

## 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24年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780171

研究課題名（和文） トラフグ特異的寄生虫の宿主認識分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of host recognition of *Heterobothrium okamotoi*

研究代表者

田角 聡志（TASUMI SATOSHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：90359646

研究成果の概要（和文）：トラフグ鰓に特異的な寄生虫はクサフグには寄生しない。本研究はこの現象に関わる分子の同定を目指した。トラフグの膜タンパク質を昆虫細胞表面に提示させる実験系を確立することはできたが、実際の分子の同定には至らなかった。並行して両種の鰓における発現量の異なる遺伝子を探索した結果、我々がかつて体表粘液から発見した免疫関連因子、パフレクチンが含まれていた。この分子を寄生虫が逆利用して宿主特異性を示しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：*Heterobothrium okamotoi*, a parasite specific to *Takifugu rubripes*, does not parasitize to relative species *T. niphobles*. The aim of this study is to identify the molecule underlying this phenomenon. At first we established the technique, which enable insect cells to display *T. rubripes* membrane proteins at the cell surface. By using this technique, we tried to identify the molecule(s), which is a receptor(s) for ligand(s) localizing at the surface of *H. okamotoi*, but it was not successful. At the same time, we searched genes expressed at different level in gills of *T. rubripes* and *T. niphobles*, and found a couple of candidates. One of the candidates is pufflectin, which is an immune related factor we originally found in the skin mucus of *T. rubripes*. *H. okamotoi* might use this molecule to recognize its host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：魚病、寄生虫、宿主特異性、トラフグ、鰓

## 1. 研究開始当初の背景

水産増養殖の現場において、寄生虫症は抗生物質やワクチンでの対応が困難だけに、決め手となる対処法に乏しく大きな問題となっている。*Heterobothriumokamotoi*はトラフ

グ養殖に甚大な被害を与える寄生虫であり、ホルマリンが使用されて大きな社会問題になったこともあった。現在では特効薬が開発されているが、高価であり、より効果的な予防・治療法の開発が望まれている。中でも予

防法確立が強く求められており、このためには感染の第一歩である、寄生虫による宿主認識機構を明らかにすることが不可欠である。これまでの研究によると、トラフグ体表粘液の他魚種より低い pH が *H. okamotoi* の誘因要素であることが示されている。しかし、本来宿主ではないクサフグ、ヒラメ、マダイにも暴露直後には付着がみられることから、pH のような単純な機構のみで感染が成立するとは考えられない。さらに、*H. okamotoi* はトラフグの皮膚にも付着するが速やかに脱落する。これらのことから、*H. okamotoi* の虫体表面に存在するレセプターとトラフグ鰓表面に存在するリガンドとの特異的な結合が宿主特異性に大きく関わっていることは間違いないであろう。申請者はこれまでに、病原体との接触の場である魚類皮膚における生体防御物質、レクチンに関する研究や、原虫性寄生虫の 2 枚貝への宿主特異的な侵入機構に関する研究を行ってきており、当該分野への興味と理解を深めていった。また、酵母を用いた細胞表面ディスプレイという方法を用いてヤツメウナギで近年見つけた新しい抗体分子 VLR の抗原認識機構の一端を明らかにした。現所属研究機関では、全ゲノムが解読されたトラフグを用いたプロジェクトを精力的に進めている。そこで、トラフグとトラフグ特異的な寄生虫である *H. okamotoi* を宿主・寄生虫間の関係のモデルの一つとしてとらえ、特に感染成立の第一歩である寄生虫による宿主認識を分子レベルで研究していくという発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では *H. okamotoi* によるトラフグ鰓の分子認識機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、トラフグ鰓表面のレセプター分子と虫体表面のリガンド分子の相互作用を解析する細胞表面ディスプレイ法という新しい手法や、トラフグとクサフグの鰓における発現量の異なる遺伝子を特定するサブトラクティブ PCR 法により、候補となる分子を同定することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1)はじめに、細胞表面ディスプレイ法の開発と至適化を行った。従来の発現ベクターだとトラフグ鰓由来の全長 cDNA ライブラリーを効率良く発現させることが困難であると考えられたため、市販の昆虫細胞発現ベクター pIB を改変して、2 つの *SfiI* サイトをもたせた pISD2 ベクターを作製した。本改変がタンパク質の発現に悪影響を与えないかどうかを確認するため、モデルタンパク質として EGFP の cDNA を挿入したもの (EGFP/pISD2) を昆虫細胞 (High Five™) にトランスフェクトした。EGFP の発現はフローサイトメーター

