

平成 25 年度博士論文

二枚貝類の体表面粘液の細菌に対する
サーフェスバリアとしての機能

東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻

水圏動物生理学分野

指導教員高橋計介准教授

学籍番号 B0AD1103

氏名岡田勇希

目次

序論	・・・ 3
第 1 章 マガキ体表面粘液の抗菌活性の検討	・・・ 7
第 1 節 マガキに対する細菌接種実験	・・・ 8
第 2 節 マガキ粘液の抗菌活性測定	・・・ 27
考察	・・・ 38
第 2 章 マガキ外套膜中のリゾチームおよびキチナーゼの特性解析	・・・ 44
第 1 節 マガキ外套膜中のリゾチームの特性解析	・・・ 46
第 2 節 マガキ外套膜中のキチナーゼの特性解析	・・・ 68
考察	・・・ 84
第 3 章 二枚貝の体表面粘液の生体防御機能の検討	・・・ 90
考察	・・・ 107
総合考察	・・・ 110
要約	・・・ 113
謝辞	・・・ 114
引用文献	・・・ 115

序論

我が国の漁業生産、海面養殖業において、二枚貝の占める割合は大きい。平成 22 年度農林水産統計では、海面養殖における魚介類生産量約 110 万トンのうち貝類が約 42 万トン、38%を占め、更に貝類生産量のうち約 52%をホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* が、約 48%をカキ類が占めている。今後も二枚貝類の生産は増養殖業における主要な位置を占め、その養殖技術の高度発展化のための研究・技術開発は重要なものであり続けると考えられる。二枚貝増養殖技術の発展のために重要な研究分野として、二枚貝の生体防御機構に関する研究がある。

二枚貝の養殖において大規模な斃死が発生することが度々あるが、世界的にはこの原因究明と対策のために二枚貝の疾病に関する研究が盛んにおこなわれてきた(Tubiash *et al.*, 1965; Potasman *et al.*, 2002)。特に病害が深刻化しやすく、研究対象としても広く用いられているのはカキ類である。カキ類では寄生虫 (Carnegie and Burrson, 2012) やウイルス (Renault and Novoa, 2004) による被害が大きく、特に寄生虫による病気はアメリカガキ *Crassostrea virginica* での原虫 *Prekinsus marinus* (Villalba *et al.*, 2004) や *Haplosporidium neisoni* (Burrson and Ford, 2004), ヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* における *Bonamia ostreae* (Carnegie and Cochenec-Laureau, 2004) などが有名である。こういった世界での状況に対し、日本では病害による大規模な二枚貝の斃死の事例はあまり報告されておらず、むしろ二枚貝の斃死の原因としては水温や貧酸素などの環境要因、あるいは貝自身の生理活性の低下が考えられてきた(森ら, 1974; 森, 2005; 杉野ら, 2009)。しかし、近年はマガキ卵巣肥大症の原因寄生虫の同定 (Itoh *et al.*, 2002) やウイルス性によるものと考えられるアコヤガイ *Pinctada fucata* の大量斃死 (Miyazaki *et al.*, 1999) が報告されており、日本においてもこれらのような疾病の対策に繋がる、二枚貝の病気や生体防御機構に関わる研究をより推進していく必要があると考えられる。特に、日本では現在広まっていない病原体による疾病が海外から持ち込まれる危険性を

考慮するならば、二枚貝の防御に関する研究をおろそかにすることはできないであろう。

二枚貝の疾病において、魚類におけるそれと大きく異なるのは、二枚貝は魚類や甲殻類に比べ細菌性の疾病が非常に少ないということである。例えば魚類では様々な種が養殖されているが、これらの養殖魚類においても様々な疾病が報告され、感染の原因や病原体の特定、治療法の研究がなされているが、この病原体として様々な細菌が挙げられている (Toranzo, 2004)。細菌性の魚類の病害としてはビブリオ症 (Egidius, 1987)、連鎖球菌症 (Ringo and Gatesoupe, 1998) をはじめとして多様性があるが、これに対し、二枚貝類での細菌性疾患といえばそのほとんどがビブリオ症であるといっている (Paillard *et al.*, 2004)。二枚貝類において特に問題になっているビブリオ属細菌による疾患として、イガイ類やアサリ *Ruditapes philippinarum* に対するブラウンリング病 (Paillard *et al.*, 1994; Paillard, 2004)、マガキやアメリカガキ幼生の斃死 (Boettcher *et al.*, 1999, 2000; Ford and Borrero 2001; Paillard *et al.* 1996) が挙げられ、二枚貝の安定的な生産の妨げとなっているが、逆に言えばこれらビブリオ属以外の細菌に対しては、二枚貝は優れた生体防御機能を発揮して感染を防いでいるとも考えられる。二枚貝の研究において、細菌に対する防御能について解明することは、二枚貝の生体防御機構に関する重要な知見となるであろう。

二枚貝を含め無脊椎動物は獲得免疫を持たず、その生体防御は先天性防御に依存しており、血球による貪食、細胞性防御 (高橋・室賀 2007) と、抗菌酵素をはじめとした液性防御因子 (室賀・高橋 2006) により生体防御機構が成り立っていると考えられている。これらの研究において、血球や液性防御因子の機能に関しては、主に *in vitro* の実験系により個々の機能に関して研究するものが多く、実際の二枚貝生体における防御機能そのものを調べた研究例はまだ少ない。そこで本研究では、*in vivo* と *in vitro* の両面から、二枚貝生体防御機構の有効性を調べることを企図した。

二枚貝は濾過食性の生物であり、常に環境中の細菌に曝露されている状態にある。特に摂食器官である鰓や、体表面組織である外套膜が

病原体の主な侵入経路であることが知られている (Kleeman *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2004)。一方、二枚貝の外套膜には抗菌酵素であるリゾチームやキチナーゼの遺伝子の発現や酵素活性があることが知られており、細菌に対する防御機能も備えていることが考えられる。そこで、二枚貝の細菌性疾病に対する優れた防御能は、この外套膜で細菌を排除し体内への侵入を防いでいることによるものではないかと考えられる。

生物の組織表面に存在する生体防御機構として、分泌される粘液が物理的・生化学的に微生物を排除するというサーフェスバリアが存在する (Lamont, 1992; Hoffert *et al.*, 2008)。魚類においても体表面粘液に抗菌酵素であるリゾチームや凝集タンパクであるレクチン等の防御因子が含まれており、粘液が防御機能を持つことが知られている (Shephard, 1994)。またウナギやドジョウの様に鱗を持たない魚の体表面粘液は、マアジやマハゼなど鱗を持つ魚の体表面粘液よりも糖タンパクの割合が多く、体表面を分厚く覆い物理的な障壁として生体防御に寄与していると考えられている (浅川, 1996)。貝殻という一種の鎧を持つ二枚貝であっても軟体部は細菌を含む環境中の水と直接接しており、この体表面組織における生体防御として、粘液のサーフェスバリアとしての機能が二枚貝にとって重要なのではないかと考えられる。しかし、二枚貝の粘液に関する研究としては摂餌における機能がよく調べられているものの (Smith, 1975; Beninger and St-Jean, 1997)、魚類の様に生体防御に寄与すると報告した事例は少ない。二枚貝体表面粘液中にリゾチーム (McDade and Tripp, 1967)、プロテアーゼ (Brun *et al.*, 2000)、レクチン (Fisher, 1992) などの活性が確認され、予備的な性質評価がされているのみであり、粘液の細菌に対する作用機構はもとより、本当に生体防御因子として有効に機能するのは明らかではない。すなわち、二枚貝の体表面粘液の生体防御機構としての役割の解明、また機能において実際に作用する防御因子の特定は、二枚貝が持つ強力な細菌防除システムへの理解を助ける知見となると考えられる。

本研究では、3種類の二枚貝を用いて、これまでは明らかでなかった体表面粘液の細菌に対する防御機能、抗菌作用に関して調べ、二枚貝が有する生体防御機構としての粘液の機能を解明することを目的とする。本研究を遂行した結果、二枚貝に普遍的に存在すると思われる粘液の防御戦略が理解できるようになる。さらに本研究の結果を応用することにより、粘液を用いた二枚貝の生理状態の把握や健康状態の評価、また逆にその粘液を突破して二枚貝に感染する病原体に関する知見の蓄積、あるいはヒトの衛生・医療にも利用できる抗菌因子の探索などといった様々な発展的な研究や水産業への適用が考えられる。

第 1 章 マガキ体表面粘液の抗菌活性の検討

【緒言】

序論で述べたとおり、二枚貝において体表面に分泌される粘液が本当に細菌を排除するサーフェスバリアとしての役割を担うのかを直接研究した例は無い。そこで、実際に二枚貝の粘液と細菌を接触させることで、細菌を排除するか、抗菌的な作用が示されるかを調べた。

第 1 章では材料としてマガキを用い、細菌を外套膜に接種してその排除を調べる実験 (*in vivo* 実験、第 1 節) と、採取した体表面粘液が抗菌活性を示すかを調べる実験 (*in vitro* 実験、第 2 節) を行った。第 1 節の細菌接種実験は二枚貝では通常シリンジで閉殻筋から体内に打ち込み、全身に確実に菌を行き渡らせるが、本研究ではあくまで体表面粘液・組織における細菌排除機能を調べるため、マガキの外套腔内に接種した粘液を溜め、時間をおいて回収し、生菌数の変化を確認することで行った。第 2 節の実験は、実験系を *in vitro* に限定化することで、粘液の作用をよりわかり易いかたちで理解するためである。

第 1 章においては一貫してマガキを材料として用い、体表面粘液の防御機能を把握し、基礎的な知見を得ることとした。

第 1 節 マガキに対する細菌接種実験

【材料と方法】

マガキ

マガキは 2013 年 5, 8, 10 月の北海道厚岸湾産のものを用いた。サンプリング後 12°C の人工海水を満たした水槽に無給餌の状態に保持し、順次実験に供した。

細菌

接種に使用した細菌は、グラム陽性菌 *Micrococcus luteus* (JCM1464)、グラム陰性菌 *Vibrio tapetis* (FPC1121), *Escherichia coli* の 3 種類である。*M. luteus* と *V. tapetis* は Marine broth 2216 (Difco) で 26°C で一晩静置培養したものを実験に供した。*E. coli* は、アンピシリン耐性を持つ GFP 組換え *E. coli* を用いた。pGLO Bacterial Transformation Kit (Bio-rad) の GFP 発現プラスミドを用いて、One Shot TOP 10 Chemically Component *E. coli* (Invitrogen) をプロトコルに従って形質転換したものを、0.5 % アラビノースを含む LB 培地により、37°C、200 rpm で一晩の振とう培養を行って実験に供した。

細菌接種

実験は 3 回行い、1, 2 回目は *M. luteus* と *V. tapetis* を、3 回目は *E. coli* を用いた。培養したそれぞれの細菌を含む培地を、遠心分離 (4 °C、600×g, 15 分) し、上清を除去して、孔径 0.20 μm のセルロースアセテートディスクポアザブルメンブレンフィルターユニット (Advantec) を用いて濾過滅菌した人工海水 (アクアリウムシステムズ) を加え、細菌を再懸濁した。この洗浄を 2 回繰り返して、培地を完全に滅菌人工海水に置換した後 OD600 を測定したあと、細菌懸濁液に滅菌人工海水を加えて OD600 = 0.25 に希釈し、更に人工海水で 1000 倍に希釈した。これにより細菌懸濁液の菌体濃度を 10⁵ cell/ml のオーダーとした。

接種のためのマガキは左殻がよくお椀型に湾曲したものを選んで実験に用いた。右殻の腹側の前部および後部に、それぞれ幅 1 mm、5 mm 程の切欠きを、外套膜に傷をつけないように注意して入れた (Fig. 1A)。細菌懸濁液 5 ml を、テルモシリンジ (5 ml) (テルモ) と注射針 (25G×1") (テルモ) を用いて後部の切欠きから外套腔内 (左右の外套膜に囲まれた空間、Fig. 2) に、液が漏れないように、軟体部が傷つかないように注入し、その後帯状に切ったパラフィルムを殻の穴を塞ぐようにしてマガキに巻きつけた (Fig. 1B)。細菌を接種したマガキは、保冷剤を入れ約 4 °C に保った発泡スチロール製の箱の中に、左殻を下にして静置した。保冷剤は必要に応じて新しいものと交換し、箱内の温度は低温に保った。細菌接種後、1 回目の実験では 6, 12, 24 時間後に、2 回目では 1, 6 24 時間後に、3 回目では 6 時間後に、巻きつけたパラフィルムを解いて、殻内に接種した細菌懸濁液を後部の切欠きから 15 ml 滅菌チューブに回収した。

1 回目の実験では、細菌を接種する前の個体、および細菌懸濁液を接種後 6, 12, 24 時間後に懸濁液を回収した個体の体表面から粘液を採取した。また対照区として細菌を含まない滅菌人工海水を接種したサンプルを用意し、6, 12, 24 時間後にこれらからも粘液を採取した。粘液の採取はマガキの右殻を取り外した後、外套膜の内側表面を傷つけないようにスクレーパーでなぞり、表面を覆っていた粘液をかき集め、マイクロピペットとオートクレーブ滅菌済チップを用いて吸い取ることで行った。粘液は遠心分離 (4°C、600 ×g、15 分) して上清だけを回収し、-30°C で冷凍保存した。

2 回目の実験において、接種に用いた細菌懸濁液を一部分注し、マガキと一緒に発泡スチロール製の箱の中に静置し、1 時間後・6 時間後にマガキから回収した細菌懸濁液と同様に希釈して培地プレートに撒き、コロニーを形成させた。これは 4 °C・人工海水の条件下で生菌数が自然に減少する可能性を考え、それを確認するためのものである。

2, 3 回目の実験では、接種した細菌がマガキ軟体部に付着した可能性を考え、菌体懸濁液が殻内で溜まっていたと考えられる左殻の底部に位置する左外套膜・左鰓の一部、約 1 cm × 1 cm の範囲を解剖用ハサミ

で切り出し、オートクレーブ滅菌した 1.5 ml エッペンチューブに入れ、500 μ l の滅菌人工海水を加えてマイクロピペットと滅菌済チップでピペッティングし、外套膜および鰓の洗浄液を得た。また、接種したマガキ個体とは別の個体を 3 個体用意し、右殻と右外套膜を取り払って鰓と左外套膜の上に 5 ml の滅菌人工海水を載せ、マガキ軟体部のどの程度の範囲に接種した海水が広がるかを測定した。

実験に用いたマガキサンプル数は、*M. luteus*・*V. tapetis* を用いた 1・2 回目の実験では、それぞれのサンプリング時間・実験区で 3 個体ずつ、*E. coli* を用いた 3 回目の実験では 4 個体である。

細菌培養・コロニーカウント

回収した細菌懸濁液および外套膜・鰓洗浄液を、寒天培地プレートに塗布し、形成されたコロニーをカウントした。用いたプレートは、*M. luteus* と *V. tapetis* では Marine broth 2216 に最終濃度 1.5 % となるように粉末寒天（和光）を、*E. coli* は LB agar (Invitrogen) に濃度 1 mg/ml でアンピシリン塩酸塩（和光）をそれぞれ加えて、滅菌シャーレに入れたものを用いた。培養は、回収した細菌懸濁液は滅菌人工海水で 10 倍希釈して、外套膜・鰓洗浄液は希釈せずそのまま、滅菌ガラスビーズを用いて 100 μ l をプレートに塗布して培養することで行った。*M. luteus* は 26°C で 24 時間、*V. tapetis* は 26°C で 48 時間、*E. coli* は 37°C で 24 時間インキュベートし、形成されたコロニーを数えた。それぞれの細菌懸濁液においては、ポジティブコントロールとして、マガキに接種したのと同じ細菌懸濁液を滅菌人工海水で 10 倍希釈してプレートに塗布して用いた。*M. luteus* と *V. tapetis* での実験は抗生物質による選択がかけられず、これら以外の菌のコロニーも形成されるため、それぞれの細菌の特徴が見て取れるコロニーのみをカウントし、それ以外のコロニーは除外した。すなわち、*M. luteus* は直径約 1 mm の黄色いコロニーを、*V. tapetis* は直径約 1.5 mm ~ 2 mm 程度の白色のコロニーだけを数えた。*E. coli* はアンピシリン塩酸塩で選択がかけられるため、形成された全てのコロニーをカウントした。それぞれの区について duplicate で培養を行い、カウントしたコロニーの平均値を、

その区における Colony forming unit (CFU) とし、また本研究では CFU = 生菌数と見なした。最終的な結果として、プレートに塗布した細菌懸濁液の原液 1 ml あたりの CFU を計算し、マガキに接種する前の細菌懸濁液に比べて回収した細菌懸濁液中の生菌数がどのように変化したのかを調べた。

細菌接種後のマガキ粘液のリゾチーム活性・タンパク質濃度測定

細菌を接種したことによりマガキ粘液に何らかの応答が示すかを調べるため、1 回目の細菌接種実験においては、採取したマガキ体表面粘液の溶菌酵素リゾチームの酵素活性およびタンパク質濃度を測定した。

リゾチーム活性の測定基質液として *M. luteus* 乾燥菌体 (生化学工業) を用い、0.02 M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$) (pH 5.0) に 1 mg/ml となるように懸濁した。96 穴マイクロプレート上でそれぞれのサンプル 20 μl と基質溶液 180 μl を混合し、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-rad) で 540 nm における吸光度を測定した後、37°C で 1 時間反応させ、再び 540nm で吸光度を測定した。各サンプルは triplet で測定し、コントロールは粘液の代わりに人工海水を用いた。それぞれのサンプルの、反応前 (0 分) と反応後 (60 分) の吸光度の差を濁度の減少量とし、コントロール区の吸光度の変化量で補正した。このときのリゾチーム活性は、サンプル 20 μl 当たりの、濃度 1 mg/ml の *M. luteus* 乾燥菌体懸濁液 180 μl と混合した時の、反応 1 分間につき濁度を 0.001 下げる溶菌活性の強さを 1 U (ユニット) と定義し、これで表した。計算した U の値は、サンプル粘液 1 ml 当たりの値 (U/ml) に換算した。

タンパク質濃度はプロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いたブラッドフォード法で測定した。検量線はアルブミンスタンダード (Thermo) を使用し、プロテインアッセイ付属のプロトコルに従って測定した。

最後に、測定したリゾチーム活性およびタンパク質濃度から、タンパク質単位量当たりのリゾチームの活性、比活性 (U/mg) を計算した。

リゾチーム活性・タンパク質濃度・リゾチーム比活性の測定結果は、Dunnett の多重比較片側検定により、それぞれの時間での対照区と実験区との結果の間に有意な差があるかどうかを解析した。危険率は5%とした。

【結果】

M. luteus および *V. tapetis* 細菌懸濁液のコロニーカウント

1 回目、2 回目の実験での、細菌接種後にそれぞれの時間に回収した細菌懸濁液の 1 ml 当たりの CFU の測定結果をそれぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に示す。細菌懸濁液はプレートに塗布する前に 10 倍希釈しているが、この結果においては元の濃度に換算している。

Fig. 3 に示す 1 回目の実験においては、細菌接種前、0h での細菌懸濁液の CFU/ml は、*M. luteus* は 2.5×10^5 CFU/ml, *V. tapetis* は 2.1×10^4 CFU/ml であった。どちらの細菌においても、この濃度の生菌が、接種して 6 時間後には約 1/10 に減少していた。12 時間後に細菌懸濁液を回収した個体では CFU/ml の平均値は接種前の細菌懸濁液の約 1/5 程度の値になっているが、24 時間後の個体では再び約 1/10 か、それ以下の値となった。

Fig. 4 に示す 2 回目の実験においても CFU/ml は同様の傾向を示した。細菌接種前の細菌懸濁液の CFU/ml は、*M. luteus* は 3.0×10^5 CFU/ml, *V. tapetis* は 3.5×10^5 CFU/ml であった。*M. luteus* ではこの生菌が接種 1 時間後に回収した菌液では約 1/4 になり、時間経過に伴って減少し、24 時間後に回収した菌液では約 1/15 になった。*V. tapetis* では、それぞれの時間で CFU にばらつきはあるものの、平均値をとればすべての測定時間で接種前の細菌懸濁液の約 1/8 になっていた。

なお、この実験で回収できた細菌懸濁液の量は、1 個体につき平均して約 2.3 ml 程であった。

外套膜・鰓洗浄液の *M. luteus* および *V. tapetis* のコロニーカウント

2 回目の細菌接種実験でのマガキ外套膜および鰓 1 cm² 当たりの洗浄液の CFU/ml をそれぞれ Fig. 5 および Fig. 6 に示す。外套膜洗浄液では *M. luteus* では接種後 1 時間の時点で平均約 100CFU/ml/cm² であり、時間経過に伴い僅かに減少した。*V. tapetis* は 1 時間目の時点では 250CFU/ml/cm² であったのが、時間経過に伴って大きく減少し、24 時間後にはコロニーはほとんど形成されなかった。鰓洗浄液では、

CFU/ml/cm² の経時変化の傾向は外套膜洗浄液と同様であったが、CFU/ml/cm² の数値は外套膜洗浄液よりも大きかった。接種後 1 時間の時点で *M. luteus* は約 900 CFU/ml/cm² で、接種後 6 時間の個体から得たサンプルでは CFU は大きくなったが、接種 24 時間後のサンプルでは約 300 CFU/ml/cm² に減少した。*V. tapetis* は細菌接種後 1 時間で約 7,000 CFU/ml/cm² であり、時間経過に伴って減少し、24 時間後には約 2,000 CFU/ml/cm² となった。

また、接種した細菌が外套腔内で広がっていたと考えられる範囲であるが、マガキ 3 個体を用いて検討したところ、およそ 4 cm × 2 cm = 8 cm² 程の面積であった。外套膜は 8 cm² の面積が細菌懸濁液に接触し、また鰓に関しては幅が狭いため、およそ半分、4 cm × 1 cm = 4 cm² の範囲が菌液に触れていたと考えられた。

***E. coli* 細菌懸濁液および外套膜・鰓洗浄液のコロニーカウント**

E. coli の細菌懸濁液の CFU/ml は、接種後 6 時間の時点で接種前の懸濁液 (Control) の約 1/5 に減少した (Fig. 7)。外套膜・鰓洗浄液の CFU/ml は、どちらもばらつきは非常に大きいですが、平均すればほぼ同じ数値となった (Fig. 8)。

マガキ粘液のリゾチーム活性・タンパク質濃度測定

1 回目の実験で採取した時間経過毎のマガキ粘液のリゾチーム活性、タンパク質濃度、リゾチーム比活性の測定値を Fig. 9~11 に示す。滅菌人工海水を接種した対照区ではいずれの測定項目でも時間経過に伴う大きな数値の変化はなかった。

細菌接種区では接種後 6 時間後にリゾチーム活性の低下が見られた。*V. tapetis* 接種区は対照区に対し有意にリゾチーム活性が低下した ($p < 0.05$)。対照区の約 240 U/ml に対し *V. tapetis* 接種区では約 70 U/ml であった。*M. luteus* 接種区も有意差は無いが ($p > 0.05$)、対照区よりも活性が低下する傾向があり、約 150 U/ml であった。この後、*V. tapetis* 接種区では 12 時間後には有意差は無いもののリゾチーム活性が対照区よりも上昇する傾向が見られ、これは 24 時間後でも同じであった。

M. luteus 接種区は逆にリゾチーム活性は対照区よりも低いままであったが、12 時間以降は対照区との有意差は無かった (Fig. 9)。

タンパク質濃度に関しては、それぞれの時間において対照区と実験区の間で有意差のあるような変化は見られなかった (Fig. 10)。

リゾチーム比活性においては、リゾチーム活性と同様の変化が見られた (Fig. 11)。異なるのは、細菌を接種して 6 時間後の時点で、*M. luteus* 接種区でも対照区に対し有意に比活性が低下した点である。リゾチーム活性では低下傾向はあるものの有意ではなかったが、比活性では有意差が生じた。

A



B



Fig. 1 The position of bacteria injected into oyster's mantle cavity.

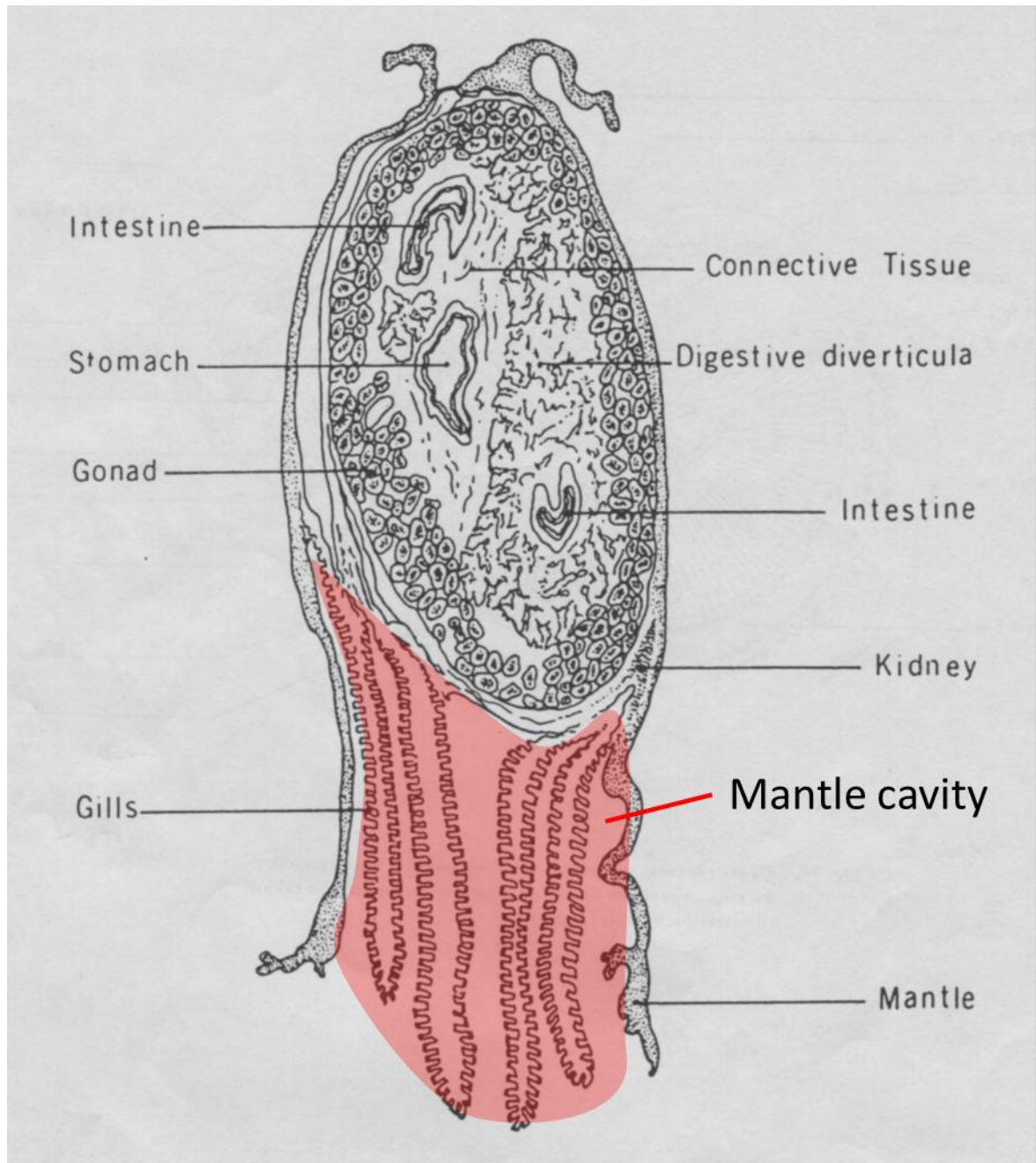


Fig. 2 Microscopic illustration of cross-section of oyster. Region indicated in red between mantles is mantle cavity. This illustration was quoted from Howard and Smith (1983).

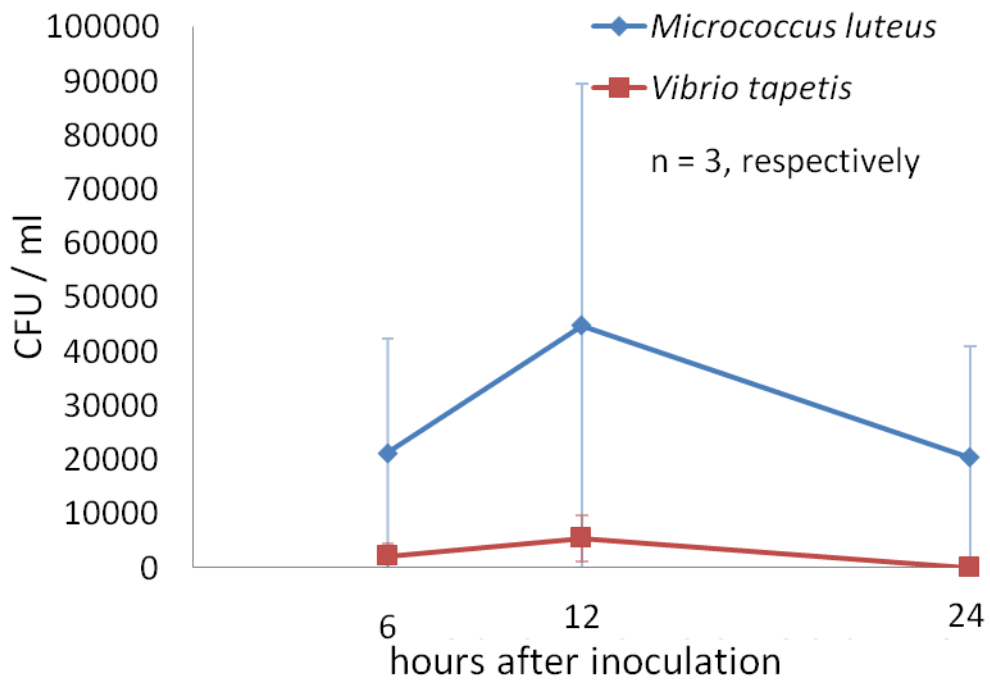


Fig. 3 Temporal changes in number of colony-forming bacterial cells in bacterial suspension inoculated into the mantle cavity of the Pacific oysters in the first experiment. Means \pm SD are indicated. In this case, CFU/ml of bacterial suspension at 0 h are about 250,000 for *M. luteus* and 21,000 for *V. tapetis*, respectively.

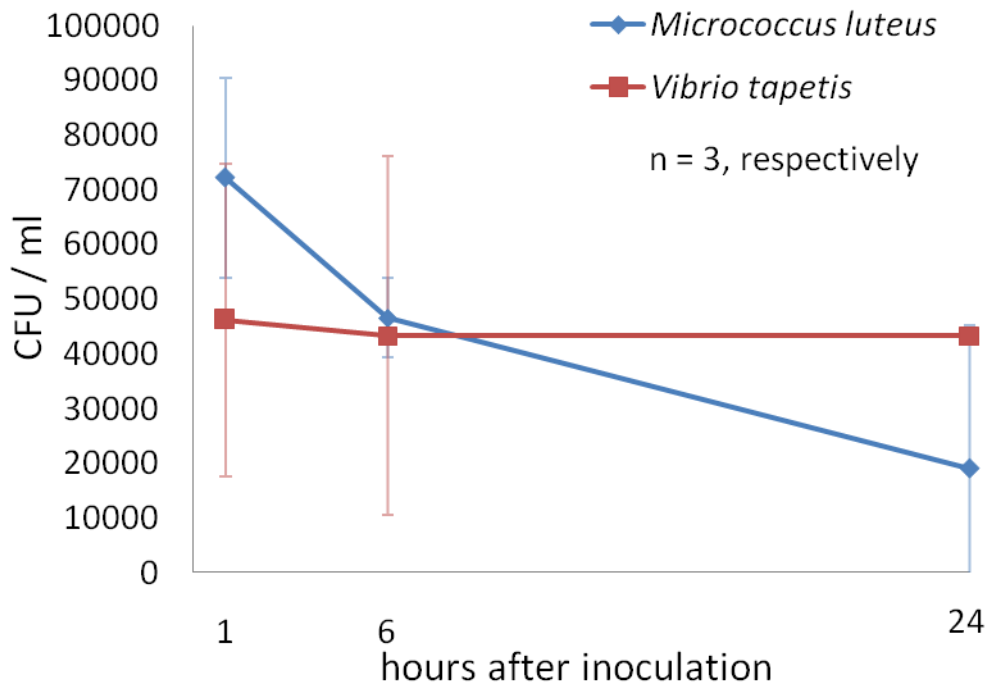


Fig. 4 Temporal of changes in number of colony-forming bacterial cells in bacterial suspension inoculated into the mantle cavity of the Pacific oysters on the second experiment. Means \pm SD are indicated. In this case, CFU/ml of bacterial suspension at 0 h are about 300,000 for *M. luteus* and 350,000 for *V. tapetis*, respectively.

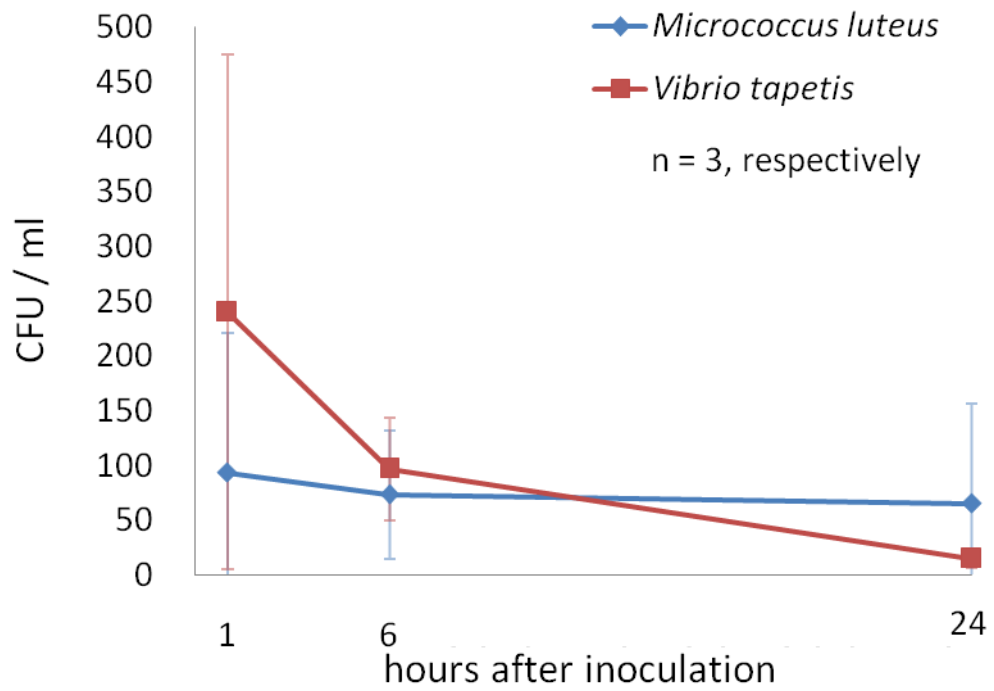


Fig. 5 Temporal changes in number of colony-forming bacterial cells in mantle lavage fluid of the Pacific oysters after inoculation of bacterial suspension on the second experiment. Means \pm SD are indicated.

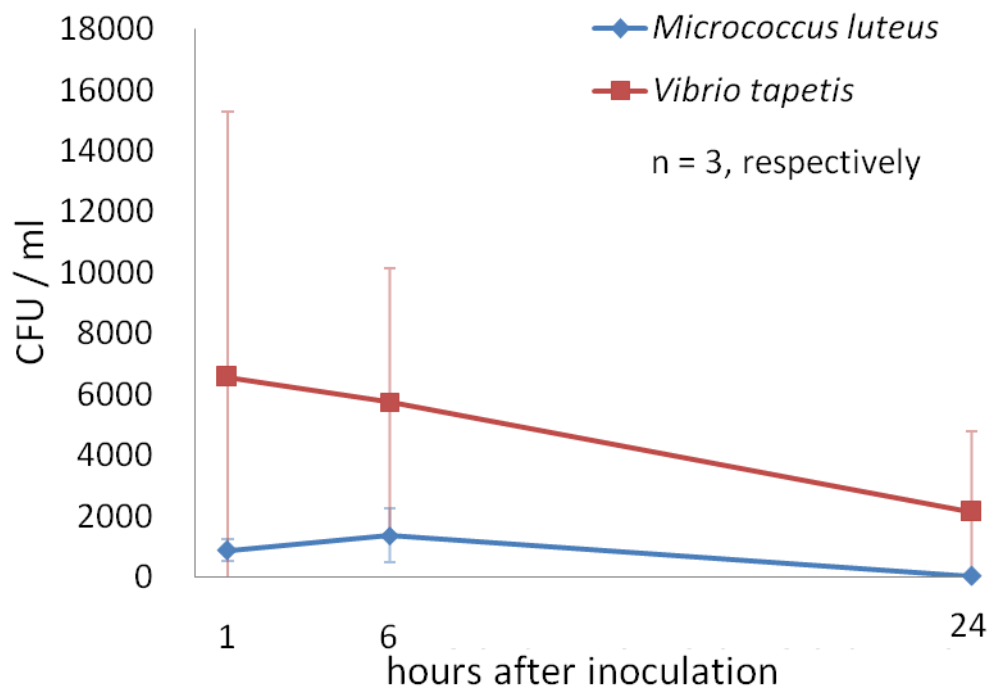


Fig. 6 Temporal changes in number of colony-forming bacterial cells in gill lavage fluid of the Pacific oysters after inoculation of bacterial suspension on the second experiment. Means \pm SD are indicated.

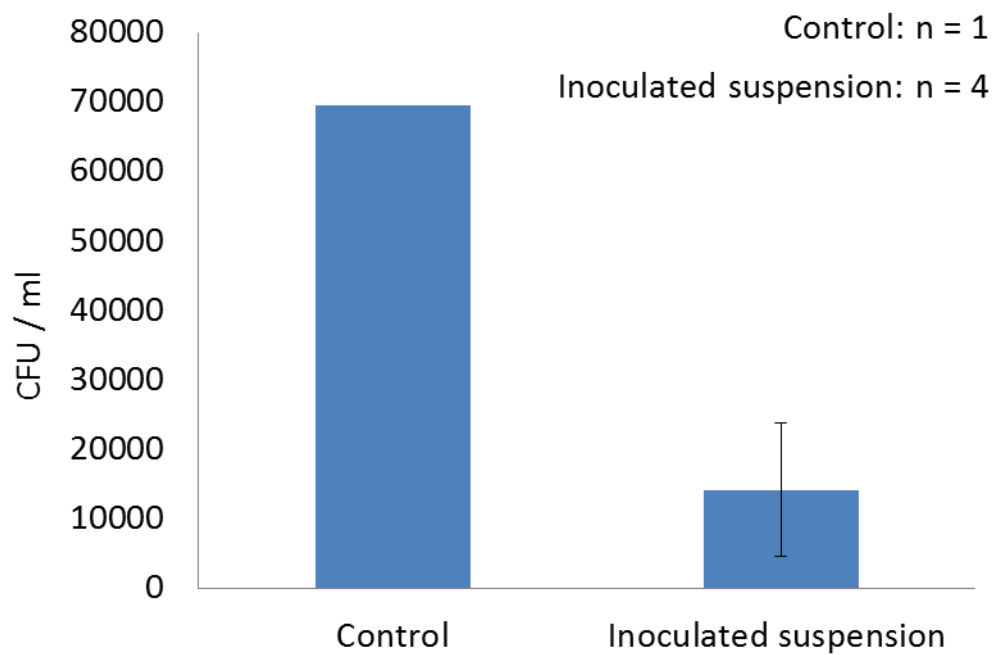


Fig. 7 Temporal changes in number of colony-forming bacterial cells in bacterial suspension inoculated into the mantle cavity of the Pacific oysters on the third experiment. Means \pm SD are indicated.

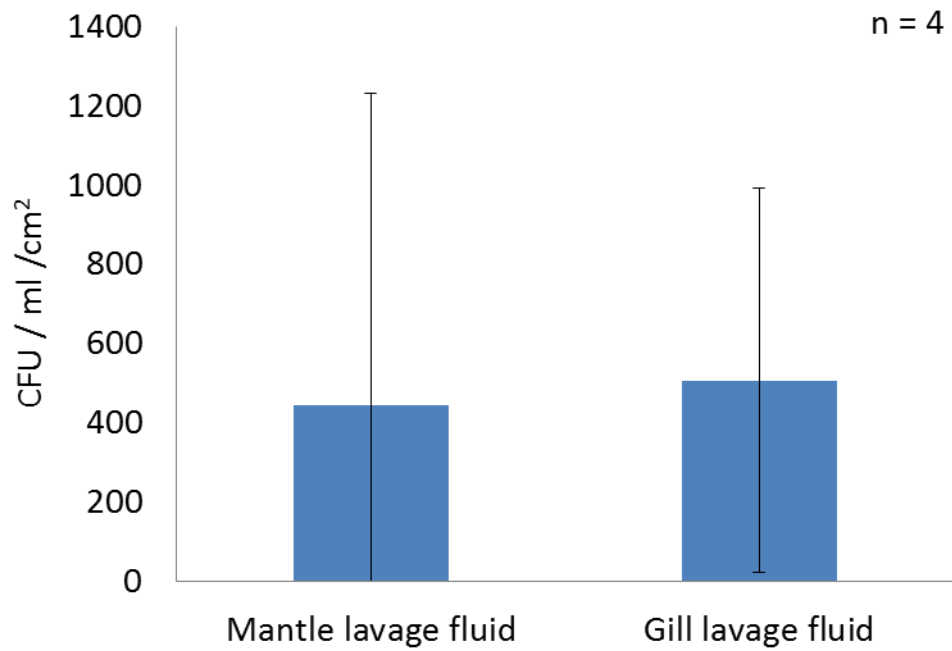


Fig. 8 Changes in number of colony-forming bacterial cells in mantle and gill lavage fluid of the Pacific oysters after inoculation of bacterial suspension on the third experiment. Means \pm SD are indicated.

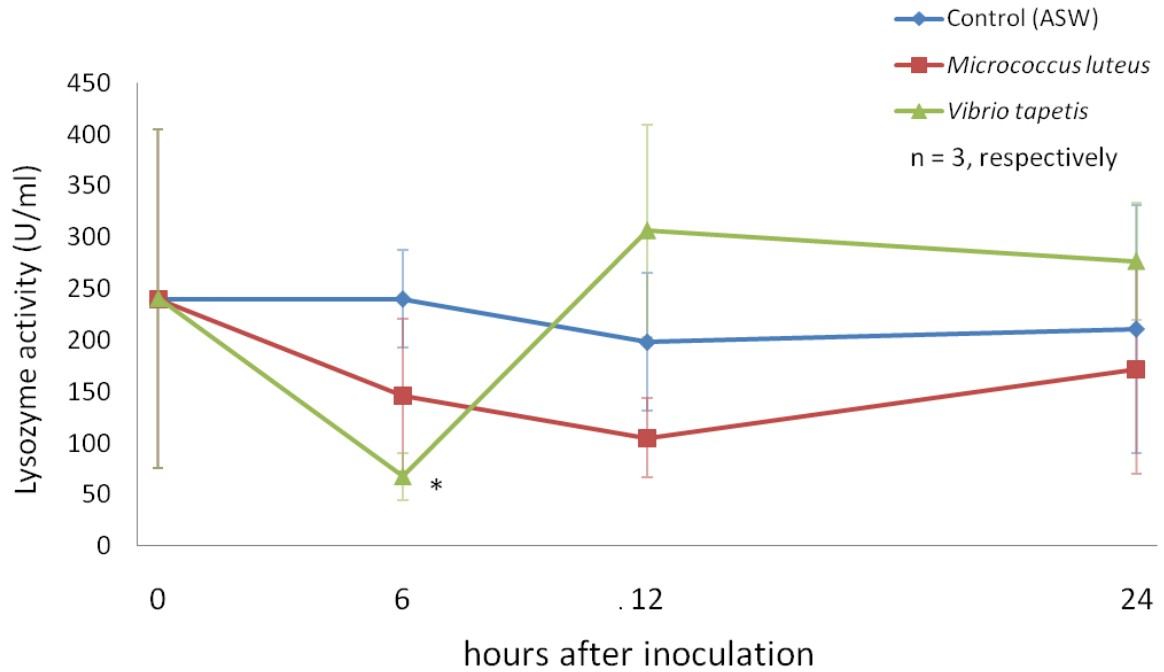


Fig. 9 Temporal changes in lysozyme activities of the mucus of the Pacific oyster mantle after inoculation of bacterial suspension or artificial seawater. Means \pm SD are indicated. Lysozyme activities are measured at pH 5.0 by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min). Asterisks indicate statistical significant differences from the control value ($p < 0.05$).

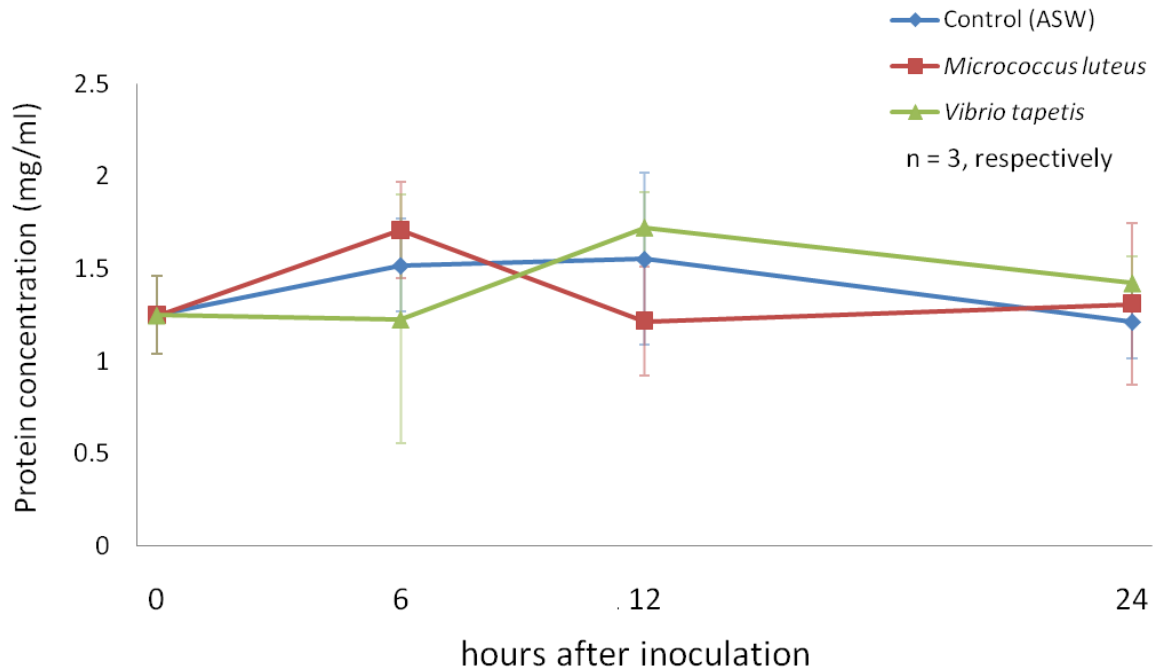


Fig. 10 Temporal changes in protein concentration of the mucus of the Pacific oyster mantle after inoculation of bacterial suspension or artificial seawater. Means \pm SD are indicated. Protein concentration are measured with Bradford protein assay.

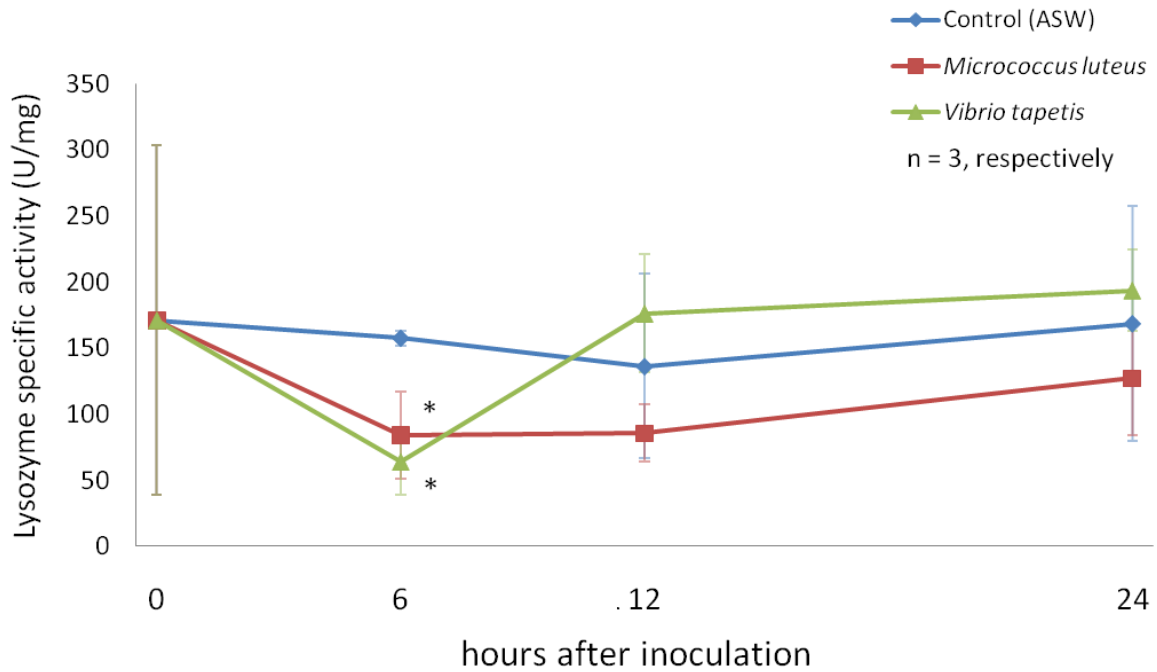


Fig. 11 Temporal changes in lysozyme specific activities of the mucus of the Pacific oyster mantle after inoculation of bacterial suspension or artificial seawater. Means \pm SD are indicated. Lysozyme activities are measured at pH 5.0 by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min). Asterisks indicate statistical significant differences from the control value ($p < 0.05$).

第2節 マガキ粘液の抗菌活性測定

【材料と方法】

マガキ粘液および血リンパの採取

抗菌活性測定に用いたマガキ粘液および血リンパはそれぞれ 2012 年 8 月および 10 月の新潟県加茂湖のマガキよりサンプリングした。粘液は 10 個体から前述したとおりの方法で採取し、夾雑物の除去をした。血リンパは 3 個体からマガキ閉殻筋よりツベルクリン用シリンジ注射針付 (26G×1/2") (テルモ) を用いて採取し、粘液と同様の条件で遠心分離を行い、血球や夾雑物を除いた上清を得た。粘液は一部をリゾチーム活性・タンパク濃度測定用に分注したあと、2~3 個体分のプールとして数サンプルに纏め、孔径 0.20 μ l のフィルター (Advantec) を用いて濾過滅菌し、滅菌エッペンチューブに入れて -30°C で冷凍保存した。血リンパは 3 個体分を全てプールした後、濾過滅菌を行ってから分注し冷凍保存した。

また、2012年11月の北海道厚岸湾産マガキを5個体サンプリングし、上記と同様の方法で粘液と血リンパを採取し、タンパク濃度を測定した後に SDS-PAGE に供した。

細菌

使用した細菌は、*M. luteus* と *V. tapetis* の 2 種類である。細菌接種実験と同様に培養したものを実験に供した。

マガキ粘液および血リンパのリゾチーム活性・タンパク質濃度測定

粘液および血リンパのリゾチーム活性・タンパク質濃度測定は第1節と同様にして行った。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE は XCell SureLock Electrophoresis Cell (NOVEX) と NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gell 1.0mm X 12 well (Invitrogen) を使用

した。サンプリングした 11 月マガキの粘液および血リンパを精製水で 1 mg/ml の濃度に希釈し、NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)と NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) (Invitrogen)を用いて処理し、NuPAGE Antioxidant (Invitrogen)を添加した還元条件下で 150 V で泳動した。サンプルは一律 20 μ l をゲルの各レーンに添加し、分子量マーカーは 5 μ l のプレステインドタンパク質マーカー (Broad range) (Nacalai tesque)とエクセルラダー (Broad range) (Aprosciense) を使用した。ゲルの染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 (MERCK) を用いた。

抗菌活性測定

細菌接種実験と同様の方法で、それぞれの細菌懸濁液を 10^5 cell/ml のオーダーに調整した。細菌懸濁液とマガキ粘液および血リンパを 20 μ l ずつ混合し、26°C で 2 時間インキュベートした。コントロールとして、滅菌人工海水と細菌懸濁液を混合した対照区を用意した。インキュベート後、滅菌人工海水を用いて、*M. luteus* は 10 倍希釈、*V. tapetis* は 100 倍希釈し、細菌接種実験と同様の方法で寒天培地プレートに細菌懸濁液を塗布し、コロニーをカウントした。コントロールのコロニー数と比べた場合の、実験区のコロニー数の増減を調べた。測定結果は、Student の片側 t 検定により、それぞれのサンプル・細菌において実験区の CFU の平均値が対照区の平均値より有意に増加あるいは減少しているかどうかを判定した。危険率は 5%とした。

【結果】

マガキ粘液および血リンパのリゾチーム活性・タンパク質濃度測定

マガキ粘液がリゾチーム活性を示したのに対し、マガキ血リンパはほとんど活性を示さなかった (Fig. 12)。また、タンパク質濃度はほぼ同じ値であった (Fig. 13)。

SDS-PAGE 解析

マガキ粘液と血リンパでは、還元条件における SDS-PAGE において、よく似た泳動パターンを示した (Fig. 14)。27 kDa, 55 kDa, 80 kDa 等の主要なバンドは共通して存在し、それ以外のバンドも個体差や粘液・血リンパ間のサンプルの差が見出せるものがあるが、どちらかのサンプルに特異的に存在するようなタンパク質バンドは見られなかった。

抗菌活性測定

マガキ体表面粘液は、*M. luteus* に対しては有意に CFU を減少させ ($p < 0.05$)、抗菌活性を示したが、*V. tapetis* に対しては有意な活性を示さなかった (Fig. 15)。人工海水と細菌を混合した対照区の CFU を 100%とした場合、粘液と混合した実験区では 56%であり、コントロールの半分近くに減少した。これに対し、*V. tapetis* では、平均が 79%であり対照区より低くなったが、ばらつきが大きく対照区より CFU が大きくなることもあり、有意な抗菌活性は示されなかった。Fig. 15 の *V. tapetis* では対照区のばらつきも非常に大きいためわかりにくいですが、測定した 7 回の個々の結果を、平均値を取らずに表したものを Table 1 に示す。この表では、それぞれの場合において対照区の CFU を 100%とした場合の、マガキ粘液と細菌を混合した実験区の CFU の割合を示している。1~4 回目の実験ではマガキ粘液と混合したサンプルの CFU は大きく減少したが、5~7 回目の実験では逆に大きく増加した。Fig. 16 は、*M. luteus*, *V. tapetis* に対して測定したマガキ体表面粘液の抗菌活性の結果のうち、用いた粘液が同じプールから分注したサンプルである 5 つのデータについて、それぞれの細菌に対する抗菌活性を縦横の

軸にとって散布図にしたものである。寄与率 $R^2 = 0.759$ であり、マガキ体表面粘液の *M. luteus* に対する抗菌活性と *V. tapetis* に対する抗菌活性との間には強い正の相関があると考えられた。

粘液の結果に対し、血リンパでは *M. luteus* に対する有意な抗菌活性は示されず、*V. tapetis* は有意にコロニー数が増加した (Fig. 17)。

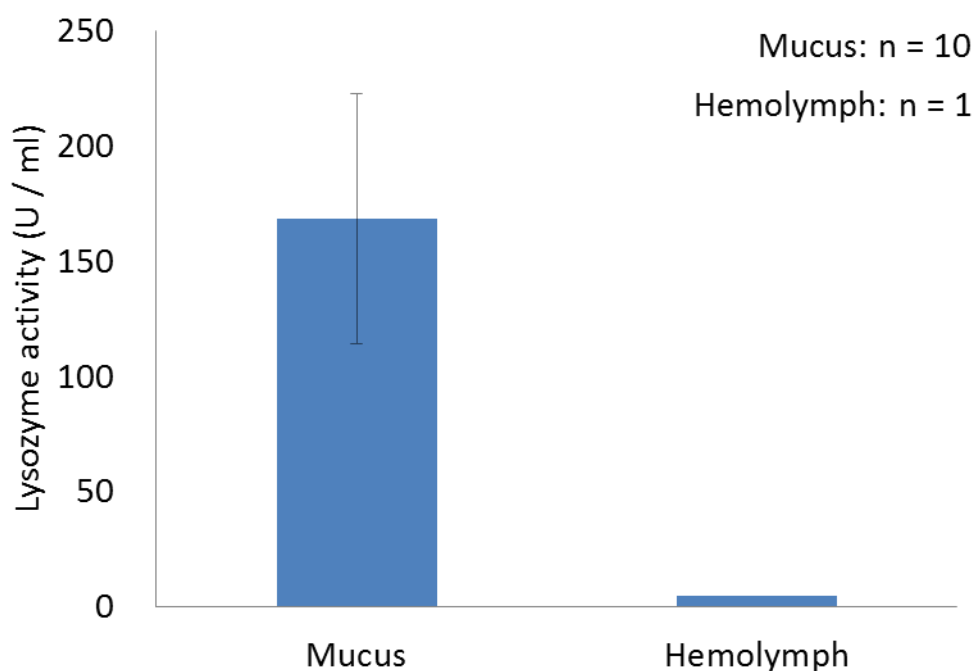


Fig. 12 Lysozyme activities of mucus and hemolymph from the Pacific oysters. Means \pm SD are indicated. Lysozyme activities are measured at pH 5.0 by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min).

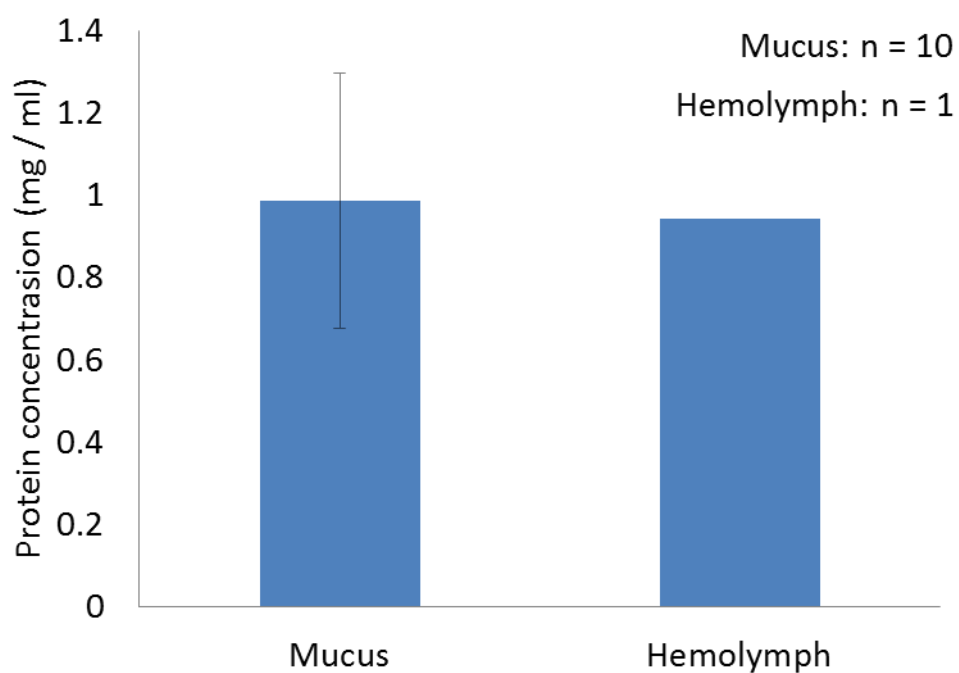


Fig. 13 Protein concentration of mucus and hemolymph from the Pacific oysters. Means \pm SD are indicated. Protein concentration are measured with Bradford protein assay.

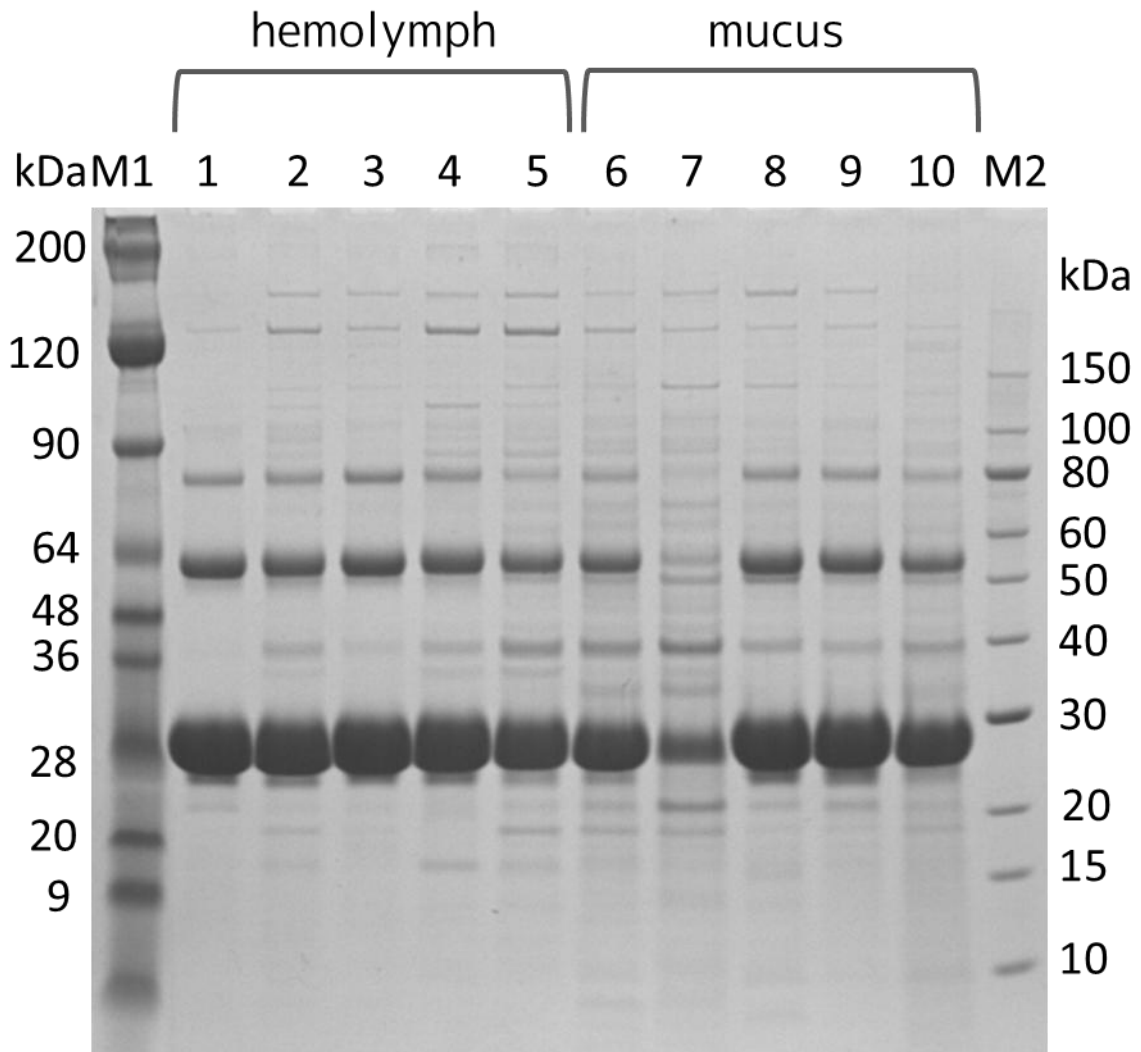


Fig. 14 SDS-PAGE of hemolymph and mucus of the Pacific oysters. Electrophoresis was carried out in a 4-12% gradient acrylamide/bis gel under reduced conditions and the gel was stained with CBB. M1 and M2 were pre-stained protein markers (Broad Range) for SDS-PAGE and the XL Ladder broad range. Lanes 1-5: hemolymph. Lanes 6-10: mucus. Each sample was adjusted to 1 mg / ml protein concentration. Only lane 7 sample was about 0.7 mg / ml protein concentration.

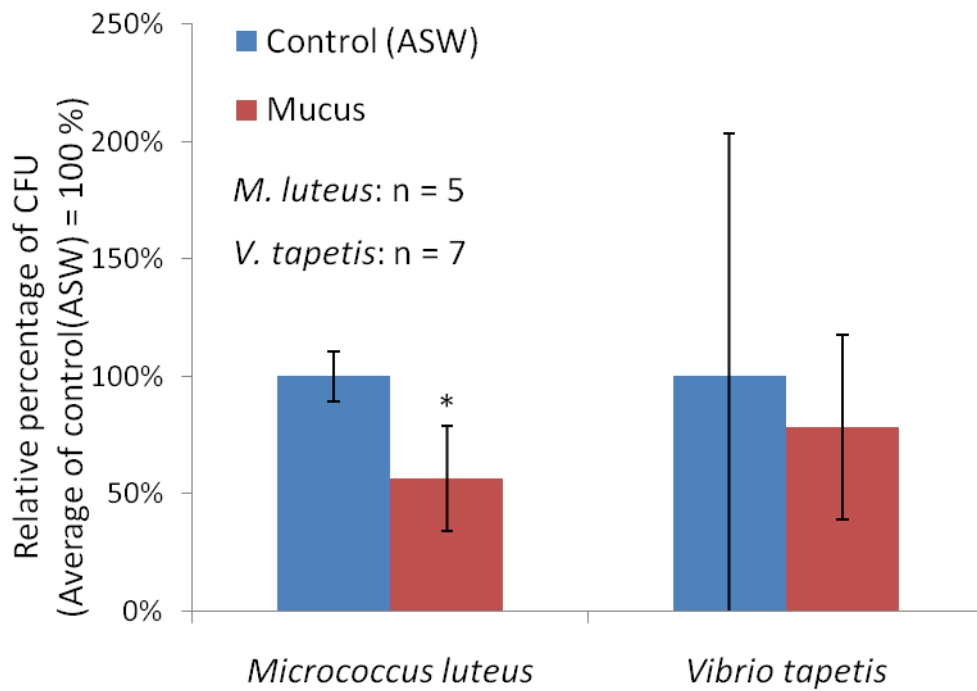


Fig. 15 Antibacterial activity of the mucus of the Pacific oysters. Means \pm SD are indicated. Mean of CFU of control (Artificial seawater) were defined as 100% on each bacteria. Asterisks indicate statistical significant differences respect to control ($P < 0.05$).

Table 1 Relative percentage (RP) of CFU by each mucus sample of the Pacific oysters in the antibacterial assay.

Sample	RP of CFU
1	28.2%
2	57.4%
3	58.0%
4	55.0%
5	240.2%
6	169.6%
7	225.8%

*Control = 100%

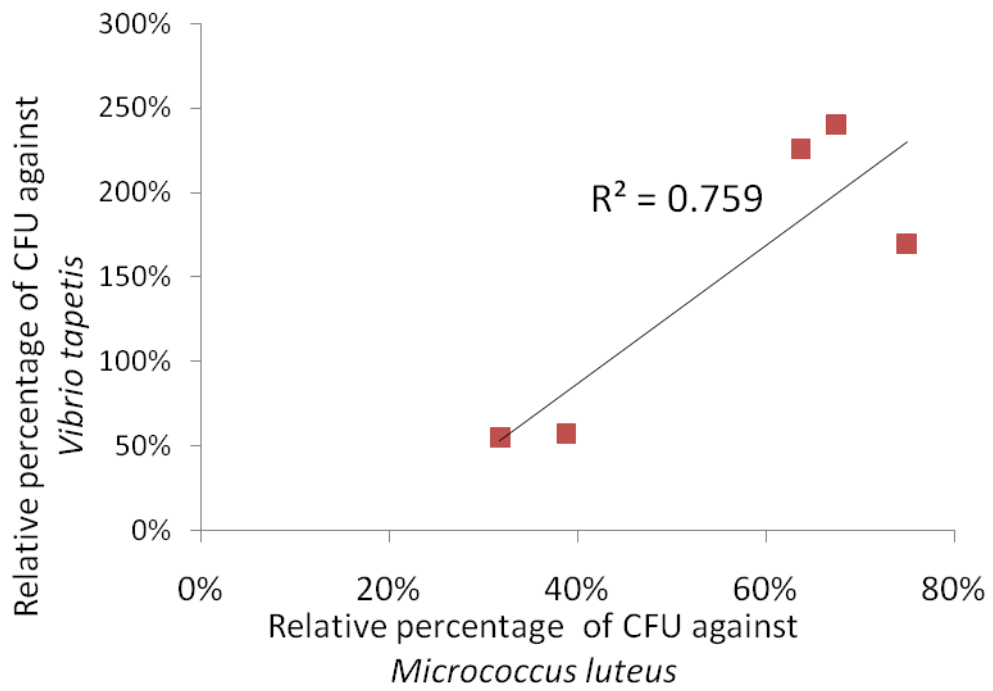


Fig. 16 Relationship between rates of CFU against *M. luteus* and *V. tapetis* of the same mucu samples.

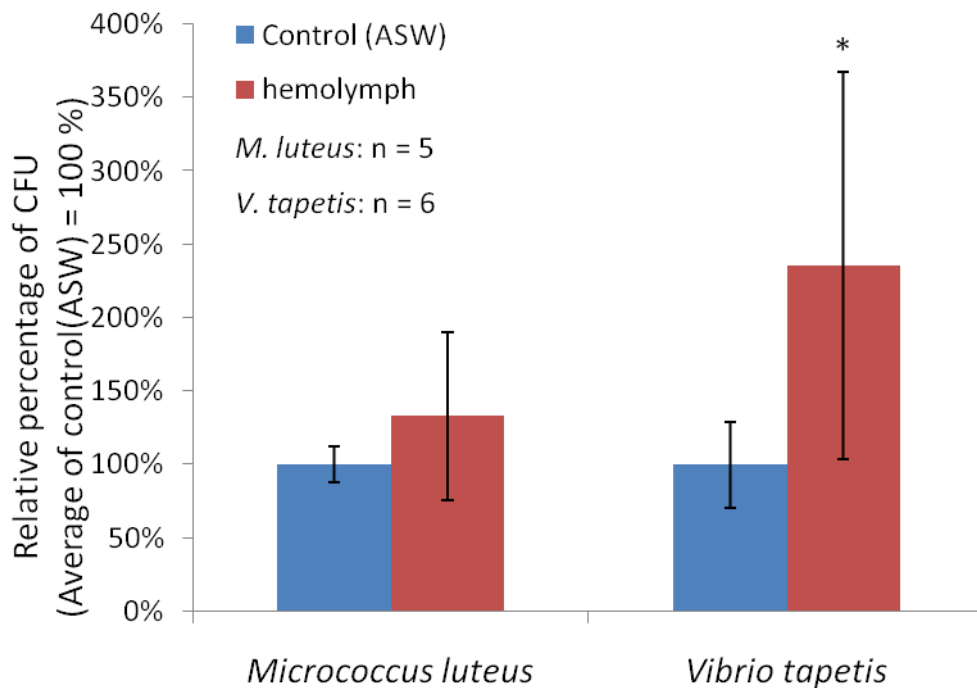


Fig. 17 Antibacterial activity of the hemolymph of the Pacific oysters. Means \pm SD are indicated. Mean of CFU of control (Artificial seawater) were defined as 100% on each bacteria. Asterisks indicate statistical significant differences respect to control ($P < 0.05$).

考察

第 1 節において、マガキ外套腔内に接種した細菌懸濁液は、急速に液中の CFU = 生菌数を減少させることが明らかとなった。3 回行った実験の内、最短で細菌懸濁液を回収した 2 回目の実験の接種後 1 時間の時点でのサンプルでも、懸濁液中の CFU は 1/4 以下となっており、オーダーが 1 つ下がるほどに減少している。なお、この実験は CFU の計算のためにコロニーをカウントする際、マガキ外套腔に元々存在している細菌のコロニーも混じってしまうため、*M. luteus* および *V. tapetis* を接種した場合はこれらの細菌のコロニーだけを正確にカウントすることはできていない。しかし、アンピシリンで選択可能な GFP 組換え *E. coli* の接種実験でも同様の減少が観察され、1, 2 回目の実験と結果が大きく異なることはなかったため、マガキ外套腔内に初めから存在する細菌の影響はごく小さいものとして考えないこととする。ここで、この接種実験でどれだけの生菌が細菌懸濁液から消えたかについて、計算を極力単純化するために、2 回目の実験の細菌接種後 6 時間後において、接種した菌液 5 ml を全て回収したと仮定した場合も、接種前よりどれほど生菌数が減少したかを考える。2 回目の実験の 6 時間目で考えるのは、3 回の細菌接種実験の全てにおいて 6 時間目のサンプルを回収しており、この経過時間までに接種した生菌が大きく減少することが確信できるため、および 2 回目の実験では接種した *M. luteus* と *V. tapetis* の元の液の CFU がほぼ同じで、かつ 6 時間後には回収した液の CFU もほぼ同じなので、どちらの細菌に関しても同じように単純化できて計算がしやすいためである。これを計算すると、接種した細菌懸濁液中の生菌約 1,500,000 cell の内、数を最大限多く見積もった場合 220,000 cell が 6 時間後の細菌懸濁液中に存在し、1,280,000 cell の生菌が細菌懸濁液から消失したという計算になる。これらの細菌が消失した理由としてまず考えられるのは、懸濁液中で死滅したか、あるいは懸濁液から別の場所に移動したかである。そして移動するのであれば菌液が接している外套膜か鰓に移動した可能性が高いと考えられ、そして組織に付着して生きているか、あるいは付着してから死滅したという可能性が考え

られた。そこで組織に付着したと想定し、組織洗浄液の CFU を調べたが、これには接種した細菌懸濁液から消えた 1,280,000 cell に比べて明らかに少なかった。Fig. 5, Fig. 6 の外套膜および鰓の洗浄液の 6 時間目の CFU と、細菌懸濁液が浸っていたと推定した軟体部内の面積から組織に付着していた生菌数を推測すると、外套膜ではどちらの細菌でも生菌数は 400 cell, 外套膜は 4 枚あるのでそれを全て合計して、*M. luteus* で 8,000 cell, *V. tapetis* で 48,000 cell である。いずれも細菌懸濁液から消失した細菌よりも少ない。したがって、消失した分の細菌は、細菌懸濁液中においてか、組織表面においてかは不明だが、何らかの形で死滅したものと考えられる。あるいは細菌が組織内部に入り込むか餌として摂食されたことで生菌として検出できなくなったということも考えられるが、その場合でも菌は鰓や外套膜の体表面粘液を介する必要があるとあり、粘液の影響を受けると考えられる。そして、細菌懸濁液・外套膜および鰓の洗浄液中の CFU は時間経過に伴い徐々に低下する傾向が示された。これらの結果から、マガキの外套腔内に接種した細菌は急激に減少すること、外套膜や鰓といった体表面組織において細菌を排除する生体防御機構をマガキが有していること、そこに粘液が関与していることが考えられた。このことから、*in vitro* 実験による粘液の抗菌活性測定により、マガキ体表面粘液が細菌に対して抗菌能を示すかを第 2 節において検討した。なお、今回観察されたマガキ外套腔内での細菌の消失について、マガキ組織内への細菌の侵入や餌としての取り込みを踏まえて詳しく研究するには、接種する細菌に何らかの標識をしておき、接種後にマガキの組織切片を作成して細菌を追跡・検出して考えることが必要であろう。

in vitro の抗菌活性実験においては、マガキ血リンパはいずれの細菌にも抗菌活性を示さなかったが、粘液は *M. luteus* に対し活性を示し、*V. tapetis* に対しては活性を測定するたびにばらつきはあるものの、抗菌活性を示す可能性が想定された。この結果は *in vivo* の実験で考えられたマガキ体表面粘液の生体防御機能としての役割を支持するものである。*V. tapetis* に対する効果の不安定さは、それぞれの実験を

行った時に用いたサンプルの差、つまり個体差が関係している可能性がある。

粘液の作用が不安定な *V. tapetis* に対し、*M. luteus* に対する有意な抗菌作用は、リゾチームによるものである可能性が高いと思われた。リゾチームはグラム陽性菌の細胞壁を分解する酵素であるが、粘液と血リンパで、主要なタンパク質の組成が似ており (Fig. 14)、粘液にだけリゾチーム溶菌活性があることから (Fig. 12)、マガキ粘液の *M. luteus* に対する抗菌作用はリゾチームの溶菌作用による部分が重要だと考えられた。オーロラニシキガイ *Chlamys islandica* のリゾチーム様酵素クラミジンやアメリカガキ *Crassostrea virginica* のリゾチームにグラム陰性菌に対する抗菌活性があるように (Nilsen *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2007)、マガキ粘液中の、リゾチームと思われる抗菌因子がグラム陰性菌である *V. tapetis* にも作用している可能性も考えたが、Fig. 16 のそれぞれの細菌に対するマガキ粘液の作用をサンプルごとに対応させた散布図からは、これらの前例の様にリゾチームと考えられる *M. luteus* に抗菌作用を示した因子が *V. tapetis* に対しても抗菌活性を示すということは考えにくいと思われた。マガキ粘液の *M. luteus* に対する抗菌作用と *V. tapetis* に対する抗菌作用との間に相関関係があることが考えられるが、*M. luteus* に対しては、サンプルごとに強さの差はあれど一様に CFU を減少させているのに対し、*V. tapetis* に対しては CFU が増加したものと減少したものとに結果が分かれている。これは、リゾチームと考えられる *M. luteus* に対する抗菌因子のみの多寡による差ではなく、この防御因子とは別の液性防御因子が存在し、*V. tapetis* に対して作用しているためではないかと考えた。すなわち、リゾチームと思われる *M. luteus* に作用した抗菌因子と、*V. tapetis* に対して作用した抗菌因子は別々のものだが、*M. luteus* に対する抗菌活性が強いサンプルでは *V. tapetis* に対する抗菌活性も強いと考えられる。マガキ体表面粘液中には、*M. luteus* に対して安定した作用を示す抗菌因子リゾチームと、*V. tapetis* に対して不安定な作用を示す抗菌因子の、少なくとも 2 種類の抗菌因子が存在することが考えられた。そして、粘液中に存在すると考えられたこれら

の抗菌因子が、マガキ外套腔内での殺菌に関連している可能性が考えられた。

リゾチームが外套腔内での殺菌に関わっていると考えられるもう1つのデータとして、マガキ外套腔内に細菌接種をして6時間後に採取した体表面粘液で接種前の粘液と比べて有意にリゾチーム活性が低下したことが挙げられる。これはマガキの、細菌接種に対する何らかの反応であると考えられる。二枚貝では細菌曝露によりリゾチームの活性が低下した事例と上昇した事例があり、ヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* では *Vibrio anguillarum* の接種によりリゾチーム活性が低下し (Hauton *et al.*, 2000)、逆にアサリにおいて *V. tapetis* の感染によりリゾチーム活性が上昇した (Allam *et al.*, 2000a,b) など、二枚貝のリゾチームが細菌の曝露によって何らかの誘導を受けることが報告されている。今回観察された細菌接種によるリゾチーム活性の低下は一見細菌防御に不利な反応であるとも考えられるが、実際には細菌懸濁液および外套膜・鰓の CFU は時間経過に伴い減少しているため、このリゾチーム活性が低下する反応もその細菌防御のための反応である可能性がある。ホンビノスガイ *Mercenaria mercenaria* の血球を含む血リンパにグラム陽性菌 *Bacillus megaterium* の死菌を暴露したところ血球中のリゾチーム量が低下し 血漿中のリゾチーム量が上昇したという報告があるが (Cheng *et al.*, 1975)、これは血球中のリゾチームが細菌の刺激により血球外へ分泌されたものであると説明されている。この血球と同様の反応が外套膜においても起こったと考えれば、接種された細菌の刺激により 外套膜内のリゾチームの分泌が促進され、粘液へ、さらに粘液から細菌懸濁液へと放出され、外套膜組織内のリゾチームが枯渇したために、新しく分泌された粘液ではリゾチーム活性が低くなり、更に時間が経過すると元のリゾチーム活性の水準に戻った、ということが想定される。仮にこのような応答反応をしているのであれば、細菌を認識し粘液・体表面組織で排除するという生体防御機能としての反応であると言えるであろう。リゾチームが分泌されたのであれば細菌懸濁液中からも リゾチーム活性が検出されると考え、測定はしたが明確な活性は認められなかった (date not shown)。これに関しては接種した

細菌懸濁液の量が多過ぎたため、濁度法では活性が測れない程にリゾチームが希釈されてしまったということも考えられる。抗リゾチーム抗体を用いたウエスタンブロットや ELISA など濁度法以上に少量のリゾチームを検出する方法を用いればより確かな結論が得られるであろう。リゾチーム以外でも、マガキの外殻腔内に *E. coli* を曝露することにより外殻膜や鰓で異物認識タンパクであるペプチドグリカン認識タンパク質 (Peptidoglycan Recognition Protein: PGRP) の一種、CgPGRP-S1S の発現量が上昇するなど、外殻腔内や組織表面の細菌を認識し応答反応を示すと考えられる例は他にもあり (飯塚 2012)、体表面組織や粘液中の、リゾチームなどの抗菌因子の応答反応は、マガキ粘液の生体防御システムとしての役割を示唆するものであると考えられた。

以上の、マガキ体表面粘液中のリゾチームによると考えられるグラム陽性菌 *M. luteus* に対する抗菌作用に対し、グラム陰性菌 *V. tapetis* に対する抗菌作用もまた粘液の生体防御機能として重要なものであると考えられた。*Vibrio* 属細菌が二枚貝に対し病原性を有する理由として考えられる要因に、菌体外プロテアーゼの産生 (Labreuche *et al.*, 2006) や、血球の *Vibrio* 属細菌に対する貪食能が低いこと (森ら, 2005; Labreuche *et al.*, 2006) などの *Vibrio* 属細菌が持つ特性が挙げられる。本実験でマガキ体表面粘液が *V. tapetis* の生育を抑制できたということは、マガキ粘液にはこれらの防御機能を備えた *Vibrio* 属細菌であっても排除できるという可能性を示している。最も、本実験で用いた *V. tapetis* は主にアサリのブラウンリング病の原因菌であり (Paillard *et al.*, 1994; Paillard, 2004)、マガキ幼生に対する感染性も報告はされているもののマガキに対する病原性は高くなく (Saulnier *et al.*, 2010)、多くの場合、マガキの *Vibrio* 病による大量斃死は幼生期における問題であること (Boettcher *et al.*, 1999, 2000; Ford and Borrero 2001; Paillard *et al.* 1996)、実験に用いたのは成体のマガキであることなどから、単純にマガキ幼生においても同様の *Vibrio* 病に対する抗菌性があるとは言えない。しかし、いずれにしてもこの粘液中に存在すると思われる作用因子を解明できれば二枚貝幼生の *Vibrio* 病への有効な対症法の確立に繋がるのではないかと考えられる。マガキという同じ種内でも作用の

強さにばらつきがあることは、個体差による因子の強さの差が存在することが考えられ、この抗菌因子による個体選抜によつての耐病性品種の作出や、抗菌因子の *Vibrio* 病の治療薬への応用などが期待される。

マガキにおいてはディフェンシンや PGRP、モルシジンなど様々な生体防御因子に関する多数の報告がなされており (Gueguen *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007a,b; Itoh and Takahashi 2008; Gueguen *et al.*, 2009; Itoh and Takahashi 2009; Seo *et al.*, 2013)、マガキ以外の二枚貝においても抗菌ペプチドや PGRP の報告がある。本研究において示されたマガキ粘液の *V. tapetis* に対する抗菌作用も、血リンパには無いが粘液のみに存在する抗菌ペプチドや PGRP などが作用した結果の可能性がある。今後の課題として、この抗菌因子がどのようなものであるのか、その同定と特性解析が必要だろう。

第2章 マガキ外套膜中のリゾチームおよびキチナーゼの 特性解析

【緒言】

第1章でマガキ粘液において確認された抗菌活性は、*M. luteus* に対して確実に効果を発揮し、*V. tapetis* に対しては不安定ながら効果がある可能性を示した。このことから、マガキ粘液中の抗菌活性を示す因子には、少なくともグラム陽性菌に対して特に効果的に作用する物質が含まれていると考えられた。そこで、マガキにおいて存在が確認されている抗菌因子の内、第1章においても粘液中の活性を測定し、グラム陽性菌に対する溶菌作用を示す酵素であり、*M. luteus* に対しても抗菌作用を示していたと推測した酵素であるリゾチームに関して、特性解析を行い実際にマガキ粘液のサーフェスバリア機能において重要な役割を担っているかを検討した。また、リゾチームに加えて、真菌や一部のグラム陽性菌に対して溶菌作用を示すキチナーゼにも着目し、体表面粘液の抗菌活性に関わっているかを検討した。

第1節ではマガキの外套膜組織リゾチームの精製と特性の解析を行い、第1章で示されたマガキ粘液の抗菌活性に本当にリゾチームの関与が考えられるかを検討した。リゾチーム (EC 3.2.1.17) はファージ、バクテリア、植物、脊椎動物、無脊椎動物と様々な生物に分布する酵素で、グラム陽性菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と N-アセチルグルコサミン (GluNAc) 間の β -1,4 結合を加水分解する溶菌酵素である (林ら, 1974; Jolles and Jolles, 1984)。マガキのリゾチーム分子 (CGL) は 3 種類存在することが確認されており、CGL - 1, CGL - 2, CGL - 3 と呼ばれている。これらのリゾチームのうち、1 は閉殻筋を除く調べられた全組織で、2 は主に消化盲囊の消化細胞で、3 は主に外套膜で遺伝子が発現している (Matsumoto *et al.*, 2006; Itoh *et al.*, 2007, Itoh *et al.*, 2010)。CGL - 1 および CGL - 3 は共に外套膜で発現していることから、この 2 種の

リゾチームが生体防御に重要な因子であり、また機能も分化している可能性があると考えた。そこでマガキ外套膜抽出液を用いて溶菌活性の特性を把握し、続いて当研究室の伊藤直樹助教が *Pichia Expression Kit* (Invitrogen) を用いて形質転換を行った *Pichia pastoris* 酵母により、組換え酵素 recombinant CGL (rCGL) の合成・精製と溶菌・抗菌活性を行い、CGL が細菌に対する防御因子として有効なものであるか明らかにすることを旨とした。二枚貝において *P. pastoris* を用いてリコンビナントリゾチームを合成した例としてはアサリ (Takeshita *et al.*, 2004) やアカザラガイ *Chlamis farreri* (Zhao *et al.*, 2006) などの前例があり、合成されたリゾチームは高い溶菌活性を示すことから、リコンビナントリゾチームは特性の解析に用いる事が可能であると考えた。

第2節ではマガキ外套膜抽出液の抗真菌酵素キチナーゼに関して特性を調べ、更に完全長 cDNA を合成し大腸菌を用いて組換えタンパクを合成し、機能を調べた。マガキには glycoside hydrolase family 18 (GH18) に属するキチナーゼとして Cg-chit1 (Badariotti *et al.*, 2007), Cg-chit2, Cg-chit3 (Badariotti *et al.*, 2011) の遺伝子が同定されており、Cg-chit1 は外套膜で発現しているが、その酵素活性の解析は行われていない。キチナーゼの作用としては真菌の細胞壁を構成する β -1-4-N-アセチルグルコサミンのポリマーであるキチンを加水分解し真菌や酵母などに対する生体防御因子として機能する (Boot *et al.*, 1995; Boot *et al.*, 2001; Kramer and Muthukrishnan, 1997; van Eijk *et al.*, 2005) ほか、リゾチームと基質が共通するためカリゾチームと同様の溶菌活性を示す場合もある (Majeau *et al.*, 1990)。リゾチームと関わりの深い酵素であり、また二枚貝は細菌と同様に真菌性の感染症も少ないことから、真菌に対しても優れた防御能を有していると考えられ、キチナーゼの機能解析を行うことも重要な知見となるであろうと考えた。

