

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580254

研究課題名(和文) アユ抗菌ペプチドの網羅的解析による冷水病耐性獲得の機構解明への取り組み

研究課題名(英文) Investigation of resistance mechanism of ayu against cold water disease by comprehensive analysis of antimicrobial peptides

研究代表者

飯島 憲章 (IIJIMA, NORIAKI)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90136143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：海産系アユ脾臓の酸抽出液より2種類の新規抗菌ペプチドを単離し、plecoglosin-1及びplecoglosin-2と命名した。Plecoglosin-1,-2を化学合成し、各種魚病細菌、さらにはアユ冷水病菌の原因菌に対する殺菌活性を検討した結果、いずれの魚病細菌に対しても殺菌活性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We report here the isolation of two novel antimicrobial peptides from the spleen of Ayu, *Plecoglossus altivelis*. Antimicrobial peptides were purified from the acid extract of Ayu spleen with ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography, and two-step reversed-phase HPLC. Peptide sequences were determined by a combination of Edman degradation and ESI mass spectrometry. Two antimicrobial peptides, named plecoglosin-1 and -2, consist of 11 and 10 amino acids, respectively. Synthetic plecoglosin-1 and -2 displayed broad-spectrum bactericidal activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and fish and crustacean pathogens.

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 生体防御 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

アユ冷水病は 1987 年に国内の養殖場で最初に確認された後、全国のアユ養殖場や河川に広まり、現在でも大きな被害を与えている。そのため、ワクチン開発、加温治療や、湖産系アユと海産系アユとの交配など、様々な冷水病対策研究が行われてきたが、冷水病を根本から解決するには至っていない。古澤は、冷水病対策としてアユの獲得免疫系の面から検討を加えたところ、アユにおいて獲得免疫系は存在するが、抗体産生能がほ乳類に比べてかなり低いことから、自然免疫応答が優位であると指摘している。アユの自然免疫系の液性防御因子としては、これまで体表粘液にレクチンやリゾチームなどが見出されているが、それ以外の生体防御因子・抗菌ペプチドに関する研究例はいまだ認められていない。冷水病菌に対する抵抗性獲得の機構を明らかにするためには、アユで発現している生体防御因子の種類と構造について、その全体像を把握する必要がある。

申請者は、“アユの組織には数多くの種類の抗菌ペプチドが共存しており、これらが冷水病菌に対する生体防御因子として重要な役割を果たしている”と確信している。事実、申請者らは、これまでにマダイ鰓組織より 3 種の新規抗菌ペプチドを単離し、一次構造も決定したが、その研究過程で、“これら 3 種の抗菌ペプチドに加え、それ以外にも数多くの抗菌ペプチドが存在する”ことを確認している。さらに最近になって、アユ体表粘液や鰓、脾臓には分子量数千程度の抗菌活性成分が複数存在することを確認している。それ故、本研究を実施することにより、アユ体表や生体内の組織で合成・分泌される抗菌ペプチドの種類と構造について、その全体像を把握することが可能となり、冷水病菌耐性に関わる生体防御因子を明らかにすることができると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、冷水病菌の侵入経路にあたる体表粘液や鰓、さらには冷水病菌の主な感染部位である脾臓や肝臓で産生される構成分泌型及び誘導分泌型の抗菌ペプチドを、その電荷・疎水性・分子量に基づく多次元クロマトと LC-MS を併用して網羅的に解析し、その全体像を把握すると共に、湖産系及び海産系アユの冷水病菌に対する感受性の違いが“抗菌ペプチドの種類と産生量の違いによる”ことを証明することにある。本研究を実施することにより、湖産系及び海産系アユの組織で“構成的あるいは、冷水病菌感染により誘導的に合成・分泌される抗菌ペプチドの種類と構造に関する全体像”を把握することができるので、アユの自然免疫機構を解明する上で重要な情報を提供できる。さらに、アユの冷水病菌に対する感受性の差が抗菌ペプチドの種類や産生量、冷水病菌に対する抗菌活性の違いによることを証明できれば、冷水病菌に対する耐病性獲得の機構を明らかにすることが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 抗菌活性の測定

B. subtilis ATCC6633 菌懸濁液 100 μ l に、0.1% AcOH-0.1% BSA に溶解したサンプル 100 μ l 又はコントロールとして用いた 0.1% AcOH-0.1% BSA 100 μ l をそれぞれ加え、よく混合した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置培養した。培養後、反応液 100 μ l に 0.85% NaCl を加えて 10 倍及び 100 倍の段階希釈液を調製した。次いで、100 倍希釈液を 100 μ l ずつ TSA 培地 2 枚に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 10 時間から 15 時間静置培養した後、コロニー数を測定した。

抗菌活性はコントロールの CFU とサンプルの CFU を比較することで判定した。

抗菌活性は killing (%) で表し、その式は以下に示す。

$$\text{Killing (\%)} = (1 - \text{CFU in the sample} / \text{CFU in the control}) \times 100$$

なお、killing (%) の値が 90% を示す時の最小濃度を MBC (Minimal Bactericidal Concentration) とした。

(2) タンパク質及びペプチド濃度の測定

2.1 タンパク質濃度の測定

粗抽出液及び各精製ステップにおけるタンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用い、付属のプロトコールに従って測定した。なお、Bovine gamma globulin (Bio-Rad Protein assay Standard, 以下 IgG とする) を標準タンパク質として用いた。

2.2 ペプチド濃度の測定

Angiotensin 標品の希釈液をカラムにチャージし、HPLC 分析を行った後、各ピークのピーク面積を半値幅法により求めた。チャージしたペプチド量と得られたピーク面積から Angiotensin の検量線を作成し、目的とするピークの面積値を求めることによりペプチド濃度を算出した。

(3) アユ脾臓組織からの抗菌ペプチドの精製

海産系アユ成魚200尾の脾臓より酸抽出液を調製し、脱塩した後、SP-Sephadex C25により強酸性、弱塩基性、強塩基性の3画分を得た。次いで、弱塩基性画分及び強塩基性画分をゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量分画し、それぞれ Fraction ~ を得た。両画分とも Fraction を用いて2段階の逆相HPLCによりペプチドを精製した後、ESI-MSにより分子量を測定すると共に、Protein Sequencerによりアミノ酸配列を決定し

た。なお、各精製段階における抗菌活性には *B. subtilis* を用い、コロニーカウント法により MBC (Minimal Bactericidal Concentration) を求めた。

4. 研究成果

(1) 海産系アユ脾臓の粗抽出液を酸性、弱塩基性及び強塩基性画分に粗分画し、各画分の抗菌活性を測定したところ、強塩基性画分に最も高い抗菌活性が認められた。そこで、この画分をゲル濾過カラムクロマト、2段階の逆相 HPLC により抗菌ペプチドを単離した。さらに、プロテインシーケンサー並びに MS/MS 解析により本ペプチドのアミノ酸配列を明らかにし、plecoglosin-1 (PSLKPKLLKYD) と命名した。

(2) アユ脾臓抽出液の弱塩基性画分にも抗菌活性が確認されたことから、ゲル濾過カラムクロマト、2段階の逆相 HPLC により抗菌ペプチド精製すると共に、プロテインシーケンサー並びに MS/MS 解析によりアミノ酸配列を明らかにし、plecoglosin-2 (PDFNRLGDD) と命名した。

(3) 本研究により、アユ脾臓中に2種の抗菌ペプチド、plecoglosin-1 及び plecoglosin-2 の存在することが明らかになったことから、これら抗菌ペプチドを化学合成し、逆相 HPLC により精製標品を得た。次いで、精製標品を用い、魚病細菌 *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Edwardsiella ictaluri*、さらにはアユ冷水病菌の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* に対する殺菌活性を検討した結果、いずれの魚病細菌に対しても 40~180 μ M の濃度で殺菌活性を示すことが明らかとなった。

(4) アユ脾臓 Plecoglosin-1 及び plecoglosin-2 の N 末側に CGG を付加したペプチドをそれぞれ作成した後、ウサギに免役し、抗血清を調製した。次いで、CGG 付加ペプチド結合カラムを用いて抗体を精製した。

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 3 件)

濱野太肇・乗富修平・国吉久人・藤川愉吉・飯島憲章 (広大院生物圏) : マダイ及びアユ抗菌ペプチド遺伝子のクローニングと発現、日本水産学会中国・四国支部例会、宇和島市総合福祉センター (2013.11.16)

坂口裕紀・山口 翔 (広大院生物圏) ・網本智子 (広大技術センター) ・内田直行 (日大生物資源) ・飯島憲章 (広大院生物圏) : アユ表皮粘液における抗菌ペプチドの網羅的解析、日本水産学会中国・四国支部例会、宇和島市総合福祉センター (2013.11.16)

藤本実希・青木 翼 (広大院生物圏) ・網本智子 (広大技術センター) ・内田直行 (日大生物資源) ・影山哲史 (岐阜県河川研) ・飯島憲章 (広大院生物圏) : アユ脾臓組織における抗菌ペプチドの網羅的解析、日本水産学会中国・四国支部例会、福山大学工学部 (2012.12.1)

[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

飯島憲章 (IJIMA, Noriaki)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号 : 90136143

(2) 研究分担者

古澤 修一 (FURUSAWA, Shuichi)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号 : 80130037

