもきれいに交差反応したことであった。ギンブナの CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞を用いた解析により、両 T 細胞が Tecrem を発現し、その発現量は T 細胞マイトジェンである PHA による刺激で上昇すること、さらに PHA 刺激による T 細胞増殖が、1F12 抗体処理で阻害を受けることが判明した⁴⁵⁾。これにより、CD46

による T 細胞活性化・増殖の制御は、有顎脊椎動物の出現初期から今日に至るまで、進化的によく保存された機能であることが示唆された。

さらに、コイやギンブナの鰭から樹立された上皮細胞株（それぞれ KF-1、CFS）にも Tecrem の発現が確認されたので、これら上皮細胞による細胞シート形成における Tecrem の役割を解析することにより、CD46 の恒常性維持的な生理機能についても、その系統発生を遡ることが可能となっている⁴⁶⁾。

7-3. コイ・ギンブナからゼブラフィッシュへ

ゼブラフィッシュの実験魚としての優位性は、ゲノム編集による逆遺伝学的解析への適合性の高さが挙げられる。未着手ではあるが、CRISPR-Cas9 による Tecrem ノックアウトゼブラフィッシュを作出し、CD46 の多様な機能を個体レベルで解明したいと考えている。

8. 今後の展望

魚類は、獲得免疫・自然免疫の進化を理解するために有用な実験動物である。今後は、ゲノム情報が整備された小型魚種を中心に、ゲノム編集を駆使した遺伝子機能解析が普及し、新奇遺伝子機能の発見が進むと期待される。一方で、産業動物である養殖対象魚種は世界で多様化が進んでおり、すべての養殖対象魚種で、詳細な免疫研究を進めることには大きな労力と時間を要する。今後は、限られたモデル魚種で得られた基礎研究の成果を養殖対象魚種に種を跨いでスムーズに応用するための研究戦略が、さらに重要性を増すと予想される。

9. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究には、共同研究者である柚本智軌博士、長澤貴宏博士（九州大学大学院農学研究院）が大きく貢献した。

10. 利益相反

筆者には、本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はない。

【文献】

- 1) Ritchie H. Seafood Production. Published online at *OurWorldInData.org*. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/seafood-production' (2019) [Online Resource]
- 2) 荒井克俊. 水産増養殖における染色体操作の現状. 水産増殖 45: 411-416 (1997)
- 3) 長野県水産試験場. 信州サーモンができるまで. <https://www.pref.nagano.lg.jp/suisan/jisseki/salmon/dekirumade.html> (2017)
- 4) Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, Tohari S, Brenner S, Miyadai T, Venkatesh B, Suzuki Y, Kikuchi K. A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLOS Genet.* 8: e1002798 (2012)
- 5) Rasmussen RS, Morrissey MT. Biotechnology in aquaculture: transgenics and polyploidy. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 6: 2-16 (2007)
- 6) Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, Akutsu T, Okamoto N. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Genet Genomics.* 265: 23-31 (2001)
- 7) Barroso, RM, Wheeler PA, LaPatra SE, Drew RE, Thorgaard GH. QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) × Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*)

- trout cross. *Aquaculture*. 277: 156-163 (2008)
- 8) Ozaki A, Yoshida K, Fuji K, Kubota S, Kai W, Aoki J, Kawabata Y, Suzuki J, Akita K, Koyama T, Nakagawa M, Hotta T, Tsuzaki T, Okamoto N, Araki K, Sakamoto T. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a monogenean parasite (*Benedenia seriolae*) in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) through genome wide analysis. *PLOS ONE*. 8: e6498 (2013)
 - 9) Fuji K, Hasegawa O, Honda K, Kumasaka K, Sakamoto T, Okamoto N. Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 272: 291-295 (2007)
 - 10) Ohama M, Washio Y, Kishimoto K, Kinoshita M, Kato K. Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*. 529: 735672 (2020)
 - 11) 玄 浩一郎. ゲノム編集による"養殖しやすい"マダロの育種素材の開発. 養殖ビジネス 56: 58-62 (2019)
 - 12) 佐藤行人, 西田 睦. 全ゲノム重複と魚類の進化. 魚類学雑誌 56: 89-109 (2009)
 - 13) Finstad J, Good RA. The evolution of the immune response. 3. Immunologic responses in the lamprey. *J Exp Med*. 120: 1151-1168 (1964)
 - 14) Raison RL, Hull CJ, Hildemann WH. Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 5679-5682 (1978)
 - 15) Ishiguro H, Kobayashi K, Suzuki M, Titani K, Tomonaga S, Kurosawa Y. Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J*. 11: 829-837 (1992)
 - 16) Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*. 430: 174-180 (2004)
 - 17) 須藤洋一, 笠原正典. 脊椎動物における抗原受容体の選択 相同リンパ球に発現される由来の異なる受容体. 化学と生物 50: 624-626 (2012)
 - 18) Wu F, Chen L, Liu X, Wang H, Su P, Han Y, Feng B, Qiao X, Zhao J, Ma N, Liu H, Zheng Z, Li Q. Lamprey variable lymphocyte receptors mediate complement-dependent cytotoxicity. *J Immunol*. 190: 922-930 (2013)
 - 19) Matsushita M. The Complement system of agnathans. *Front Immunol*. 9:1405 (2018)
 - 20) Smith NC, Rise ML, Christian SL. A Comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. *Front Immunol*. 10: 2292 (2019)
 - 21) Dooley H, Flajnik MF. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol*. 30: 43-56 (2006)
 - 22) Nonaka M, Smith SL. Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish Shellfish Immunol*. 10: 215-228 (2000)
 - 23) 南雲浩之, 林 晋平, 野中 勝. サメ補体 C5 遺伝子の構造解析. 補体シンポジウム講演集 44: 39-40 (2007)
 - 24) Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Dev Comp Immunol*. 35: 1296-1308 (2011)
 - 25) Forn-Cuní G, Reis ES, Dios S, Posada D, Lambris JD, Figueras A, Novoa B. The

