

論文内容要旨

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

指導教員 中村修 准教授

要 旨

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。粘性を持ち、物理的な障壁として働くだけでなく、レクチンや抗菌ペプチドなど、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。ケラチンは細胞骨格である中間径フィラメントを形成するタンパク質である。非常に多様な分子であり、それらは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。タイプⅠケラチンとタイプⅡケラチンが二量体を形成し、この二量体がさらに重合を繰り返して頑丈なケラチンフィラメントを構築する。

魚類の皮膚粘液に存在するケラチンの役割はこれまでほとんど注目されていなかった。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の皮膚粘液から見つかった抗菌物質 Tr65 がケラチンと同一とされたのが唯一の報告であるが、続報はない。

筆者は皮膚粘液中のケラチンは防御因子として働くのではないかと考えた。この仮説を証明するために、トラフグ *Takifugu rubripes* を対象に、皮膚粘液に含まれるケラチンの微生物に対する防御因子としての役割を調べた。第一章ではトラフグケラチンの分布を網羅的に調べ、表皮で発現するケラチン遺伝子および粘液に存在するケラチンを同定した。第二章では真菌である酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、第三章では複数種の細菌に対する粘液ケラチンの作用を調べ、トラフグ粘液ケラチンの微生物に対する作用を明らかにした。

第一章 トラフグの皮膚に発現するケラチンの網羅的解析

トラフグ皮膚粘液ケラチンの機能解析を目指すにあたり、まず、皮膚粘液に含まれるケラチンおよび表皮で発現するケラチンを網羅的に調べる必要がある。そこで、トラフグ

ノムデータベースにケラチンとして登録されていた各遺伝子の組織発現を PCR 法により調べた。

トラフグゲノムデータベースにケラチンとして登録されていた遺伝子は 21 種類あり、系統解析の結果、16 種類がタイプ I、5 種類がタイプ II ケラチンに分類された。それぞれに特異的なプライマーを作製し、PCR をおこなった結果、調べた全ての組織に複数種類のケラチン遺伝子が発現していることが明らかとなり、ケラチンが上皮組織にしか存在しない哺乳類と異なり、魚類ではケラチンの分布が広く複雑であることが示された。表皮では 12 種類のタイプ I ケラチンと 3 種類のタイプ II ケラチンが発現していた。

さらにハリエニシダレクチン *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) がトラフグ表皮において粘液細胞と特異的に結合することから、トラフグ皮膚切片に UEA-1 を用いたレクチン染色を施し、レーザーマイクロダイセクション法を用いて粘液細胞を多く含む UEA-1 陽性領域と、含まない UEA-1 陰性領域を別々に回収し、cDNA を作製してケラチンの遺伝子発現を比較した。その結果、krt95 (201-203)、krt95 (204-206)、krt222、Tr-K4 の 4 種類は UEA-1 陽性領域でのみ発現が見られた。粘液細胞は表層部に多いことから、これらのケラチンは粘液細胞または表層の上皮細胞でのみ発現していることが示唆された。

次に、皮膚粘液に含まれるケラチンの同定を試みた。トラフグ皮膚粘液を可溶性画分と不溶性画分にわけ、それぞれを二次元電気泳動に供した。抗ヒトケラチン抗体

(AE1/AE3) を用いたウエスタンブロッティングにより、粘液可溶性画分では pH 5.0-7.0、分子量 37 -50 kDa の範囲内で複数の抗体陽性スポットが検出された。これらと対応する領域をゲル上から切り出し、LC-MS/MS 解析に供した結果、タイプ II ケラチンである Tr-K4、タイプ I ケラチンである krt97、krt1-19d (203-208)、krt15 (2 of 2)、krt95 (201-203) の 5 種類のトラフグケラチンがヒットした。以上より、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。またこれらのうち、Tr-K4、krt97、krt15 (2 of 2)、krt95 (201-203) は UEA-1 陽性領域で発現していた。

第二章 真菌に対する防御因子としての粘液ケラチンの作用

皮膚粘液ケラチンの真菌に対する作用を明らかにするため、まず粘液ケラチンが酵母と結合するかを調べた。粘液可溶性画分を酵母と混合し、洗浄後、酵母と結合したタンパク質を 8 M 尿素で溶出した。この画分を SDS-PAGE に供して、PVDF 膜に転写後、AE1/AE3 を用いたウエスタンブロッティングをおこなった。その結果、37 -50 kDa に 3 本の抗体陽性バンドが検出された。ゲル上からこれらと対応するバンドを切り取り、LC-MS/MS 解析に供した結果、タイプ II ケラチンである Tr-K4、およびタイプ I ケラチンである krt1-19 (203-208)、krt15 (2 of 2) がヒットした。この結果から、トラフグ皮膚粘液中の少なくとも 3 種のケラチンが酵母と結合することがわかった。

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。この酵母凝集塊に AE1/AE3 を用いて蛍光免疫染色を施したところ、凝集塊の表面や細胞間に抗体陽性シグナルが検出された。このことから酵母の凝集にケラチンが関与していることが示唆された。

次に、タイプ II ケラチン Tr-K4 に対する抗体を作製し、その抗体を用いた凝集阻害試験

をおこなった。他のトラフグケラチンと相同性の低い領域を選び、組み換え体を作製した。これをウサギに免疫して抗体を得た。粘液可溶性画分に抗体を加え、凝集試験をおこなったところ阻害が見られたことから、Tr-K4 は酵母の凝集に関わることが明らかとなった。

さらに、トラフグ皮膚粘液中に不溶性の塊が存在することを発見した。興味深いことに、粘液可溶性画分と酵母を混合すると、凝集塊とは別に、酵母を取り込んだ不溶性塊が観察された。セルストレナーを用いて皮膚粘液から不溶性塊を回収し、電気泳動用サンプルバッファで溶解して SDS-PAGE に供した結果、37 -50 kDa の主要なバンドが認められた。ウェスタンブロッティングにおいて、これらのバンドは AE1/AE3 陽性反応を示した。また、TOF/MS 解析によって得られたペプチド配列はトラフグの Tr-K4、krt1-19d (203-208)、krt15 (2 of 2) の配列と一致した。酵母を封じ込めた不溶性塊に AE1/AE3 を用いた蛍光免疫染色を施した結果、不溶性塊全体から明瞭な陽性シグナルを検出した。以上の結果から、ケラチンは微生物を不溶性塊に封じ込めるという、他の防御因子には見られない作用をもつことがわかった。

第三章 細菌に対する防御因子としての粘液ケラチンの作用

水中には真菌よりもはるかに多くの細菌が棲息しており、水棲動物にとって細菌は感染性微生物としてより大きな脅威である。本章では、トラフグ皮膚粘液ケラチンが細菌に対しても防御因子として働くかを検証した。

粘液ケラチンが細菌と結合するかを調べるため、皮膚粘液とグラム陰性細菌 4 種 (*Escherichia coli*、*Vibrio anguillarum*、*Aeromonas hydrophila*、*Edwardsiella tarda*) およびグラム陽性細菌 2 種 (*Streptococcus iniae*、*Streptococcus parauberis*) をそれぞれ混合し、洗浄後、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の結果、*S. parauberis* を除く全ての細菌結合タンパク質画分において抗体陽性バンドが検出され、ケラチンがこれらの細菌と結合しうることが示された。

続いて、各種細菌に対する凝集活性を調べた。トラフグ皮膚粘液中には細菌凝集能を有するレクチンが見つかっており、ケラチンの活性を検出するのが難しいため、皮膚粘液からケラチンを粗精製した。粗精製ケラチン画分と各種細菌を混合し、一晩静置した結果、全ての細菌が凝集した。特に、*Es. coli* と *V. anguillarum* に対しては強い凝集活性を示した。以上の結果よりトラフグ粘液ケラチンは種々の細菌に対する凝集活性を有することが示唆された。

細菌の凝集は 1 種類のケラチン分子によって起こりうるのかを調べるために、皮膚粘液中で存在が確認された唯一のタイプ II ケラチンである Tr-K4 の全長配列の組み換え体 rTr-K4 (full) を作製した。rTr-K4 (full) と *V. anguillarum* を混合し、洗浄後、菌体ごと溶解して、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングに供した。その結果、rTr-K4 (full) は単体でも *V. anguillarum* と結合することが示された。しかし *V. anguillarum* の凝集は観察されなかったことから、凝集には他の分子を必要とすることが示唆された。タイプ I ケラチン分子と重合することによって凝集が起こるのではないかと考えられる。

以上、本研究は魚類皮膚粘液に含まれるケラチンが真菌および細菌に対して凝集素とし

て機能することを初めて明らかにした。また、ケラチンが形成する不溶性塊に微生物を封じ込めるというユニークな排除機構も発見した。ケラチンは脊椎動物に普遍的な分子であり、哺乳類の皮膚だけでなく多くの脊椎動物の粘膜上皮組織にも存在する。本研究の成果は、静的な細胞骨格分子と考えられていたケラチンの細胞外での新たな機能を示すものであり、脊椎動物の粘膜上皮における普遍的な防御因子である可能性を提示する。