

令和元年11月13日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15319

研究課題名(和文) 魚類の血液中に存在する新規生体防御因子の活性制御機構について

研究課題名(英文) Activation mechanism of host-defense molecule in fish blood

研究代表者

木谷 洋一郎 (Kitani, Yoichiro)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：70565340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において海産硬骨魚キジハタ血液にL-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)を見出した。このLAOはキジハタ血液において不活性体として存在することを明らかとした。LAOは過酸化水素を産生しこれが抗菌活性を示すが同時に魚体にとって毒性を示すことによると考えられる。キジハタLAOの活性化作用を調べたところ、海水中に含まれるイオン、すなわちナトリウム、カリウム、カルシウムなどにより活性化することがわかった。活性化に必要なイオン濃度は海水に含まれるものと近似したことから、キジハタLAOは海水との接触により活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、強力なラジカルジェネレーターであるL-アミノ酸オキシダーゼが生体内で不活性体として存在し、必要に応じて活性化しその機能を示すことが明らかとなった。これはLAOが感染症等からの生体防御の際に厳密に制御された攻撃手段として存在することが予想される。この成果は魚類のみならず他の生物におけるLAOを中心とした生体防御機構の理解へ向けた端緒となる。

研究成果の概要(英文)：We found a novel L-amino acid oxidase from Orange-spotted grouper serum. This LAO was existed as an inactivated form in the blood of the grouper, because of the toxicity of hydrogen peroxide that provides by L-amino acid oxidation. The activation mechanisms of grouper LAO were investigated and ions that contain seawater such as sodium, potassium and calcium were triggered to activate. Activating concentration of those ions was almost the same as seawater contents. Those results suggested that the grouper LAO was typically inactive form and was activated by contact with seawater.

研究分野：水産化学

キーワード：L-アミノ酸オキシダーゼ 魚類 生体防御 抗菌タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

高度に発達した生物（脊椎動物）は病原微生物の感染を防ぐためにいくつもの防壁を先天的に備えている。特に魚類は、a) 水中には病原性細菌を含む多様な微生物が高密度に存在していること、b) 陸上動物とは異なり乾燥から身を守る必要がないため皮膚に角質層が存在せず、脆弱な表皮細胞で覆われていることなどから、その体表には生体防御のための特別な仕組みが存在する。さらに魚類の免疫系は哺乳類などと比べて未発達であることから、原始的な免疫系すなわち抗原抗体反応に由らない自然免疫系が大きな役割を果たしている。これには様々な生体防御因子が活躍しており、なかでも抗菌ペプチドであるヒストン由来ペプチド、両親媒性ペプチド、βディフェンシン、溶菌酵素であるリゾチムなどの抗微生物因子が魚類体表から単離されている。しかし、これらの他にも巨大な分子構造を示し、精製が困難な未知の抗微生物因子を含む魚類が存在することも明らかとなりつつあった。そのような状況の中、申請者は海産硬骨魚クロソイ *Sebastes schlegelii* 体表粘液から新規な抗微生物因子としてL-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) を同定した (Kitani et al. 2007)。

LAO はフラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素として持ち、L-アミノ酸を基質としてこれを酸化しα-ケト酸とアンモニアそして過酸化水素を産生する酸化還元酵素であり (図1)、産生された過酸化水素が様々な生物活性を示す。LAO 研究はヘビ毒に含まれるものについては多くの報告が存在するが、そのほかの生物種で生体防御因子として捉えた研究は少なく、マウスおよびヒトのインターロイキン4誘導遺伝子産物1、マウス乳汁LAO など数えられる程度である。魚類においては、現在のところ申請者を含めて国内外合わせて3グループほどが活動しているのみであり、LAO の生理学的意義を理解するには未だ研究の途上であるといえる。

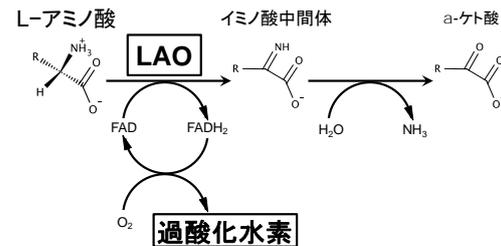


図1 LAOの反応

クロソイを中心とした研究を進める過程で、クロソイ血液にも LAO が存在することを明らかとした (Kitani et al. 2010)。血清 LAO は体表ではなく体内における生体防御に役立っていると予想されるが、この酵素が産生する過酸化水素およびアンモニアは魚体自身に対しても高い毒性を示すことが考えられ、また血清 LAO の基質となる血中遊離アミノ酸の消耗は魚体の生命維持にも不利なものとなる。この矛盾をどのように回避しているか明らかとすることは LAO を中心とした生体防御機構を理解する鍵となる。

### 2. 研究の目的

申請時までには得られていた結果から、血清中の LAO 活性は反応系の塩化ナトリウムにより活性化することが明らかとされている (Kitani et al. 2010)。そこで本研究ではこの活性化メカニズムについて、何らかの制御因子が結合することによるものであると推測し、これを明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 魚種選定および魚類血清 LAO の単離

安定的に入手でき、かつ強い LAO 活性を示す魚種を用いて研究を施行するため、種々の魚類に対して活性スクリーニングを行った。研究に供する魚種を選定後、魚類 LAO の構造解析および当初計画にある抗体作製のため、過去の研究を参考に種々のクロマトグラフィーを用いて血清 LAO の単離を行った。クロマトグラフィーには、レクチンアフィニティー、イオン交換、サイズ排除、ヒドロキシアパタイトおよびオクタデシルシランなど異なる分離モードを組み合わせて用いた。単離の際には対象の物質を抗菌活性もしくは酵素活性などによりモニターした。純度の検定には電気泳動法を用いた。

#### (2) 血清 LAO 活性化条件の検討

海水中に存在する塩等を血清に加え、LAO 活性に変化がみられるか検討した。NaCl をはじめとして KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub> について活性化作用を検討した。生理学的条件では血清 LAO は活性を示さないことが予想されたため、魚体内に存在する量の数十から数百倍の濃度について検討した。

#### (3) 血清 LAO 活性制御分子の探索

LAO の活性化は活性阻害物質の解離によるものと推定し、本項目では魚類血清 LAO の活性制御に関連する分子を探索することを目的とした。

魚類血清 LAO 複合体の様子を知るために、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて複合体の分子量を推定した。低塩濃度もしくは高塩濃度の移動相で平衡化されたゲルろ過担体に血清を付し、LAO 活性を継時的にモニターし活性ピークの保持時間を比較した。それぞれの条件で分子量標準タンパク質の保持時間を分析することにより塩が与える分離の影響を相殺した。この保持時間の変化から複合体の分子量および結合している分子の分子量を推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 魚種選定および魚類血清 LAO の単離

###### ① 魚類 LAO の探索と性状

試料採取および市場などで入手した種々の魚類を対象に LAO 活性測定を行ったところ、海産硬骨魚キジハタ *Epinephelus akaara* (図2) の体表粘液および血清が LAO 活性を示すことがあきらかとなった。キジハタ血清 LAO の基質特異性を明らかにするため、キジハタ血清を用い 20 種の L-アミノ酸を基質として LAO 活性測定を行った。



図2 キジハタ

図3に示す通り L-トリプトファンに対する LAO 活性が最も高く、次いで、L-フェニルアラニン、L-メチオニンに対しても LAO 活性を示した。キジハタ血清の抗菌活性を明らかにするために、指標菌として魚病細菌である *Aeromonas salmonicida* を用いて、微量液体希釈法によって抗菌活性を評価した。同時にカタラーゼによるキジハタ抗菌活性への影響を調べた。その結果、キジハタ血清濃度依存的に抗菌活性が見られた。また、この抗菌活性はカタラーゼ添加により消失もしくは減少した。以上よりキジハタ血清には LAO が存在し、少なくとも過酸化水素を主要因とした抗菌活性を示すことが分かった。

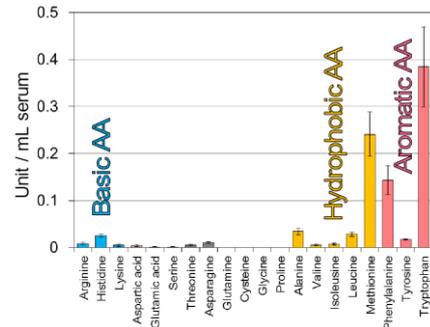


図3 キジハタ血清の基質特異性

###### ② キジハタ血清 LAO の単離

キジハタ血清中に含まれる LAO は強陰イオン交換低圧クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト HPLC、ゲルろ過 HPLC および強陰イオン交換 HPLC の組み合わせにより単離された。得られた LAO の分子量はゲルろ過 HPLC で 450 kDa、SDS-PAGE で 67 kDa を示したことから、生体内では多量体を形成していることが予想された。

###### ③ キジハタ血清 LAO の構造

単離されたキジハタ血清 LAO を SDS-PAGE で分離しポリビニリデンジフルオリド膜に電気転写後、目的バンドを切り出しエドマン分解プロテインシーケンサーで N 末端アミノ酸配列を分析した。その結果、この配列は既知の LAO と相同性を示し、キジハタ血清中に LAO が含まれることを確認した。また精製された LAO をリシルエンドペプチダーゼ消化後に逆相 HPLC で分離しピーク分取で得られた物質のアミノ酸配列も同様に測定し、内部アミノ酸配列を得た。これらの配列情報をもとに縮絨プライマーを設計しディジェネレート PCR によるキジハタ血清 LAO 遺伝子全長配列のクローニングを試みた。その結果、現在までに 470bp のキジハタ血清 LAO 遺伝子部分配列が決定された。

##### (2) 血清 LAO 活性化条件の検討

キジハタ血清に種々の塩を加え、活性化に必要な条件を検討した。海水に含まれる主要な塩を加えたところ、一価の陽イオンであるナトリウムおよびカリウムは 0.5M で活性化した。一方二価陽イオンであるマグネシウムでは 0.06M、カルシウムでは 0.03M で活性化した (図4)。以上の結果から、キジハタ血清 LAO は海水中に含まれる塩と反応して活性化することが明らかとなった。イオン種により活性化に必要な濃度が異なることから、塩素イオンそのものは LAO の活性化に寄与しないことが示唆された。海水におけるこれら塩の濃度はナトリウムが約 0.45M、マグネシウムが約 0.05M、カリウムおよびカルシウムが約 0.01M であることから (野崎 地球化学、1992)、カリウム以外は LAO 活性化に必要な塩濃度と近似している。このことから、キジハタ血清 LAO は出血の際に海水と接触し活性化し、血液中の基質と反応することで細菌の侵入を阻止していることが予想された。また、数種の界面活性剤でも同様に活性化した。

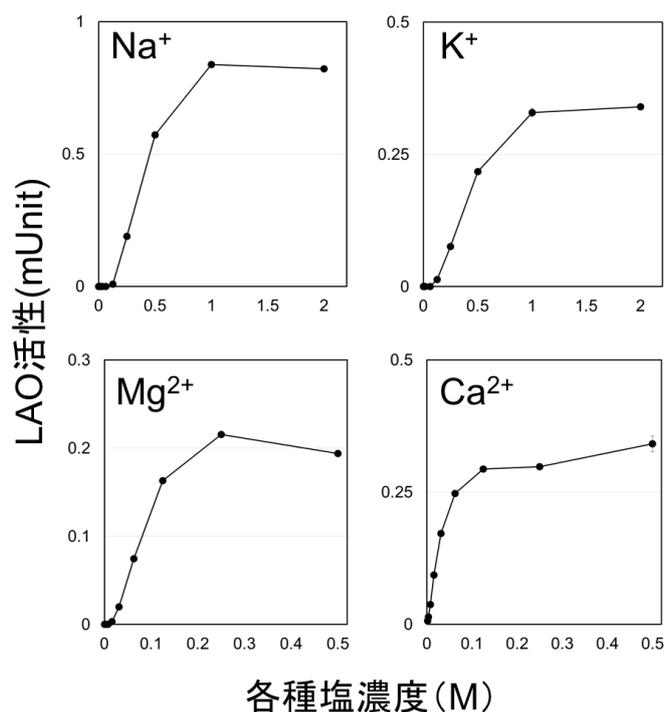


図4 各種塩による LAO 活性化の様子

### (3) 血清 LAO 活性制御分子の探索

血清 LAO と結合している物質が存在するか確かめるために、血清 LAO を活性化した状態でゲルろ過 HPLC に供しその分子量の変化を調べた。活性化しない塩化ナトリウム濃度 (0.15M、図5、青線) で平衡化したゲルろ過 HPLC における LAO 活性ピーク時間から推定された分子量は 450kDa を示した。次に 1.0M 塩化ナトリウムで平衡化し同様に分析したところ (図5、黒線)、分子量に変化は見られなかった。

この結果から、キジハタ血清 LAO はタンパク質等の巨大分子による活性阻害を受けておらず、低分子量阻害物質により活性制御を受けているか、もしくは阻害剤によらず本体のみで活性制御を行っているかと推定された。低分子性物質の解離が活性化につながるならば、活性化処理した LAO をゲルろ過 HPLC に供すれば共存する低分子性物質はすべてゲルろ過担体の性質により分離される。その

ためここで得られた LAO は塩の添加にかかわらず常に活性化していると考えられるが、本研究ではこれは否定され、得られた活性化後にゲルろ過 HPLC で得られた LAO は塩濃度依存的に活性した。この結果から、当初予想とは異なりキジハタ血清 LAO は阻害物質ではなく、本体のみで活性制御を行っていることが推測された。

本研究の結果から、キジハタ血液には LAO が含まれ、これはイオン強度の変化により活性を制御していることが示された。またこの活性制御は可逆的なものであった。他魚種における LAO の活性制御は不可逆的なものであることが予想されているが (Kitani et al. 2010)、少なくともキジハタにおいては異なった。LAO を過酸化水素産生試薬と捉えた場合、キジハタ LAO に特徴的な可逆的 LAO 活性制御は任意のタイミングで過酸化水素の産生を行うことができる物質として応用が可能かもしれない。この現象を明らかとするためには不活性体と活性体について、その構造変化を詳しく調べる必要がある。このためには現在進行中のキジハタ LAO 全遺伝子配列の解析が急がれる。

魚類免疫学的な観点からは、LAO の活性が厳密に制御されているということは恒常性維持に都合よく、必要に応じて自己の負担を少なく侵入者を排除することができる。また LAO の活性化には海水中に含まれるイオンが関与しているが、実際に海水と LAO が創傷治癒過程においてどのように働いているか今後明らかとしていくべきである。

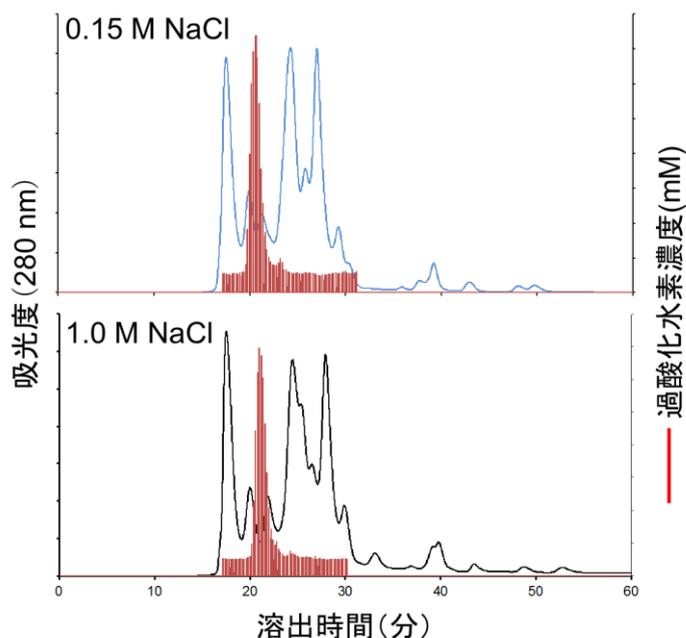


図5 塩化ナトリウムによる活性化と分子量の変化

#### <引用文献>

- ①Kitani, Y., Tsukamoto, C., Zhang, G., Nagai, H., Ishida, M., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., Nagashima, Y., 2007. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. FEBS J. 274, 125-136.
- ②Kitani, Y., Ishida, M., Ishizaki, S., Nagashima, Y., 2010. Discovery of serum L-amino acid oxidase in the rockfish *Sebastes schlegeli*: isolation and biochemical characterization. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 157, 351-356.
- ③野崎義行, 1992. 海水中の微量元素: 平均濃度と北太平洋における鉛直分布. 地球化学 26, 25-39.

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

1. 木谷洋一郎、町 敬介、キジハタ血清 L-アミノ酸オキシダーゼ:血清中の基質について、平成 31 年度日本水産学会春季大会、2019 年 3 月、東京
2. Yuto Osaka and Yoichiro Kitani, Alternation of immune related genes by lipopolysaccharide injection in red-spotted grouper, International Symposium of Institute of Nature and Environmental Technology Kanazawa University "Research Frontiers of Transboundary Pollution" 2019 年 1 月、石川(国際学会)
3. Yoichiro Kitani, L-amino acid oxidases: A new antibacterial protein family in fish, 8th INTERNATIONAL FISHERIES SYMPOSIUM 2018 "Sustainable Fisheries and Aquaculture for the Benefits of Mankind, 2018 年 11 月、タイ王国(国際学会)
4. Yuto Osaka and Yoichiro Kitani, Purification and characterization of the antibacterial L-amino acid oxidase from the serum of red-spotted grouper, 8th INTERNATIONAL FISHERIES SYMPOSIUM 2018 "Sustainable Fisheries and Aquaculture for the Benefits of Mankind, 2018 年 11 月、タイ王国(国際学会)
5. 小坂優斗・木谷洋一郎、キジハタ (*Epinephelus akaara*) 血清に含まれる L-アミノ酸オキシダーゼについて、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018 年 3 月、東京
6. Yuto Osaka and Yoichiro Kitani, Purification and Characterization of the Antibacterial L-Amino Acid Oxidase in the Red-Spotted Grouper Serum, The 3rd International Symposium to Promote Joint Usage/Research Center "International Collaboration Research Base for Reaction of Atmosphere-Marine-Ecosystem Caused by Aerosol" 2017 年 10 月、石川(国際学会)

## 6. 研究組織

特になし

以上