

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04577

研究課題名(和文)ヌマエラビルにおける凍結耐性機構の解明とその利用に関する包括的研究

研究課題名(英文) Study on mechanism for freeze tolerance of a leech *Ozobranchus jantseanus* and its application

研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, Toru)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：50206504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヌマエラビルの飼育繁殖法が確立された大きな成果があった。しかし、これまでの研究からヌマエラビル抽出物(カルノシンも含めて)には氷結晶成長を抑制する効果が無いこと、また凍結したヒルの組織内細胞は多数ダメージを受けているにも関わらず高い復元性を示すことからヌマエラビルは凍結のダメージを抑制するのではなく、凍結ダメージから復元する高い能力を持っている可能性が示唆される。それにはメタボローム解析から見出された抗酸化能を有するカルノシンが関与している可能性も否定できない。カルノシンが乳酸菌の凍結乾燥耐性を向上させるなどの応用効果もそれを裏付ける一つの側面かもしれない。

研究成果の概要(英文)：A big result in this research was that breeding method of a leech *Ozobranchus jantseanus* was established in this study. From a past and this studies, it was known that the leech extract (including carnosine) not having an effect to control ice crystal growth. On the other hand, a lot of damaged cells in the organ frozen leech was found in the leech showing high ability to restore. These results suggest that the leech does not restrain damage due to ice crystallization in freezing, but having a high reconstruction characteristics in thawing. Indeed, there is a possibility that carnosine having antioxidant ability found by metabolic loam analysis participates in it. The applied effect such as carnosine improving the lyophilization tolerance of the lactic acid bacterium may be one side to support it.

研究分野：低温生物学

キーワード：ヌマエラビル 耐凍性 カルノシン

## 1. 研究開始当初の背景

通常、生物は細胞内凍結すると生命は終焉する。しかし、ヌマエラビル (*Ozobranchus jantseanus*) は凍結しても死を免れることを申請者らは発見した; Suzuki et al., A Leech Capable of Surviving Exposure to Extremely Low Temperatures. PLOS ONE, 9: e86807(2014)。この生物の凍結耐性機構を解明すると共に、体内に存在する保護物質を特定し、その利用性を明らかにすることで、農産物生産のイノベーションはもとより、医療、医薬、食品、宇宙開発など、様々な産業分野への実用的貢献が期待される。

## 2. 研究の目的

ヌマエラビルはクサガメ (*chinemy reevesii*) の甲羅に寄生し、その血液を吸うことで生命活動を維持していると見られている。クサガメは日中、体温を維持するために甲羅干しを行う。その間、ヒルは乾燥に耐えねばならない。先述の通り、乾燥と凍結とは共通性のある物理現象であり、ヌマエラビルが持つ乾燥耐性が凍結耐性としても寄与する仮説が提案される。しかし、現時点において申請者らが知り得た情報は極めて限定的である。その原因として、ヌマエラビルの生存環境が明らかでなく飼育方法が確立されていないため、それを自然環境から採取しなければならないことが挙げられる。育種技術の確立は実験効率の向上に必須といえる。一方、研究代表者の専門分野である低温生物学からの知見や技術は、生物の凍結特性の解明 (凍結ダメージの組織学的解析など) には必須である。しかし、ヌマエラビルの驚異的な耐凍機構の解明には、遺伝子発現解析やメタボローム解析などの遺伝子的アプローチや、氷結晶の成長速度やガラス化特性などに着目した分子論的アプローチも求められる。更に、応用を見据えた場合、ヌマエラビルの持つ新規機能物質の探索とその評価が必要となる。本研究ではこれらの問題に対応可能な専門家研究チームを結成し、ヌマエラビルにおける凍結耐性機構の解明とその利用に関する包括的研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

- 1) 動物学的手法によるヌマエラビルの生態調査解析と飼育
- 2) 蛍光染色による凍結及び未凍結細胞の観察
- 3) 遺伝子手法によるオミクス解析とメタボローム解析
- 4) カルノシン添加時における氷結晶成長観察
- 5) カルノシンが凍結乾燥乳酸菌の安定化に関する検討

## 4. 研究成果

- 1) ヌマエラビル *Ozobranchus jantseanus* の生態調査と飼育法の確立
  - 1.1) 飼育法研究

室内水槽下での飼育では、野外水槽と比較して水質 (水温・pH) の安定化が実現できた。これにより、一年を通したヌマエラビルの飼育の可能性が広がった。しかしながら、本来の目標である「ヌマエラビルの継続的な大量繁殖方法の確立」には十分といえるデータの取得には及ばなかった。要因としてはやはり水質の悪化が挙げられる。比較的水質を管理した飼育日程 C では、3 世代目までのヒルの飼育に成功した。pH に関しても、pH7.5 前後を保っていた。さらにスキマーにおいて水中のタンパク質由来の塵を取り除いていた。これらのことから、ヌマエラビルが体内で卵を作成する為には、それに適した水質環境が必要であることが示唆された。

### 1.2) 生態に関する調査研究

野外環境における水質とヌマエラビル寄生率の関係性について

京都府京都市内の寺院の池において、水質調査を行った。この寺院は複数の池を有し、それぞれにクサガメやニホンイシガメが生息しているが、池ごとにヌマエラビルの寄生率が異なっていた (地点数 3。そのうち、2 地点は寄生率が 50% 以上、残り 1 地点の寄生率は 0%)。そこで、ヌマエラビルの生息最適水質環境条件を知るために、それらの池の水質がヌマエラビルの寄生率に関係していると仮説を立てて、池ごとの水質調査 (水温、pH、濁度、溶存酸素率、塩分濃度等) を行ったが、3 地点間で調査項目に大きな違いは見つからなかった。そのため、これらの寄生率の違いは水質以外の要因によるものとみられた。

この場所の場合、池に生息する魚種が異なっていることが影響している可能性も考えられたが、まだ確証は無い。

### 2) 蛍光染色によるヌマエラビル

*Ozobranchus jantseanus* の凍結及び未凍結細胞の観察

凍結融解したヒル、活ヒルを対象として、酵素活性、細胞膜損傷、ミトコンドリアの膜電位の有無に関して調べることを目的とした。特に損傷の有無によって特異的に細胞を染め分けることが可能な蛍光染色を用い、全細胞を染める試薬と組み合わせることによって、膜損傷率及び、損傷細胞の分布を把握すべく、実験系を組み立てた。今回の実験では実験 1 においてはヒル全体の染色、実験 2 においてはヒル切片の作成による観察を行った。

#### FDA-PI 二重染色

観察結果からヌマエラビルの活性は比較的足周辺において高くなっている傾向があることが示唆された。また、損傷細胞に関しては、体節付近に集中的に多かった。

これは、体節に細胞が多い為、比較的損傷した細胞が多いためと考えられる。

また、液体窒素凍結を繰り返した試料では全体的に赤く P I に染まり、損傷細胞が殆どで

あることが視覚的に分かった。一方、未凍結サンプルの試料では体節に損傷細胞はあるもののその他では比較的損傷度は低めであり、全体的に FDA に強く染まっていた。やはり、一度凍結したヒルは活性も低くなり、ダメージを多く受けていることが分かった。しかしながら、それでも生命を維持できていることから、ある程度の細胞のダメージには対応可能ということが示唆された。

Mitored 染色では結回数が低い試料ではミトコンドリアが複数染色されたが、液体窒素凍結を5回加えた試料では殆ど染色されたミトコンドリアを発見できなかったことからミトコンドリアの膜電位は失われていることが判明した。しかし -90 に42日間凍結保存したものは、ミトコンドリアの膜電位はある程度残り、生命維持が保たれているのだと考えられる。

PI-Hoechst33342 二重染色 ヌマエラビルの細胞個々の観察並びに損傷分布の観察を可能にするため、細胞組織切片作成によるヌマエラビルの蛍光染色及び観察を行った。

結果 G 励起及び UV 励起による自家蛍光は確認されなかった。よって、各励起によってヌマエラビルの染色された細胞を観察することが可能ということが分かった。

PI によって膜損傷した細胞の核を赤く染められ、かつ染色された細胞の殆どは消化器官の周辺に多く観察された。これは凍結によるダメージが外側から浸食している可能性を示唆している。さらに損傷細胞と非損傷細胞を区別するために、PI と Hoechst-3334 を二重染色した結果、やはり損傷細胞(赤)は消化器官や側面に多く損傷していない細胞(青)は内側に多いことが分かった。また、比較的損傷細胞は大きい細胞であった。

### 3) ヌマエラビルのオミクス解析とメタボローム解析

#### 3.1) ゲノム解析

単離した核を用いたフローサイトメーター解析により、ヌマエラビルのゲノムサイズは190Mb ほどである事が明らかとなった。続いてシュートリード型次世代シーケンサーを用いた de novo ゲノム解析を行った。しかしサンプル調整時に混入したバクテリア由来のゲノムが解析されてしまった可能性がある。

ヌマエラビルの寄生種であるイシガメやクサガメの生殖場所が河川や湖沼の泥の上であることを考えると、野外からサンプリングしたヌマエラビルからバクテリアなどの微生物を完全に除去することは難しい。すなわち、ヌマエラビルのサンプリングから DNA 抽出の過程で、他の生物由来のゲノム DNA の混入は避けられない。

#### 3.2) トランスクリプトーム解析

ゲノム解析と並行して、遺伝子発現産物である RNA の解析(トランスクリプトーム解析)を行った。-80 に保存していたヌマエラビルを室温で解凍し、解凍直後、30分後、3時

間半後、24時間後のサンプルから RNA を抽出した。前述のゲノム解析と同様にバクテリア由来の RNA の混入は避けられなが、バクテリア由来 RNA を排除して得た遺伝子産物に対して、Gene ontology 解析と呼ばれる遺伝子の機能分類解析を行って、解凍時期に特異的な発現する遺伝子群をデータ抽出した。ペプチダーゼインヒビター活性(GO: 0030414)を持つ29の遺伝子産物が、解凍時期特異的な発現を行う事がわかった。また、細胞局在性予測解析を行った結果、解凍時期特異的遺伝子産物のほとんどが細胞外分泌性タンパク質や細胞膜タンパク質をコードしていることがわかった。これら遺伝子産物は、解凍過程で傷ついた細胞や生体分子の修復や再生に寄与している可能性が考えられる。

#### 3.3) メタボローム解析

ヌマエラビル(*Ozobranchus jantseanus*)の凍結耐性に関連する分子を同定すべく、メタボローム解析を行った。実験に供したサンプルは、-90 に凍結したヌマエラビルを解凍後に生存していたもの、液体窒素凍結と融解を複数回反復して死に至ったヌマエラビル、ヌマエラビルの近縁種で凍結耐性が全く無いマルゴエラビル(*Ozobranchus margoii*)の3つを用いた。得られた定量値を用いて主成分分析を行った結果、3つのサンプルには異なったメタボロームの特徴があることが分かった。物質の因子負荷量を調べると、カルノシンが(PC1, PC2)=(-4.8, -7.2)と上記の条件を満たし、標準物質を用いて絶対定量を行ったところ、生き返ったヌマエラビルには304 nmol/g-wet body のカルノシンが存在していたが、死んだ個体には78 nmol/g-wet body へ減少していた。また、マルゴエラビルには0.4 nmol/g-wet body しかカルノシンが蓄積していなかった。

#### 4) カルノシン添加時における氷結晶成長観察

ヌマエラビルは凍結、解凍後に体内に大量のカルノシンを蓄えていることがメタボローム解析から明らかにされた。これより、カルノシンは生体に対して何らかの保護作用を持つ可能性が示唆される。カルノシン添加時の氷結晶が抑制されている原因追求のため、30%スクロース溶液にカルノシンを添加した時と同様な水分量の30%スクロース溶液を作製して、比較を行った。その結果、結晶観察だけの時点では、カルノシンを添加していても大きな差は見られなかったが、実際に画像解析を行って結晶の大きさを数値化すると再結晶化速度定数の平均値という形で差が見られたが、t検定結果は、優位な差は見られなかった。このことから、カルノシンに氷結晶の再結晶化抑制能はあると結論づけられなかった。

#### 5) カルノシンが凍結乾燥乳酸菌の安定化に関する検討

本セクションではカルノシンの凍結乾燥乳

酸菌への保護作用を検討した。カルノシンを添加した凍結乾燥乳酸菌の 37 °C で 4 週間後の生菌数を調べ無添加のコントロールと比較した。次に、カルノシンを構成するアラニンとヒスチジンを単体で保護剤として適用しその効果を調べた。さらに、他の抗酸化物質が乳酸菌の生存率に与える影響を 3 つの菌種において調べ、その効果をカルノシンと比較した。

無添加のコントロールは 37 °C、4 週間の保存後に生菌数が 5.9 log CFU/ml (初期の菌数から約 4 log CFU/ml の減少)であったのに対して、200 mM カルノシンの添加により生菌数は 9.2 log CFU/ml (僅か 0.6 log CFU/ml の減少)であった。また、カルノシンの濃度の低下と共に生菌数は低下したが、2 mM カルノシンでも保護効果は認められた。これより、カルノシンの明らかな凍結乾燥 *L. reuteri* に対する安定化作用が明らかにされた。10 ~ 200 mM のアラニンとヒスチジンを添加した凍結乾燥 *L. reuteri* の 37 °C、4 週間後の生菌数では、アラニンを添加した結果コントロールと同じ程度の菌数、もしくはそれより少ない菌数が観測され、安定化作用は得られなかった。一方で、ヒスチジンを添加した結果では全ての濃度においてコントロールより高い菌数が得られた。さらに、100 mM ヒスチジンの添加で 200 mM カルノシンとほぼ等しい結果が得られ、生菌数が 8.9 log CFU/ml (0.9 log CFU/ml の減少)であった。これより、カルノシンの凍結乾燥 *L. reuteri* に対する保護効果はヒスチジンによるものであることが分かった。

#### 6) 全体の総括

研究第 1 グループではヌマエラビル *Ozobranchus jantseanus* の生態の理解と飼育法の確立を進めつつ、蛍光染色によるヌマエラビル *Ozobranchus jantseanus* の凍結及び未凍結細胞の観察を通して組織ダメージの理解を検討した。またヌマエラビルのオミクス解析とメタボローム解析を行い生理的代謝経路の知見、遺伝子的特性の解明を試みた。その結果、研究計画の最終年に飼育法が確立され、3 世代続けて卵から成ヒルに繁殖させられる段階に入った。しかしながら、遺伝子的アプローチには間に合わずヒル個体数の不足、コンタミによる困難さから、結論を得るには至らなかった。一方、凍結による組織ダメージ解明では蛍光染色法によりミトコンドリアが崩壊している細胞が多数見られるにも関わらずヒルは凍結復元性を示すことが判明した。また比較的初期に行ったメタボローム解析の結果、ヒルの体内にはカルノシンが有意に多量に含まれていることが判明した。

これを受けて研究第 2 応用グループ研究ではカルノシン添加が氷結晶成長に与える影響と、凍結乾燥乳酸菌の安定化に及ぼす効果を検討した。その結果、カルノシンは氷結晶成

長抑制には有意な効果は見出せなかったものの、乳酸菌に凍結乾燥時の安定性にはカルノシンの抗酸化能によると思われる安定化効果が見出せた。

以上、ヌマエラビルの凍結耐性のメカニズムは十分明らかにされたとはいえないものの、これまでの研究からヌマエラビル抽出物(カルノシンも含めて)には氷結晶成長を抑制する物質は含まれていないこと、また凍結したヒルの組織内細胞は多数ダメージを受けているにも関わらず高い復元性を示すことから、ヌマエラビルは凍結のダメージを抑制するのではなく、凍結ダメージから復元する高い能力を持っている可能性が示唆される。それにはメタボローム解析から見出された抗酸化能を有するカルノシンが関与している可能性も否定できない。乳酸菌の凍結乾燥耐性を向上させるなどの応用効果もそれを裏付ける一つの側面かもしれない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 川井清司, 三ヶ尻脩人, 藤達, 羽倉義雄, 鈴木大, 萩原知明, 黄川田隆洋, 鈴木徹, 低温生物工学会誌, in print, (2018) <査読有>.
2. 川井清司, 三ヶ尻脩人, 羽倉義雄, 鈴木大, 黄川田隆洋, 鈴木徹, 日本冷凍空調学会年次大会講演論文集 (2017.9.26-29, 東京), A101(2017) <査読無>.
3. 鈴木大, ヌマエラビルの凍結耐性. 冷凍. 92 (1078): 24-28 (2017) <査読無>
4. Nakano, T., Nakamura, R., Ohtsuka, S., Suzuki, T., Suzuki, D., Low genetic diversity in *Ozobranchus jantseanus* (Hirudinida: Ozobranchidae) in Japan: possibility of introduction with their host turtles. *Parasitology International*. 66(6): 798-801 (2017) (IF=1.744) <査読有>.

[学会発表](計 5 件)

1. Svetlana Kuznecova, Dai Suzuki, Maria Logacheva, Olga Kozlova, Takahiro Kikawada, Rushan Sabirov, Oleg Gusev, Using de novo transcriptome for identification genes involved in cryotolerance in the turtle leech *Ozobranchus jantseanus*, Moscow Conference on Computational Molecular Biology 2017 (MCCMB-2017), Moscow, Russia, July 27-30 (2017).
2. 川井清司, 三ヶ尻脩人, 藤達, 羽倉義雄, 鈴木大, 萩原知明, 黄川田隆洋, 鈴木徹, 保護物質が凍結乾燥乳酸菌の生菌数に及ぼす影響, 低温生物工学会第 62 回大会, 北海

道, 2017年5月.

3. 鈴木徹, 関口由起, 原川昭宏, 鈴木大,  
高い凍結耐性を持つヌマエラビル  
(*Ozobranchus jantseanus*)の細胞組織変化,  
低温生物工学会第62回大会, 北海道, 2017  
年5月.

4. 関口 由起, 原川 明宏, 鈴木 大, 鈴木  
徹, 凍結耐性を示すヌマエラビルの細胞組  
織変化及び飼育法に関する研究, 第61回日  
本応用動物昆虫学会大会, 東京, 2017年3  
月.

5. Svetlana Kuznetsova, Dai Suzuki,  
Maria Logacheva, Takahiro Kikawada,  
Rushan Sabirov, and Oleg Gusev,  
Transcriptomic of the leech *Ozobranchus  
jantseanus.*, Moscow Conference on  
Computational Molecular Biology 2015  
(MCCMB-2015), Moscow, Russia, July 16-19,  
(2015).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, Toru)  
東京海洋大学・学術研究院・教授  
研究者番号: 50206504

### (2) 研究分担者

黄川田 隆洋 (KIKAWADA, Takahiro)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研  
究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員  
研究者番号: 60414900

萩原 知明 (HAGIWARA, Tomoaki)  
東京海洋大学・学術研究院・教授  
研究者番号: 20293095

川井 清司 (KAWAI, Kiyoshi)  
広島大学・生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号: 00454140

鈴木 大 (SUZUKI, Dai)  
東海大学・生物学部・講師  
研究者番号: 9064789

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )