

# 論文審査及び最終試験結果報告書

論文提出者氏名：澁谷 航

論文題目：トラフグ粘液ケラチンの生体防御機能に関する研究

## 審査の概要：

魚類の皮膚粘液は感染性微生物の侵入を防ぐ重要な障壁である。粘性を持つ液体として付着する異物を洗い流す物理的障壁であるだけでなく、様々な防御物質を保持する化学的障壁でもある。

魚類の皮膚粘液中には、細胞骨格タンパク質であるケラチンが含まれていることがいくつかの魚種で報告されている。ケラチンは非常に多様な分子で、等電点により酸性ケラチン（タイプⅠケラチン）と中～塩基性ケラチン（タイプⅡケラチン）に分類される。細胞内ではタイプⅠケラチンとタイプⅡケラチンが会合して二量体を形成し、二量体がさらに重合を繰り返すことでケラチンフィラメントが形成される。

ケラチンの細胞外での働きはほとんど知られておらず、魚類の皮膚粘液中のケラチンの働きもこれまで注目されてこなかった。本論文は魚類皮膚粘液中のケラチンが微生物に対する防御因子として機能しているという仮説を立て、その証明に取り組んだものである。

第一章では、トラフグの皮膚に発現するケラチン遺伝子及び粘液中に存在するケラチン分子を網羅的に検索した。まずトラフグゲノムデータベース上に登録されているケラチン遺伝子を抽出し、それらの発現を逆転写 PCR で調べた。さらにハリエニシダレクチン(UEA-I)がトラフグ粘液細胞と特異的に結合することから、凍結切片上で UEA-I を反応させたレクチン染色を行い、粘液細胞を多く含む UEA-I 陽性領域と含まない陰性領域をレーザーマイクロダイセクション法で切り取り、両者における発現を確認した。その結果、タイプⅡケラチンである Tr-K4 を含むいくつかのケラチン遺伝子が前者で特異的に発現していることを確認した。

次に皮膚粘液を可溶性画分と不溶性画分に分離し、二次元電気泳動に供した。さらに魚類ケラチンと交叉反応を示す抗ヒトケラチン抗体(AE1/AE3)を用いたウェスタンブロッティングでケラチンを検出し、陽性スポットを LC-MS/MS 解析に供した。その結果、可溶性画分にタイプⅡケラチン Tr-K4 と 4 種類のタイプⅠケラチンのアミノ酸配列が認められ、トラフグ皮膚粘液には少なくとも 5 種類のケラチンが可溶性の状態で存在することが示された。またこの 5 種類のケラチンのうちの 4 つは上述の UEA-I 陽性領域で発現していた。

第二章ではケラチンの真菌に対する作用を調べた。粘液可溶性画分を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と反応させたのち、酵母と結合したタンパク質を尿素で溶出、ウェスタンブロッティング及び LC-MS/MS 解析に供した。その結果、Tr-K4 を含む少なくとも 3

種類のトラフグケラチンが酵母と結合することが分かった。また、トラフグ皮膚粘液と酵母を混合し、静置すると、酵母の凝集塊が観察された。蛍光抗体法により、凝集した酵母の表面にケラチンの存在が認められた。次に Tr-K4 の組み換え体を作製し、抗 Tr-K4 ウサギ抗体を作製した。この抗体を粘液可溶性画分と反応させたのちに酵母に加えたところ、凝集が阻害されたことから、Tr-K4 は酵母の凝集に関わることが明らかになった。

さらにトラフグ皮膚粘液可溶性画分と酵母を混合すると、凝集塊以外に、酵母を取り込んだ不溶性の塊が観察された。これを分離、溶解してウェスタンブロッティング及び TOF/MS 解析を行ったところ、不溶性塊の主成分はケラチンであることが分かった。さらに抗ケラチン抗体を用いた蛍光抗体法では不溶性塊全体から明瞭な陽性シグナルを得た。以上の結果から、ケラチンは酵母を凝集するのみならず、不溶性塊に封じ込めるという、ユニークな作用を持つことが分かった。

第三章では、ケラチンの細菌に対する作用を調べている。4 種類のグラム陰性細菌及び 2 種類のグラム陽性細菌とトラフグ皮膚粘液を反応させ、細菌に結合したタンパク質を溶出した。ウェスタンブロッティングにより上記 6 種類のうち 5 種類の細菌の溶出画分からケラチンが検出され、ケラチンがこれらの細菌に結合することが示された。次に皮膚粘液からケラチンを粗精製した。この画分と各種細菌を混合したところ、すべての細菌が凝集した。以上の結果から、トラフグ皮膚粘液ケラチンは細菌に対する凝集活性を持つことが示唆された。





ケラチン粗精製画分に対しては最も強く凝集の見られた *Vibrio anguillarum* と組み換え体 TrK4 を反応させたところ、凝集は見られなかった。しかしウェスタンブロッティングにより *V. anguillarum* に Tr-K4 が結合することが確認された。このことから、Tr-K4 は単独で細菌と結合しうるが、凝集にはさらに他の分子が必要であることが示唆された。凝集にはおそらくタイプ I ケラチンと重合することが必要なのではないかと考察している。

ケラチンは細胞骨格分子として知られている。ケラチンフィラメントは難溶性で、アクチンフィラメントや微小管のような極性もないため、ケラチンは一般に動的な要素に乏しいタンパク質と考えられている。また細胞外での働きはほとんど知られていない。本論文は、そのケラチンが粘液中で防御因子として働くという大胆な仮説の証明を試みたものである。その結果、トラフグ皮膚粘液ケラチンは真菌、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌という幅広い微生物に対して防御因子としての活性を有することを明瞭に示した。また酵母を不溶性の塊に封じ込めるという、極めてユニークな作用も発見した。これまで魚類の皮膚粘液に存在することが知られていながら、その働きを見逃されていたケラチンの新たな存在意義を明らかにした画期的な研究であり、博士論文にふさわしい内容であると判断できる。

2020 年（令和 2 年）1 月 27 日に実施した最終試験においては、論文の内容ならびに関連分野について、本人が学位を受けるために必要十分な学識並びに学力を持つことを認め、合格と判定した。以上の結果から、審査員一同はこれを北里大学・博士（水産学）の学位を授与

するに値すると判定した。

論文審査担当者：

主査	北里大学	教授	高橋明義	
副査	北里大学	教授	天野勝文	
副査	九州大学	教授	中尾実樹	
副査	北里大学	准教授	神保	
副査	北里大学	准教授	高田健太郎	