

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07551

研究課題名(和文) プロテオミクスによるアコヤガイ赤変病発症機構の解明

研究課題名(英文) A study on pathogenic mechanism of Akoya oyster disease by proteomic analysis

研究代表者

島崎 洋平 (Shimasaki, Yohei)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40363329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、アコヤガイ赤変病の発症機構を解明するため、プロテオーム解析により病原体由来および病気により変動するアコヤガイ由来のタンパク質を探索した。その結果、赤変病個体で発現が有意に増加しているタンパク質として、細胞骨格関連タンパク質、酸素運搬・貯蔵関連タンパク質、細菌由来タンパク質が同定された。今回の結果から、赤変病個体における細胞組織および呼吸機能の異常が推察され、衰弱による免疫力の低下が体内細菌数の増加をもたらしている可能性が推察された。さらに解析を進め、発症機構の解明を目指す予定である。

研究成果の概要(英文)：Present study aimed at revealing the pathogenic mechanism of Akoya oyster disease by proteomic analysis. As a result, cytoskeleton related protein, oxygen transport and storage related protein, bacterial protein were identified among protein spots which showed increased abundance in diseased Akoya oyster compared with uninfected individuals. These results suggested that abnormality of cell tissue and respiratory function occur in diseased Akoya oyster, then bacterial number may be increased with decreased immunity by disease induced weakness. Further study is needed to clarify the pathogenic mechanism of Akoya oyster disease.

研究分野：水産生物環境学

キーワード：アコヤガイ 赤変病 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) の軟体部の赤変化を伴う斃死、いわゆる赤変病は 1994 年に愛媛県で最初に確認されて以来、1996 年から 1998 年の 3 年間で西日本の主要な真珠養殖漁場全域に広がり壊滅的な被害をもたらした。本疾病を発症したアコヤガイは濾過水量が低下とともに摂餌能力が低下し、衰弱・斃死すると考えられている。

本疾病の原因として環境要因や有害プランクトン、原虫等様々な原因が考えられてきたが、赤変病感染貝の外套膜を健常貝に移植する感染実験 (黒川他、1998) や 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過した血リンパ液に感染力が認められたため (森実他、2001)、現在は濾過性病原体による感染症であると考えられている。現在、冬季の低水温飼育などの対処法が確立され、赤変病の被害は軽減しているが、現在でも赤変病は毎年発生しており、病原体および発症機構の解明が望まれている。

(本研究開始後、細菌説が提唱されている; Matsuyama et al, 2017)

2. 研究の目的

赤変病に感染・発症したアコヤガイの体内には病原体由来のタンパク質分子、および発症により発現量が変動するアコヤガイ由来のタンパク質分子が存在することが予想される。そこで本研究では、タンパク質群を網羅的に検出・定量可能な手法であるプロテオーム解析を用い、赤変病の病原体由来およびアコヤガイ由来のタンパク質を検出・定量することにより、病原体の推定および発症機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

事前の研究において、三重県英虞湾の赤変病感染発症貝 (赤変)、赤変病感染未発症貝 (健常)、福岡県相島の未感染貝 (未感染) の閉殻筋を用いた二次元電気泳動 (図 1) によるタンパク質発現量比較により、有意な変動を示す 39 のタンパク質スポットが見つかった。特に赤変病個体と健常・未感染間での変動が顕著であった (図 2)。

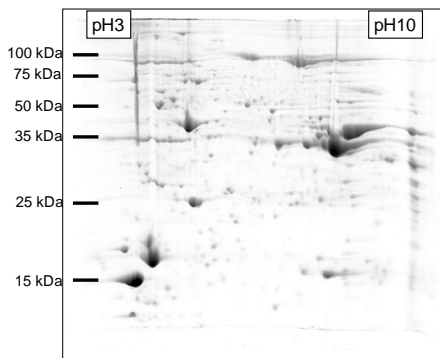


図 1. アコヤガイ閉殻筋の二次元電気泳動像。蛍光染色にて 271 個のタンパク質スポットが確認され、そのうち 39 のスポットの有意に変動していた。

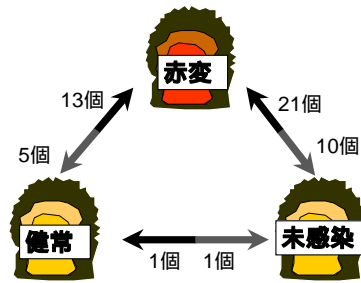


図 2. 赤変発症個体 (赤変)、赤変感染・未発症個体 (健常)、未感染個体 (未感染) 間で有意に変動したタンパク質スポット数 ..

発現量がグループ間で変動していたタンパク質スポットを中心に、二次元電気泳動後のゲルより各スポットを切り出した後、トリプシン酵素処理によりタンパク質を断片化した。得られたペプチド群の質量を MALDI-TOF MS によって測定し、MASCOT サーバーを用いて peptide mass fingerprinting (PMF) 解析を行い、タンパク質種の同定を行った。同定できたタンパク質種とその発現量の増減との関係から、病原体および発症機構を検討した。

4. 研究成果

赤変貝で有意な増加が確認され、且つ PMF 解析で同定できた主なタンパク質は大きく分けて、細胞骨格関連タンパク質 (40, 82)、酸素運搬・貯蔵関連タンパク質 (132, 151, 153)、細菌由来タンパク質 (210, 212, 196) であった (表 1)。

表 1. 赤変病個体で増減が観察され、同定された主なタンパク質 .

スポット番号	タンパク名	生物種	赤変貝における増減 (赤変 / 未感染)
40	フィラメント様タンパク	アコヤガイ	245%
82	アクチン	ムラサキウニ	483%
132	ミオグロビン	エイラクブカ	266%
151	ミオグロビン	エイラクブカ	671%
153	ミオグロビン	エイラクブカ	423%
210	ABC輸送体	フィルミテクス門の一種	557%
212	tRNAメチル基転移酵素	ボツリヌス菌	611%

(1) フィラメント様タンパク質およびアクチンの増加 (図 3)

スポット 40 はフィラメント様タンパク質、スポット 82 はアクチンと同定された。アクチンは細胞骨格としての役割をもち、生物間で高く保存されているタンパク質として知られており、今回同定されたムラサキウニ (*Haliotis erythrogramma*) のアクチンはアコヤガイアクチンと比較してアミノ酸一致率 97% と高いホモロジーを示した。既往

の知見において、赤変病発症個体では軟体部の委縮や筋繊維間に結合組織が発達し、しばしば広範囲にわたり筋繊維が消失し結合組織や血球で置き換わっている(黒川ら、1998)ことや、筋細胞の繊維状構造が消失する(平野、2002)ことがわかっている。本実験においても筋組織がこのような異常をきたしている可能性があるにもかかわらず、赤病貝においてアクチン等が増加している要因として、組織修復のための新規合成を行っている可能性、または死滅した筋肉細胞由来のアクチン断片がスポットとなって増加したという可能性が考えられた。

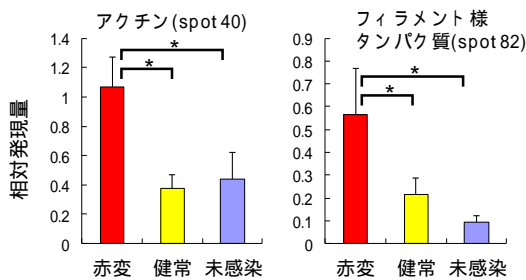


図3. 赤変発症個体(赤変)、赤変感染・未発症個体(健常)、未感染個体(未感染)におけるアクチン(Spot 40)およびフィラメント様タンパク質(spot 82)の相対発現量(*: p<0.05).

