

令和 3 年 9 月 16 日現在

機関番号：80122

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23690

研究課題名（和文）体表粘液に着目したプロテオーム解析によるサクラマス種苗の感染症早期診断技術の開発

研究課題名（英文）Mucus proteome profiling of Cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) infected with pathogen and development of early diagnosis method for fish disease with detecting protein in surface mucus.

研究代表者

西川 翔太郎（NISHIKAWA, Shotaro）

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 さけます・内水面水産試験場・研究職員

研究者番号：80845727

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、サクラマス増養殖で発生する感染症を早期に診断する技術の開発を目的とした。宿主が病原体と最初に接触する体表粘液に着目し、病原体感染時のタンパク質の発現動態をプロテオーム解析により網羅的に調べ、ウイルス感染により7種類のタンパク質、細菌感染により別の7種類のタンパク質の発現変動に有意な差がみられたことを見いだした。さらに、このうちの3種類のタンパク質を感染症早期診断バイオマーカーとして検出する抗原検出ELISA法を開発した。今後、開発した技術の精度を向上させることで、感染症の発症を予測できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの魚病診断では、感染初期の体内に存在する少量の病原体を検出し診断することは困難であった。本研究で開発した体表粘液中に存在するタンパク質を検出する診断技術をサクラマス増養殖へ応用することにより、活魚の健康状態をモニタリングすることが可能となり、このことが感染症の早期発見ひいては蔓延防止に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a technology for early diagnosis of infectious diseases occurring in salmon farming. We focused on the body surface mucus, which is the first site of contact between pathogens and the host, and comprehensively investigated the dynamics of protein expression during pathogen infection by proteome analysis. We found that there were significant differences in the expression of seven proteins during viral infection and another seven proteins during bacterial infection. In addition, we developed an antigen detection ELISA method to detect three of these proteins as biomarkers for early diagnosis of infectious diseases. By improving the accuracy of the developed technique in the future, we have shown the possibility of predicting the onset of infectious diseases.

研究分野：魚病

キーワード：魚病 サクラマス 体表粘液 体表 粘液 プロテオーム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

北海道では、サクラマス沿岸漁業資源を安定化するために、人工孵化で得られた 400 万尾の稚幼魚を毎年河川へ放流することにより、増殖事業が行われている。また、近年の国内サーモン養殖ブームに乗り、道内では種卵生産から出荷まで自家生産によるサクラマス陸上養殖の生産量が増加している。一方、道内の放流用種苗や養殖魚には、伝染性造血器壊死症 (IHN) 等のウイルス病や冷水病等の細菌病が発生し、深刻な死亡被害を及ぼしている。これまで申請者が所属する道総研さけます・内水面水産試験場が、民間増養殖経営体で飼育されているサクラマスを含むサケ科魚類の魚病診断を毎年実施したところ、感染症の診断件数が近年急増していることがわかった。サクラマスの増養殖で感染症の蔓延を防止するためには、ひとつの方策として、早期診断が不可欠である。従来魚病診断では、病原体を検出しやすい腎臓や脾臓等の体内の器官を試料として、病原体遺伝子を増幅し検出する PCR 法や病原体を直接分離する培養法が実施されてきた。しかし、PCR 法では標的遺伝子に検出限界があり、下限値未満の遺伝子は検出できない。加えて、培養法は増殖速度の遅い病原体の分離に長期間を要し、分離すること自体困難な病原体も存在することが問題となる。従って、従来魚病診断では十分な診断ができていないと切り切れず、特に病原体量の少ない感染初期での診断は困難であるといえる。さらに、診断に用いられる各種器官や血液を稚魚期の魚から採取するのは困難であることから、稚魚からでも容易に採取可能なサンプルを用いた早期診断技術を開発する必要がある。

魚類は、大気中に比べ病原体密度が高いとされる環境水中で生活しており、病原体感染の危機に絶えずさらされている。病原体と宿主である魚類が一番初めに接する上皮、特に体表では、多量の糖タンパク質やレクチン等の生体防御タンパク質を含む粘液が、表皮層にある粘液細胞から絶えず分泌されており、この体表粘液は環境水及びそこに含まれる病原体から常に魚体を保護する物理的・化学的バリアーとして機能している。これまでサケ科魚類では、粘液に含まれるタンパク質や代謝物について、個々の物質の動態や機能に関する研究が多数報告されているが、これら物質の病原体感染初期における網羅的な挙動は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、感染症の発生が多い稚魚からでも採取が比較的容易な体表粘液を利用した感染症早期診断技術を開発することを目的とした。稚魚期の体表粘液を検体とした検査法を開発するにあたり、サクラマスの体表粘液の病態生理学的知見を得ることが重要である。よって、本研究では、まず病原体感染時の体表粘液中のタンパク質を網羅的に解析する。次に、病原体感染により発現変動したタンパク質を検出する診断技術を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) サクラマスの体表粘液におけるタンパク質発現動態の網羅的解析

申請者の所属機関で孵化させたサクラマス稚魚に IHN ウイルス及び冷水病原菌を人為的に浸漬感染させ、感染 1 日後及び 7 日後に 1 群につき 30 尾のサクラマスから体表粘液を採取した。体表粘液はサクラマスを 2-フェノキシエタノールで鎮静化した後、カバーガラスを用いて優しくかき取った。また、同時に非感染サクラマスの体表粘液も同様の方法で採取し、対照群とした。得られた体表粘液試料は群ごとにプールし、質量分析のための前処理後、高速液体クロマトグラフィー質量分析計を用いたショットガンプロテオーム解析に供試した。得られた MS/MS スペクトルデータを Mascot 検索に供し、タンパク質を同定した。

#### (2) 抗バイオマーカー候補タンパク質抗体の作製

(1) で得られた体表粘液中で発現するタンパク質から IHN 及び冷水病の早期診断に利用可能なバイオマーカー候補タンパク質を選出した。早期診断技術に用いるための抗候補タンパク質抗体を作製するため、サクラマスの体表粘液サンプルから候補タンパク質の分画・精製を試みた。含まれるタンパク質量の問題から困難であった。よって、NCBI の Protein Database に登録されている候補タンパク質のアミノ酸配列をもとに抗原部位として適切と考えられるアミノ酸配列を推測しペプチドを合成した。合成したペプチドにキャリアタンパク質 (KLH) を付加しウサギに免疫することで、抗候補タンパク質ポリクローナル抗体を得た。

#### (3) IHN 及び冷水病早期診断技術の開発

各感染症の早期診断技術として、(2) で得られた抗体を用いた抗原検出 ELISA 法を開発した。まず、抗原として使用したペプチドの固相化濃度 (検出限界濃度) ならびに作製した抗体の希釈率について適切な条件を検討した。次に、IHN ウイルス及び冷水病原菌に人為的に感染させたサクラマスの体表粘液に対し、開発した抗原検出 ELISA 法を上記で検討した条件で実施し、早期診断技術の有効性を検証した。また、道内のサクラマス増養殖経営体で採集したサクラマス稚魚の体表粘液試料に対しても、同様の ELISA 法を用いた魚病検査を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) サクラマス体表粘液中に含まれるタンパク質発現プロファイルの比較

感染1日後及び7日後のIHNウイルス及び冷水病原菌感染群と非感染群の体表粘液中に含まれるタンパク質発現プロファイルを比較した。本試験では、どの群においても670個程度のタンパク質が体表粘液中から検出された。そのうち、IHNウイルス感染群及び非感染群、冷水病原菌感染群及び非感染群の発現プロファイルを比較した結果、IHNウイルス感染では7種類のタンパク質で、冷水病原菌感染ではIHNウイルス感染時とは異なる7種類のタンパク質で有意な変動が認められた。これらタンパク質を感染症早期診断技術のバイオマーカー候補とした(表1)。

表1 病原体感染により発現変動が認められた粘液中タンパク質

感染病原体	タンパク質名	感染後日数
IHN	Histone H3.2	1日後
	40S ribosomal S15	1日後
	60S ribosomal L37a	1日後
	CCR-NOT transcription complex subunit 1	1日後
	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	7日後
	Interferon-induced GTP-binding protein Mx3	7日後
	Guanylate-binding protein 1	7日後
	Calpain-2 catalytic subunit	1日後
	Splicing factor 3B subunit 3	1日後
	Tubulin beta-1 chain	1日後
冷水病	Actin, alpha skeletal muscle	1日後
	Actin, cytoplasmic 1	1日後
	Apolipoprotein A-I-1	7日後
	Apolipoprotein A-I-2	7日後

##### (2) IHN 及び冷水病早期診断技術の開発

IHNウイルス感染により変動したタンパク質のうち Interferon-induced GTP-binding protein Mx2 及びその相同体である Mx3 (Mx)、Guanylate-binding protein 1 (GBP) と、冷水病原菌感染により変動したタンパク質のうち Calpain-2 catalytic subunit (Cal2) を感染症早期診断バイオマーカーとして選出した。この3つのタンパク質は免疫応答に関与するタンパク質として知られており、特に Mx タンパク質ならびに GBP タンパク質はウイルス感染により血中でも増加するタンパク質である。本研究では、感染有無により変動しやすいと考えられる免疫関連タンパク質をバイオマーカーとして選出することとした。これらタンパク質の抗原部位として推測されるアミノ酸配列についてペプチドを合成し、それぞれを抗原としたポリクローナル抗体を作製することができた。

この3種類のポリクローナル抗体(抗 Mx 抗体、抗 GBP 抗体及び抗 Cal2 抗体)それぞれを用いて抗原検出 ELISA 法を開発した(図1)。開発した抗原検出 ELISA 法は、2 µg/mL 体表粘液以上の抗原を検出可能であり、その際に使用する作製したポリクローナル抗体の希釈率は抗 Mx 抗体で40倍、抗 GBP 抗体で1000倍、抗 Cal2 抗体で320倍が適当であった(図2)。人為感染試験により得られたサクラマス体表粘液を試料として、開発した ELISA 法の有効性を検証した結果、Mx、GBP、Cal2 の吸光度について、いずれも感染群と非感染群の間に統計学的有意差はなかった(図3)。以上のように本研究では、感染と非感染を区別するには精度上の問題が残った。今後は、感染及び非感染を明確に判別できるよう検出精度を向上させる必要がある。

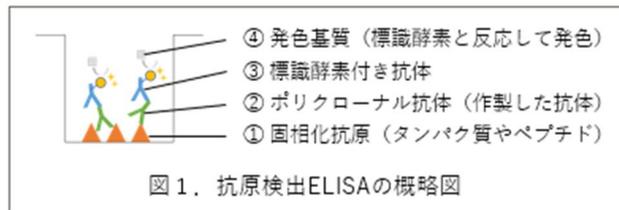


図1. 抗原検出ELISAの概略図

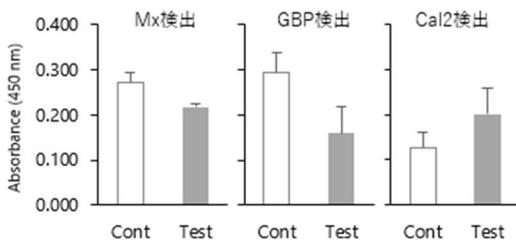


図3. 抗原検出ELISA法を用いた体表粘液中における各バイオマーカータンパク質の検出  
Cont; 非感染群, Test; 病原体感染群を示す。

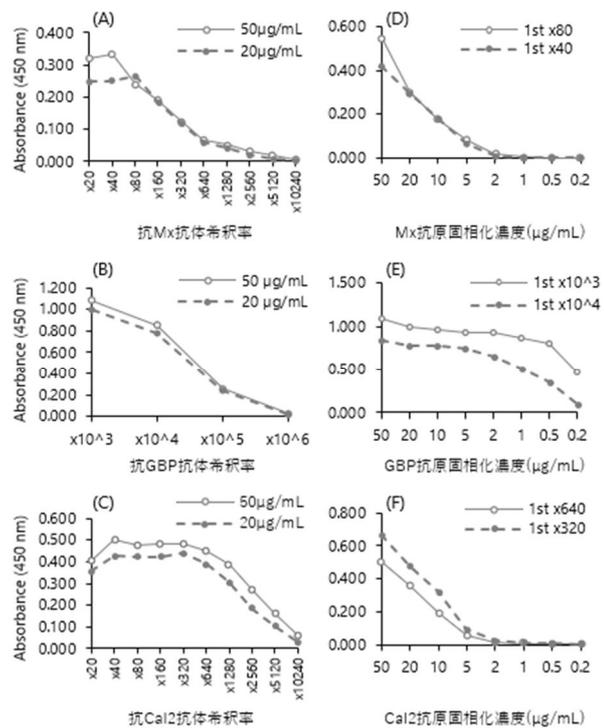


図2. 各バイオマーカーを検出する抗原検出ELISA法の条件検討

(A)~(C); 各一次抗体希釈濃度の検討, 実線および破線は抗原濃度を示す。  
(D)~(F); 各抗原検出限界濃度の検討, 実線および破線は抗体希釈率を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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