

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780182

研究課題名(和文)トラフグに寄生虫感受性をもたらすタンパク質の探索

研究課題名(英文) Screening of candidate proteins related to susceptibility of fugu to its parasite

研究代表者

田角 聡志 (Tasumi, Satoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90359646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグの鰓に寄生するがクサフグにはしない寄生虫は、トラフグ鰓に特異的に存在する分子を認識していると考え、2次元電気泳動およびサブトラクティブPCR法により、候補分子の探索を行った。2次元電気泳動の結果、種特異的に認められるスポットが複数個見つかった。LC-MS/MSにより、両者ともに9、計18スポットについて同定できた。サブトラクティブPCR法ではこれまでに計350個の候補配列を得た。細胞表面ディスプレイ法による、候補分子のさらなる絞り込みにまでは至らなかったが、今回用いた実験手法に起因する様々な問題点を洗い出すことができ、今後さらに研究を進める上での重要な基礎的知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：A monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi* parasitize gills of *Takifugu rubripes*, but not those of its relative species *T. niphobles*, suggesting that the parasite recognize molecules exclusively existing in gills of *T. rubripes*. To screen such molecules, 2D electrophoresis followed by MALDI-MS/MS analysis, and suppression subtractive hybridization (SSH) techniques were applied. By 2D electrophoresis, at least 34 species specific protein spots were found, among them 18 spots were identified. By SSH, so far 350 candidate sequences have been obtained. In this study, further screening by cell surface display has not yet been completed, however, multiple candidates have already been obtained and a various experimental problems to be solved became apparent. Knowledge obtained by this research mentioned above is helpful for further research on searching host-specificity determining molecules.

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：宿主特異性 2次元電気泳動 MS/MS トラフグ 鰓

1. 研究開始当初の背景

魚介類の疾病の中でも、寄生虫症は近年大きな問題となってきている。多くの寄生虫は特定の宿主に寄生することが知られているが、宿主特異性がどのようなメカニズムによってもたらされているのかについての詳細は不明である。寄生虫の宿主認識機構を明らかにすることは、寄生虫症の予防方策を見つけていく上で重要であると考えられる。*Heterobothrium okamotoi* はトラフグに特異性を示す単生類で、鰓弁および鰓腔壁に寄生して吸血を行い、重篤な場合斃死に至るために養殖現場で問題となっている。先行研究により、トラフグ体表粘液は他魚種よりも pH が低く、これに *H. okamotoi* が誘因されることが明らかになっている。一方、*H. okamotoi* はクサフグ、ヒラメ、マダイといった本来は宿主ではない魚種にも、実験的に暴露した直後には付着がみられる。またトラフグの場合でも本来の着定部位ではない皮膚にも付着するものの、速やかに脱落するという報告もある。これらのことから低 pH という単純な条件だけではなく、*H. okamotoi* が何らかの方法で宿主を認識し、感染を成立させていると考えられる。申請者は、虫体表面に存在するリガンドとトラフグ鰓表面に存在するレセプターとの間に特異的な結合が生じ、これが宿主特異性に関わっているのではないかと考えている。研究開始当初、細胞表面ディスプレイという新しい手法を確立させ、候補遺伝子のスクリーニングを実施していた。また、サブトラクション法を用いてトラフグおよびクサフグのどちらかの鰓でのみ発現量が多い遺伝子の探索も同時並行で行い、いくつかの候補遺伝子を得ていた。一方現所属研究機関において、遺伝学的手法により *H. okamotoi* の感染に関わるゲノム領域が絞られてきていた。今回、遺伝学的手法による研究成果を補完するとともに、分子生物学的手法では見落とす可能性のある候補分子を、2次元電気泳動法という生化学的手法を用い、タンパク質レベルでさらに探索することを発想した。

2. 研究の目的

本研究では2次元電気泳動法により、トラフグあるいはクサフグどちらかの鰓でのみ存在量の多いタンパク質の同定を目指す。遺伝学的手法によってある程度絞られている、*H. okamotoi* の感染に関わるゲノム領域に同定されたタンパク質が含まれば、有力な候補となりうる。そこで、トラフグゲノムデータベースと照らし合わせることによって、同定されたタンパク質がどのゲノム領域に位置するのかを調べる。ついで、同定されたタンパク質が実際に *H. okamotoi* 虫体表面タンパク質と結合できるかどうかを、細胞表面ディスプレイ法を用いて調べる。さらに、組み換えタンパク質が *H. okamotoi* の誘引活性を有するかどうかについても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 2次元電気泳動による鰓由来タンパク質の分離

トラフグおよびクサフグ各3個体から鰓を採取し、それぞれから EzApply 2D Kit (ATTO) を用いて泳動用のサンプルを調製した。はじめに難溶性画分由来のサンプルを pH3-10 のアガーゲルを用いた等電点電気泳動で分離し、さらに5-20%のグラジエントゲルを用いた SDS-PAGE により展開を行った。泳動後のゲルは Quick-CBB PLUS (Wako) を用いて染色し、LAS-1000 (FUJIFILM) を用いて画像の取り込みを行い、スポットパターンに個体差があるかどうかを調べた。次に、各種3個体ずつからサンプルを調製し、これらを等量ずつ混合して個体差を軽減させたものを準備し、これらを前述と同じ条件で2次元電気泳動により分離を行った。分離能を上げるために、1次元目に pH 5-8、2次元目に 12.5% または 7.5% のゲルを用いた2次元電気泳動も行った。これらのゲルを染色後、同様に画像を取り込んで種特異的に出現するスポットの探索を行った。また、泳動後のゲルからタンパク質を PVDF 膜状に転写し、CBB で染色したのも用意し、種特異的なスポットを切り出した。これらの N 末端アミノ酸配列の決定を、プロテインシーケンサーを利用して試みた。

(2) LC-MS/MS を用いたタンパク質の同定

取り込んだゲルの画像から種特異的に出現したスポットを選び、これらをゲルから切り出して 1.5 ml チューブに移した。これらのトリプシンによる消化断片を LC-MS/MS にて解析を行うことで同定を試みた。

(3) Pull-Down による、*H. okamotoi* 虫体表面タンパク質と相互作用するトラフグ鰓由来タンパク質の精製の試み

H. okamotoi の孵化幼生を集め、虫体表面のみを Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) を用いてビオチン化した。これとトラフグの鰓を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、1% Nonidet P-40、0.5% Sodium Deoxycholate) 中でホモジェナイズ後遠心分離を行い、抽出液を得た。Pull-Down は Pierce™ Pull-Down Biotinylated Protein:Protein Interaction Kit (Thermo Scientific) を用いて行った。得られた溶出画分のバッファー交換は TCA 沈殿により行った。これを2次元電気泳動に供して泳動後、画像の取り込みを行った。

(4) アフィニティーカラムを利用した、*H. okamotoi* 虫体表面タンパク質と相互作用するトラフグ鰓由来タンパク質の精製の試み

虫体表面タンパク質を含む、*H. okamotoi* 抽出液を HiTrap NHS-activated HP 1 ml カラム (GE Healthcare Life Sciences) に注入してタンパク質を担体に結合させた。これにトラフグの鰓抽出液を注入した後洗浄し、溶出バッファーで溶出した。この画分のバッファー交換は TCA 沈殿により行い、2次元電

気泳動に供して泳動後、画像の取り込みを行った。

(5) サブトラクション法

これまでに既に構築済の、トラフグ鰓においてクサフグより発現量の多い cDNA ライブラリーから新たな配列の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 2次元電気泳動による鰓由来タンパク質の分離

1次元目に pH 3-10 のアガーゲル、2次元目に 5-20% のグラジエントゲルを用いた 2次元電気泳動に供し、各種内における個体差の有無について検討を行った。その結果、いずれの種の場合でもスポットのパターンに大きな個体差は認められないことが示された(図1)。このことから、種間の比較を行う場

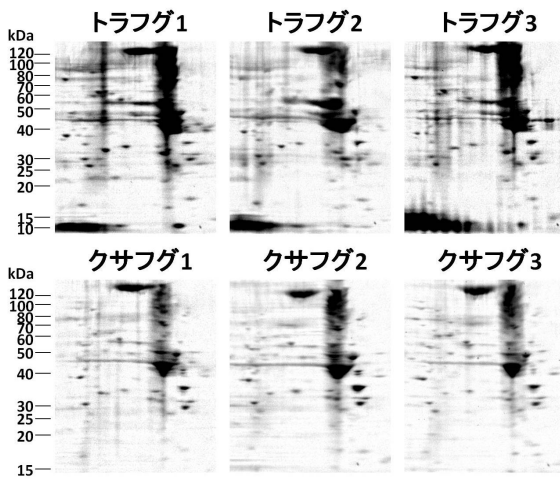


図1 異なる個体の鰓由来タンパク質の2次元電気泳動像

合には任意の個体由来のサンプル同士を用いても問題ないと考えられたが、念のため各種3個体ずつからサンプルを調製し、等タンパク質量を混合したものを用いることとした。このようにして両種のスポットのパターンを比較したところ、ほとんどのタンパク質のスポットが一致していたが、それぞれの種に特異的に認められるスポットが複数個存在することが明らかとなった(図2)。

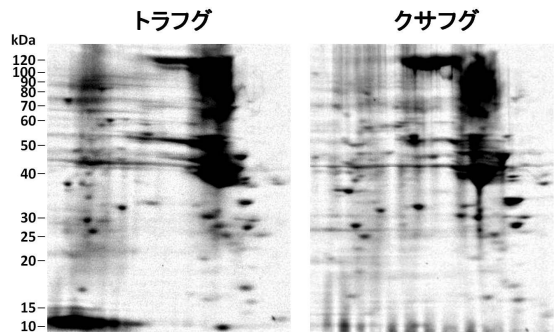


図2 鰓由来タンパク質の2次元電気泳動による種間比較

次に1次元目に pH 5-8、2次元目に 12.5% または 7.5% のゲルを用いた 2次元電気泳動によりタンパク質の分離を行った。その結果、

前者の場合トラフグ特異的な6スポット(T7、T8、T9、T10、T11、T12)、およびクサフグ特異的な6スポット(K2、K3、K4、K5、K7、K8)が確認できた(図3)。後者の場合、トラフグ

