

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05770

研究課題名(和文) 魚類L-アミノ酸オキシダーゼの免疫調節機能：ROSシグナリング起点としての役割

研究課題名(英文) Immune regulatory potentials of fish L-amino acid oxidase

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・准教授

研究者番号：70565340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御因子の一つL-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)の遺伝子を持つにも関わらずLAO活性が検出されない魚種は多い。このような魚種としてゼブラフィッシュを選定し、健康な状態のLAO活性の検出を試みた。クマリン-フェントン反応を利用した高感度LAO活性測定法を開発したがゼブラフィッシュ各組織からLAO活性は検出されなかった。またLAO遺伝子発現も低いレベルにとどまった。一方、ゼブラフィッシュ腹腔内にポリICを投与したところ、遺伝子発現は肝臓において100倍程度増加した。ゼブラフィッシュにおいてLAOは通常発現が抑制されており、ウイルス感染により機能する分子であることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

普遍的に存在する生体内のアミノ酸を基質として、様々な生物活性を示す過酸化水素を産生するL-アミノ酸オキシダーゼが生体内における諸現象の起点になりうるか議論することで現在までに未解明の疾患等メカニズムを解決する糸口になる。本課題ではゼブラフィッシュが持つLAOは通常は発現が抑制されており、ウイルス感染により発現が惹起されることを明らかとした。魚類LAOは抗菌タンパク質としての研究が進められてきたが、新たに抗ウイルスタンパク質としての機能が示唆された。この成果は新興感染症メカニズムの理解や新規創薬ターゲットとしてLAOを選択するヒントとなる。

研究成果の概要(英文)：L-amino acid oxidase (LAO) activity is not general among fish species despite its gene coded in wide variety species of fishes. In this study, we select zebrafish as a test fish species that does not show LAO activity, also the genome coding LAO gene. First, we try to detect the LAO activity using high-sensitive method based on coumarin-Fenton reaction. However, the healthy zebrafish did not show the activity in any tissues. Also, the LAO gene expression level was very low in the same condition. Second, we try to induce the LAO gene expression level by the IP injection of polyIC, and zebrafish liver showed that 100 times upregulation of the LAO gene. From the above, zebrafish LAO gene is normally suppressed, and it could fight with virus when the fish infected.

研究分野：水産化学

キーワード：L-アミノ酸オキシダーゼ ゼブラフィッシュ ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

報告者らは魚類の自然免疫物質として L-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) を同定し、これが一部の魚類において体表粘液や血液中に存在することを明らかとした[1-4]。体表粘液や血液中に存在する LAO は魚体内に存在する遊離アミノ酸を基質として過酸化水素を産生し、これにより細菌の増殖を抑制することが明らかとなっている。この LAO 遺伝子は細菌類から哺乳類まで広範に保存されており、約 100 魚種から LAO 様遺伝子配列が特定されている。一方、LAO 酵素活性 (L-アミノ酸を基質とした過酸化水素産生能) が確認されている魚種は非常に少なく、魚類では LAO 遺伝子が存在しても LAO タンパク質ならびに LAO 活性の発現に著しい量的もしくは質的差異があると考えられる。さらに、LAO 酵素活性は検出されないものの、魚病菌の曝露により LAO 遺伝子の発現量が増加することも明らかとなっている[5]。我々は、LAO 遺伝子を発現しつつも LAO 活性を示さない魚種について、LAO は過酸化水素による細菌への直接的な攻撃のための物質ではなく、細胞内など局所的に極微量の過酸化水素を産生することで活性酸素種 (ROS) シグナル伝達に関与しているのではないかと予想した。

2. 研究の目的

本研究は細胞内 LAO は魚類の免疫系に寄与するか、予備実験で皮膚抽出物や血液中に LAO 活性が認められないゼブラフィッシュ *Danio rerio* における LAO を起点とした ROS シグナル経路の存在や LAO が与える免疫調節機構への影響について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 高感度 LAO 活性測定法の開発

本実験では、クマリンと二価の鉄イオンを用いたフェントン反応によって H₂O₂ から 7-ヒドロキシクマリン(7-HC)を生成した。フェントン反応とは二価の鉄イオンと H₂O₂ が反応することでヒドロキシラジカルを遊離する反応である。クマリンは非蛍光物質であるのに対し、7-HC は蛍光物質であり H₂O₂ 定量の指標とすることが出来る。はじめに 882 μM H₂O₂ 水溶液 100 μL と 20% TCA 100 μL を混合した。これに 4.0×10⁻⁴M のクマリン 300 μL と 1.25×10⁻²M の FeSO₄・7H₂O 溶液 10 μL を加えて 10 分間静置し、HPLC で 7-ヒドロキシクマリンを定量した。HPLC 条件は下表のとおり設定した。

