

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580245

研究課題名(和文)細菌感染に対するサーフェスバリアとしての二枚貝体表面粘液の機能解明

研究課題名(英文)Functional profiles of skin mucus in bivalve mollusks involved in a surface barrier against bacterial infection

研究代表者

高橋 計介(Takahashi, Keisuke)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80240662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：二枚貝は、常に殻内を水中細菌に曝露されているものの、他の魚介類と比較して細菌感染症が極めて少ないという特徴がある。外套器官を構成する外套膜、鰓、唇弁は常に水中の微生物や有機物と接触しており、これらの器官は魚類や甲殻類における体表面や鰓に相当する位置にある。魚類では、体表面に分泌される粘液がサーフェスバリアとして細菌感染の防御に重要である。申請者は、二枚貝でも同様のメカニズムで細菌防除をしていると考え、外套膜表面から採取した粘液の抗菌活性と貝殻の中に直接細菌を接種して、抗菌活性を調べることにより、二枚貝全般に普遍的に存在するシステムとしてのサーフェスバリアの仕組みや意義を解明した。

研究成果の概要(英文)：Shellfish belongs to the phylum Mollusca and is mainly comprised of bivalves and gastropods. The Phylum Mollusca is one of the largest and numerous groups in the animal kingdom. Shellfish and microorganisms coexist in the biosphere in numerous ways. Thus, bivalves have evolved sensitive mechanisms for recognizing pathogens and an array of strategies to defend themselves against attacks by microorganisms such as bacteria, fungi, and parasites. An oft-asked question is how invertebrates including shellfish survive against pathogenic microorganisms without an adaptive immune system. Indeed, invertebrates do not have lymphocytes and do not produce antibodies. Thus, we have investigated that skin mucus from mantle and gill functions as a surface barrier against bacterial infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：生体防御 二枚貝 マガキ 体表面粘液 抗菌活性 リゾチーム キチナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

水中生活者でありほとんどの種が濾過食者である二枚貝は、常に殻内を水中細菌に曝露されているものの、他の魚介類と比較して細菌感染症が極めて少ないという特徴がある。もう少し詳細に見ると「幼生は細菌性壊死症によって大量死を引き起こすことはあるが、成貝では細菌を原因とする感染症の発生は少ない」ことがわかる。アサリの brown ring disease (BRD) やカキ類の *Vibrio aestuarianus* 感染症など深刻な被害をもたらすものはあるが、他の魚介類よりも細菌感染症の発生事例は格段に少ない。すなわち、「原虫やウイルスに対する脆弱さと細菌に対する強靭さ」は、異物に対する二枚貝類の感受性や応答性をはじめとする自然免疫能を特徴づけるものであり、原因物質と貝の生体防御能との機能連関を読み解くことが感染症を防ぐことに結びつくと考えられる。

外套器官を構成する外套膜、鰓、唇弁は常に水中の微生物や有機物と接触しており、これらの器官は魚類や甲殻類における体表面や鰓に相当する位置にある。魚類では、体表面に分泌される粘液がサーフェスバリアとして細菌感染の防御に重要である (Shephard, 1994)。二枚貝でも同様のメカニズムで細菌防除をしているとすれば、外套膜や鰓の体表面粘液が重要な役割を担っていると想定される。しかし、二枚貝の外套膜や鰓において、粘液の存在はよく知られているものの、生体防御能との関連はほとんど明らかになっていない。これまでわずかにリゾチーム (McDade and Tripp, 1967; 高橋ほか, 1986)、プロテアーゼ (Brun et al., 2000)、レクチン (Fisher, 1992) などの活性が体表面粘液中に確認され、予備的な性質の評価がなされているのみであり、作用機構や生体防御における重要性はよく把握されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

海産二枚貝類において細菌がどのように排除されるのか、溶菌酵素であるリゾチームを中心に粘液中の生体防御因子の機能を調べ、体表面粘液のサーフェスバリアとしての細菌防除機構を検討する。二枚貝ではこの体表面粘液の細菌防除能が極めて強力であると想定しているが、もしサーフェスバリアを通過して体内に細菌が侵入した場合にはさらにどのような排除機構が存在するのかを明らかにする。研究の最終目的は、単なる種特異的な生体防御機構の解明にとどまるのではなく、二枚貝全般に普遍的に存在するシステムとしてのサーフェスバリアの仕組みや意義を解明することにある。

## 3. 研究の方法

研究は大きく分けて3つのパートから構成される。

### (1): 体表面粘液における液性生体防御因子の組織局在、存在様式および分泌様式の決定

マガキ外套膜および体表面粘液におけるリゾチームとキチナーゼに代表される液性生体防御因子の組織局在と存在様式、分泌様式を明らかにする。最初に、組織切片を作成し、HE染色、多糖染色により粘液の存在様式、粘液細胞の特定を行い、さらに特異抗体を用いた免疫染色によりリゾチームなどの局在と分泌細胞を同定する。次に、リゾチームおよびキチナーゼの分泌様式を決定する。外套膜を対象組織として、常法を用いて遺伝子のクローニングを行い体表面組織で発現するリゾチームとキチナーゼを同定する。組織化学的に明らかにしたタンパクの存在部位と遺伝子の発現部位を調べる。また、刺激を与えた際の遺伝子発現量の変化を調べ、生体防御的に応答するかどうかを明らかにする。さらに、外套膜から体表面粘液を取り、そのリゾチーム活性および抗菌活性を測定する。

### (2): In vivo におけるマガキ体表面粘液

### の抗菌活性の検討

体外に取り出した粘液を用いた実験（いわゆる *In vitro* の実験）は、実施が比較的容易であり、研究例は少なくない。本研究の（１）もその類の研究である。そこで本項目では生きたマガキ体表面粘液の抗菌活性を調べることにした。試験個体の外套腔（左右の殻のすぐ内側にある左右の外套膜に囲まれた空間）内に、グラム陽性菌の *Micrococcus luteus* あるいはグラム陰性菌の *Vibrio tapetis* の生菌懸濁液（ $5 \times 10^5$  CFU/ml、5 ml）を接種したものを研究試料とする。4 の低温下で 1、6、24 時間静置してから、懸濁液を全量回収して寒天平板培地に塗布し、生育する細菌のコロニーを計数することで接種された細菌の生残を評価する。次に、細菌が外套膜や鰓に付着する可能性を考慮して、組織表面の細菌の生残を調べる。それぞれの組織を 1 cm<sup>2</sup> の大きさに切り出してから滅菌海水中で付着している細菌を洗い落とし、その液の一部を取って寒天平板培地で培養し、生育コロニーを計数する。これらの計数結果と最初の接種細菌数を比較して、抗菌活性の有無と強さを評価する。

### （３）：体表面粘液産生量が大きく異なる二枚貝種における抗菌活性の比較

上記 2 つの項目はマガキを研究材料に用いて検討するが、二枚貝の種類によって外套膜表面の粘液の質・量ともに大きく異なると考えられる。本研究では、質的な検討まで至らないが、見た目の分泌量が明らかに違う 2 種類の二枚貝種を選び、マガキと同様に粘液を採取して抗菌活性を測定する。供試する種の 1 つはマガキ以上に大量の粘液を分泌するヒオウギガイ、もう 1 つは粘液の産生量が非常に少ないアカガイである。粘液の採取方法や抗菌活性の測定方法は（１）の実験と同様とする。

## 4．研究成果

### （１）：体表面粘液における液性生体防御因子の組織局在、存在様式および分泌様式の決定

リゾチーム、キチナーゼともに、マガキ外套膜から強い活性を見いだしたが、完全精製することはできなかった。そこで、マガキ外套膜に発現するリゾチーム遺伝子の配列から推定したペプチドを合成し、これを抗原とするリゾチーム抗体を作製した。この抗体を用いて免疫組織化学反応を調べた結果、外套膜の一部の細胞に明確な陽性反応が認められた。遺伝子の検出結果ともよく一致したこと、外套膜の抽出液と粘液中のリゾチームが同一のものと考えられることから、リゾチームは外套膜の細胞で産生され、粘液に分泌されていると推測された。キチナーゼについても活性の確認と遺伝子の発現を明確にすることができた。マガキ外套膜中の抗菌活性は、*Micrococcus* に対して強いものであったが、*Vibrio* に対しては活性を示す個体、示さない個体のばらつきが大きく安定していなかった。

### （２）：*In vivo* におけるマガキ体表面粘液の抗菌活性の検討

マガキ外套腔内で一定時間反応させた後、回収された細菌懸濁液の生菌数は、接種 1 時間後の段階で大きく低下していた。これは *Micrococcus*、*Vibrio* とも同様であった。この生菌数の減少はすべてが死滅によるものとするには、減少率も減少の速度も早すぎると考えられたことから、外套膜や鰓の付着を調べることにした。その結果、特に鰓に多くの細菌が付着・生残していることがわかった。しかし、この生菌数を考慮しても最初に接種した細菌数を大きく下回ることから、外套腔内および組織表面で細菌は死滅した、言い換えれば外套腔内には強い抗菌活性のあることが示され、*in vitro* 実験の結果と考え合わせると、抗菌の本体は体表面粘液であることが推測された。

### (3): 体表面粘液産生量が大きく異なる二枚貝種における抗菌活性の比較

粘液の分泌量が大きく異なるヒオウギガイとアカガイにおいて、リゾチーム活性を測定した結果、酸性条件下においてヒオウギガイ粘液はマガキ粘液の5倍以上という極めて高い活性を示した。しかし、pH8.0の海水中ではほとんど活性はみられなかった。一方、抗菌活性については、*Vibrio*に対して海水中でも高い活性を示した。*Micrococcus*に対してはまったく活性がみられなかったことから、ヒオウギガイ体表面粘液はグラム陰性菌に対する抗菌因子を含むと考えられた。アカガイについては、粘液量が非常に少なく明確な結果を得ることができなかった。しかし、アカガイの血リンパには高いリゾチーム活性が検出されていることから、二枚貝の種類によっては、体表面以外の場所において粘液以外のもの、例えば循環血リンパによって細菌の活動を抑制する等の抗菌の作用機序を持つことも考えられる。

#### 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 3件)

1. Iizuka, M., Nagasaki, T., Takahashi, KG., Osada, M. and Itoh, N.  
Involvement of Pacific oyster CgPGRP-S1S in bacterial recognition, agglutination and granulocyte degranulation. *Dev. Comp. Immunol.*, 査読有、43, 2014, 30-34  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.011>
2. Takahashi, KG., Shellfish Bio-Defense, volume 5.5.35 Fish Disease, UNESCO EOLSS Encyclopedia, 査読有、2014, 11-16
3. Okada, Y., Yamaura, K., Suzuki, T., Itoh, N., Osada, M. and Takahashi, KG.  
Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

*Comp. Biochem. Physiol.*, 査読有、165, 2013, 83-89

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.03.008>

[学会発表](計 12件)

1. Takahashi, KG., Assessment of unique phagocytic properties of the Pacific oyster hemocytes against yeast and yeast cell wall derivatives, The 5<sup>th</sup> International Oyster Symposium, December 12, 2013, Saigon Exhibition Conference Center, Ho Chi Minh, Vietnam.  
(招待講演)
2. Takahashi, KG., Formation of spheroidal hemocyte aggregates of *Crassostrea gigas* hemocytes involved in protein kinase C signaling pathways in bio-defense mechanisms, The 5<sup>th</sup> International Oyster Symposium, December 12, 2013, Saigon Exhibition Conference Center, Ho Chi Minh, Vietnam.
3. 高橋計介、伊藤直樹、尾定 誠、簡易測定キットにより調べた海産二枚貝の血リンパの酵素活性の特徴、日本水産増殖学会第12回大会、2013年10月14日、鹿児島大学、鹿児島市
4. 高橋計介、二枚貝の生体防御における活性酸素の機能、第24回日本生体防御学会・シンポジウム I、2013年7月10日、くまもと森都心プラザ、熊本市、(招待講演)
5. 高橋計介、マガキ血球の2つの細胞亜集団、顆粒球および無顆粒球の遺伝子発現解析、JST・研究成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム)・平成25年度サイトビジット検討会、2013年5月29日、放射線医学総合研究所、千葉市
6. 高橋計介・中島菜花子・藤森 亮、海産二枚貝アカガイに対する線の照射効果、平成25年度HIMAC共同利用研究成果発表会、2013年4月22日、ホテルポートプラザち

ば、千葉市

7. Takahashi, KG., Bio-defense mechanisms in bivalve molluscs, Memorial symposium on discovery of intermediate snail hosts of *Schistosoma japonicum.*, The 82<sup>nd</sup> Annual Meeting of JSP. March 30, 2013, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo. (招待講演)

8. Iizuka, M, Nagasaki, T., Takahashi, KG., Osada, M., and Itoh, N., A Peptidoglycan Recognition Protein Induces Hemocyte Degranulation in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas.*, Aquaculture 2013, World Aquaculture Society, February 25, 2013, Nashville, Tennessee, USA.

9. 高橋計介・中島菜花子・藤森 亮・伊藤直樹・尾定誠、海産二枚貝サルボウ組織に対する重粒子線照射の影響、平成24年度日本水産学会秋季大会、2012年9月15日、水産大学校、山口県下関市

10. 阿部史隆・福田陽一・高橋計介・伊藤直樹・尾定誠、マガキ血球における貪食胞内酸性化、平成24年度日本水産学会秋季大会、2012年9月15日、水産大学校、山口県下関市

11. 高橋計介・中島菜花子・藤森 亮、海産二枚貝アカガイの造血組織の対する重粒子線照射の効果、HIMAC 共同利用研究成果発表会、2012年4月23日、ホテルポートプラザちば、千葉市

12. 飯塚真生・長崎稔拓・高橋計介・尾定誠・伊藤直樹、マガキ PGRP-S1S によるグラム陰性菌認識、日本比較免疫学会第23回学術集会、2011年8月22日、海洋研究開発機構、神奈川県横須賀市

〔図書〕(計 1 件)

1. Takahashi, KG. and Itoh, N., Lysozymes in molluscs., 2011, pp. 93-102, In Bondad-Reantaso, MG., Jones, JB., Corsin,

F., Aoki, T. (eds), Diseases in Asian Aquaculture VII, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 385 pp.

〔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  
高橋 計介 (TAKAHASHI, KEISUKE)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：80240662

研究者番号：

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：