

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292119

研究課題名(和文) マボヤ被囊軟化症の被囊軟化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of tunic softening in *Halocynthia roretzi* affected with soft tunic syndrome

研究代表者

北村 真一 (KITAMURA, Shin-ichi)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授

研究者番号：40448379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：マボヤ被囊軟化症は同養殖に被害を与えている。本課題では、被囊軟化機構を明らかにすることを目的とした。発症個体で被囊の主成分であるセルロースの分解はみられず、軟化に関与していないことが明らかとなった。次にタンパク質に注目し、被囊から筋肉層にかけてプロテオミクス解析を行ったところ、発症個体ではHR-29が最も減少していた。免疫染色を行ったところ、本タンパク質は筋肉および細胞外基質付近の細胞に局在していた。健全個体でも軟化個体でも本タンパク質の局在に違いはなかったが、発症個体では表皮細胞の配列の崩壊および細胞外基質の崩壊が観察された。本課題で新たに表皮付近に傷害が認められることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Soft tunic syndrome is a problem in ascidian aquaculture. In this study, we tried to clarify the mechanism of tunic softening. Cellulose was not decomposed in diseased ascidians. As a next step, we focused on proteins around tunic (tunic, epidermis, extracellular matrix (ECM) and muscle). Proteomic analysis was performed to identify the protein involved in tunic softening. The HR-29 stabilizing the myofibrillary structure was detected as the most degraded protein. It is cleared that the protein existed in muscle and the cells around ECM by immunohistochemistry analysis using anti-HR-29 antibody. Although the significant difference of the protein between healthy and softened individuals, we observed disturbed cell alignment in epidermis and collapse of ECM in diseased individual. In this study, we could not elucidate direct cause of tunic softening, however newly found occurrence of destruction of epidermis and ECM in softening process.

研究分野：魚病学

キーワード：マボヤ マボヤ被囊軟化症 Azumiobodo hoyamsuhi

1. 研究開始当初の背景

マボヤ(*Halocynthia roretzi*) は延喜式(927年)にも記載されている我が国の伝統的な食材で、東北地方や韓国においては、養殖が盛んに行われている。韓国におけるマボヤ養殖は日本から技術移転されたもので、その養殖量は日本の10倍以上にも増加した。しかしながら約20年前から、被囊が軟化し斃死する病気が確認され、同養殖に甚大な被害が生じている(Jung et al., 2001, The biology of ascidians. Springer-Verlag, Tokyo, 436-441)。このため、2002年以降、韓国は日本からマボヤを輸入する事態に陥っている。本症は「被囊軟化症」と呼ばれ、日本でも2007年に東北地方の一部の海域で本病が確認された。我が国では、2011年の東日本大震災でマボヤ養殖は壊滅的な被害を受けたものの、翌年には養殖が再開された。震災後、本症の発生は確認されていないが、天然マボヤでも本症の発生が認められていることから、再興が危惧されている。

被囊軟化症の原因については、感染症の側面から、いくつかのグループが究明にあたったが、病原体の確定には時間を要した。近年、宮城県産の被囊軟化個体の組織を用いて、実験的に健全なマボヤに軟化症を発症できることや、軟化個体の被囊には健全個体に認められない鞭毛虫が存在していることが明らかにされた(Kumagai et al., 2010, Dis Aquat Org, 90, 223-234)。我々は本鞭毛虫の単離培養に成功し、この培養鞭毛虫によって軟化症が生じることを実験的に明らかにした(Kumagai et al., 2011, Dis Aquat Org, 95, 153-161)。その後、本虫を新属新種の *Azumiobodo hoyamushi* として記載した(Hirose et al., 2012, Dis Aquat Org, 97, 227-235)。上記のように、本症に関する組織学的研究や原因虫に関する研究は進展がみられている。しかしながら、本症の最大の特徴である被囊の軟化メカニズムについては、全く分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本課題では、*A. hoyamushi* に感染したマボヤの被囊の軟化機構を解明することを目的とした。

I: セルロースに着目した研究

被囊の主成分がセルロースであることから、本虫がセルラーゼを分泌し、被囊のセルロースを分解することで軟化が起こると仮定し、軟化被囊と健全被囊のセルロース量および構造の違いを調べた。また、*A. hoyamushi* のセルラーゼ活性の有無を調べるとともに、セルラーゼ遺伝子の探索も行った。

II: 被囊中のタンパク質に注目した研究

被囊中のセルロースは分解されず、セルロースを架橋する未知のタンパク質が分解され、軟化が起こると仮説を立てた。まずは、*A. hoyamushi* が細胞外プロテアーゼを分泌するかどうかを人工基質を用いて明らかにし

た。一方、宿主応答の研究として、被囊(被囊-表皮-細胞外基質)のプロテオーム解析を行い、被囊崩壊に伴い減少するタンパク質を明らかにした。次に、最も減少したタンパク質の遺伝子をクローニング、大量発現し、ウサギ抗体を作製した。作製した抗体を用いて、免疫組織染色法にて健全個体と軟化個体における本タンパク質の局在の違いを調べた。

3. 研究の方法

I: セルロースに着目した研究

①被囊中のセルロース含有量

3個体の健全マボヤと軟化マボヤから50mgの被囊を切り取り、加水分解し、グルコース量を測定した。

②健全および軟化マボヤの被囊のX線回折

異なる軟化度合い(健全: n=1, やや軟化: n=2, 完全に軟化: n=3)のマボヤから被囊を切り出し、凍結乾燥後、測定用ディスクを作製し、X線回折に供した。回折ピークには、Scherrer式を用いて結晶領域を測定した。

③マボヤの各臓器と *A. hoyamushi* からのセルラーゼ検出

健全マボヤと軟化マボヤの被囊・肝臓・筋肉・消化管・血球、そして *A. hoyamushi* を磨碎し、粗抽出液を作製した。本抽出液を用いて、カルボキシメチルセルロースを基質として、セルラーゼ活性を測定した。

④ *A. hoyamushi* の expressed sequence tags (ESTs)解析

培養液で培養した本虫(定常期・対数増殖期)、海水またはマボヤの被囊抽出液で暴露した本虫の合計4つのサンプルを準備し、それぞれからmRNA抽出し、常法により、次世代シーケンサーにして発現解析を行った。

II: 被囊中のタンパク質に注目した研究

① *A. hoyamushi* からのプロテアーゼ検出

A. hoyamushi を培養し(Kumagai et al., 2011, Dis. Aquat. Org, 95, 153-161)、その培養上清をプロテアーゼ画分とした。これを7種の蛍光性ペプチド基質(MCA基質)と混合し、プロテアーゼ活性を測定した。基質にはアミノペプチダーゼ用基質1種、トリプシン用基質2種、キモトリプシン用基質2種およびエラスターゼ用基質2種を用いた。

②表皮-被囊のプロテオミクス解析

プロテオーム解析のために感染実験を行い、発症個体および未発症個体から被囊(被囊-表皮-細胞外基質)を切り出し、解析に供した。本解析はLC/MS/MSで行い、結果はMASCOTおよびBLASTXで解析した。

③HR-29タンパク質の大量発現

軟化個体で最も減少していたHR-29タンパク質の大量発現を行った。マボヤの被囊から、mRNAを抽出し、cDNAを作製した。Takagi et al. (1993, J Biochem, 113, 321-326)によって報告されているhr-29遺伝子から遺伝子全体を増幅できるプライマーを設計し、PCRを行った。得られたPCR産物を無細胞

タンパク質発現系用ベクターに組み込んだ。コムギ胚を用いた無細胞タンパク質発現系で本タンパク質を大量発現した。また、発現したタンパク質をウサギに免疫し、本タンパク質に対する抗血清を作製した。

④HR-29 タンパク質の分解実験

③で大量発現したタンパク質 10 μg を *A. hoyamushi* の培養液 1mL に加え、0, 1, 3, 5 および 7 日目に 10 μL ずつサンプリングし、本虫により、タンパク質が分解されるかどうかを調べた。タンパク質の検出は、ウェスタンブロッティングによって行った。対照区として、虫体を加えない区を設けた。