表1 7-ヒドロキシクマリン検出の HPLC 条件

カラム	TSKgel ODS-120T (4.6×150 mm) (TOSOH)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	30 °C
励起波長	330 nm
蛍光波長	450 nm
移動相 A	1%酢酸
移動相 B	1.67%酢酸 : メタノール=60 : 40

次に、予備実験の結果恒常的に LAO 遺伝子を発現していたゼブラフィッシュの鰓から組織抽出液を調製し、その LAO 活性を HPLC 法で測定した。ゼブラフィッシュ鰓を解剖後トリス緩衝生理食塩水とともに破碎し、これを組織抽出液とした。ゼブラフィッシュ LAO の基質アミノ酸は不明であるため、塩基性アミノ酸群(H, K, R, すべて一文字表記, 以下同様)、酸性アミノ酸群(D, E)、疎水性アミノ酸群(A, I, L, M, V)、芳香族アミノ酸(F, W, Y)、その他のアミノ酸群(C, G, N, P, Q, S, T)に分け基質として使用した。鰓組織抽出液 12.5 μL に基質 2.5 μL、LAO buffer 25 μL、5M 塩化ナトリウム溶液 10 μL を混合し 37°C で 1~2.5 時間インキュベートした。これに等量の 20%トリクロロ酢酸を加え、18,000g 4°C で 20 分遠心した。上清 80 μL を回収し 4.0×10⁻⁴M のクマリン 120 μL を加えたのち 1.25×10⁻²M 硫化鉄七水和物 4 μL 加えて 10 分静置しフェントン反応を起こした。反応後 200 μL 回収し HPLC で測定した。また、コントロールとして基質の代わりに 100mM の塩化水素溶液と 5M の塩化ナトリウム溶液を 1:4 で混合したスタンダード溶液を等量加えた。

(2) LAO タンパク質検出法の開発

ゼブラフィッシュの各組織(皮膚・鰓・腎臓・肝臓・脾臓・腸・筋肉)と血漿を試料としてウェスタンブロット法により LAO タンパク質の組織間分布を調べた。各組織抽出液と血清 25 μL に 2×SDS 25 μL をそれぞれ加えて 95°C 5 分間加熱した。加熱後ポリアクリルアミドゲルに 5 μL ずつ注入し 45 分間泳動した。これをメタノール置換し 1×EzFastBrot(ATTO, 東京)で浸透した PVDF 膜に転写した。5%スキムミルクを含むトリス塩酸緩衝液 (TBS, pH 7.4) でブロッキングを行い、一次抗体と二次抗体を反応させた。一次抗体には抗ゼブラフィッシュ LAO 特異的カスタム抗体を、二次抗体には一次抗体に特異的な、ペルオキシダ

一ゼ標識二次抗体を用いた。二次抗体はジアミノベンチジンと過酸化水素を用いて可視化した。またポジティブコントロールとして当研究室で作製したリコンビナントゼブラフィッシュ LAO(rZf-LAO)を同時に泳動した。

(3) LAO 遺伝子ノックアウト魚の作出

ゼブラフィッシュ LAO 遺伝子配列をもとにガイド RNA を設計し CRISPR/Cas9 システムにより L 当該遺伝子のノックアウトを試みた。各世代で T7 エンドヌクレアーゼ法により上記システムによる変異を検出し、変異が見られた個体を F3 世代まで交配させた。その後、変異後の配列を解析し野生型の配列と比較した。

(4) LAO 誘導条件の検討

グラム陰性魚病細菌として知られる *Edwardsiella tarda* NBRC 105688 を 10^5 CFU/mL の濃度で含むように添加した飼育水でゼブラフィッシュ成魚を一週間飼育し、その後各組織を解剖してゼブラフィッシュ LAO 遺伝子の発現量を定量 PCR で測定した。次に、ゼブラフィッシュ腹腔内にポリイノシン酸：ポリシチジル酸 (poly(I:C)) もしくはリポポリサッカライド (LPS) 100 μ g (10 μ L) を腹腔内投与し、3, 6, 12, 24, 48 時間経過した際の当該遺伝子転写量を同様に測定した。

4. 研究成果

(1) 高感度 LAO 活性測定法について

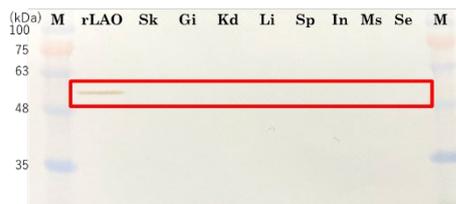
本課題で開発したクマリン-フェントン反応系を原理とした HPLC による高感度 LAO 活性測定では、過酸化水素濃度 0, 3.2, 9.8, 29.4 および 88.2 μ M の間で高い相関性を示した。これは従来法である OPD-POD 法の範囲である 0, 62.5, 125, 250, 500 および 1000 μ M と比較しより低い濃度で定量が可能であることが確かめられた。キジハタ血清を試料として従来法である OPD-POD 法と比較したところ、300 倍希釈のキジハタ血清が生じた 69.4 μ M の過酸化水素を検出し、これより大きい希釈倍率において過酸化水素を検出できなかった。これに対し、HPLC 法では、3,000 倍希釈したキジハタ血清が生じた 0.51 μ M の過酸化水素の検出に成功し、過酸化水素量基準で 100 倍以上高感度であることがわかった。一方、各種アミノ酸混合液とゼブラフィッシュ 鰓抽出液を混合したものを本法を用いて過酸化水素量を測定したところ、いずれの基質アミノ酸とも LAO 由来と思われる過酸化水素は検出されなかった。

(2) LAO タンパク質の検出

予備実験の結果、健康なゼブラフィッシュ成魚の皮膚、鰓、肝臓、腸 LAO 遺伝子を発現していた。しかし、ゼブラフィッシュ LAO に特異的なカスタム抗体を用いたウエスタンブロットでは、野生型ゼブラフィッシュ LAO と同一のアミノ酸配列を持つリコンビナントゼブラフィッシュ LAO に対して陽性反応が見られたものも、各組織抽出液からは LAO タンパク質特異的なバンドは検出できなかった (図 1)。

図 1 ゼブラフィッシュ LAO 抗原交差タンパク質の組織間分布

M; マーカー, rLAO; リコンビナント, Zf-LAO, Sk; 皮膚, Gi; 鰓, Kd; 腎臓, Li; 肝臓, Sp; 脾臓, In; 腸, Ms; 筋肉, Se; 血清



(3) LAO ノックアウトゼブラフィッシュについて

本申請課題では最終的に F3 世代の LAO 変異型ゼブラフィッシュを作出した。しかしながら当該系統の変異導入位置を含むゲノム DNA 配列を解析したところ、3 塩基欠失が認められたがこれは 1 アミノ酸残基が短縮された LAO をコードすることが明らかとなり、LAO の酵素活性が失われているか確認ができなかった。この結果は LAO 遺伝子がノックアウトされた個体が発生初期に死滅し、かつ LAO の機能を維持した変異を持つ個体のみが生残した可能性を否定できない。LAO 遺伝子がゼブラフィッシュの発生に影響を与えることを示唆するため、LAO が魚類の初期発生にどのようにかわるか検討する予定である。

(4) LAO 遺伝子の誘導

E. tarda 曝露による LAO 遺伝子発現量に変化は見られなかった。一方、ゼブラフィッシュ腹腔内に poly(I:C) を投与したとき、LAO 遺伝子の転写量は対照群と比較して肝臓で 113 倍と顕著に増加したほか、腸、鰓、皮膚でもそれぞれ 70 倍、26 倍、14 倍と有意に増加した (図 2)。また、肝臓での転写量増加のピークは 6~12 時間であった (図 3)。これに対して LPS 腹腔内投与時の LAO 遺伝子転写量は各組織で対照群の約 2 倍に増加したが有意差は見られなかった。Poly(I:C) の腹腔内投与が体表の組織における LAO 発現にも影響を及ぼしていることから、何かしらの免疫誘導経路が LAO 発現を制御していることが示唆された。

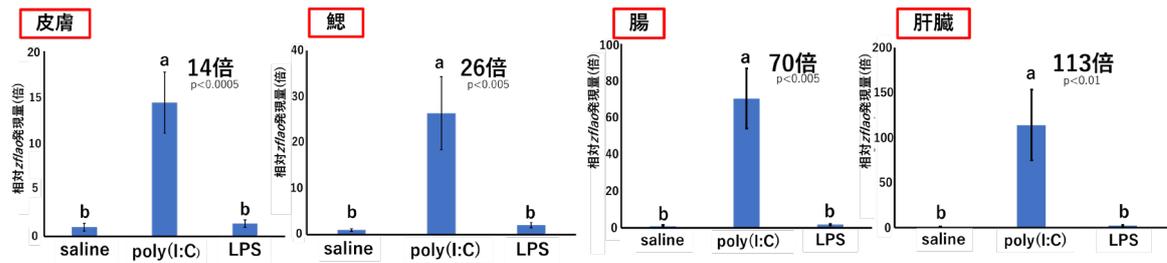


図2 各組織におけるゼブラフィッシュ LAO 遺伝子発現量の変化

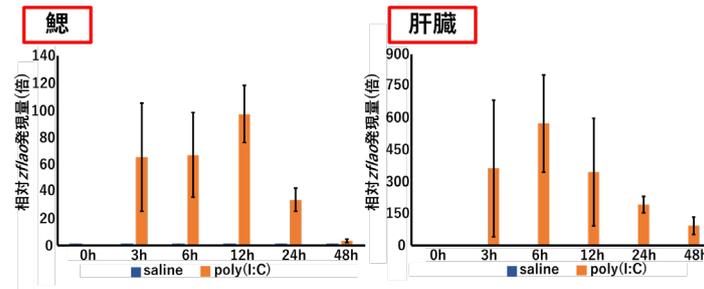


図3 鰓と肝臓における Poly(I:C)腹腔内投与によるゼブラフィッシュ LAO 遺伝子発現量の経時的変化

加えて、Poly (I : C) 腹腔内投与後 6 時間のゼブラフィッシュ肝臓を摘出し、LAO タンパク質の変化を比較するために前述の方法でウエスタンブロッティングを行った。しかしながら、抽出液および不溶性の抽出残渣の両者とも LAO タンパク質に特異的なバンドは見られなかった。

(5) まとめ

本研究では LAO が通常検出されない魚種における LAO の機能について、局所的に存在することで過酸化水素による外敵への直接的な攻撃以外にも何らかの役割、すなわち過酸化水素を介したシグナル伝達等への寄与を想像した。しかしながら健康なゼブラフィッシュにおける LAO の活性やタンパク質量は遺伝子発現が認められるにもかかわらず検出できないほど低いレベルであったことから、さらに高感度な検出法が必要であると思われる。

本課題により、poly(I:C)腹腔内投与が強く LAO 遺伝子発現を誘導したことから、ゼブラフィッシュにおいて LAO はウイルス感染に対抗するための手段として備えられていることが示唆された。本申請課題の次の段階として、魚類抗菌タンパク質としての LAO に加え、抗ウイルスタンパク質としての機能についても明らかとしていく予定である。

参考文献

1. Kitani Y, Tsukamoto C, Zhang G, et al (2007) Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. FEBS J 274:125–136. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05570.x>
2. Kitani Y, Ishida M, Ishizaki S, Nagashima Y (2010) Discovery of serum L-amino acid oxidase in the rockfish *Sebastes schlegeli*: Isolation and biochemical characterization. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 157:351–356. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.05.051>
3. Kitani Y, Nagashima Y (2020) L-Amino acid oxidase as a fish host-defense molecule. Fish Shellfish Immunol 106:685–690. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.028>
4. Osaka Y, Kitani Y (2021) Blood loss induces L-amino acid oxidase gene expression in the head kidney of the red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Dev Comp Immunol 114:103842. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103842>
5. Kitani Y, Hieu DQ, Kiron V (2019) Cloning of selected body surface antimicrobial peptide/protein genes of Atlantic salmon and their responses to *Aeromonas salmonicida*. Fisheries Science 85:847–858. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01331-1>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩間瑛人・木谷洋一郎
2. 発表標題 ゼブラフィッシュL-アミノ酸オキシダーゼの誘導
3. 学会等名 令和6年度公益社団法人日本水産学会春季大会，東京海洋大学，東京（2024.3.27-30）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩間瑛人・木谷洋一郎
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおけるL-アミノ酸オキシダーゼの役割について
3. 学会等名 第6回富山湾研究会（能登大会）
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
研究分担者	亀井 宏泰 (Kamei Hiroyasu) (00610362)	金沢大学・生命理工学系・准教授 (13301)	
研究分担者	長島 裕二 (Nagashima Yuji) (40180484)	新潟食料農業大学・食料産業学科・教授 (33114)	

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
---------	---------