

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03042

研究課題名(和文) 魚類における新奇腸管キチンナノファイバー膜生体防御機構の学術的基盤整備

研究課題名(英文) A chitinous membrane as a defense system against microorganisms in the intestine of teleost species

研究代表者

渡邊 壮一 (Watanabe, Soichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20507884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では真骨魚類のキチン合成酵素が真にキチン合成能を有することを示した。また当該分子をコードする遺伝子がほぼすべての条鰭亜綱魚類で保存され、広範な条鰭亜綱魚類腸管内にキチン膜が実際に存在することを明らかにした。キチン膜の孔径は100 nm以下であり、腸管内キチン膜が細菌類に対する生体防御機構が条鰭亜綱魚類で普遍的に機能することが示唆された。加えてキチン合成酵素分子は腸管上皮細胞の頂端膜に局在することが示された。さらにキチン合成酵素の基質であるUDP-GlcNAcの腸管細胞内での生合成経路に関与する遺伝子についても絞りこんだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は魚類の腸管においてキチン膜による生体防御機構が普遍的に存在することを強く示唆するものであり、腸内細菌叢の動態等を理解する上で極めて重要な知見をもたらした。また、脊索動物門の生物が機能的なキチン合成酵素を持つことを明確に示した報告はこれまでになく、これまで無脊椎動物に限られると考えられてきた内因性キチンの役割を脊索動物門に対象を広げて検討することを求める成果であることから、その学術的意義は大きい。今後、魚類腸管内キチン膜による生体防御機構の詳細をさらに明らかにすることで、魚類養殖での疾病対策技術につなげることもできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that chitin synthase in teleost species can synthesize chitin, and homologues of chitin synthase are widely conserved among Actinopterygii. Also, we found the intestinal chitinous membrane in various fish species. The pore size of chitinous membrane in the fish intestine is around 100 nm, which is fine enough to function as a barrier against bacteria. These findings strongly suggest that the intestinal chitin-based defense system against bacteria is universal among ray-finned fishes. We also determined that the chitin synthase protein is localized at the apical brush-border membrane of the intestinal epithelial cells in teleost fish, and identified several genes involved in the synthesis pathway of UDP-GlcNAc, a substrate of chitin synthase, specifically expressed in the intestinal epithelia.

研究分野：魚類生理学

キーワード：魚類 生体防御 腸管 キチン

1. 研究開始当初の背景

消化管はほぼすべての動物において共通の器官であり、外部栄養を取込む窓口としての役割を担う。消化管内には栄養を外部から得るために取込んだ食物等が常に供給される。この時病原体等の有害なものも同時に消化管内に流入してしまうことも日常的に起こる。そのため消化管における生体防御機構は生命維持に不可欠な役割を果たす。

真骨魚を含む脊椎動物の消化管研究はこれまで哺乳類を中心に行われてきており、消化管の機能は脊椎動物全般で保存されていると考えられてきた。哺乳類での消化管内生体防御機構はゲル形成ムチンおよびそこに定着する腸内細菌叢がバリア機構を担い、腸上皮下に存在する多数の免疫担当細胞が第二段階目の生体防御を担うという基本機構により成立している。この機構が真骨魚でも保存されている前提で、脊椎動物のモデル生物として魚類を用いた研究も広く行われている。しかし真骨魚類では腸内細菌叢の組成が環境変化によって速やかに変化するなど哺乳類と異なる点も多く、真骨魚類特有の機構の存在も考えられていた。

我々の研究グループでは真骨魚腸管内にキチンナノファイバーで形成された微細メッシュ構造を持つ膜を見出し、無脊椎動物で知られる囲食膜による消化管生体防御機構との類似性から消化管内微生物に対する物理的障壁として機能することが強く示唆された。またキチン合成酵素遺伝子の塩基配列も同定し、その発現は少なくともティラピアでは腸上皮で極めて高くかつ特異的であり、腸管内で盛んに内因性キチンナノファイバーが形成されることが示唆された。キチン合成酵素遺伝子についてはニジマスとゼブラフィッシュで既に確認しており、少なくともティラピア特異的な機構ではないことが考えられた。

無脊椎動物の消化管にみられる囲食膜はキチンナノファイバーで構成される微細メッシュ構造を持つ膜であり、ここに各種タンパク質が結合し、生体防御機構を担う。マラリアは蚊が媒介するマラリア原虫によって起こる感染症であるがマラリア原虫はキチナーゼを分泌することでこの囲食膜を分解・突破して蚊に感染することが知られている。脊索動物のカタクウレイボヤで消化管内のキチンナノファイバー膜の形成を阻害すると抗生物質非存在下でホヤの生残率が著しく低下することも報告されている。つまり、キチンナノファイバー膜ベースの消化管内物理的生体防御機構は進化の過程で無脊椎動物から真骨魚まで保存されていることが考えられ、特定の魚種のみ存在する特殊な機構ではないことが示唆された。しかし無脊椎動物と異なり、真骨魚の消化管では顕著なゲル形成ムチンの存在も示されており、粘液層による生体防御機構の存在も考えられる。このようなことから「真骨魚類の腸管生体防御機構は無脊椎動物と脊椎動物の境界の性質を有するのではないのか？」と考え、哺乳類の知見をベースとした既報研究に対して疑問が生じた。しかし真骨魚類は2万種にもおよぶ非常に多様な分類群であり、食性や生息環境も多岐に亘る。このように真骨魚における腸管キチンナノファイバー膜による生体防御区機構の機能普遍性および魚種による特性の違いについては更なる検討が必要な状況であった。

2. 研究の目的

真骨魚腸管で発見された新奇キチンナノファイバー膜の役割および形成メカニズム等を主に生体防御機構の観点から明らかにするとともに、その普遍性を検証し、新たな真骨魚の腸管生体防御機構についてその学術的基盤を整備することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種条鰭亜綱魚類腸管でのキチン膜の探索

真骨魚類におけるキチン膜の存在普遍性を確認するため各種条鰭亜綱魚類の腸管および幽門垂について内容物が存在した状態で固定後、切片を作成し、蛍光標識キチン結合プローブを用いてキチン膜の探索をおこない、その存在普遍性を検証した。併せて腸管上皮上の粘液層についても検討した。魚種としては条鰭亜綱からチョウザメ、ニジマス、ニホンウナギ、キンギョ、ブリ、マダイ、ヒラメを選定し、分類学的に広範な解析を実施した。併せてキチン合成酵素遺伝子について脊索動物門のゲノムデータベースで探索し、遺伝子の観点からも存在普遍性を確認した。

(2) キチン膜の微細形態観察・結合タンパクの同定

キチン膜の基本構造はモザンビークティラピアで報告されていたが、部位ごとの構造の差異などは不明であった。キチン膜による生体防御にはその構造の緻密さこそが重要であり、キチン膜が確認されたとしても痕跡的なキチン膜形成機構によるもので生体防御機構としての機能性を発揮するためには不十分である可能性も考えられた。本研究ではキチン膜が確認された魚種より膜を単離し、走査型電子顕微鏡を用いてその微細構造を観察した。加えてキチン膜に結合するタンパク質をキチン結合能を指標として探索した。また生体を用いた検討として、キチン結合タンパク質のキチンへの結合を阻害することが報告されている化合物を添加した飼料を用いた飼育試験も実施し、キチン膜の形成に及ぼす影響を検討した。

(3) キチン生合成関連酵素群の同定

キチンはグルコース等の単糖から生合成される。しかし真骨魚類の胃ではキチン分解活性が見られ、分解産物である N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)をキチン生合成の基質として用いる

とエネルギー源として重要な他の単糖を使用せずキチン膜形成が可能となる。またキチン生合成最終基質 UDP-GlcNAc は糖鎖修飾の重要な基質であり関連酵素自体は存在することが考えられるが、キチン合成に特化した遺伝子が存在するかについては不明である。本研究ではまずキチン生合成系としてヘキソサミン合成経路に着目し、これに関連する酵素群候補配列を *in silico* クローニングを主軸として探索した。探索後、組織別発現と *in situ* hybridization で腸上皮に高発現する遺伝子を同定した。また見出されたキチン生合成関連酵素候補遺伝子の発現について絶食への応答や発達段階における変化を解析した。

(4) 真骨魚キチン合成酵素のキチン合成能の検討と腸管内局在の解明

無脊椎動物のキチン合成酵素遺伝子との相同性から真骨魚のキチン合成酵素遺伝子はすでに報告されており、腸管特異的に発現することが示されている。しかしそのアミノ酸配列の相同性は最大で 40% 程度であり、真にキチン合成酵素であるのかどうか、つまり、キチン合成能の検討が必須である。またこれまでのキチン合成酵素の機能性解析は無脊椎動物や細菌における遺伝子改変や細胞膜で形成した小胞を用いた実験で示されたものであり、脊椎動物での機能解析系は存在しない。本研究ではキチン合成能を持たない哺乳類培養細胞を用いた機能解析系を新たに構築し、真骨魚キチン合成酵素遺伝子のキチン合成能を直接検討した。また、真骨魚のキチン合成酵素の対する既知のキチン合成酵素阻害剤の阻害活性についても解析し、飼育試験への使用可能性を検証した。また、キチン合成酵素分子の腸管内局在はキチン膜形成機構を解明する上で重要な情報であることから、特異的抗体を作製し、腸上皮における細胞内局在を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 各種真骨魚類腸管でのキチン膜の探索

条鰭亜綱における消化管内キチン膜の存在普遍性をキチン結合プローブによる検出により検討したところ、今回用いたすべての魚種の腸管内にキチン膜の存在が確認された。また幽門垂を有する魚種では、幽門垂においてもキチン膜が存在した。この際、既報で用いた樹脂包埋法では検出感度が低いことが確認されたため、本研究では新たにハイドロゲル包埋法を確立し、その存在を高感度に検出することが可能となった。粘液層の存在を粘液構成ムチンに含まれる糖鎖に特異的なプローブを用いることで確認したところ、腸管上皮上には薄い粘液層が存在した。これは哺乳類の大腸で見られる肥厚した粘液層と異なるものであることが考えられ、腸内細菌叢のニッチとして機能することは難しいことが推察されたが、固定・検出段階におけるアーティファクトである可能性も考えられるため、今後のさらなる検討が必要である。また脊索動物門に属する生物種のゲノムデータベースを用いて、既報のティラピアキチン合成酵素遺伝子と類似する遺伝子の網羅的探索をおこなった結果、ほぼすべての条鰭亜綱で高度に保存されていることが明らかとなった(図 1)。円口類、シーラカンスや板鰓類ではその存在が確認されなかった。既報では円口類に含まれるヌタウナギにおいてもキチン膜の存在が確認されているが、今回の探索では類似遺伝子の存在は確認できなかった。このことはゲノムデータベースの情報の不備によるものであることが考えられ、今回類似遺伝子の存在が確認されなかった生物種においても探索を継続することでその存在が見出される可能性を秘めている。

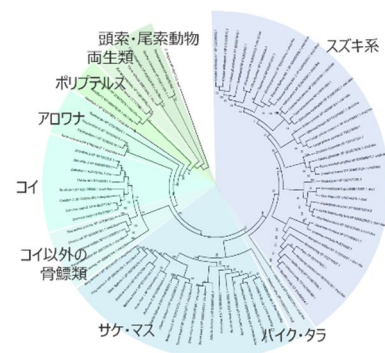


図 1. 脊索動物門におけるティラピアキチン合成酵素候補遺伝子類似遺伝子の分子系統樹

(2) キチン膜の微細形態観察・結合タンパクの同定

モザンブークティラピアの腸管各部位におけるキチン膜について走査型電子顕微鏡を用いて形態学的解析をおこなったところ、腸管各部位でキチン膜は孔径 100 nm 程度のメッシュ構造を持つことが明らかとなった。これは一般に滅菌に用いられるフィルターの孔径である 200 nm よりも小さいものであり、生体防御機構として機能するために十分な形態的特徴を有しているといえる。加えて、腸を内容物を含んだ状態で切断した試料を観察したところ内容物側に多くの微生物が観察された。これらの微生物は腸上皮側に面した膜表面には確認されず、キチン膜が腸管内で微生物に対する生体防御機構として機能することが示された(図 2)。また腸の後部になるにつれて、キチン膜が多層構造をとることも見出された。次に単離したキチン膜に結合しているタンパク質の抽出を実施したが、現段階ではキチン膜の形成や形態維持に関与する結合タンパク質の存在は確認できなかった。キチン結合タンパク質のキチンへの結合を阻害する物質を餌に添加した飼育試験においても膜状構造物は確認された。当該阻害剤はキチン結合プローブの結合も阻害するため、確認された構造物がキチンで構成されているのかについては更なる検討を要するが、モザンブークティラピアの腸管内キチン膜の形成への結合タンパク質の寄与は大きくないことが考えられた。

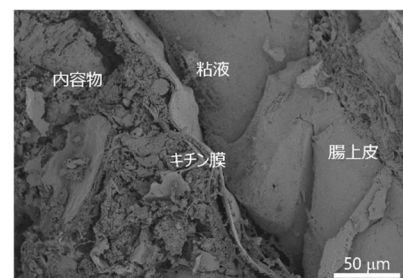


図 2. 腸を内容物を含んだ状態で切断した試料の走査型電子顕微鏡像

(3) キチン生合成関連酵素群の同定

キチン合成酵素の基質として UDP-GlcNAc が知られており、細菌から無脊椎動物まで広い生物

種で保存されている。脊索動物門でのキチン合成においても同様の仕組みが存在することが強く考えられ、その合成経路に關与する遺伝子をヘキソサミン合成経路に着目して探索した。in silico クローニングの結果絞り込まれた 14 種の遺伝子について組織別発現解析をおこなった結果、腸管で特異的に発現する酵素遺伝子を複数見出した。特に、GlcNAc-6-P 以降の一連のプロセスに關与する酵素をコードする遺伝子について腸管特異的な発現を示すものが見出され、その発現パターンはキチン合成酵素候補遺伝子のものと極めて類似していた。加えて摂餌物に含まれるキチン由来の単糖 GlcNAc をキチン生合成に利用する経路の存在も示唆する遺伝子も見出された。またこれらの遺伝子はキチン合成酵素候補遺伝子と同様に、すべて腸管上皮細胞に発現しており、粘液細胞での顕著な発現は確認できなかった。遺伝子の絶食への応答をキチン合成酵素候補遺伝子と併せ検討したところ、すべて同様の変動を示し、これらがキチン合成経路を担う酵素群をコードする遺伝子群であることが強く示唆された。これらの結果からキチン生合成経路は粘液多糖やタンパク質糖修飾のためのヘキソサミン合成経路から相当程度独立した系であることが示唆された。また真骨魚の発達過程におけるキチン合成関連遺伝子群の発現変動を解析した結果、摂餌開始直前の時期に発現が上昇することが示され、消化管内キチン合成能は摂餌に伴う外来物質の消化管内流入に備えた仕組みであることが強く示唆された。このことは当該機構が消化管内生体防御機構として重要であることを支持する知見であるといえる。

(4) 真骨魚キチン合成酵素のキチン合成能の検討と阻害剤の探索

これまで真骨魚を含めて脊索動物門でのキチン合成酵素については配列の相同性のみによって同定されている。先述の通り、無脊椎動物のキチン合成酵素のアミノ酸配列との相同性は高くなく、真にキチン合成能を有しているのかどうかについては不明である。これを検証するため、哺乳類細胞を用いた機能解析系を構築した。その結果、モザンビークティラピアキチン合成酵素はキチン合成能を有することが示された。加えて、ティラピアキチン合成酵素は比較的高濃度の細胞内 UDP-GlcNAc を基質として要求することが強く示唆された。このことはキチン合成経路に特化したと考えられるヘキソサミン経路関連遺伝子が存在することを強く示唆した先の結果と一致するものであると考えられる。また、この機能解析系を用いて無脊椎動物で既知の阻害剤 Nikkomycin Z の作用について検討した結果、高濃度添加区のみでキチン合成が阻害された。Nikkomycin Z はキチン合成酵素の基質である UDP-GlcNAc とキチン合成酵素の結合を競合的に阻害するとされており、真骨魚キチン合成酵素の UDP-GlcNAc 結合部位の構造は無脊椎動物が有するものと異なることが示唆された。キチン合成酵素の細胞内局在を新たに作製した特異的抗体を用いた免疫組織化学により観察したところ、腸上皮細胞頂端膜に局在することが示された。このことから、真骨魚腸管内キチン膜は細胞内小胞中で合成されたキチンファイバーが分泌されて形成されるのではなく、頂端膜に局在するキチン合成酵素が腸管内に直接キチンを合成することで形成されることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡邊壮一
2. 発表標題 魚類消化管における新奇キチンメッシュ膜による生体防御機構
3. 学会等名 日本比較免疫学会第33回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊壮一、金子豊二
2. 発表標題 モザンビークティラピア腸管内のキチンナノファイバー膜に関する形態学的研究
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野文香、矢野大空、渡邊壮一
2. 発表標題 モザンビークティラピアにおけるキチン合成酵素候補分子Chs1の機能解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soichi Watanabe
2. 発表標題 Chitin is not only for invertebrates: Endogenous chitinous membrane in the fish intestine
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumika Kawano, Soichi Watanabe
2. 発表標題 Expression analysis of chitin synthesis-related genes in the intestine of Mozambique tilapia
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関