- evolution and appearance of C3 duplications in fish originate an exclusive teleost C3 gene form with anti-inflammatory activity. *PLOS ONE*. 9: e99673 (2014)
- 26) Nakao M, Yano T. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol Rev*. 166: 27-38 (1998)
 - 27) Nonaka M, Nonaka M, Irie M, Tanabe K, Kaidoh T, Natsuume-Sakai S, Takahashi M. Identification and characterization of a variant of the third component of complement (C3) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) serum. *J Biol Chem*. 260: 809-815 (1985)
 - 28) Sunyer JO, Zarkadis IK, Sahu A, Lambris JD. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 8546-8551 (1996)
 - 29) Nakao M, Mutsuro J, Nakahara M, Kato Y, Yano T. Expansion of genes encoding complement components in bony fish: biological implications of the complement diversity. *Dev Comp Immunol*. 27: 749-762 (2003)
 - 30) Wang S, Gao Y, Shu C, Xu T. Characterization and evolutionary analysis of duplicated C7 in miiuy croaker. *Fish Shellfish Immunol*. 45: 672-679 (2015)
 - 31) Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol*. 6: 295-302 (2005)
 - 32) Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, LaPatra SE, Bartholomew J, Sunyer JO. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol*. 11: 827-835 (2010)
 - 33) Li J, Peters R, Lapatra S, Vazzana M, Sunyer JO. Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes. *Dev Comp Immunol*. 28: 1005-1021 (2004)
 - 34) Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol*. 7: 1116-1124 (2006)
 - 35) 河本 宏、桂 義元. 造血における前駆細胞の系列決定の過程 古典的なミエロイド系／リンパ球系二分法からの脱却. *化学と生物* 50: 584-591 (2012)
 - 36) Meseguer J, Esteban MA, Rodriguez A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microsc Res Tech*. 57: 491-497 (2002)
 - 37) Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, Nakao M. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Front Immunol*. 5: 445 (2014)
 - 38) Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. *Dev Comp Immunol*. 52: 107-111 (2015)
 - 39) Sukeda M, Shiota K, Kondo M, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T. Innate cell-mediated cytotoxicity of CD8⁺ T cells against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*. *Dev Comp Immunol*. 115: 103886 (2020)
 - 40) Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, Plasterk RH. Target-selected inactivation of

- the zebrafish *rag1* gene. *Science*. 297: 99-102 (2002)
- 41) Tokunaga Y, Shirouzu M, Sugahara R, Yoshiura Y, Kiryu I, Ototake M, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Comprehensive validation of T- and B-cell deficiency in *rag1*-null zebrafish: Implication for the robust innate defense mechanisms of teleosts. *Sci Rep*. 7: 7536 (2017)
 - 42) Tsujikura M, Nagasawa T, Ichiki S, Nakamura R, Somamoto T, Nakao M. A CD46-like molecule functional in teleost fish represents an ancestral form of membrane-bound regulators of complement activation. *J Immunol*. 194: 262-272 (2015)
 - 43) Kemper C, Verbsky JW, Price JD, Atkinson JP. T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46. *Immunol Res*. 32: 31-43 (2005)
 - 44) Nur I, Harada H, Tsujikura M, Somamoto T, Nakao M. Molecular characterization and expression analysis of three membrane-bound complement regulatory protein isoforms in the ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish Shellfish Immunol*. 35: 1333-1337 (2013)
 - 45) Nur I, Abdelkhalek NK, Motobe S, Nakamura R, Tsujikura M, Somamoto T, Nakao M. Functional analysis of membrane-bound complement regulatory protein on T-cell immune response in ginbuna crucian carp. *Mol Immunol*. 70: 1-7 (2016)
 - 46) Prakash H, Motobe S, Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Expression and homeostatic functions of Tecrem, a CD46-like complement regulatory protein, on epithelial cells in bony fish. *Immunobiology*. 221: 1209-1210 (2016)