⑤HR-29 タンパク質の局在

感染実験を行い、Kitamura et al. (2010, J Fish Dis, 33, 153-160) の評価法に従い、G0 (健常)、G2 (やや軟化)、G4 (完全に軟化) の被囊を得た。本サンプルをパラホルムアルデヒドで固定し、常法により凍結切片を作製後、一次抗体 (③で作製したもの) および二次抗体 (Alexa 555 標識) で反応し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

4. 研究成果

I: セルロースに着目した研究

①被囊中のセルロース含有量

健常マボヤと軟化マボヤのセルロース含有量は、それぞれ 22.8% [w/w] および 25.4% [w/w] で差はなかった。

②健常および軟化マボヤの被囊の X 線回折

軟化度合いの異なるサンプルを用いたが、全てのサンプルで同様の回折パターンが得られた (図 1)。これらの回折パターンは、これまでに報告されている健常マボヤのセルロースパターンと酷似していた (Wada et al., Cellulose 4: 221-232)。このことから、軟化マボヤの被囊を構成するセルロースの構造は変化していないことが明らかにされた。

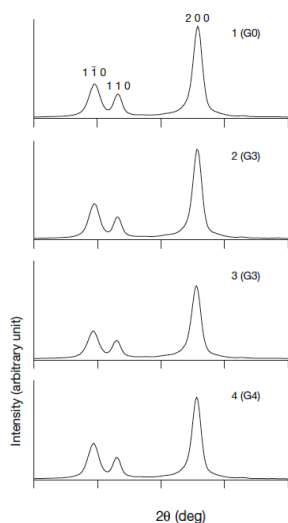


図1. 健常および軟化マボヤの被囊セルロースのエクス線回折。110, 110および200は典型的なセルロースピークを示している。G0; 健常マボヤ, G3; 発症個体, G4; 瀕死個体。

③マボヤの各臓器と *A. hoyamushi* からのセルラーゼ検出

いずれの組織および虫体からもセルラー

ゼ活性は検出されなかった (<0.01 U/mL)。

④ *A. hoyamushi* の ESTs 解析

それぞれのサンプルの約 5,000,000 リードから 12,799-16,518 の contig が得られた。BlastX で解析を行ったところ、いずれのサンプルからもセルラーゼ遺伝子は同定されなかった。

【結論】実験 I では、*A. hoyamushi* がセルラーゼを分泌し、マボヤのセルロースが分解されることで被囊軟化が誘発されると仮説を立てたが、健常マボヤと軟化マボヤのセルロース量および構造に違いはなかった。また、病原体からセルラーゼ活性およびセルラーゼ遺伝子は検出されなかった。これらのことから、被囊軟化にはセルロース分解は関わっていないことが、強く示唆された。これらの成果は、以下の [雑誌論文] 中の③として、発表した。

II: 被囊中のタンパク質に注目した研究

① *A. hoyamushi* からのプロテアーゼ検出

7 種の基質を用いて細胞外プロテアーゼの活性を測定したところ、アミノペプチダーゼおよびトリプシン用基質で活性が認められた (図 2)。特に、トリプシン用基質の 2 種で 250 nmol/L/h 以上と高い活性が示された。Z-Phe-Arg-MCA は、他の寄生虫で病原性因子として知られているカテプシン (Sajid and McKerrow, 2002, Mol. Biochem. Parasitol, 120, 1-21) などによって分解される基質であり、本基質を分解した酵素は本虫の病原性因子として重要な働きを担っている可能性が示された。

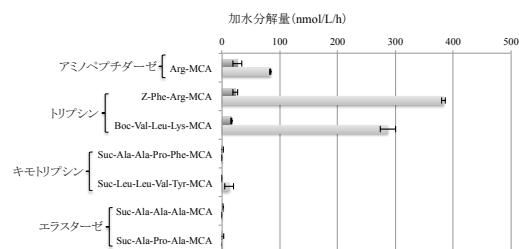


図2. *Azumibodo hoyamushi* の培養上清中のプロテアーゼ活性。上段は対照区 (培地のみ) を示し、下段は実験区を示す。対照区のプロテアーゼ活性は、牛胎児血清由来のプロテアーゼである。

