

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660174

研究課題名(和文) 寄生虫感染魚の生体反応と魚肉品質への影響解明

研究課題名(英文) Study on the biological reaction in infected fish muscle by parasites and its effect on muscle quality

研究代表者

木村 郁夫 (Ikuo, Kimura)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授

研究者番号：30443344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：魚類では寄生虫の感染により、資源量の減少や食品利用において重大な問題が発生している。寄生虫が感染した水産物を水産加工原料として利用する場合には、プロテアーゼ活性の亢進による肉の軟化や魚肉の硬化が起きる。本研究では、これら事象の発生機序について研究を行った。その結果、宿主側の生体防御機構が作用し、それが魚肉品質に影響を及ぼしていることを示す結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Parasite infection in fish causes the decrease in quantity of fisheries resources and the lower the quality of fishery food. The infected fish muscle by parasites shows the softening by the increasing protease activity or the hardening. In this study, we investigated occurrence mechanism of these events. The results showed that biophylaxis of host against parasites affected the food quality of fish muscle.

研究分野：水産食品科学

キーワード：寄生体寄生魚 Ichthyophonus hoferi トリメチルアミンオキシド TMAOase

1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染が食品学上問題となっている魚種ではパシフィックホワイティング (PW と略) が知られている。漁獲量は約 22 万トンで北米での重要魚種であるが、粘液胞子虫の *Kudoa* の感染があり、Jelly meat 現象を引き起こすことが問題となっている。冷凍すりみ生産では、プロテアーゼ阻害作用を示す卵白等を使用した対策が取られているが、寄生虫が感染した魚肉のプロテアーゼ活性が高い理由について、「寄生虫の酵素」か、あるいは「宿主の酵素」によるものかは明らかになっていない。

一方、魚肉中には水産物特有の成分としてトリメチルアミンオキド (TMAO と略) が存在している。これは浸透圧調節に関係する物質であるが、分解するとジメチルアミン (DMA と略) とフォルムアルデヒド (FA と略) が生成する。この反応に関わる TMAOase 作用を示す酵素として Aspolin が単離精製され生化学的性状が明らかにされているが、その生理的な作用については明らかにされていない。生成する FA にはタンパク質の変性作用があり、食品品質に影響すると考えられる。私たちの TMAOase に関する研究では、寄生虫感染と TMAOase 活性に着目した取組みを開始した。

2. 研究の目的

魚類では寄生虫の感染により、資源量の減少や食品利用において重大な問題が発生している。寄生虫感染を原因とした食品学的に問題となる事象を解決するためには、これら事象の発生機序を明らかにする必要がある。既存の研究では、寄生虫自体が魚肉品質に影響すると考えられてきているが、私たちの研究では、宿主側の生体防御反応が働くと、それが魚肉品質に影響する可能性を示唆する結果が得られてきている。

本研究では、寄生虫感染により発現する宿主生体防御に関連する各種生体反応の解析とそれらの反応が魚肉品質に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。具体的には、寄生体として真菌類に近縁の原生動物として分類されている *Ichthyopnus hoferi* (*Ih* と略) が寄生したニジマス、スケトウダラを試験材料として、魚体内の各組織における生体反応についてプロテアーゼ活性と TMAO の分解を指標として、発現するプロテアーゼの種類と由来の解析および TMAOase 活性の変化に影響する要因の解析を行い、魚類の生体防御反応の亢進の程度が魚肉品質・性状に及ぼす影響を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

「材料」

寄生体として *Ih* が寄生しているニジマスは国内の養鱒場にて、また、スケトウダラは米国アラスカ州にてサンプリングを行った。な

お、スケトウダラは天然の漁獲物であり、*Ih* が寄生した魚体の寄生率は非常に低いためサンプリング出来ることは希であるので、膨大な数の魚体から感染魚を検出した。これを急速凍結し、-25 あるいは -30 保存し必要ときに解凍して試験に供した。組織としては普通筋あるいは腎臓を使用した。試料魚の *Ih* 感染については、顕微鏡観察による *Ih* 多核球状体の有無により判断した。感染度は、組織の一部を顕微鏡で観察して測定した。即ち、腎臓および普通筋の一部をリング付きスライドグラスにとり、カバーグラスで軽く圧平し、顕鏡して直径 10mm のリング内に観察される *Ih* 多核球状体数を測定した。

「プロテアーゼ活性測定法」

1) 自己消化法

魚肉のプロテアーゼ活性は自己消化法で測定した。即ち、冷凍魚肉を半解凍後、細断し氷冷下で 4 倍量の 0.1M KCl, 20mM Tris-HCl (pH7.0) 溶液を添加してホモジナイズした。ホモジネート 0.9ml に各 pH buffer (0.5M 酢酸-酢酸 Na : pH4, 4.5, 0.5M Tris-maleate : pH5,6,7, 0.5M Tris-HCl : pH7.5) を 0.1ml 加え、0 または 30 で加熱処理した。反応液 1ml に 15% トリクロロ酢酸を 0.5ml 加え酵素反応を止めた。失活させた溶液を遠心分離し得られた上清についてフェノール発色法にて発色し、660nm の吸光値を測定した。

2) 粗酵素活性測定法

腎臓のプロテアーゼ活性は、以下の方法で粗酵素を抽出後、カゼインを基質として測定した。即ち、ニジマスの腎臓を半解凍後、氷冷下で 19 倍量の 0.1M KCl, 20mM Tris-maleate (pH7.0) 溶液を添加してガラス製ホモジナイザーでホモジナイズし、これを 8,000rpm 15 分間遠心分離し上清を得た。この上清 0.2ml に 0.6% カゼイン溶液を 1.2ml、各 pH buffer (0.5M 酢酸-酢酸 Na : pH4.0, 4.5, 0.5M Tris-maleate : pH5.0, 6.0, 7.0, 0.5M Tris-HCl : pH7.5) を 0.2ml、蒸留水を 0.4ml 加え全量を 2ml とし、30 で 0、120 分間処理をした後、1ml を取り出し 15% TCA 0.5ml を加えて酵素反応を止めた。これを遠心分離にかけ得られた上清について、フェノール発色法により TCA 可溶性窒素量を測定し、プロテアーゼ活性を求めた。酵素活性の単位は 1 時間で 1 μ g の L-チロシンに相当する非タンパク性フェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性を 1 単位とした。本研究では魚肉あるいは腎臓 1g 当たりの活性を表すこととし Unit/g として表記した。

「TMAO、トリメチルアミン (TMA)、DMA の定量」

細かく刻んだ組織を 5g 秤量し、蒸留水 5mL、10% (w/w) トリクロロ酢酸 (TCA) 10mL と共に氷冷下でホモジナイズし、遠心分離を行った。上清を回収し、沈殿に 5% TCA 5mL を加えて攪拌し、再び遠心分離を行う操作を 2 回繰り返した。回収した上清に

5%TCA を用いて 25mL にメスアップし、TCA 抽出物とした。得られた TCA 抽出物について TMAO、TMA、DMA 濃度の測定を行った。TMAO と TMA の定量は Dyer らの方法¹⁾に基づいて行った。DMA の定量は銅-ジメチルカルバメート法に準じて定量した。²⁾

「TMAOase 活性の測定」

筋肉の TMAOase 活性については、筋原線維フラクションに吸着された状態となることが Kimura らにより報告されているので、³⁾これらの報告に準じて、筋原線維を調製し、その画分の TMAOase 活性を測定した。

腎臓組織については TMAOase 酵素の存在状態が不明であるため、筋原線維を調製する代わりに、腎臓組織に対して 9 倍量の 0.1M NaCl, 20mM Tris-acetate(pH 7.0)溶液でホモジナイズしたものを腎臓ホモネートとし、TMAOase 活性測定に供した。

酵素反応液 (終濃度 20mM TMAO, 20mM Tris-acetate (pH7.0), 2mM Cysteine, 2mM Ascorbate, 0.2mM FeCl₂) 溶液に筋原線維あるいは腎臓ホモネートを加えて、25℃にて反応させ、一定時間毎に一定量の反応液に対して等量の 5%(w/w) TCA を添加して反応を停止した。TCA により反応停止した液について銅ジメチルカルバメート法により DMA 生成量を定量し、単位時間 (分) 当たり生成した DMA 量 (μ moles) から TMAOase 活性を算出した。

4. 研究成果

「IH 感染ニジマス」

IH に感染したニジマスを図.1 に示した。特徴として眼球突出、腹部肥大、皮膚の黒色変化が認められた。感染魚の筋肉の色は正常魚に比べ白色に変化し、また、腎臓は肥大化して褐色を帯び、白点の形成を示した。(Fig. 2) Fig.3 に腎臓及び筋肉組織中に認められた IH 多核球状体の顕微鏡像を示した。IH の胞子は厚い細胞壁を有した多核球状体の特徴としている。



Fig. 1 IH 感染したニジマスの外観

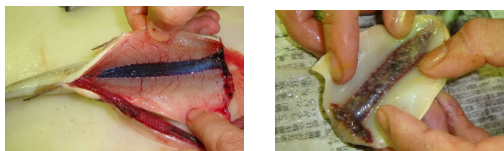


Fig. 2 正常魚(左)および IH 感染魚(右)の筋肉と腎臓

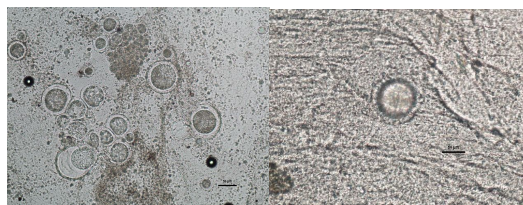


Fig. 3 IH 多核球状体 (左図 腎臓)(右図 筋肉)

なお、正常ニジマスでは、IH 多核球状体は認められなかった。IH 感染魚の筋肉および腎臓組織に観察された IH 多核球状体を計数した結果を図.4 に示した。IH 多核球状体数は、腎臓組織の方が筋肉に比べて圧倒的に多い結果を示した。腎臓での孢子数が多い場合は筋肉中の数も多くなる傾向はあるものの、検出数が 0 と少ない場合も認められた。また、IH 孢子数にバラつきがあり、使用した魚体ごとに IH 感染ステージが異なるものと推察した。

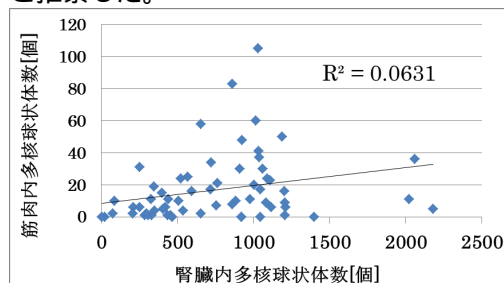


Fig. 4 腎臓と筋肉内における IH 多核球状体数の関係

「IH 感染ニジマスの筋肉内非タンパク体素とプロテアーゼ活性」

Fig.4 に示したように、腎臓に IH 多核球状体が検出されても、筋肉に検出されない場合がある。そのような場合でも筋肉の状態は Fig.2 に示した白色を帯びたものとなっている。筋肉成分の特長として、筋肉内非タンパク体素量を比較すると、正常筋肉ではチロシン換算で約 100μg/g に対して、感染魚では約 2 倍の濃度を示していた。ただし、この値は筋肉内 IH 多核球状体数とは相関せず、感染が認められると変化することを示した。また、筋肉内のプロテアーゼ活性についても、IH 感染により活性は高くなる傾向を示すが、筋肉内の IH 多核球状体数との明確な相関は認められなかった。以上の結果は、IH 感染により、筋肉内の IH 多核球状体そのものがプロテアーゼ活性を高めるといよりは、宿主側の生体反応としてプロテアーゼ活性が高まることを示唆していると考えられる。

「IH 感染ニジマスの腎臓プロテアーゼ活性」

ニジマス腎臓のプロテアーゼ活性は非常に高い値を示すが、Fig.5 に IH 感染したものと正常にニジマスの腎臓プロテアーゼ活性の pH 依存性を示した。IH 感染魚の腎臓プロテアーゼ活性の pH 依存性は正常魚と異なり、

正常魚で活性が認められる pH 5 でより高い活性を示し、また、pH 6~7.5 で新たに強い活性が確認された。pH5 では pepstatinA、pH 7 では EDTA でプロテアーゼ活性が阻害された。アスパラギン酸系および金属系プロテアーゼが活性化したと推察される。ゼラチンを基質としたザイモグラフでは、*Ih* 感染魚だけに見られる 4 バンドが認められ、また、この内 3 バンドは EDTA で酵素反応が阻害された。感染魚に特有の金属プロテアーゼ (3 種) の存在が示唆された。今後これらのプロテアーゼについて更に検討を進める予定である。

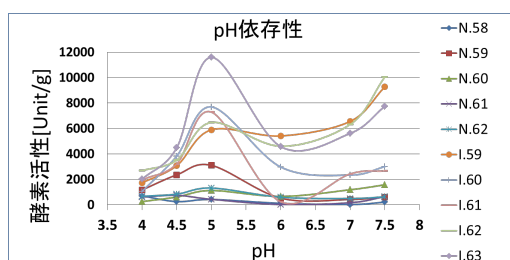


Fig.5 ニジマス腎臓プロテアーゼ活性の pH 依存性に及ぼす *Ih* 感染の影響

「*Ih* 感染スケトウダラ」

Fig.6 に *Ih* 感染スケトウダラのフィレの写真を示した。ニジマスの場合とは異なり筋肉内にシストを形成している。ただし、*Ih* 多核球状体の形態は Fig.3 と同様である。

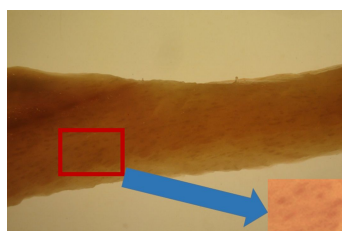


Fig.6 *Ih* 感染スケトウダラフィレ

「*Ih* 感染スケトウダラの TMAO 関連成分変化および TMAOase 活性」

スケトウダラの場合、筋肉中の TMAO 含量は約 60 mM/kg であるが、*Ih* 感染により TMAO の減少と DMA 濃度の上昇が確認された。この変化は *Ih* 多核球状体数を指標にした感染程度と相関する傾向を示した。更に、*Ih* が感染したスケトウダラ筋肉中の TMAOase 活性も上昇し、その上昇の程度は *Ih* 感染度と相関する傾向を示した。

以上の結果は、*Ih* の感染により TMAO の分解が増大することを示唆しており、TMAO 分解物の FA が生体防御を作用を示す成分の一つとして重要な働きをしていると推察している。

< 引用文献 >

Takeuchi K, Hatanaka A, Kimura M, Seki N, Kimura I, Yamada S, and Yamashita S. Aspolin, a Novel Extremely Aspartic Acid-rich Protein in Fish Muscle,

Promotes Iron-mediated Demethylation of Trimethylamine -N-oxide. *J. Biol. Chem.* **278**, 2003, 47416-47422

Kimura M, Takeuchi K, Kimura I, and Seki N. The existence of aspolin and its trimethylamine-N-oxide demethylating activity in the muscle of freshwater fish. *Fisheries Science.* **71**, 2005, 904-913

Kimura I, Nasu M, Ito G, Satake M, Graves D, Kogeichi Y, Ogawa K, Watabe S. Protease activity in walleye Pollock muscle which has been infected by parasites. *Fisheries Science.* **68**, 1994, 1549-1552

Kimura M, Kimura I, and Seki N. TMAOase, trimethylamine-N-oxide demethylase, is a thermostable and active enzyme at 80 °C. *Fisheries Science.* **69**, 2003, 414-420

Dyer WJ, Dyer FE, Snow JM, Amines in fish muscle.V. Trimethylamine oxide estimation. *J. Fish. Res. Board Can.* **8**, 1952, 309-313

Dyer WJ, Amines in fish muscle. I, Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J. Fish. Res. Board Can.* **6**, 1945, 351-358

Dyer WJ, Mounsey YA, Amines in fish muscle.II. Development of trimethylamine and other amines. *J. Fish. Res. Board Can.* **6**, 1945, 359-367

Kimura M, Seki N, Kimura I. Occurrence and some properties of trimethylamine-N-oxide demethylase in myofibrillar fraction from walleye Pollock muscle. *Fish. Sci.* **66**, 2000, 725-729

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Mami Akatsuka, Sanae Kato, Atsushi Yamamoto, Ikuo Kimura, The influence of protozoan infection on TMAOase activity in fish, The 22nd International congress of Zoology, 2016年11月17日 沖縄県宜野湾市 Okinawa convention center.

赤塚麻美、山本 淳、木村郁夫、寄生体感染が魚類 TMAOase 活性に及ぼす影響、平成 28 年度日本水産学会春季大会、平成 28 年 3 月 27 日、東京都港区 東京海洋大学(品川キャンパス)

山本 侑、山本 淳、木村郁夫、*Ichthyopnus hoferi* に感染した魚類の Aspolin 酵素に関する研究、平成 26 年度日本水産学会九州支部大会、2015 年 1 月 10 日、宮崎県宮崎市 宮崎市市民プラザ。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 郁夫 (KIMURA, Ikuo)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授
研究者番号：30443344

(2)研究分担者

山本 淳 (YAMAMOTO, Atsushi)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授
研究者番号：00336330

(3)連携研究者

加藤 早苗 (Kato, Sanae)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教
研究者番号：80291061

(4)研究協力者

戸田 萌 (Toda, Moyuru)
山本 侑 (Yamamoto, Tasuku)
赤塚 麻美 (Akatsuka, Mami)
岩切 友絵 (Iwakiri, tomoe)
鹿児島大学大学院水産学研究科学生
緒方 由美 (Ogata, Yumi)
鹿児島大学水産学部研究員