察された。つまり、*M5R* の破壊は脳内の細胞に大きな形態的变化をひき起こしたのである。

この動物実験の結果にオスとメスで違いがあることに筆者らは着目した。メスの *M5R* 欠損マウスはオスと異なりまったく正常対照マウスと差がないのである⁽³⁾。これは、メスでは血管における何らかの機能代償が起きて表現型が観察されないと考えられた。筆者らは、メスの *M5R* 欠損マウスの卵巣を摘出して、脳の血流や神経細胞の形態、さらに短期記憶学習能力を解析した（この卵巣摘出手術は女性ホルモンの影響を検討する実験として一般的である）。その結果、卵巣の摘出によりメス遺伝子欠損マウスはオス遺伝子欠損マウスと同じ表現型をとることが示された。卵巣から放出される女性ホルモンであるエストロゲンは脳の血液循環を良くする効果があること、さらに神経細胞の突起伸長を促すこと、更年期障害による情動の障害を回復させること、アルツハイマー病発症を抑制するなどの効果が報告されている。

そこで筆者らは、エストロゲンが脳の血液量をアセチルコリンに代わって増加させている可能性を考えた。血液の循環が増えるのにマウス脳血管内皮細胞において、アセチルコリンとエストロゲンが NO の産生に関わる可能性を検討した。不死化したマウスの血管内皮細胞 (TM-BBB) はマウスの血管内皮細胞の性状をよく維持している細胞株である。TM-BBB には GP130 と呼ばれる G タンパク質結合型の膜型エストロゲン受容体が発現していた。さらに GP130 特異的作動薬の投与によって、アセチルコリンを添加したときと同様に細胞株で NO の放出を促進する mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) の活性化が示された。実際、オス *M5R* 欠損マウスにエストロゲンを埋め込んで長期投与したところ、脳動脈の拡張、脳血流量の回復が認められた。さ

らに、大脳皮質や海馬におけるアストロサイトの膨張や神経突起萎縮の症状も回復し、結果的に認知機能も改善していることが判明した⁽³⁾。

従来、メスの実験動物レベルでは卵巣摘出によって神経突起萎縮が観察される脳組織は海馬の一部に局限されていた。また、エストロゲンは BBB を突破し、直接的に海馬神経細胞の突起伸長に効果をもつと考えられている。オス *M5R* 欠損マウスの神経突起萎縮に特徴的なのは、脳の血液循環の低下している大脳皮質でも観察されることである。今回得られた特筆すべき知見は、エストロゲンによって脳の血液循環の回復とともに大脳皮質の神経突起の萎縮が回復された点である。対照実験として、正常オスマウスにエストロゲンを投与したところ、脳動脈の太さや脳の血液循環にも、また大脳皮質や海馬の神経突起の数にも変化はなく、短期記憶学習に関しても学習能力の向上は示されなかった⁽⁴⁾。したがって、筆者らの結果は、脳の血液循環の支配領域にエストロゲンが働くことを示唆するものである。

アルツハイマー病では脳血管周囲に β -アミロイドが沈着することによる動脈硬化が知られている⁽⁴⁾。ここで紹介したエストロゲンの働きは、長年アルツハイマー病発症に関していわれていた男女差を説明できる可能性があり、筆者らはアルツハイマー病発症機序を血管機能の観点から見直すことが必要と考えている。

- 1) M. Yamada *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14096 (2001).
- 2) R. Araya *et al.* : *Neurobiol. Dis.*, **24**(2), 334 (2006).
- 3) N. Kitamura *et al.* : *PLoS One.*, **v4**(4), e5159 (2009).
- 4) K. Niwa *et al.* : *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**(1), H315 (2002).

(山田真久, 北村尚士, 理化学研究所脳科学総合研究センター)

魚類体表粘液の新しい抗菌タンパク質、L-アミノ酸オキシダーゼ 魚病細菌に対する魚類の生体防御因子として注目

魚類の表皮は角質層をもたないため、体表は脆弱な細胞が最外層にむき出しの状態になっており、病原性微生物の格好の標的となる。これを防ぐため、魚類の体表は鱗や粘液で覆われている。粘液は体表を滑らかにして寄生生物の侵入を防止する他、生理活性タンパク質・ペプチドを含み、これらが生化学的な生体防御の役割を果た

している⁽¹⁾。魚類体表粘液の抗菌タンパク質として溶菌酵素リゾチーム、タンパク質分解酵素、アルカリホスファターゼあるいは核タンパク質のヒストンとその分解ペプチドが知られ、この他構造未解明の抗菌タンパク質が報告されているが、最近新しいタイプの抗菌タンパク質として L-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) が見いだされ

た。クロソイ体表粘液から単離された LAO (クロソイの学名 *Sebastes schlegeli* にちなみ *Sebastes schlegeli* antibacterial protein, SSAP と仮称) は、①細菌選択性が高く魚病細菌に抗菌活性を示す、②その抗菌活性は強力で、これまでに報告されている魚類の抗菌タンパク質・ペプチドの中で最強の部類に属する、という特徴をもつことから、SSAP はクロソイ体表における生体防御関連タンパク質の重要なメンバーとして機能していると考えられる⁽²⁾。

LAO (EC1.4.3.2) はフラビン酵素で、分子状酸素を用いて L-アミノ酸を酸化的に脱アミノし、2-オキソ酸に変換する反応を触媒する。このとき生じる過酸化水素が抗菌作用を示すため、抗菌活性が報告されている LAO のほとんどはグラム陽性細菌とグラム陰性細菌に対し幅広い抗菌スペクトルを示す。しかし、SSAP は既報の抗菌性 LAO とは異なり細菌選択性が高く、グラム陰性細菌である魚病細菌のウナギ鰭赤病原菌 *Aeromonas hydrophila*、サケセッソ病原菌 *A. salmonicida*、ブリ類結節症病原菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* や海洋細菌で食中毒原因菌 *Vibrio parahaemolyticus* に対して強力に作用する一方、大腸菌 *Escherichia*

coli やサルモネラ *Salmonella typhimurium* には抗菌活性を示さなかった⁽³⁾。SSAP の抗菌作用はカタラーゼ存在下で完全に失活することから、抗菌作用を示す因子は過酸化水素であることは間違いない。では、なぜ SSAP はグラム陰性の魚病細菌に対して選択的に抗菌作用を示すのだろうか。

筆者らは、SSAP と細菌の結合を想定し、これを確かめるため SSAP に感受性を示す *P. damsela* subsp. *piscicida* と非感受性の *E. coli* を用いて 2 つの実験を行った。まず、菌体懸濁液に SSAP を添加し抗 SSAP モルモット抗血清を用いて菌体への SSAP の結合を調べた結果、*P. damsela* subsp. *piscicida* 菌体からは SSAP が検出されたが、*E. coli* では SSAP は検出されなかった。次に、SSAP を添加した菌体懸濁液をメンブレンフィルターでろ過して菌体を除去し、ろ液中の LAO 活性を測定したところ、*P. damsela* subsp. *piscicida* では活性が減少したが、*E. coli* ではほとんど変化しなかった。この 2 つの実験から、SSAP は *P. damsela* subsp. *piscicida* に吸着または結合するものの、*E. coli* にはこのような作用を示さないことがわかり、SSAP の細菌選択性に菌体結合能が関与していることが示唆された。

図1 ■ 予想される抗菌性 L-アミノ酸オキシダーゼ SSAP の細菌選択メカニズム

図2 ■ 抗菌性 L-アミノ酸オキシダーゼ SSAP で処理した *P. damsela* subsp. *piscicida* (A) と *V. parahaemolyticus* (B) の電子顕微鏡写真

SSAP は上述の魚病細菌に対してごく微量（最小発育阻止濃度 0.65~5.2 nM）で抗菌作用を示す。この強力な抗菌活性は SSAP の菌体結合能で説明できるだろう。SSAP が細菌の菌体表面に結合した場合、産生された過酸化水素は菌体表面で局所的に高濃度となり、細菌にダメージを与えると考えられる⁽³⁾（図1）。さらに興味深いことに、細菌によって SSAP の抗菌作用が異なることが電子顕微鏡観察で明らかになった（図2）。図2-A に示すように、SSAP 処理された *P. damsela* subsp. *piscicida* の菌体は著しい伸長がみられ、矢印で示した菌体では長径が 20 μm を超えた。一方、*V. parahaemolyticus* では菌体の伸長に加え、細胞表面全体に陥没や大きな孔など、著しい損傷がみられた（図2-B）⁽³⁾。

SSAP のもう一つの特徴として基質特異性がきわめて高いことが挙げられる。LAO の基質特異性は生物種によって異なり、ヘビ毒 LAO は疎水性アミノ酸と反応するものが多い。アメフラシアルブメン腺由来の抗腫瘍性 LAO (aplysianin A) は塩基性アミノ酸 L-アルギニンと L-リジンを特異的に認識し、アフリカマイマイ体表粘液の抗菌性 LAO (achacin) は疎水性アミノ酸と塩基性ア

ミノ酸の両方を認識する⁽⁴⁾。これらの LAO とは異なり SSAP は L-リジンだけを認識する⁽²⁾。現在までのところ、SSAP 以外に L-リジンだけを認識する LAO はトゲカジカ体表粘液の抗菌性 LAO (MPLAO1 と MPLAO3)⁽⁵⁾ ならびにサバ内臓由来のアポトーシス誘導性 LAO (AIP)⁽⁶⁾ だけで、魚類からしか見つかっていない。魚類の LAO はなぜ L-リジンだけを認識するのだろうか。魚類体表粘液に存在する抗菌性 LAO が基質を限定することでどのようなメリットがあるのだろうか。

LAO はアミノ酸代謝に関連する酵素であるため、その体内分布を調べることは SSAP の意義を考察する上でも重要と考えられる。そこで、SSAP mRNA 発現を RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR で測定したところ、皮膚と鰓で発現していることが明らかになり、SSAP は水と接触するクロソイの体表に分布していることがわかった⁽⁷⁾。また、魚類体表粘液の LAO 活性スクリーニングにおいて、いくつかの魚種が活性を示したことから（未発表）、獲得免疫系が十分に進化した哺乳類とは異なり、生体防御を自然免疫系に大きく依存する魚類において、LAO は魚類体表における重要な生体防御因子として活躍していることが想像できる。今後、魚の健康状態や感染による影響など、LAO と魚類免疫との関連がより深く解明されることを期待したい。

- 1) S. K. Whyte : *Fish Shellfish Immunol.*, **23**, 1127 (2007).
- 2) Y. Kitani *et al.* : *FEBS J.*, **274**, 125 (2007).
- 3) Y. Kitani *et al.* : *Comp. Biochem. Physiol., B*, **149**, 394 (2008).
- 4) H. Kamiya *et al.* : *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **43**, 215 (2006).
- 5) Y. Nagashima *et al.* : *Comp. Biochem. Physiol., B*, **154**, 55 (2009).
- 6) S. K. Jung *et al.* : *J. Immunol.*, **165**, 1491 (2000).
- 7) Y. Kitani *et al.* : *Fish Shellfish Immunol.*, **23**, 1178 (2007).

(木谷洋一郎*¹, 長島裕二*², *¹日本大学生物資源科学部, *²東京海洋大学海洋科学部)