

Structure, diversity, and function of the  
membrane-bound complement regulatory protein in  
ginbuna crucian carp *Carassius auratus*  
*langsdorfii*

ヌル, インドリヤニ

<https://hdl.handle.net/2324/1398434>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名・(本籍・国籍)	インドリヤニ ヌル Indriyani Nur (インドネシア)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第731号
学位授与の日付	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生命機能科学専攻
学位論文題目	Structure, diversity, and function of the membrane-bound complement regulatory protein in ginbuna crucian carp <i>Carassius auratus langsdorfii</i> (ギンブナ膜結合型補体制御タンパク質の構造、多様性および機能に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中尾実樹 (副査) 教授 大嶋雄治 准教授 柚本智軌

## 論文内容の要旨

Regulators of complement activation (RCA) are classified into the soluble and membrane-bound proteins, and regarded as to play a key role in protecting host cells from excessive complement activation in mammals. In bony fish, those two classes of RCA have also been found. However, functions of membrane-bound RCA protein remain to be characterized. Recently, complement regulatory membrane proteins (Tecrem) has been found in carp and zebrafish. The present study aimed at identifying Tecrem orthologues in ginbuna crucian carp, and analyzed their diversity, expression, and function at mRNA and protein levels.

For identification of Tecrem cDNA from ginbuna crucian carp, a primer, corresponding to a sequence containing the predicted 5'-untranslated region, was designed on the basis of the Tecrem sequence from common carp. 3'-RACE PCR was performed and the amplified cDNA was sequenced. As a result, three isoforms of membrane-bound RCA have been identified in ginbuna crucian carp (gTecrem-1, gTecrem-2, and g-Tecrem3).

Expression analysis at mRNA level was performed using total RNA extracted from eleven tissues and blood cells (erythrocytes, total leucocytes, CD4<sup>+</sup> T cells CD8<sup>+</sup> T cells and IgM<sup>+</sup> B cells), which were subjected to RT-PCR. The gTecrem isoforms showed different mRNA expression patterns; Only gTecrem-1 mRNA was expressed in both peripheral blood leukocytes (PBLs) and erythrocytes and was also expressed in T cell subsets. Moreover, gTecrem-1 has a tyrosine phosphorylation site in its cytoplasmic tail, while other isoforms lack its site.

To perform functional analysis at the protein level, monoclonal antibody specific for carp Tecrem (anti-Tecrem mAb) was established and shown to cross-react Tecrem of ginbuna crucian carp (gTecrem). Expression of gTecrem on leucocyte and erythrocyte was determined by FCM analysis using anti-Tecrem mAb. To understand whether gTecrem is involved in T cell immunity, we investigated regulation of gTecrem on PBL after stimulation with PHA, a known T cell mitogen. Furthermore, effect of anti-Tecrem mAb on proliferation of PBL triggered by the PHA-stimulation was examined by MTT assay.

gTecrem protein was detected on both erythrocyte and leucocyte. Expression of gTecrem on PBL was upregulated following stimulation with PHA. The proliferative response was inhibited by addition of anti-Tecrem mAb, suggesting that gTecrem are involved in T cell activation.

In conclusion, three diverged isoforms of membrane-bound RCA have been identified in ginbuna crucian carp. gTecrem-1 was suggested to be functionally equivalent to mammalian CD46, in that CD46 is expressed on T cells and promotes T cell activation.

## 論文審査の結果の要旨

魚類の免疫機構の解明は、魚病防除法を確立して健全な養殖魚を安定的に生産するために重要である。中でも補体系は液性自然免疫因子として感染防御に重要な役割を果たし、魚類でも高度に発達していることが判明している。補体系にはその活性化を適性レベルに保つ制御因子が内在されているが、特に膜結合型の補体制御因子 CD46 は、哺乳類における近年の研究で、補体の活性化以外に T 細胞の活性化を制御して、細胞性の獲得免疫応答にも深く関与することが明らかになっている。しかし魚類においては補体制御因子の機能に関する知見は少なく、コイやゼブラフィッシュで数種の補体制御因子が発見され、その補体活性化抑制機能が確認されたのみである。魚類における膜結合型補体制御因子の獲得免疫応答における役割が解明されれば、今後、魚病防除に有効なワクチンを効率的に開発するための重要な基礎的知見となる。

本研究は、獲得免疫応答の研究に適したギンブナをモデル魚として用い、膜結合型補体制御タンパク質 Tecrem の構造的多様性を解明すると共に、魚類における獲得免疫応答制御への Tecrem の関与をタンパク質レベルで解析したものである。

まず、コイで既知の Tecrem のアミノ酸配列を元に PCR プライマーを設計し、ギンブナ Tecrem の cDNA クローニングを試みたところ、1尾のギンブナから 3 種の Tecrem アイソフォーム (gTecrem-1, gTecrem-2 および gTecrem-3) が単離された。これらは、互いに 70~80% のアミノ酸配列同一性を示し、細胞外ドメインを構成する Short Consensus Repeat モジュールの数や細胞内ドメイン内のリン酸化部位の有無などが異なっていた。これらアイソフォームの発現を各種臓器および血球の種類別に RT-PCR によって解析したところ、3 種のアイソフォームは異なる発現パターンを示した。これらの構造的多様性および発現臓器・細胞の違いから、ギンブナ Tecrem アイソフォームは互いに機能分化して

いることが示唆された。また、T細胞において gTecrem-1 が他のアイソフォームと比較して高い発現を示したことから、gTecrem-1 がヒト CD46 に近い機能を持っていると推察している。

次に、Tecrem の機能をタンパク質・細胞レベルで解析するためのツールとして、抗 Tecrem モノクローナル抗体 (mAb) を樹立した。本研究では、組換えコイ Tecrem を抗原として mAb を得たが、この mAb は gTecrem に交差反応したことから、gTecrem の機能解析にも使用可能であることが判明した。そこで抗 Tecrem mAb を用いたフローサイトメトリーにより、ギンブナ末梢血 T 細胞の機能と gTecrem との関係を解析した。まず、T 細胞特異的なマイトジェンであるフィトヘマグルチニン (PHA) で末梢血白血球を刺激すると、細胞増殖活性の上昇と並行して gTecrem の細胞表面における発現が上昇することを見出した。一方、抗 Tecrem mAb で末梢血白血球を処理すると、T 細胞の PHA 依存的細胞増殖が阻害された。これらの結果から、T 細胞上に発現した gTecrem は T 細胞の活性化・増殖に深く関与することを魚類で初めて示した。

以上要するに、本研究は、膜型補体制御因子による T 細胞機能の制御機構が硬骨魚類にも存在することを示しており、これを利用したワクチン効果の向上など応用研究への道を拓いた点で、魚類免疫学、水族生化学に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有すると認める。