

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07907

研究課題名(和文) コイ血液由来糖タンパク質を用いた低環境負荷型の抗菌剤および除菌剤の開発

研究課題名(英文) Development of the low environmental load type antibacterial agent and disinfectant using carp blood-derived glycoprotein

研究代表者

青木 恭彦 (Aoki, Takahiko)

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：00212366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はコイ赤血球膜よりグリコホリンを単離した。この調製したコイグリコホリンは抗菌作用があることを見出したので、グリコホリンの大量調製が可能な新しい単離法を検討した。その結果、ほぼ100%の回収率となるグリコホリン調製法を開発した。次に、グリコホリン結合カラムを作成して細菌懸濁液をカラムに負荷した結果、除菌効果を確認した。さらに、*V. anguillarum* を接種してピブリオ病に罹病させたニジマスに、グリコホリンを直接血管内に投与して致死時間を計測した。その結果、生存時間に明瞭な差が認められた。以上の結果より、少量で効果的かつ低環境負荷型の除菌剤および抗生物質の開発の目的が立ったと判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の今までの研究から、コイ血液から調製された膜タンパク質であるコイグリコホリンには、シアル酸を含むオリゴ糖が結合し、それには抗菌作用があることを見出した。この生理活性は、オリゴ糖が細菌に対して吸着作用を有するために生じる。本研究では、コイグリコホリンの環境浄化作用および抗生物質としての効果を実際に検証して、少量で効果的かつ環境に残留しない抗生物質および除菌剤の開発を行った。本研究の応用により種々の病原菌に対する抗菌剤が開発できれば、抗生物質などの化学物質に頼る事のない新しい魚病対策に貢献できるのみならず、0-157対策などへのヒトへの適用も可能であり、産業的にも大いに意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We isolated a high-purity carp glycoprotein from carp red blood cell (RBC) membranes. The prepared carp glycoprotein exhibited bacteriostatic activity toward all tested bacteria including three known fish pathogens.

The purpose of our research on fish glycoprotein is for practical applications as antimicrobials. The drawback for practical application is the large-scale preparation from fish blood. On this reason, we have developed the simple preparation method of carp GP with its high recovery for practical applications. Furthermore, we showed that carp glycoprotein was effective at adsorbing *V. anguillarum* and *M. luteus* from suspension following glycoprotein-binding column chromatography. In addition, the efficacy of carp glycoprotein as an antibacterial reagent was evaluated for the control of disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The results suggest that intravenous administration of glycoprotein significantly delays the time of death following challenge with *V. anguillarum*.

研究分野：水産化学

キーワード：抗菌剤 オリゴ糖 膜タンパク質 グリコホリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複合糖質の研究は1960年代から活発に行われ、1980年代までに飛躍的に進展した。1990年代初めになると、血液型決定基の存在場所を巡って論争が生じ、混在物質(脂質等)の除去の困難さから、糖鎖研究はやや停滞するようになってきた。しかしながら、ヒト赤血球膜に存在する糖タンパク質であるグリコホリンには以前から免疫学的・生理学的特性を有すると言われており、今までに生体防御機能としてインフルエンザウィルスのレセプター能などが報告されている。

しかし、現在に至っても糖タンパク質に含まれる糖鎖の免疫学的・生理学的特性は十分に解明されていない。その要因として、混在する糖脂質が有する生理活性の問題が常に存在し、精製過程においても、タンパク質の変性が生じるためである。また、特定のオリゴ糖を単離・精製する困難さも看過できない。そのため、哺乳類以外のグリコホリンの研究では鳥類で僅かに試みられる程度であり、魚類のグリコホリンの報告は国内外を問わず見当たらず、申請者の報告のみである。

上述のように、糖鎖の生理機能の研究は重要性が認識されながら、ほとんど研究が進まなかった分野であり、特に本研究で扱う糖質(オリゴ糖)は、遺伝子やリコンビナントとは異なって異性体が多く存在するために精製が困難であり、糖質の研究を進めるには従来の発想の延長ではなく、新しい方法論(例えば糖鎖の限定的な加水分解法、酸性糖鎖の脱塩方法、ハプテン糖を利用した単離方法、NMRの構造解析法等)の確立が必要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、今まで水産加工場で廃棄されている魚類の血液を用いて、赤血球膜中の糖タンパク質(グリコホリン)を調製し、その性質を利用することによる低環境負荷型の生体防御物質の開発、すなわち少量で効果的かつ環境に残留しない抗生物質および除菌剤の開発を行い、養殖場の衛生環境の向上を図ることである。併せて原料調達のコスト減を図るべく、コイ以外の魚類血液も利用可能であるかを検討するための効率の良い大量調製法を開発した。

そのため、ヒトグリコホリンで用いられる低回収率の抽出法の代わりに新しい分離・精製方法を確立して、回収率の飛躍的向上を目指した。高回収率の精製方法を確立した後に、グリコホリンの大量調製法を確立してグリコホリン糖鎖の安定かつ大量調製を試みた。次いで、大量調製したグリコホリンを用いてグリコホリンが結合したアフィニティーカラムを作成し、それによる環境浄化力の検討を行い、浄水装置への応用化を目指した。さらに病態魚におけるグリコホリンの挙動が確認できたので、グリコホリンによる魚病治療力の検討を行って低環境負荷型の抗生物質の開発を目指した。すなわち、コイ血液からの少量で効果的かつ環境に残留しない除菌剤および抗生物質の開発を目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

大量調製法の検討

本研究では、今まで用いていたヒトの抽出方法である LIS(3,4-ジヨード 刈刈酸リウム) - フェノール法の代わりにグリコホリンの単離法を検討した。具体的には、非イオン性の界面活性剤を用いて赤血球膜を可溶化した後、陰イオン交換カラムに吸着させた後に NaCl による連続的濃度勾配溶出法で溶出する方法を検討した。LIS - フェノール法では、酸性であるフェノールを用いることによりシアル酸が脱離し、さらに煩雑な抽出操作によってシアル酸および中性糖の大量の脱離が生じて回収率の低下につながっており、より穏和かつ短い操作過程によって回収率の増加を図った。

まずコイの背部動脈からヘパリン入りのシリンジを用いて血液を採取し、直ちに白血球および血漿を遠心分離によって分離した後、得られた赤血球から赤血球膜の調製を行った。コイは常時蓄養し、複数尾から合計60 ml程度の血液を採取し、その日の内に赤血球膜調製を完了した。調製した赤血球膜は魚類リンゲル液に懸濁した後、-80℃で凍結して保存した。

赤血球膜調製物を解凍し、非イオン性の界面活性剤等を用いて可溶化した後、陰イオン交換カラムに吸着させた。カラムを洗浄後に NaCl による連続的濃度勾配溶出法で溶出を行い、グリコホリンを単離した。遊離糖鎖を調製する場合は、単離したグリコホリンを用いて -脱離を行ってシアル酸結合糖鎖をタンパク質から遊離させた。調製した遊離糖鎖を、糖鎖分析用陰イオン交換カラムを用いた HPLC で各糖鎖を分取した。この画分中には塩が多量に含有しているので、活性炭等のカラムクロマトグラフィーを用いて脱塩を行った。

グリコホリンによる環境浄化力の検討

コイ血液から、幅広い抗菌スペクトルを持つグリコホリンを上述の方法で単離・調製した。これらのグリコホリンのタンパク質部をリガンドとして中スケールのカラムゲルに吸着させることによって、グリコホリン結合アフィニティーカラムを作成した。次に、環境汚染物質の指標であるグラム陰性およびグラム陽性菌を用いて懸濁液を調製し、作成したアフィニティーカラムに負荷した。負荷前後の溶液中の生菌数を計測して除菌率を算出し、除菌効果を検討した。これ

らの実験結果により実際の養魚場での環境浄化への応用の可能性について検証を行った。

グリコホリンによる魚病治癒力の検討

魚病の病原菌（ビブリオ病の病原菌である *V. anguillarum* を用いた）を接種して罹病させたニジマスにグリコホリン懸濁液を血管内に直接投与し、致死に至る時間（生存時間）を計測して魚病治癒力を検証した。コイグリコホリンがニジマスのような他の魚種にも効果があれば、ヒトへの応用の可能性が生じると思われる。

4. 研究成果

ゴーストの可溶化溶液をそのままアフィニティーおよび陰イオン交換カラムに負荷した場合、過剰の界面活性剤の影響によりカラムへの吸着・溶出が不十分となった。さらに、用いた界面活性剤である LIS はリン酸塩等とキレートを形成して白色沈殿を生じるため、カラムへ負荷する前の可溶化試料中の過剰な LIS 除去が不可欠となった。Econo-Pac カラムは従来脱塩カラムであるが、LIS の分子量がタンパク質よりも低いことを利用して界面活性剤の除去に応用した。

次に、溶出に用いる各種界面活性剤を検討した結果、非イオン系の界面活性剤では、アフィニティーおよび陰イオン交換カラムからのグリコホリン溶出が困難となり、結果的にイオン系界面活性剤であるコール酸ナトリウムを選択した。適応可能なアフィニティーカラムの検討も同時に行ったが、吸着部位である *N*-グリコリル基に対応するハブテン糖および界面活性剤が見出せないため、負に荷電しているシアル酸の性質を利用した陰イオン交換カラムを用いる事とした。併せて、NaCl およびコール酸ナトリウムを組み合わせた濃度勾配溶出法により、グリコホリンを効率良く溶出する事が可能となった。

集めたグリコホリン画分中のシアル酸の定量を行って回収率を算出した。その結果、DEAE Toyopeal カラムに負荷前の可溶化試料中のシアル酸量は 88.6 μg であり、カラムから溶出後のグリコホリン画分中のシアル酸量は 91.8 μg であった。これにより、本実験でのシアル酸量から見たグリコホリンの回収率は 103% となり、当研究室で行われてきた LIS-フェノール法の回収率である 1.1% と比較すると、94 倍の回収率増加となった。

さらに、グリコホリン結合カラムを作成して *V. anguillarum* および *M. luteus* の細菌懸濁液をカラムに負荷した結果、付加した菌数によって 50~100% の除菌率が計測され、グリコホリン結合カラムによる除菌効果を確認した (Fig. 1)。

次いで、グリコホリンの抗菌剤（抗生物質）としての効果を検討するためにビブリオ病に罹病させたニジマスにグリコホリンを投与してコントロールの生存時間と比較した。その結果、生存時間が 2 倍以上延長され、明瞭な効果が認められた (Fig. 2)。

以上の実験結果より、コイ血液から少量で効果的かつ低環境負荷型の除菌剤および抗生物質の開発の目途が立ったと判断した。

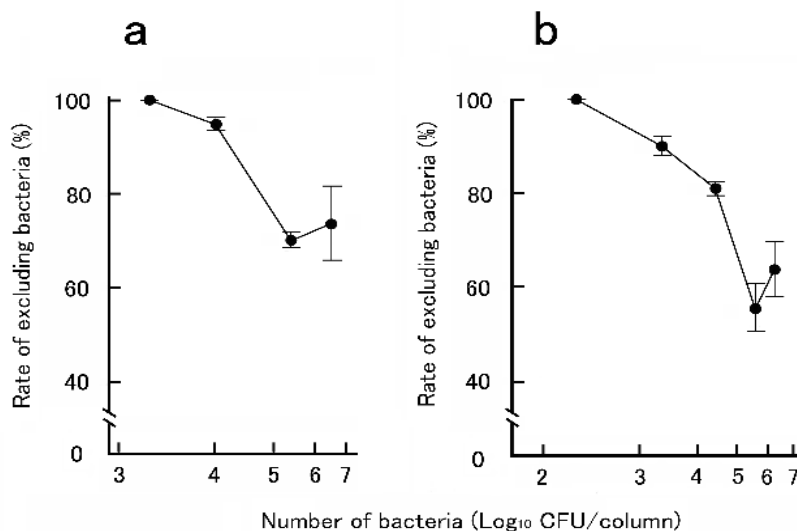


Fig. 1. Viable cell counts in the eluent following glycocholin-binding column chromatography.

(a) *V. anguillarum*. (b) *M. luteus*.

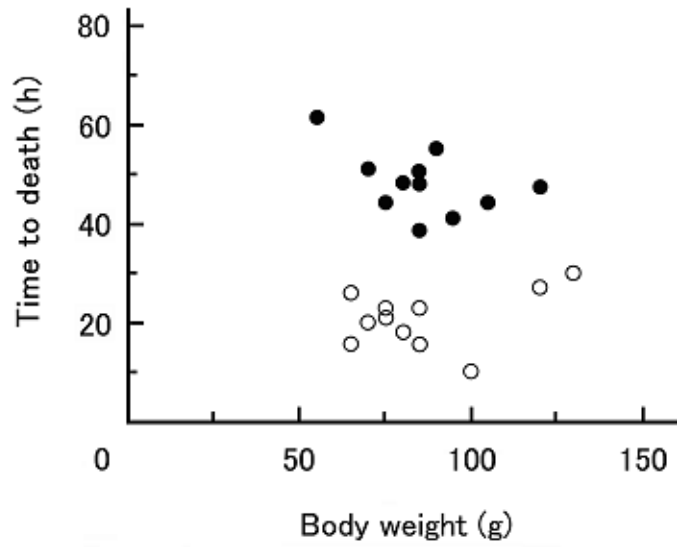


Fig. 2. Correlation between time to death and body weight in rainbow trout treated with *Vibrio anguillarum*. (●) Rainbow trout injected with glycoporphin; (○) control group.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahiko Aoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Short commentary on our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques	6. 最初と最後の頁 426-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 青木 恭彦	4. 巻 10月号
2. 論文標題 コイ血液由来糖タンパク質を用いた低環境負荷型および除菌剤の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 38-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahiko Aoki	4. 巻 March
2. 論文標題 A novel source for novel antimicrobials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact Research	6. 最初と最後の頁 66-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahiko Aoki	4. 巻 7
2. 論文標題 A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 56-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes7040056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiko Aoki
2. 発表標題 Application of Carp Glycophorin from Red Blood Cell Membranes as an Antibiotic Regent
3. 学会等名 The 17Th Annual Congress of International Drug Discovery Science & Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiko Aoki, Hikaru Sugiura
2. 発表標題 Application of carp glycophorin from red blood cell membranes as an antibiotic reagent
3. 学会等名 2nd International Conference & Expo on Phamacology and Regulatory Affairs (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------