②表皮-被囊のプロテオミクス解析

プロテオーム解析の結果、発症個体では筋原繊維安定化タンパク質と推定されている HR-29, アクチン, ミオシンなどの筋原繊維関連タンパク質が減少していた (表 1)。

表1. プロテオーム解析による軟化症発症個体で減少したタンパク質

ID	description	Score(Ave)		peptide (Ave)		ratio (disease/health)
		health	disease	health	disease	
gi 303227 gb 560426.1	HR-29	1368.3	50.1	23.7	1.0	0.064
gi 27372801 dbj AB086889.1	actin	1052.0	57.0	14.4	0.8	0.089
Hr-Aug-120507.5000436.g02527.TU01	vitellogenin	8781.3	786.5	110.8	14.3	0.094
GD-C103321	ATP synthase subunit gamma	341.0	0.0	4.8	0.0	0.105
GD-C114083	Calponin	373.7	6.9	7.3	0.2	0.113
GD-C125427	Myosin	376.3	7.6	7.5	0.2	0.114
Hr-Aug-120507.5000003.g00359.TU01	Myosin	367.1	13.7	6.3	0.2	0.132

③HR-29 タンパク質の大量発現

コムギ由来無細胞タンパク質発現系にて、HR-29 の大量発現実験を行った。その結果、予想される分子量である 29 kDa 付近に良好な発現タンパク質が得られた (図 3A)。本発現タンパク質をウサギに免疫し、抗体を作製した。これらの実験で得られた発現タンパク質と抗 HR-29 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行ったところ、特異的なバンドが確認できた (図 3B)。

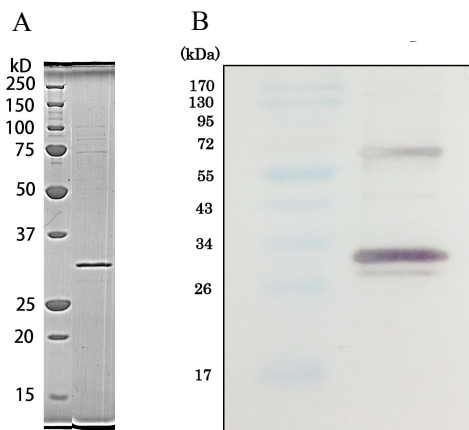


図3. HR-29タンパク質のSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングプロファイル。(A) SDS-PAGE, (B) ウェスタンブロッティング。

④HR-29 タンパク質の分解実験

HR-29 タンパク質を *A. hoyamushi* の培養液に添加し、本虫により分解されるかどうかを経時的に調べた。その結果、培養 3 日目より分解が始まり、7 日目には完全に分解された (図 4)。一方、対照区では分解は起こらなかった。このことから、本虫は HR-29 タンパク質を分解するポテンシャルを有することが明らかとなった。

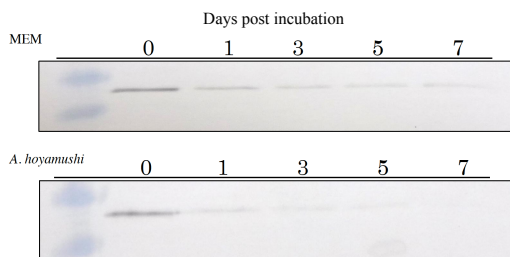


図4. *Azumiobodo hoyamushi* によるHR-29タンパク質の分解実験。本タンパク質の検出には抗HR-29タンパク質ウサギ抗体を用いた。MEMは対照区(培地のみ)を示す。

⑤HR-29 タンパク質の局在

健常個体における本タンパク質の局在を調べたところ、筋肉層で強い蛍光が認められた (図 5A)。また、筋肉と表皮間の細胞外基質に存在する細胞にも蛍光が観察された (図 5B)。これらのことから、本タンパク質は筋肉層と細胞外基質に存在することが明らかとなった。Takagi et al. (1993, J Biochem, 113, 321-326)は、本タンパク質が筋肉中に存在することを報告しているが、本課題の結果から、新たに細胞外基質にも存在することが示された。

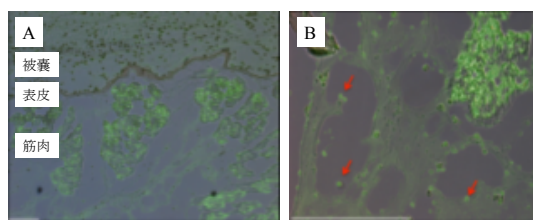


図 5. 健常個体の被囊から筋肉におけるHR-29タンパク質の局在。(A)被囊から筋肉の全体像。(B) 筋肉および細胞外基質の拡大像。免疫染色には、抗HR-29ウサギ抗体を用いた。矢印は本タンパク質を発現している細胞外基質の細胞を示す。写真は明視野と蛍光視野をmergeした。スケールバー=200 μ m。

次に、感染個体で同様の観察を行ったところ、筋肉組織に変化は認められなかったが、細胞外基質の崩壊および表皮細胞の配列の乱れが確認された (図 6)。現在のところ、これらの影響が被囊軟化とどのように関わっているかは不明であるが、これまでの病理組織学的観察により、発症個体は被囊のみに傷害が起こるとされてきたが、新たに表皮および細胞外基質にも変化が起こることが明らかにされた。

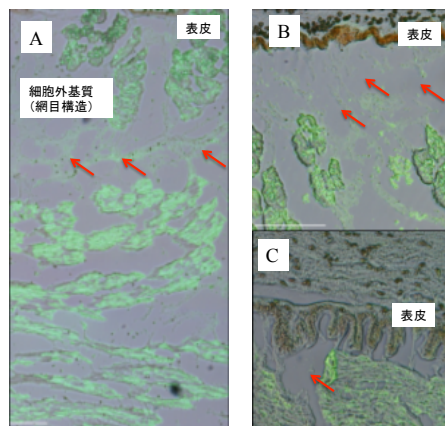


図 6. 被囊、表皮および筋肉におけるHR-29タンパク質の局在。(A)健常個体被囊、(B) やや軟化している個体、(C) 軟化個体。矢印は本タンパク質を発現している細胞外基質の細胞を示す。発症個体(B)および(C)では、細胞外基質が崩壊し、表皮細胞の配列が乱れている。写真は明視野と蛍光視野をmergeした。スケールバー=200 μ m。

【結論】

被囊軟化症の原因鞭毛虫 *Azumiobodo hoyamushi* は、カテプシン様プロテアーゼを始め、多様なプロテアーゼを細胞外に放出していることが明らかとなった。プロテオミクス解析で最も減少していたタンパク質である HR-29 タンパク質を本虫に分解させたところ、7 日目には完全に分解した。これらの実験結果から、本虫は細胞外プロテアーゼにより、宿主であるマボヤのタンパク質を分解し、栄養源としていることが示唆された。

抗 HR-29 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、細胞外基質および筋肉層に局在していたが、被囊で特異蛍光は観察できなかった。

本観察で、健常個体と軟化個体で被囊に違いは認められなかったが、図 5 のように軟化個体では、表皮と細胞外基質に損傷がみられた。特に、表皮と被囊の間に隙間が生じてい

るように思われた。そのため、プロテオミクス解析に用いたサンプルは健常個体では被囊-細胞外基質が含まれ、軟化個体ではこれらの混入がなかったと考えられ、実験結果として、細胞外基質に存在するHR-29が減少したと考えられる。

実験Ⅱでは、直接的な被囊軟化機構を解明することはできなかった。しかしながら、新規知見として、*A. hoyamushi* は細胞外プロテアーゼを産生していることや、本症を発症した個体は、被囊のみならず表皮および細胞外基質に傷害を受けることが明らかにできた。

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3件)

①Kimura S, Nakayama K, Wada M, Kim UJ, Azumi K, Ojima T, Nozawa A, Kitamura SI, Hirose E. Cellulose is not degraded in the tunic of the edible ascidian *Halocynthia roretzi* contracting soft tunic syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms*, 査読有, 116, 2015, 143-148.

②Nawata A, Hirose E, Kitamura SI, Kumagai A. Encystment and excystment of kinetoplastid *Azumiobodo hoyamushi*, causal agent of soft tunic syndrome in ascidian aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 査読有, 115, 2015, 253-262.

③Hirose E, Kumagai A, Nawata A, Kitamura SI. *Azumiobodo hoyamushi*, the kinetoplastid causing soft tunic syndrome in ascidians, may invade through the siphon wall. *Diseases of Aquatic Organisms*, 査読有, 109, 2014, 251-256.

[学会発表] (計9件)

①縄田暁・熊谷明・広瀬裕一・北村真一. 被囊軟化症原因鞭毛虫 *Azumiobodo hoyamushi* の被囊抽出液に対する走化性. 日本魚病学会, 2016年3月, 日本獣医生命科学大学, 東京都, 武蔵野市.

② Kitamura SI, Nozawa A, Koyama Y, Nakayama K, Odaka T, Yamada L, Hirose E. Proteomic analyses of soft tunic in ascidian *Halocynthia roretzi* infected with a kinetoplastid, *Azumiobodo hoyamushi*. 9th International Symposium on Fish Parasites, August, 2015. Valencia, Spain.

③Koyama Y, Nozawa A, Yamada L, Nakayama K, Hirose E, Hirao A, Murakami Y, Odaka T, Kitamura SI. Mechanisms of tunic softening in *Halocynthia roretzi* affected with soft tunic syndrome: detection of extracellular proteases

from the pathogenic parasite and proteomic analyses in soft tunic. 8th International Tunicate Meeting, July, 2015. Aomori, Japan.

④Kimura S, Nakayama K, Wada M, Kim UJ, Azumi K, Ojima T, Nozawa A, Kitamura SI, Hirose E. Cellulose is not degraded in the tunic of *Halocynthia roretzi* contracting soft tunic syndrome caused by the infectious kinetoplastid. 8th International Tunicate Meeting, July, 2015. Aomori, Japan.

⑤北村真一・野澤昭乃・仲山 慶・山田力志・澤田 均・広瀬裕一・縄田 暁. マボヤ被囊軟化症の被囊軟化機構に関する研究 ～病原鞭毛虫からのプロテアーゼ検出と軟化時に量的変化する被囊タンパク質の探索～. 日本魚病学会, 2014年9月, 九州大学, 福岡県, 福岡市.

⑥広瀬裕一. マボヤ被囊軟化症の現状と病原虫感染・分散過程について ホヤ研究会, 2014年10月, 筑波大学東京キャンパス, 東京都, 文京区.

⑦広瀬裕一・熊谷明・縄田暁・北村真一. ホヤ被囊軟化症の病原虫”ホヤムシ”はどこからマボヤの被囊に入るのか? 4学会合同沖縄大会. 2014年5月, 琉球大学, 沖縄県, 西原市.

⑧縄田暁・熊谷明・広瀬裕一. 培養下における被囊軟化症原因鞭毛虫 *Azumiobodo hoyamushi* のシスト形成及び脱シスト. 日本魚病学会, 2013年9月, 三重大学, 三重県, 津市.

⑨Kitamura SI, Nozawa A, Kumagai A, Hirose E. Soft tunic syndrome in *Halocynthia roretzi* caused by the pathogenic kinetoplastid, *Azumiobodo hoyamushi*. 7th International Tunicate Meeting, July, 2013. Naples, Italy.

[図書] (計 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

北村 真一 (KITAMURA, Shin-Ichi)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・
准教授
研究者番号：40448379

(2)研究分担者

広瀬 裕一 (HIROSE, Euichi)
琉球大学・理学部・教授
研究者番号：30241772

仲山 慶 (NAKAYAMA, Kei)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・
講師
研究者番号：80380286

山田 力志 (YAMADA, Lixy)
名古屋大学・理学部・助教
研究者番号：10551020

(3)連携研究者

()

研究者番号：