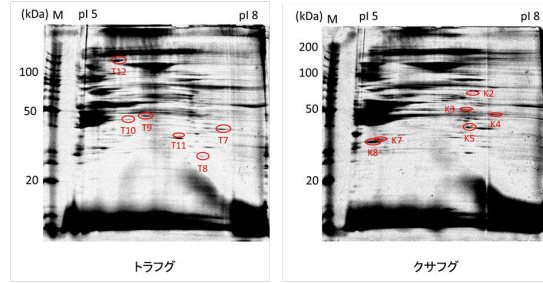


図3 1次元目: pH 5-8、2次元目 12.5%ゲルからなる2次元電気泳動による両種の鰓由来タンパク質の泳動像

特異的な4スポット(T13、T14、T15、T16)およびクサフグ特異的な6スポット(K10、K11、K12、K13、K14、K15)が確認できた(図4)。このようにゲルの pH 範囲や濃度を変え

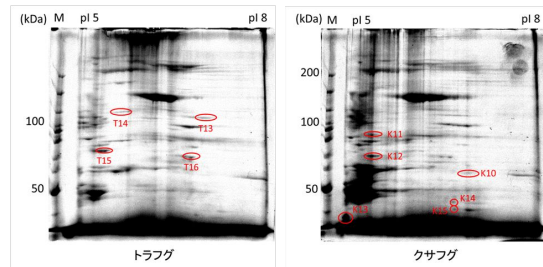


図4 1次元目: pH 5-8、2次元目 7.5%ゲルからなる2次元電気泳動による両種の鰓由来タンパク質の泳動像

ることで、注目している等電点や分子量範囲に存在するスポットの分離よくすることができ、その結果種特異的なスポットを多数見つけることができた。以上の結果から、本手法は同一組織において存在するタンパク質の種間比較や存在量に違いのあるタンパク質の探索に有効であることが示された。また、本実験で注目した pI 5 から pI 8 の範囲以外、特に塩基性側にもスポットがいくつも存在していたことから、この領域にも注目すれば新たな候補タンパク質がさらに見つけられるかもしれない。

(2) LC-MS/MS を用いたタンパク質の同定

トラフグ特異的な 13 およびクサフグ特異的な 17 スポットを切り出した。LC-MS/MS によりこれらのうち 28 スポットについては同定することができた。未発表データのため、現段階では詳細を記述できないが、いくつかの興味深い候補タンパク質を得ている。

(3) Pull-Down による、*H. okamotoi* 虫体表面タンパク質と相互作用するトラフグ鰓由来タンパク質の精製の試み

Pull-Down により得られた溶出画分を 2次元電気泳動に供したが、明確なスポットは認められなかった。用いた *H. okamotoi* のタンパク質量が少なかったからではないと考えられたため、25倍量のタンパク質を用いて再

度実験を行ったがやはり明確なスポットは得られなかった。

(4) アフィニティーカラムを利用した、*H. okamotoi* 虫体表面タンパク質と相互作用するトラフグ鰓由来タンパク質の精製の試み

アフィニティーカラムを利用することで担体容量を増やし、より多くの *H. okamotoi* 由来のタンパク質を担体上に保持することにした。今回用いた担体量は Pull-Down と比べて 100 倍となることから、得られる溶出タンパク質量も単純に 100 倍となることが期待された。しかしながらやはりスポットは認められなかった。*H. okamotoi* 抽出液中の全タンパク質に占めるリガンドの割合が極めて少ないためではないか、と考えられる。あるいは相互作用の親和性が低いため、洗浄過程で目的のタンパク質が失われてしまった可能性も考えられる。別の可能性として、リガンドがタンパク質ではなく、脂質などである可能性も考えられる。

(5) サブトラクション法

サブトラクション法ではこれまでに計 350 個の、トラフグあるいはクサフグ特異的な部分配列の候補配列を得ることができ、真の陽性と確認されたクローンも得られている。未発表データのため詳細についての記述は割愛する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 田角聡志, 山口晶, 筒井繁行, 中村修, 菊池潔, 鈴木謙. トラフグとクサフグの鰓において存在量の異なる膜タンパク質の単離. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 平成 26 年 3 月 29 日. 東京.
2. S. Tasumi, A. Yamaguchi, Y. Hirabayashi, S. Kido, K. Kobayashi, W. Kai, S. Hosoya, S. Tsutsui, O. Nakamura, H. Suetake, K. Kikuchi, Y. Suzuki. Candidate key molecule(s) determining host specificity of parasite on fugu, *Takifugu rubripes*. 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology. Jul 10 2012. Fukuoka.

〔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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: