

高濃度アスコルビン酸投与に伴いヒラメ皮膚組織で発現上昇する ヘモグロビン β 鎖の研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源生産科学専攻 博士後期課程

森 美 里

論文内容の要約

魚類養殖における魚病対策としては、飼育機材や発眼卵の消毒、親魚の保菌検査、抗生物質や合成抗菌剤による薬剤治療、および水産用ワクチンや免疫賦活剤による予防がある。しかし、薬剤治療や水産用ワクチンは薬機法に基づいて対象魚種や対象疾病が厳格に定められており、使用できないケースも多くみられる。このような状況を背景に、特に水産用ワクチンの代替として、魚類の自然免疫を向上させる免疫賦活剤が注目されており、これまでにビタミン、多糖類、ラクトフェリンなどの物質において免疫賦活効果が報告されている。所属研究室でも、抗酸化物質の一種であり、安価で安全性の高いビタミンC（アスコルビン酸：以後、AsA）を過剰量配合飼料に展着して与える高濃度投与方法の研究を進めてきた。同投与方法は魚体の高水温耐性や複数の魚病に対する抗病性向上効果が確認されているが（Ishikawa *et al.*, 2011; 2012; 2013）、他の免疫賦活剤と同様、有効機序については不明な点が多い。

そこで本研究では、重要養殖魚種であるヒラメ *Paralichthys olivaceus* を供試魚として、高濃度 AsA 投与が、魚類の重要な生体防御器官の一つである皮膚組織に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。最初に、同投与を施したヒラメの皮膚粘液を対象としてプロテオーム解析を行ったところ、皮膚組織においてヘモグロビン β 鎖 (Hbβ) の発現増加を確認した。同因子は赤血球に豊富に含まれ、ヘモグロビン α 鎖と 4 量体を形成し、鉄分子を介して酸素運搬に関わるタンパク質である。近年、Hbβ は赤血球以外でも発現が確認されており、酸素保持、オピオイド様活性、および抗菌活性等の多様な機能が報告されている。本研究では、ヒラメにおける同因子の各種飼育環境下における発現動態を調べ、皮膚組織における発現・分泌細胞を特定した。また、その分解産物（ペプチド）が抗菌活性

を有することを明らかにし、Hb β が高濃度 AsA 投与に伴うヒラメ皮膚組織の免疫能向上に重要な役割を果たしている生体防御因子の一つであると結論したので報告する。

配合飼料 1 kg 当り AsA 2,000 mg を展着した配合飼料を 7 日間ヒラメに与え、Subramanian *et al.* (2007)の報告に従い皮膚粘液を採取した。2D-PAGE 解析を行ったところ、AsA 投与魚特異的に複数のスポットが確認された。各スポットを切り出して LC-MS/MS 解析を行った結果、生体防御因子として報告されている serotransferrin、transferrin、apolipoprotein A-1、warm temperature acclimation related protein 65 kDa、complement component 3、および Hb β と同定された。また、より網羅的に皮膚粘液を解析するため、同一条件で得たヒラメ皮膚粘液を用いて SDS-PAGE を行い、nanoLC-ESI-MS/MS 解析により含有タンパク質の同定ならびに半定量解析を行ったところ、AsA 投与魚において、上記全ての因子またはそのペプチドの有意な増加が確認された。

そこで、高濃度 AsA 投与を行ったヒラメから表皮（有眼側）、鰓、腸管、腎臓、脾臓、および肝臓組織を採取し、リアルタイム PCR（qRT-PCR）法により各因子の発現解析を行った結果、Hb β のみで表皮組織で有意な発現の上昇が認められた。また、Hb β 特異的プローブを用いて *in situ* hybridization（ISH）を行ったところ、表皮層および真皮層を構成する 4 種類の細胞で Hb β の発現を確認した。いずれの細胞も AsA 投与により発現が増加しており、特に表皮組織の基底膜に局在する表皮細胞において、AsA 投与に伴い強いシグナルが確認された。これらの結果は、ヒラメにおける高濃度 AsA 投与では皮膚組織の表皮細胞が影響を受け、Hb β を含む複数の生体防御因子が皮膚粘液中で増加することを示唆している。

LC-MS/MS 解析や nanoLC-ESI-MS/MS 解析において、高濃度 AsA 投与に伴い皮膚粘液中で増加した Hb β の機能推定を目的として、飼育実験を行った。すなわち、ヒラメを供試魚として、昇温ストレス、エドワジエラ症原因細菌 *Edwardsiella piscicida* による人為感染、および高濃度 AsA またはラクトフェリン（LF）を展着させた配合飼料を与える免疫賦活剤投与、の 3 系統の飼育実験を行い、経時的に魚体を取り上げ、粘膜組織（表皮、鰓、腸管組織）を採取して Hb β の qRT-PCR 解析を行った。

飼育水温を 20 から 30°C に上昇させた結果、全ての粘膜組織において Hb β の発現は減少傾向を示

し、昇温 24 時間後の鰓組織において有意な減少が確認された。ISH により同時間の鰓組織を観察したところ、昇温させた魚体の 2 次鰓弁の上皮細胞ではシグナルが消失していた。*E. piscicida* 菌液中に魚体を浸漬させることにより実施した人為感染では、感染 3 時間後の表皮組織において *Hbβ* の有意な発現上昇が確認された。ISH により同時間の表皮組織を観察したところ、基底膜上の表皮細胞において強いシグナルを示す細胞が増加した。免疫賦活剤投与では、非展着飼料を対照として、高濃度 AsA では配合飼料 1 kg 当り AsA 500~10,000 mg の間で 5 段階、LF では 100 または 1,000mg の 2 段階の濃度設定を行い、3~14 日間投与を行った。結果として、高濃度 AsA では 500mg 以上で、LF はいずれの濃度でも *Hbβ* 発現の有意な上昇がみられた。そこで、両免疫賦活剤ともに、高い *Hbβ* 発現を示したヒラメから皮膚組織を採取して ISH を行った結果、対照魚と比較して表皮層の基底膜に局在する表皮細胞において強いシグナルが観察された。

急激な水温変動はストレスとなり、魚体の免疫能低下をもたらすことが指摘されている。鰓組織は主要な感染門戸でもあり、昇温に伴い認められた鰓組織の *Hbβ* の発現量の著しい低下は、上記を裏付けるものである。また魚類の皮膚粘液中に含まれる生体防御因子の多くは、人為感染後、病原体の付着・侵入に対して一時的に分泌量や活性が上昇することが知られている。*Hbβ* の発現も人為感染後、一時的に上昇したことから、同因子がヒラメの皮膚組織における主要な生体防御因子として機能しているものと推察された。免疫賦活剤の飼育試験で用いた高濃度 AsA およびラクトフェリンは、ともに魚類において最も安定した効果を示す免疫賦活剤である。高濃度 AsA は 1 kg 配当飼料当り 2,000~5,000 mg 以上、LF は 100 mg 以上の展着で 1 週間以上投与することにより効果が認められるが、皮膚組織における *Hbβ* の発現も、AsA では 2,000 mg 以上で、LF では 100 mg 以上で同因子の発現がプラトーに達したことから、皮膚組織から分泌される *Hbβ* は魚体の抗病性を左右する主要な生体防御因子であると考えられた。

ヒラメの皮膚粘液の LC-MS/MS 解析および nanoLC-ESI-MS/MS 解析において、イシビラメ *Scophthalmus maximus* の *Hbβ* の C 末端に相同する配列 ¹³⁵FLAVVVSALGRQYH¹⁴⁸ が、高濃度 AsA 投与魚において有意に増加した。*Hbβ* の抗菌活性部位については複数の生物種で研究が行われており、C 末端側に抗菌活性を示す領域があることが報告されている。そこで、ヒラメの *Hbβ* 配列を決定し、

抗菌活性を示す他の生物種の Hb β のアミノ酸配列と比較することで、ヒラメ Hb β 由来の抗菌活性を有するペプチドとして ¹¹⁵AAKFGPSVFTADAQEAWQKFLAVVVSALGKQYH¹⁴⁸ を人工合成した(以後、Hb β 33)。Hb β 33 の抗菌活性は、トリフルオロ酢酸に溶解した Hb β 33 を グラム陰性またはグラム陽性の魚病細菌懸濁液に加え、20°Cで6時間インキュベートし、水溶性テトラゾリウムである WST-8 を添加し、さらに 20°Cで2時間インキュベート後、A₄₅₀ を測定することにより評価した。結果として、Hb β 33 はグラム陰性菌では *Escherichia coli*、*Aeromonas veronii*、*Vibrio anguillarum*、*Edwardsiella piscicida*、および *E. ictalurii* に対して、グラム陽性菌では *Lactococcus garvieae* および *Streptococcus iniae* に対する抗菌活性を示した。これらの結果は、AsA 高濃度投与したヒラメの皮膚組織の表皮細胞で発現・分泌が亢進した Hb β 由来の抗菌ペプチドが、体表面上での魚病細菌の増殖抑制に寄与していることを示している。

Hb β は酸素運搬機能を有するヘモグロビンを構成するサブユニットの一つであり、その分解産物は多様な生理活性を有することが知られている。なかでも、抗菌活性については、哺乳類から魚類までの多様な生物種において報告されている。本研究では、明瞭な免疫賦活効果が確認されている高濃度 AsA や LF 投与を行ったヒラメ皮膚組織において、Hb β の発現・分泌が上昇することを明らかにした。同因子の人工ペプチドを用いて、抗菌スペクトルを確認したところ、グラム陰性菌5種、グラム陽性菌2種に対して抗菌活性を示したことから、皮膚組織における Hb β は重要な生体防御因子であるものと考えられた。一方、ストレス環境下では発現の減退が認められたことから、免疫賦活剤やストレス研究などの評価指標となることが期待される。