

マガキ PGRP-S1S による大腸菌の凝集と脱顆粒の誘起

飯塚真生（東北大学大学院農学研究科）

1. 目的

濾過食性の水棲生物である二枚貝は常に環境水中の微生物に曝露されており、微生物による疾病問題はしばしば水産業に甚大な被害をもたらしている。しかし二枚貝における生体防御機構については不明な点が多く、特に効率的な免疫応答の起点となる細菌認識に関するメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。ペプチドグリカン認識タンパク質（PGRP）は細菌の侵入を認識して効率的な生体防御反応を誘起することが一部のモデル生物の研究で明らかにされており、近年マガキからも 5 種の PGRP が同定されたことから、二枚貝においてもこれらが初期の細菌認識に重要な役割を果たすことが期待される。従ってマガキ PGRP の機能とそれに関連する細菌認識メカニズムを明らかにすることで、疾病に強い二枚貝生産など、水産業の発展に繋がる可能性がある。そこで本研究ではマガキ PGRP のうち、鰓や外套膜といった外部と直接接触する組織で発現し、また抗菌ペプチド様ドメインを持つ CgPGRP-S1S について機能解析を試みた。

2. 材料と方法

まず CgPGRP-S1S の組み換えタンパク質（rCgPGRP-S1S）を用いて精製ペプチドグリカン（PGN）と 5 種の生菌に対する結合特異性、抗菌活性、マガキ血球に及ぼす影響を *in vitro* にて検討した。上述の結果を踏まえ、*Escherichia coli* 接種後の CgPGRP-S1S 遺伝子発現量や顆粒球率の *in vivo* での変化を観察することにより、マガキ生体内における実際の CgPGRP-S1S の機能を検討した。

3. 結果と考察

結合試験の結果、rCgPGRP-S1S は DAP-type の PGN を特異的に認識することが分かった。一方で、生菌に対する結合試験では DAP-type PGN を有する細菌 3 種のうち、結合が確認できたのは *E. coli* のみであり、*E. coli* については菌を凝集させる機能も観察された。抗菌活性は本研究で調べた全ての菌に対して認められなかったことから、CgPGRP-S1S は認識後に他の防御反応を誘起することが考えられた。そこで、他の PGRP で指摘されている細菌に対する貪食の活性化をマガキ血球と *E. coli* を用いて検討したが、貪食の活性化は認められなかった。しかし *E. coli* の有無に関わらず、rCgPGRP-S1S 添加後に顆粒球の割

合が有意に低下したことから、**CgPGRP-S1S** は単独で血球に作用して脱顆粒を誘起し、顆粒球内の抗菌物質などを放出させることで生体防御に貢献していることが想定された。脱顆粒を考慮して貪食率、貪食指数を補正すると、無顆粒球では **rCgPGRP-S1S** 添加によってむしろ貪食の活性が下がることが考えられた。このことは、**CgPGRP-S1S** によって凝集して物理的に巨大化した菌塊に対し、貪食から包囲化へと防御の様式を変えて対応した結果を反映しているのかもしれない。*E. coli* 接種実験では、接種 6 時間後に **CgPGRP-S1S** 遺伝子発現量の有意な上昇が引き起こされたことから、**CgPGRP-S1S** は実際にマガキ生体内における迅速な細菌認識と防御反応の誘起に関与していることが考えられた。また、顆粒球率の変動は **CgPGRP-S1S** 発現量の推移とは正反対の挙動を示したため、メカニズムは不明であるが **CgPGRP-S1S** が血球組成を調節している可能性が考えられた。本研究はマガキにおける **PGRP** の機能解析の最初の研究であり、**PGRP** を起点とする免疫応答カスケードの存在が改めて示唆された。

4. 研究成果

AQUACULTURE 2013 口頭発表
論文投稿中 (2013 年 5 月現在)