(2) ミオグロビンの増加(図4)

スポット 132, 151, 153 はミオグロビン(エイラクブカ: *Hemitriakis japonica*)と同定された。ミオグロビンは脊椎動物の筋肉中で酸素を貯蔵する赤色の色素タンパク質であり、特にイルカやクジラなど長く潜水する哺乳類が多く持つが、通常、アコヤガイを含む二枚貝ではミオグロビンは存在しないとされている。二枚貝の酸素貯蔵・運搬タンパク質として知られるヘモシアニンと、今回検索されたエイラクブカのミオグロビンのアミノ酸類似性については未検討であるが、仮に本スポットがヘモシアニンである場合、その量が著しく増加しているため、何らかの原因で赤変病発症個体が酸素欠乏に陥っており、それに伴うヘモシアニンの誘導の可能性が考えられた。

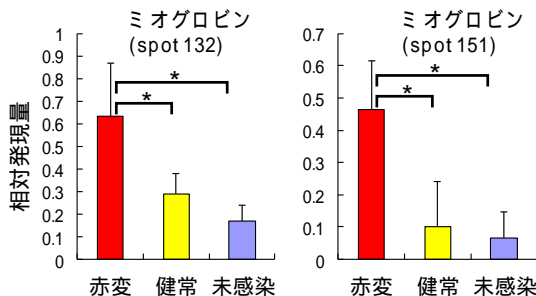


図4. 赤変発症個体(赤変)、赤変感染・未発症個体(健常)、未感染個体(未感染)におけるミオグロビン様タンパク質の相対発現量(*: p<0.05).

(3) 細菌由来のABC輸送体、tRNAメチル基転移酵素の増加(図5)

細菌由来と考えられるタンパク質が同定され、それぞれフィルミテクス門の一種、ポツリヌス菌に由来するタンパク質スポットであった。ポツリヌス菌の一部は海洋中にも存在する。フィルミテクス門は大腸菌の仲間として知られており、これらが共生、寄生しているということも考えられる。一方で、未感染貝からも相対的に少ないながら両タンパク質スポットが検出されているため、これらが赤変病の病原体とは考えにくい。赤変病発症後の衰弱による免疫力の低下などの要因により、アコヤガイ体内で細菌が増殖している可能性が考えられた。

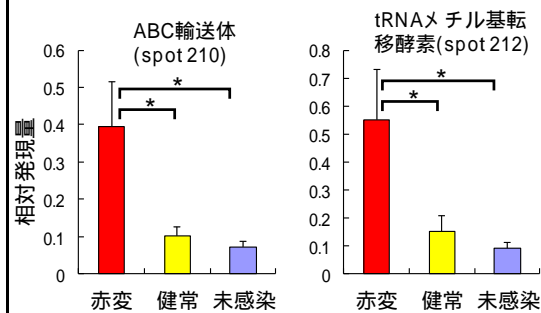


図5. 赤変発症個体(赤変)、赤変感染・未発症個体(健常)、未感染個体(未感染)における細菌類由来タンパク質の相対発現量(*: p<0.05).

(4) 今後の展望

今回の結果から、赤変病個体における細胞組織、酸素運搬・貯蔵能の異常の可能性が推察され、同時に体内の細菌数の増加が赤変病発症個体の衰弱・へい死の要因の一つと考えられた。本課題の開始以降、Matsuyama et al (2017)により、細菌のスピロヘータの一種が本疾病の病原体である可能性を示す報告が公表された。スピロヘータは赤変貝の血リンパ中に多く存在しており、本課題で増加が推定された酸素運搬・貯蔵タンパク質であるヘモシアニンに対し、病原体が何らかのダメージを与えていることも予想されるため、本課題の結果との関連性を今後調べていく必要があると考えられた。

一方で、発症機構を推定するにはタンパク質スポットの同定数が十分ではなく、今後の重要な課題である。また、閉殻筋だけでなく、感染性が確認されている血リンパ等を用いた解析をすすめ、本疾病の発症機構を継続して調べていく予定である。

引用:

Matsuyama et al. PLOS one . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182280> (2017) .

黒川他. 日本水産学会誌, 65:241-251(1999) .

森実他, 魚病研究, 37: 149-151 .(2002) .

平野. 養殖アコヤガイの大量死に関する

疫学的研究、学位論文(2002).

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 洋平 (SHIMASAKI, Yohei)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40363329

(2) 研究協力者

杉本 智軌 (SOMAMOTO, Tomonori)
九州大学・大学院農学研究院・准教授

永井清仁 (NAGAI Kiyohito)
ミキモト真珠研究所

郷譲二 (GO Jyoji)
ミキモト真珠研究所