

機関番号：3 2 6 0 7

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 8 0 1 8 2

研究課題名 (和文) 魚類体表防御因子のプロテオーム解析

研究課題名 (英文) Proteomic analysis of defense factors on fish skin surface

研究代表者

筒井 繁行 (TSUTSUI SHIGEYUKI)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：2 0 4 0 6 9 1 1

研究成果の概要 (和文): 魚類の皮膚の防御機構についての理解を深めるため、全ゲノム配列が解読されている唯一の水産重要魚種であるトラフグ (*Takufugu rubripes*) を供試魚とし、皮膚粘液中に恒常的に分泌されているタンパク質の構造を網羅的に解析した。調べた 10 数個のスポットのうち、4 つについて部分配列を得ることができたが、明確な防御因子の検出には至らなかった。さらにトラフグへの感染能の異なる 2 種類の魚病細菌を用いて浸漬処理を行い、トラフグ皮膚において発現量が増加するタンパク質の有無を調べた。非感染性の *Aeromonus salmonicida* 浸漬群とコントロール群の間に顕著な相違は認められなかったものの、トラフグに感染しうる *Edwardsiella tarda* を用いた群では、15kDa、44kDa および 75kDa のスポットの発現量が増加していた。これらの結果は、トラフグが、自己への感染能の有無に応じて、細菌に対する皮膚での防御機構を制御している可能性を示唆している。しかしながらこれらのタンパク質の同定には至らず、今後の課題として残った。

研究成果の概要 (英文): Fish skin is one of the important defense organ. For further understanding of fish skin defense mechanism, proteomic analysis of skin mucus of fugu, a model fish species whose genome sequence data has been made publicly available. Among analyzed more than 10 proteins, internal amino acid sequences of 4 proteins were obtained, although they did not appear defense molecules. Furthermore, fugu were immersed with either *Aeromonus salmonicida* or *Edwardsiella tarda* and pattern of protein spots were compared with control fugu. As a result, *A. salmonicida*, non-pathogenic bacterium for fugu, did not affect the pattern. On the other hand, expressions of three proteins with molecular masses of 15, 44 and 75 kDa were induced when fugu were stimulated with *E. tarda* that can infect to fugu. These findings suggest that fugu can alter the defense mechanism in accordance with bacterial species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 9 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2 0 1 0 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：魚類免疫学

科研費の分科・細目：水産学・水産一般

キーワード：体表・体表粘液・生体防御

1. 研究開始当初の背景

近年の魚類増養殖の急速な発展に伴い、魚病の発生およびその被害の拡大が深刻な問題となっている。その対策としての薬物使用に批判が高まる中、動物自身が病気から身を守る仕組み、すなわち免疫系を理解し、その力を最大限に引き出す方法の開発が急務である。陸棲動物の場合、外部環境に直接接する皮膚は角質化されており、病原生物の侵入に対する物理的な防御壁として機能している。そのため皮膚を経路とした感染は稀であり、感染のほとんどが、消化管や肺といった粘膜組織で生じる。これら粘膜組織には、全身免疫系とは独立した防御システム、いわゆる粘膜免疫系が存在しており、近年、大きな注目を集めている。一方、水中に生息する魚類の場合はどうか？水という様々な病原生物の生存や伝播に適している媒体に常に接しているにもかかわらず、彼らの皮膚はケラチンに乏しく、脆弱である。そのため魚類は、哺乳類の消化管や肺と同様に、皮膚を粘液で覆うことで防御にあたっている。

魚類の皮膚粘液中には抗体や補体、レクチン、抗菌ペプチドなどといった様々な防御因子が存在している。こうした因子は独立して機能しているのではなく、互いに協調して効率よく防御にあたっているものと考えられるが、これまでの研究は個々の防御因子に注目したものがほとんどであり、異物侵入時の防御因子の挙動について、タンパク質レベルでの包括的な研究は皆無であった。

2. 研究の目的

筆者はこれまで、魚類の皮膚における防御機構に着目し、感染成立時に発現量が変化する遺伝子に関するトランスクリプトーム解析を進めてきた。本研究では生体機能分子であるタンパク質に焦点をあて、魚類皮膚粘液中に恒常的に分泌されるタンパク質のプロテオーム解析を行い、これまで粘液からは見出されていなかった防御因子の検索を試みた。さらに異なる細菌侵入時に魚類の皮膚に

おいて量的変動を示すタンパク質を網羅的に解析することで、新規防御因子の同定を目指すとともに、魚類体表の防御機構を総合的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

トラフグ *Takifugu rubripes* は水産重要種であるばかりでなく、ヒトの約 1/8 という非常にコンパクトなゲノムサイズながらヒトと同等の遺伝子数を有すると考えられていることから、2001年に全ゲノム配列が解読され、その情報がデータベース上に公開されているモデル生物である。本研究ではこのトラフグを供試魚とし、以下の実験を行った。