および蛍光顕微鏡により調べた。

(2)EGFP の N 末端にインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの膜貫通領域 (NAtm) を融合させることにより EGFP を人為的に膜タンパク質に改変した。後の免疫沈降に利用するために V5 エピトープもあわせて融合させた (V5-NAtm-EGFP/pISD2)。発現と局在についてはフローサイトメーターおよび共焦点顕微鏡により調べた。次いで細胞膜を透過しないビオチン化試薬を用いて、NAtm-EGFP 発現細胞の表面に存在するタンパク質のみをビオチンによって標識した。この細胞抽出液を V5 エピトープに対する抗体を利用した免疫沈降に供し、得られた産物を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜上に転写した。この膜上のビオチン存在部位をストレプトアビジンにより検出することで V5-NAtm-EGFP が細胞表面に提示されていることを確認した。

(3)トラフグの膜タンパク質のうち、CD8 $\alpha$  と CCR7 をモデルとして選び、これらの細胞外領域に検出のための FLAG タグを融合させたものを昆虫細胞に発現させた。これらのタンパク質の発現および局在をフローサイトメーターおよび共焦点顕微鏡を用いて調べた。

(4)トラフグ鰓から全長 cDNA ライブラリーを作製した。これを pISD2 に挿入したものを昆虫細胞にトランスフェクトさせることで細胞表面ディスプレイライブラリーを得た。ビオチン化 *H. okamotoi* 虫体表面タンパク質をリガンドとして用いて、これに結合する細胞をストレプトアビジン磁気ビーズにより濃縮することを試みた。

(5)サブトラクティブ PCR 法により、トラフグの鰓で発現しているもののクサフグでは発現していない遺伝子の同定を試みた。サブトラクションの成否は G3PDH 遺伝子特異的なプライマーを用いて検討した。

(6)サブトラクティブ PCR 法によって同定された遺伝子の一つがパフレクチンという、我々がかつて体表粘液中から発見したマンノースに特異的に結合するタンパク質であった。そこで、この遺伝子の鰓における発現量がトラフグとクサフグとで違いがあるかどうかを半定量的 PCR およびウエスタンブロットティングにより調べた。

## 4. 研究成果

(1)EGFP/ pISD2 をトランスフェクトした昆虫細胞の多くはフローサイトメーターで緑色蛍光陽性を示した。蛍光顕微鏡下で観察した結果もこの結果と一致していたことから、今回の改変は挿入遺伝子の発現には悪影響

を及ぼさないことが示された。V5-NAtm-EGFP/pISD2 をトランスフェクトさせた細胞でも同様の結果が得られ、人為的に膜タンパクに改変した EGFP も本実験系で問題なく発現させることができることが示された。共焦点顕微鏡による観察の結果、EGFP を発現させた細胞は核を含めた細胞全体に緑色蛍光が認められた (図 1)。一方、V5-NAtm-EGFP を発現させた細胞では核には緑色蛍光が認められず、細胞質内でも蛍光に局在が観察された (図 2)。この結果は、NAtm が付加されたことで EGFP が細胞内輸送系によって正常に輸送されたことを示唆している。免疫沈降産物をストレプトアビジンで検出したところ、V5-NAtm-EGFP の部分にバンドが認められた。このことは、V5-NAtm-EGFP が確かに細胞表面に提示させていることを示すものであり、本実験系により膜タンパク質が細胞膜上に提示されることが考えられた。

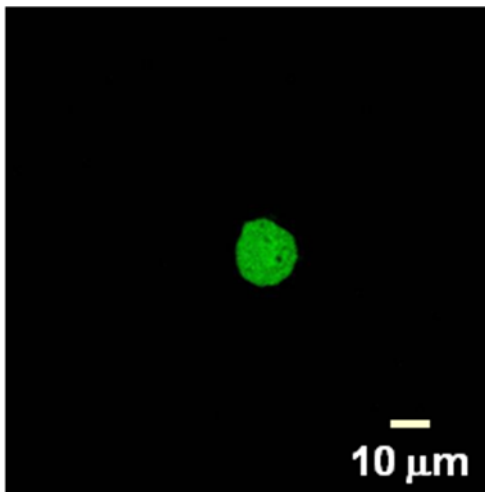


図 1 EGFP 発現細胞の共焦点顕微鏡像。

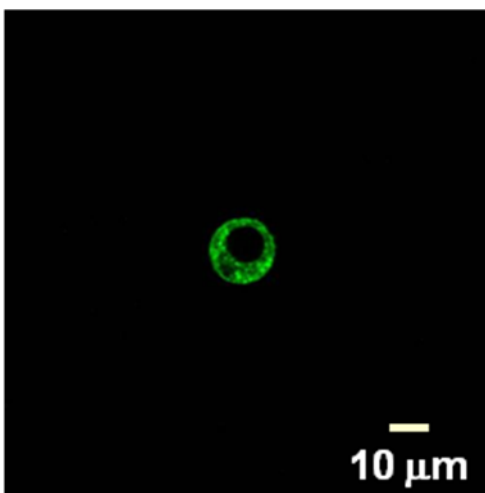


図 2 V5-NAtm-EGFP 発現細胞の共焦点顕微鏡像。

(2) トラフグの膜タンパク質のうち、1 回膜貫

通型の CD8 $\alpha$  および 7 回膜貫通型の CCR7 をモデルタンパク質として選び、これらが昆虫細胞の細胞表面に提示されるかどうかを検討した。これらのタンパク質を発現させた昆虫細胞を FITC で標識された抗 FLAG モノクローナル抗体と反応させ、フローサイトメーターで解析を行ったところ、陽性を示す細胞が認められた。これらを共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞膜のみに緑色蛍光が認められた (図 3)。このことから、フグの膜タンパク質も本実験系によって細胞膜上に提示させることができることが考えられた。

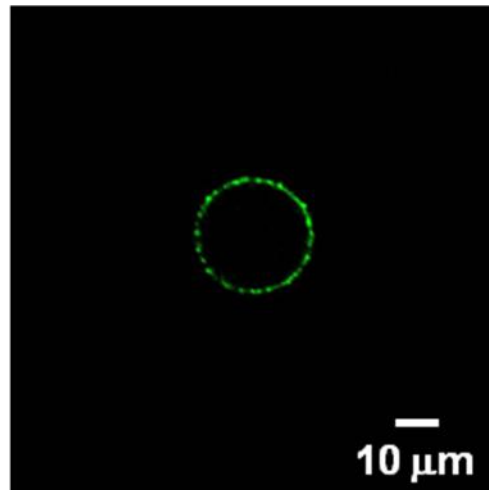


図 3 FITC-抗 FLAG 抗体で染色した CD8 $\alpha$  発現細胞の共焦点顕微鏡像。

(3) 実際のレセプターのスクリーニングに用いるトラフグ鰓 cDNA ライブラリーを作製した。多様性は約  $10^8$  と十分なものが得られた。これをトランスフェクトさせた昆虫細胞のうち、*H. okamotoi* 虫体表面タンパク質に結合するものを磁気ビーズによってスクリーニングし、濃縮された細胞を培養しようとしたが全ての細胞が死滅してしまった。今回の実験で回収できた細胞数が極めて少なかったため、培養条件が指摘でなかった可能性が考えられた。あるいは、ビオチン化 *H. okamotoi* 虫体表面タンパク質の調製に用いた界面活性剤が細胞に悪影響を及ぼしたのかもしれない。これらについては今後再検討を要する。

(4) サブトラクティブ PCR 法により、トラフグに発現量の多い遺伝子のライブラリーを作製した。このライブラリーを鋳型として、G3PDH 特異的プライマーで PCR を行ったところサブトラクト後には PCR 産物がほとんど認められなかったことから、ライブラリーが適切に構築できたことが示された。このライブラリーからこれまで約 300 クローンについて配列を決定し、いくつかの候補膜タンパク質分子を得た。今後クローン数をもっと増やす

とともに、擬陽性でないことの確認も行っていく必要がある。

(5)クサフグの鰓で発現しているパフレクチン cDNA の塩基配列は未同定であったため、これを決定した。得られた配列をトラフグの配列と比較することにより、両者とも増幅可能なプライマーを設計した。これを用いた半定量的 RT-PCR の結果、トラフグの方がクサフグよりもパフレクチンの発現量のはるかに多いことが示された。トラフグパフレクチン特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングでも同様の結果が得られた。これらの結果と *H. okamotoi* はトラフグには寄生するがクサフグにはしないこと、およびトラフグパフレクチンはこの寄生虫の虫体表面に対する結合能があることから、本来は生体防御の役割を果たしているパフレクチンを寄生虫が逆に利用することで、トラフグに対する宿主特異性を示している可能性があると考えられた。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

- ①□山口晶、田角聡志、筒井繁行、中村修、菊池潔、鈴木讓、フグ類鰓におけるパフレクチン発現量の種間差と寄生虫宿主特異性、平成24年度日本水産学会春季大会、2012年3月29日、東京海洋大学(東京都)
- ②□田角聡志、小林啓介、筒井繁行、中村修、鈴木讓、魚類膜タンパク質の細胞表面ディスプレイ法の開発、平成23年度日本水産学会春季大会、2011年3月28日、東京海洋大学(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田角 聡志 (TASUMI SATOSHI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教  
研究者番号：90359646