

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580208

研究課題名（和文）マナマコ急性期応答タンパク質のプロテオーム解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of acute phase proteins of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*

研究代表者

中村 修 (NAKAMURA OSAMU)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：00306648

研究成果の概要（和文）：マナマコ体腔内の細胞（体腔球）が、微生物由来物質に対して産生または放出するタンパク質を調べた。体腔球を含む体腔液を等分し、一方に微生物由来物質、他方に緩衝液を加え、上清中のタンパク質を二次元電気泳動で比較した。その結果、調べた4種類の微生物由来物質（リボ多糖、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、ザイモサン）に対して、新たなタンパク質の出現や、増加などの反応が見られた。それらのタンパク質のいくつかについて同定を試みた結果、1つは既報のC-タイプレクチンと高い相同性を示した。また、1つはデータベースにない新奇のタンパク質であり、ウニの、生体防御への関与が示唆されるタンパク質と低い相同性を示した。

研究成果の概要（英文）：To investigate acute-phase response proteins in a sea cucumber *Apostichopus japonicus*, the coelomic fluids containing coelomocytes were obtained from several specimens and divided into tubes. Bacteria- or fungi-derived substances such as LPS and zymosan were added to those coelomic fluids. After incubation for 48h, the supernatant of coelomic fluids were subjected to 2-D electrophoresis and compared with that of controls which were received the buffer only. As a result, many spots that were not seen in the control were detected in the stimulated fluids. We obtained N-terminal amino acid sequences of several protein spots, and found some unidentified sequences as well as C-type lectins reported formerly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,200,000	660,000	2,860,000
23年度	700,000	210,000	910,000
24年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：マナマコ、体腔球、リボ多糖、リポテイコ酸、ペプチドグリカン、ザイモサン、プロテオーム解析、C-type レクチン

1. 研究開始当初の背景

動物の生体防御は、特異的で記憶を伴う適

応免疫（古典的な意味での「免疫」に相当する）と、特異性が低く、免疫記憶を形成しない自然免疫という二つのカテゴリーに分けることができる。適応免疫は脊椎動物にしか備わっていないが、自然免疫システムはあらゆる動物が持つ、基本的な防御システムである。

自然免疫はしかし決して原始的で単純なシステムではなく、多様な認識分子によって相手を見分け、反応している。また、適応免疫系に関わる因子は脊椎動物間でほぼ共通しているのに対し、自然免疫系の因子は多様であり、動物によって様々な違いがある。

自然免疫しか持たない無脊椎動物には、甲殻類や軟体動物を始め、水産的に重要な種も多く含まれる。しかしそれらの生体防御機能については不明な点が多く残されている。

棘皮動物は後口動物であり、進化的に脊索動物に近い位置にあることから、生体防御システムの進化を考える上で、興味深い対象である。また、ムラサキウニやマナマコなど、水産上重要な種を含んでおり、研究する価値は高い。

マナマコ *Apostichopus japonicus* は日本でも食用にされているが、とりわけ中国では干しマナコとして商品価値が高く、大規模な養殖も行われている。しかしその生体防御機能についてわかっていることは少ない。養殖場における感染症の発生も報告されていることから、マナマコの生体防御機能の解明は、比較免疫学的にも水産的にも重要である。

マナマコの生体防御についてわかっていることは少ないが、これまで体腔液などから数種類のレクチンが同定されており、生体防御に関与していると考えられている。また、体腔液中には数種類の体腔球が存在し、その中には異物に対して食作用を示す細胞もいることから、体腔球は生体防御上重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これらの細胞による微生物の認識および排除に関わる分子はまったく知られていない。

動物の細胞は、リポ多糖などの微生物特有の物質を Toll-like receptor などの受容体分子を介して認識し、反応することが知られている。一般に哺乳類は微量のリポ多糖に対して強い反応を起こすが、魚類ではそうではないなど、生物種によっても反応は異なる。マナマコ体腔球が微生物由来物質に対してどのような応答を示すかは不明である。

2. 研究の目的

上述の背景のもと、本研究では、マナマコ体腔球が細菌由来および真菌由来物質に反応して、産生、あるいは分泌するタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に解析し、発見することを目指した。in vitro で種々の細菌および真菌由来物質で刺激し、体腔液お

よび体腔球のタンパク質を二次元電気泳動によりプロテオーム解析する。変化の見られたタンパク質スポットを同定し、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

瀬戸内海の漁業者より購入したマナマコを、ガラス水槽内、人工海水、水温 13°C で飼育した。

(2) in vitro 刺激実験

各刺激実験について、マナマコ 3 個体を開腹し、クリーンベンチ内で体腔液を無菌的に採取した。

体腔球を含んだままの体腔液を等分し、一方に刺激物質、他方には緩衝液を加えた。刺激に用いたのは、*Escherichia coli* 由来リポ多糖 (LPS)、*Bacillus subtilis* 由来ペプチドグリカン、*Staphylococcus aureus* 由来リポテイコ酸、または *Saccharomyces cerevisiae* 由来ザイモサンの 4 種類である。13°C で 48 時間培養後、遠心分離して上清と体腔球を回収した。

培養後の細胞の生存率を、トリパンブルーを用いて計測した。

(3) 二次元電気泳動

体腔液上清を透析後、市販のキットを用いて脱塩した。二次元電気泳動に供し、対照群とスポットパターンを比較した。

(4) プロテインシーケンシング

LPS、およびリポテイコ酸刺激後に新たに出現あるいは量的に増加したスポットの解析を進めることとした。リポテイコ酸刺激実験については、タンパク質量を増やすため、マナマコ 10 個体をもちいて、上と同様の実験を行い、体腔液約 180ml を得、これを濃縮した。これらのサンプルを二次元電気泳動後、PVDF 膜に転写、染色してプロテインシーケンシングに供した。

(5) マナマコ体表の防御因子

今回の研究の当初の目的にはなかったが、マナマコサンプルを有効利用すべく、体表の防御因子についても検索した。

体表を削り取り、抽出液を作製した。遠心分離により上清を回収、溶血活性および凝集活性を調べた。

4. 研究成果

(1) 二次元電気泳動

マナマコ体腔液は、海水に近い塩濃度を持ち、さらに天然の界面活性剤であるサポニンを含む。これらの物質は二次元電気泳動における一次元目の等電点電気泳動の妨害物質

となる。

一次元目用のサンプル調整試薬はいろいろなものが市販されているが、これらの試薬では十分なクリーンアップができず、再現性のある、かつ美しい泳動像を得られなかった。

様々な工夫の結果、良好なサンプル調整法を開発し、安定した二次元電気泳動像が得られるようになった。

(2) LPS 刺激による体腔液タンパク質の変化

LPS 刺激後にいくつかのスポットの出現を確認した。それらをプロテインシーケンシングし、得られた配列を BLAST 検索に供したところ、そのうちのひとつは既に報告されているマンノース結合 C タイプレクチンの N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示した。分子量も一致することから、このレクチン、あるいはそのホモログであると考えられる。他の配列については、ホモログは見あたらなかった。

培養後の生存率は、対照群と差がなかった。

(3) ペプチドグリカン刺激による体腔液タンパク質の変化

刺激群において、対照群にはないいくつかのスポットの出現を確認した。

ペプチドグリカン処理群の一部で生存率の低下が見られた。

(4) リポテイコ酸 (LTA) による体腔液タンパク質の変化

対照群にはないいくつかのスポットの出現を確認した。

各群間での生存率の差はなかった。

(5) ザイモサンによる体腔液タンパク質の変化

対照群にはないいくつかのスポットの出現を確認した。

ザイモサンはコウボ細胞壁の粗抽出物である。タンパク質の混入の有無を確認するため、ザイモサンのみでの二次元電気泳動も行ったが、スポットは見られなかったことから、ザイモサン刺激後に現れたスポットは体腔球のものだと判断される。

ザイモサン処理群で生存率の低下が見られた。

(6) LTA 刺激によって変化したスポットの N 末端アミノ酸解析

マナマコ体腔液には、主要卵黄タンパク質 (MYP) が大量に含まれる。二次元電気泳動できるタンパク質量には限りがあり、MYP を除くことにより、他のタンパク質を検出しやすくなる。MYP は分子量が大きいので、限外濾過を組み合わせることにより、MYP を除くこ

とができた。

こうして得たサンプルを濃縮、脱塩し、二次元電気泳動後、PVDF 膜に転写した。4 つのスポットをプロテインシーケンシングに供した。その結果、3 つのスポットでは配列が得られなかったが、1 つのスポットについて N 末端アミノ酸配列を得た。BLAST 検索にかけ、ヒットしたタンパク質のうち、分子量が近く、類似配列が N 末端にあるものを検索した結果、2 種類のウニタンパク質、putative defense protein 3-like isoforms および ficolin-1-like protein が候補として残った。これらはいずれもタンパク質としては確認されていないが、いずれも生体防御関連分子である可能性が示唆される。

(7) マナマコ体表の防御因子

マナマコの体表抽出物はウサギ赤血球に対し、強い溶血活性および凝集活性を示した。凝集反応は、試験した 7 種類の単糖のいずれによっても阻害されず、凝集素の特異糖は不明であった。

そこでウサギ赤血球を担体としてアフィニティー精製を行ったところ、2 つのバンドを得た。プロテインシーケンシングの結果、一つは既報の C-タイプレクチン (LPS 刺激後の体腔液中に増加したものと別の分子) と高い相同性を示し、分子量も一致したことから、そのレクチン、あるいはそのアイソタイプであると考えられる。もう 1 つのバンドは配列が得られず、N 末端がブロックされているものと考えられた。この分子量に相当するナマコレクチンは報告されていないため、新奇のタンパク質である可能性が高い。

(8) 考察とまとめ

LPS、リポテイコ酸、ペプチドグリカン、ザイモサンでの刺激により、培養後の体腔液上清中にスポットパターンの変化が見られた。この結果は、マナマコ体腔球がこれらの物質を認識し、何らかのタンパク質を産生、あるいは分泌する反応を起こしたことを示す。

リポテイコ酸刺激によって得られたスポットのうち、N 末端アミノ酸配列が得られた 1 スポットについては、データベースには同一の配列を持つタンパク質はなく、マナマコでは未同定のタンパク質であった。ウニの生体防御関連タンパク質と相同性が見られたものの、ホモログか否かは現段階では判断できない。このタンパク質のより長い配列を得て、cDNA クローニングを行うことにより、一次配列を決定する予定である。

体腔球についても同様にプロテオーム解析を行う予定であったが、残念ながら期間内に終えることができなかった。現在解析を進めている。

今回、マナマコ体腔球がこれらの物質に反応することが明かとなった。さらに解析を進め、出現したタンパク質の同定を行うことにより、マナマコ体腔球の微生物に対する応答機構について理解が深まるであろう。

体表は、細菌の密度が高い水中で生活する動物にとって、病原生物の侵入門戸として重要である。マナマコの体表防御物質はこれまで報告がないが、今回、既報のレクチン（体表での存在は報告されていない）と同一あるいは類似したレクチンと、新奇レクチンの存在を確認したことは、貴重な成果である。これらについても今後さらに解明を進めていく。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 修 (NAKAMURA OSAMU)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号：00306648

(2) 研究分担者

筒井 繁行 (TSUTSUI SHIGEYUKI)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号：2040691

(3) 連携研究者

なし