1) トラフグ皮膚粘液のプロテオーム解析

トラフグ体表粘液抽出液を脱塩処理した後、二次元電気泳動に供し、PVDF膜にプロットした。膜をCBB溶液またはポンソーS溶液で染色した後、プロテインシーケンサーに供し、N末端アミノ酸配列を決定した。得られた配列をプローブとしてトラフグゲノムデータベースを検索し、全アミノ酸配列を類推した。

2) 病原細菌浸漬処理により発現量が増加するトラフグ皮膚タンパク質の同定

トラフグを3個体ずつ2群に分け、10の水槽にて飼育した。一方の水槽に、トラフグへの感染能を有する *E. tarda* ホルマリン死菌を、他方の水槽にトラフグへの感染報告のない *A. salmonicida* ホルマリン死菌を、終濃度 10 µg/ml となるように添加し、1時間浸漬処理した。トラフグを別の水槽に移し、24時間静置した後、皮膚を採取し、抽出液を得た。なお、コントロールとして、未処理のトラフグ3個体から同様に皮膚抽出液を得た。

これらの抽出液を脱塩処理後、二次元電気泳動に供し、各群間でのスポットパターンを比較した。さらに浸漬処理によって発現量が増加したスポットをプロテインシーケンサーに供し、N末端アミノ酸配列の解読を試み

た。

4. 研究成果

1) 二次元電気泳動で得られた 10 数個のスポットについてプロテインシーケンシングを行ったところ、表 1 に示す 4 つのアミノ酸配列を得た。他のタンパク質については N 末端が修飾されているものと考えられた。

表 1. シーケンシングによって得られた配列

Spot1: AspAlaProLeuAsnAspIleIleAspProVal IleGlnValVal
Spot2: SerGlyIlePhePheAlaIleAspAlaThrGlu ArgPheLysAsn
Spot3: PheGlyGlyGlyAlaGluProGlnProAsp
Spot4: GlnThrLeuValProProIleAlaPheAsnPro AlaAspLeuGly

これらのアミノ酸配列に類似する配列をトラフグゲノムデータベースから検索した結果、Spot1 はケラチンと同一性を示した。ニジマス体表粘液中において、ケラチンの分解産物が抗菌物質として機能していることが報告されていることから、トラフグにおいても、Spot1 が防御因子として機能していることが示唆された。Spot2,3 は Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase および Iduronate 2-sulfatase と同一性を示したが、これらの分子が免疫系へ関与しているという報告はなく、防御因子としての期待は薄い。Spot4 は scaffold 303 上の hypothetical protein に対する同一性を示したが、同定には至らなかった。

2) *E. tarda*, *A. salmonicida* 浸漬群およびコントロール群のトラフグ皮膚抽出液を二次元電気泳動に供し、スポットパターンを比較した。その結果、*A. salmonicida* 浸漬群とコントロール群の間に顕著な相違は認められなかったものの、興味深いことに、トラフグに感染する *E. tarda* を用いた群では、15kDa、44kDa および 75kDa のスポットの発現

量が増加していた(図 1)。これらの結果は、トラフグが、自己への感染能の有無に応じて、細菌に対する皮膚での防御機構を制御している可能性を示唆している。また、*E. tarda* 浸漬処理群に共通して認められた発現量が増加する三種類のタンパク質について、スポットを切り出し、N 末端アミノ酸配列解析を行ったが、いずれも解読することができなかった。従って、これらのタンパク質が、N 末端修飾を受けていることが予想された。

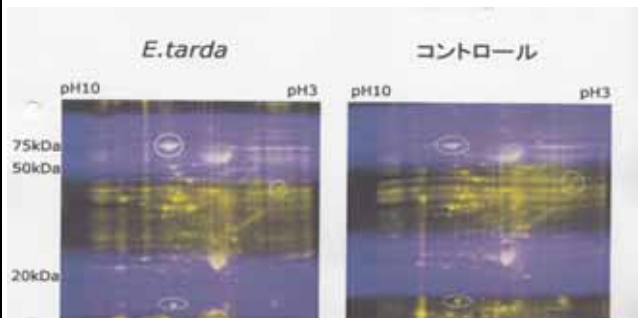


図 1. *E. tarda* 浸漬処理個体(左)および未処理個体の皮膚抽出液の二次元電気泳動像。丸で囲まれた部分は前者において発現量が増加しているタンパク質を示す。写真は 3 個体のうちの代表的なものを掲載した。

以上、本研究により、トラフグ体表粘液中に存在するいくつかのタンパク質について、構造的知見を得ることができた。しかし多くのタンパク質が N 末端の修飾を受けており、N 末端アミノ酸配列の解読には至らなかった。特に *E. tarda* 浸漬処理により発現誘導されたタンパク質については防御因子である可能性が高く、これらのタンパク質の構造については今後の課題として残された。

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)

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

筒井 繁行 (TSUTSUI SHIGEYUKI)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：20406911

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし