

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20880005  
 研究課題名（和文）  
 海産二枚貝のパターン認識レセプターによる異物識別と初期生体防御反応の解明  
 研究課題名（英文）  
 Pathogen recognition and initial immune responses related to pattern recognition receptors in marine bivalves mollusks  
 研究代表者  
 伊藤 直樹（ITO NAOKI）  
 東北大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：30502736

## 研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、海産軟体動物の二枚貝が病原体侵入を認識し、そして攻撃するメカニズムを検討した。その結果、二枚貝には無いが病原体には見受けられる分子を標的として認識・攻撃を行なうこと、その認識の担い手はタンパク質であること、さらに認識タンパク質は多岐に渡るため、複雑な病原体攻撃を可能としていることなどが分かった。また、認識と攻撃を素早く同時に行なうといった二枚貝に特有な因子の存在も推定される。

## 研究成果の概要（英文）：

This research project partially elucidated the mechanisms of pathogen recognitions and early immune responses against recognized pathogens in marine bivalves. Briefly, a marine bivalves, Pacific oyster, possesses various pathogen recognition receptor (PRR) proteins, and starts immune reactions after PRR recognize pathogens. Similar defense manners have been reported from other invertebrates, but some PRR proteins in Pacific oyster have highly characteristic structures. Based on these findings, it is considered that recognition and early immune response in marine bivalves may be similar but not identical to known mechanisms in other invertebrates such as arthropods.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：水圏動物生理学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：生体防御、パターン認識受容体、病原体関連分子パターン、ペプチドグリカン、 $\beta$ -グルカン、二枚貝、マガキ、自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫において、パターン認識受容体 (PRRs)による病原体認識・識別が初期生体防御反応で極めて重要であることが節足動物研究から明らかになってきた。PRRs は軟体動物二枚貝にも存在するが、これまでの研究結果から節足動物とは異なるメカニズムで生体防御に関与すると考えられる。というのも、二枚貝では血リンパ中の抗菌成分が少ないことや、病原体への曝露に対して明瞭な応答を示さないこと、顕著なメラニン化が見られないなど節足動物とは大きく異なる点が存在するからである。この考えを基に、全く未知の防御反応系が存在すると考え、本研究の着想へ至った。

## 2. 研究の目的

本研究ではマガキの PRRs のうちペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRPs) と  $\beta$  グルカン結合タンパク質 ( $\beta$ GBPs) を解析すること、及び関連する生体防御因子の解析を通して、二枚貝における病原体認識・識別機構の解明と、初期生体防御反応の理解を試みる。

## 3. 研究の方法

PGRP および  $\beta$ GBP 遺伝子をマガキから同定し、タンパク質の構造、遺伝子発現解析を行なう。その後、PGRP と  $\beta$ GBP タンパクの機能解析を行なうためにタンパク質をそれぞれのタンパク分子を得る必要があるが、マガキからの精製は困難である。そこで、PGRP については酵母 *Pichia pastoris*、 $\beta$ GBP については大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質を合成する。合成したタンパク質と、様々な微生物を用いて結合性、防御反応の誘起について検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) マガキより、2 種類の真菌細胞壁認識タンパク質 (Cg- $\beta$ GBP1、Cg- $\beta$ GBP2) と 5 種類の細菌細胞壁認識タンパク質 (CgPGRP-S1S、CgPGRP-S1L、CgPGRP-S2、CgPGRP-S3、CgPGRP-L) を同定した。これらの発現部位を確認後、異物 (真菌、及び細菌) 接種に対する遺伝子発現応答を調べたが、4 種類の PGRP と 2 種類の  $\beta$ GBP において、少なくとも接種後 72 時間以内には発現量の増減は見られなかった。しかし、血球で発現しリゾチーム様構造を持つ CgPGRP-L では、グラム陽性菌、陰性菌のどちらに対しても発現量が増加した。

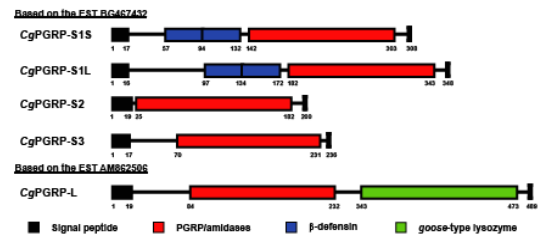


図 1: マガキから同定された PGRP の構造

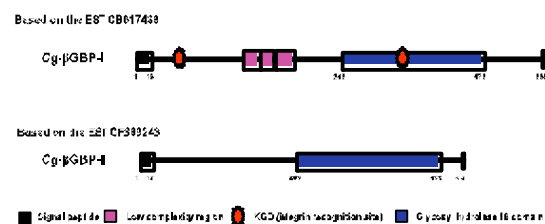


図 2: マガキから同定された  $\beta$ GBP の構造

(2) Cg- $\beta$ GBP1、2 の詳細な性質を調べるため、大腸菌発現系を用いて組換えタンパクを作成した。合成された組換え Cg- $\beta$ GBPs は、共に  $\beta$ グルカン結合性を示したが、glucanase 活性や抗微生物活性は認められなかった。一方、Cg- $\beta$ GBP2 はラミナリンを認識して血球

内の phenoloxidase 系を活性化するが、Cg-βGBP1 はこの性質を持たないことが分かった。

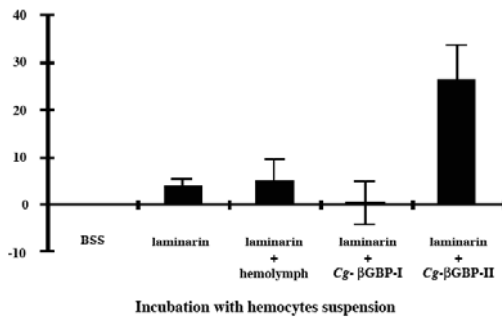


図 3: βGBP による PO 活性化への影響

(3) CgPGRP の生理機能を検討するために、CgPGRP-S1S をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* で発現させ、抗菌活性試験及びペプチドグリカン(PGN)結合性試験に供した。CgPGRP-s1s にはβ-defensin 様ドメインが存在するため抗菌活性が期待されたが、使用した 4 種類の供試菌に対する成育阻害作用は認められなかった。精製ペプチドグリカン(PGN)を用いた結合性試験では、CgPGRP-S1S は DAP、及び Lys の両 PGN タイプに対して結合性を示したが、生菌に対する結合性は認められなかった。以上のことから、CgPGRP-S1S は抗菌タンパク質である脊椎動物型 PGRP ではなく、無脊椎動物型の PGN 認識担当タンパク質であることが分かった。また、生菌細胞壁を直接認識するのではなく、構造的に変性した細胞壁を認識すること、つまり認識時に協働成分が存在することが想定された。

以上の結果より、二枚貝は節足動物同様の異物認識システムをもつが、認識タンパク質分子の構造や認識対象には違いがあることを明らかにした。従って、二枚貝は未知で特有の異物認識と初期生体防御機構をもつこ

とが考えられる。

## 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 Itoh N, Okada Y, Takahashi KG, Osada M. Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fish and Shellfish Immunology. 査読有、印刷中、2010

② Itoh N, Kamitaka R, Takahashi KG, Osada M. Identification and characterization of multiple β-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Developmental and Comparative Immunology. 査読有、34、2010、445-454.

③ Itoh N, Takahashi KG. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Molecular Immunology. 査読有、46、2009、1768-1774

④ Itoh N, Takahashi KG. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 査読有、150、2008、409-417.

[学会発表] (計 3 件)

① 長崎稔拓・伊藤直樹・高橋計介・尾定誠. 組み換え体を用いたマガキ細菌認識タンパク質PGRP-s1sの機能解析、平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 28 日、

神奈川県藤沢市

②Itoh N, Kamitaka R, Takahashi KG, Osada

M、 $\beta$ -glucan recognition proteins and their functions in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 11th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology、2009年7月2日、Prague, Czech

③Itoh N, Takahashi KG. Identification and

tissue expressions of peptidoglycan recognition proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.. Fifth World Fisheries Congress. 2008年10月23日、神奈川県横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 直樹 (ITOH NAOKI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30502736