第 1 節 マガキ外套膜中のリゾチームの特性解析

【材料と方法】

マガキ外套膜抽出液のリゾチーム活性測定

マガキは 2006 年 9 月の宮城県女川湾産および松島湾産のマガキそれぞれ 3 個体および 1 個体、2007 年松島湾産マガキ 10 個体を採取し、軟体部を摘出して -80°C で保存し、順次解凍して実験に供した。

凍結保存していたマガキの軟体部を室温で解凍後、解剖用ハサミとピンセットを用いて外套膜を摘出した。外套膜の重量を測定し、湿重量の 5 倍 (weight/volume) の 0.1 M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加えて氷中で冷却しながらホモジナイズし、遠心分離 (4°C , $17,000\times\text{g}$, 30 分) して上清を得た。上清には細かな組織片が含まれており、これを孔径 5.0 μm のメンブレンフィルター (Millipore) を用いて濾過することで除去した。得られた上清を 5 等分し、少量の 6 N HCl または 5N NaOH を加えて pH を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 の 5 段階に調整した。

リゾチーム活性は第 1 章と同様に *M. luteus* を用いた濁度法で測定したが、変更点として *M. luteus* の懸濁には Sorensen リン酸緩衝液 (1/15 M Na_2HPO_4 - 1/15 M KH_2PO_4 , pH 7.0) を用い、各 pH サンプル 100 μl と基質溶液 200 μl を混合するようにした。U (ユニット) の計算方法も同様だが、サンプル量と細菌懸濁液の量が変わっているため定義も異なっている。単位は組織湿重量当たりのリゾチーム活性 (U/g) で表示した。

マガキ外套膜リゾチームの組換え酵素 rCGL-1 および rCGL-3 の合成

それぞれの rCGL を産生できる形質転換酵母は、当研究室の伊藤直樹助教より供与を受けたものを用いた。

冷凍保存していた *P. pastris* 酵母を YPD 培地プレート (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1% agar) を用いて、 30°C で 3 日間培養した。プレート上に形成された酵母のコロニーを、BMGY 培地 (1%

yeast extract, 2% peptone, 0.34% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate, 1% Ammonium Sulfate, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% glycerol, 100mM potassium phosphate, pH 6.0) 50 ml が入ったバッフル付きフラスコに植菌し、 $30^{\circ}\text{C} \cdot 200 \text{ rpm}$ で攪拌しながら 24 時間培養し (一次培養)、培養後培地を BMGY 培地 1.5 L、2.3 L または 3 L に加え更に 3 日間培養した (二次培養)。二次培養において、培地 1.5 L を用いて培養する際は微生物用ファーメンター MBF-300ME (東京理化学器械株式会社) を使用し、約 570 rpm で攪拌して培養した。2.3 L または 3.0 L 培養する際はこれに加えバッフル付きフラスコを用い、培地 0.8 L または 1.5 L を 200 rpm で回転させながら培養した。その後酵母を遠心分離 (4°C , $3,000 \times g$, 5 分) して回収し、500 ml の BMMY 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 0.34% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate, 1% Ammonium Sulfate, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 0.5% methanol, 100mM potassium phosphate, pH 6.0) に再懸濁して rCGL 産生の誘導をかけ、更に 3 日間、24 時間おきに培地の 1% 量のメタノールを加えながら培養した。培養は rCGL-1 では二次培養を 1.5 L で 1 回のみ、rCGL-3 では 2.3 L で 3 回、3 L で 1 回行った。二次培養の 3 日目に培養を終了し、培地を遠心分離 (4°C , $3,000 \times g$, 5 分) して酵母を分離し、rCGL を含む培地を得た。これに硫酸アンモニウムを 0°C において 80% 飽和になるように加え、 4°C でスターラーを用いて over night で攪拌し、塩析を行った。析出したタンパク質沈殿を遠心分離 (4°C , $39,000 \times g$, 25 分) して上清を捨てて回収し、沈殿は使用時まで -30°C で保存した。

rCGL-1 および rCGL-3 の精製

rCGL の精製は陽イオン交換クロマトグラフィーによって行った。冷凍保存していた塩析沈殿を室温に静置して解凍し、少量の 0.02 M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に再溶解させ、これを PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した。脱塩した濃縮培地サンプルを 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した陽イオン交換カラム HiTrap SP XL 5 ml (GE Healthcare) に流速 1 ml/min で添加した。

そして酢酸緩衝液を流速 5 ml / min で 50 ml、更に緩衝液の NaCl 濃度を 0.1 M にして 250 ml 以上流し、カラムに結合しないタンパク質と培地成分を洗浄して除去した。緩衝液の NaCl 濃度を 0.1 M から 0.7 M まで、流速 2 ml / min, 流量 72ml で徐々に上昇させるグラジエント法によりカラムからタンパク質を溶出させた。溶出タンパクは 2 ml 毎にフラクションとして回収し、それぞれリゾチーム活性を測定した。この後、rCGL-1 は、フラクションのリゾチーム活性のある部分のピーク部を集め、iCON Concentrators, 7 ml/9 K (Thermo) を用いて遠心分離 (4°C, 5,000×g, 25 分) して限外濾過を行い、タンパク質を濃縮した。rCGL-3 は活性のあったフラクションを集めて 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて 10 倍に希釈し、再び同様の方法により陽イオン交換クロマトグラフィーで精製し、リゾチーム活性のあるフラクションを限外濾過で濃縮した。

タンパク質濃度測定

濃縮したサンプルは、第 1 章と同様のブラッドフォード法によりタンパク濃度を測定したが、rCGL においては検量線作成のスタンダードにプロテインスタンダード I (ウシγグロブリン) (Bio-rad) を用いた。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE により、rCGL の精製の程度を確認した。使用した機器およびゲルは第 1 章と同様であるが、タンパク質マーカにはエクセルラダー (Low range) (Aprosciense) を用い、タンパク質バンドの染色は Coomassie Fluor Orange protein gel stain (Invitrogen) を使用して、UV トランスイルミネーターにより紫外線で検出した。タンパク質マーカから、それぞれの rCGL の分子量を推定した。

溶菌活性特性解析

それぞれリゾチームの溶菌活性を、緩衝液の pH およびイオン強度を変えて測定することで、至適活性条件を解析した。手法は Xue *et al.* (2004) の測定方法を参考とした。

rCGL-1 および rCGL-3 の緩衝液を、iCON Concentrators, 7 ml/9 K (iCON Gold Recovery) を用いた遠心分離 (4°C, 5,000×g, 25 分) による限外濾過によって精製水に交換した。その後、タンパク質濃度をブラッドフォード法で測定し直し、濃度 1.8 µg/ml に調整した。

測定に使用する緩衝液は、pH は 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 の 15 通りとし、それぞれの pH に対しイオン強度は、rCGL-1 は $I = 0.005, 0.020, 0.100, 0.180, 0.260, 0.340, 0.420$ の 7 通り、rCGL-3 は $I = 0.005, 0.020, 0.100, 0.180, 0.260$ の 5 通りとした。緩衝液の種類は、pH 3.0–5.5 は酢酸緩衝液、pH 6.0–8.0 はリン酸緩衝液、pH 8.5–10.0 はホウ酸緩衝液を使用した。イオン強度は、緩衝液成分を $I = 0.005$ としたものを分注し、NaCl を加える事で $I = 0.005, 0.020, 0.100, 0.180, 0.260, 0.340, 0.420$ の緩衝液をそれぞれ作成した。これらの緩衝液 990 µl に、精製水で 100 mg/ml の濃度に懸濁した *M. luteus* を 10 µl 加えて混合し、各 pH・イオン強度条件の 1 mg/ml *M. luteus* 懸濁液を調製した。これらを用いて溶菌活性を測定した。測定方法は、それぞれの pH・イオン強度条件の *M. luteus* 懸濁液を基質に用い、コントロールもそれぞれの条件の緩衝液にした以外は第 1 章と同様である。最も溶菌活性が高かった pH・イオン強度条件における溶菌活性の U (ユニット) を 100% として、各条件での溶菌活性を% で表した。

また、rCGL の溶菌活性における反応温度特性も解析した。上記の pH・イオン強度の条件内における溶菌活性の至適条件下で、リゾチームサンプルと細菌懸濁液を混合した後のインキュベート温度を 5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、37°C の 7 通りとしてリゾチーム活性を測定した。

抗菌活性測定

リゾチームはグラム陽性菌に対する溶菌作用を持つこと、および第 1 章よりグラム陽性菌 *M. luteus* に対する抗菌作用にリゾチームが関わっていることが考えられることから、リゾチームは *M. luteus* に対しては溶菌的に殺菌することが考えられるが、それ以外の菌に対してはどのように作用するかは明らかではない。そこで、溶菌作用とは別に抗菌作用を測定する。抗菌活性の測定には、グラム陽性細菌 *Marinococcus halophilus* (IAM 12844), *Planococcus citreus* (IAM 12456), *Staphylococcus aureus* (IFO 3761), グラム陰性細菌 *Alteromonas haloplanktis* (IAM 12919), *E. coli* (IAM 1264), *Vibrio tubiashii* (ATCC 19106) の 6 種を用いた。これらのうち *M. halophilus*, *P. citreus*, *A. haloplanktis*, *V. tubiashii* の 4 種は海洋細菌であり、*V. tubiashii* はマガキを含む二枚貝幼生に対し病原性を示す菌である。

緩衝液は、rCGL-1 は PBS (pH 7.2) I = 0.005, 0.172, 0.700 および酢酸緩衝液 (pH 5.5) I = 0.172 の 4 種類、rCGL-3 は PBS (pH 7.2) I = 0.020, 0.172, 0.700 の 3 種類である。PBS (pH 7.2) I = 0.172 の PBS の組成は 10 mM PB, 0.85 % NaCl であり、I = 0.005 および 0.020 の PBS はこれを 34.4 倍および 8.6 倍希釈して調整したもので、それぞれ rCGL-1, rCGL-3 の溶菌活性の至適条件に近づけたものである。I = 0.700 の PBS は 10 mM PB, 3.93 % NaCl で、NaCl の濃度を上げてイオン強度条件を海水に近づけたものである。酢酸緩衝液は I = 0.172 の PBS と同じく NaCl 濃度を 0.85 % としたもので、rCGL-1 は酸性条件でもある程度の溶菌活性を示す特徴があった、その条件下での抗菌活性を調べるため設けた実験区である。

リゾチームは iCON Concentrator 9K/7 ml を用いた限外濾過により、rCGL-1 サンプルの緩衝液を PBS I = 0.005 および酢酸緩衝液 I = 0.172 に、rCGL-3 サンプルの緩衝液を PBS I = 0.020 に交換した。これらのサンプルを孔径 0.20 μm のフィルターを通して滅菌し、ブラッドフォード法でタンパク質濃度を測定した後に、各緩衝液で希釈してタンパク濃度を 38.8 $\mu\text{g/ml}$ とした。さらに連続二倍希釈を行って

タンパク濃度 19.4, 9.70, 4.85, 2.43, 1.21, 0.606, 0.303, 0.152, 0.076, 0.038 $\mu\text{g/ml}$ の希釈系列を調製した。

それぞれの細菌を各緩衝液で濃度 10^6 cells/ml のオーダーに希釈して、抗菌活性測定用の細菌懸濁液を調整した。それぞれの緩衝液で調整した細菌は、 $I = 0.005$ および 0.020 の PBS と $I = 0.172$ の酢酸緩衝液は *V. tubiashii* 以外の 5 種類、 $I = 0.172$ の PBS では *S. aureus* と *E. coli* の 2 種、 $I = 0.700$ の PBS では海洋細菌 4 種である。低イオン強度での PBS および酢酸緩衝液で *V. tubiashii* を用いなかったのは、これらの条件下では *V. tubiashii* は増殖できなかったためである。

滅菌済みの 96 ウェルプレート上で各細菌懸濁液 20 μl と各希釈系列の rCGL 溶液 20 μl とを混合し、室温で 2 時間反応させた後、海洋細菌 4 種には Marine 2216 培地 (Bacton, Dickson and Company) を、*S. aureus* と *E. coli* にはトリプトソーヤ培地 (Nissui) を 160 μl 加え、 26°C で 24 時間培養して、マイクロプレートリーダーで 630 nm で細菌の増殖を濁度として測定した。ポジティブコントロールとして細菌懸濁液と各緩衝液を混合した区 (rCGL 0 $\mu\text{g/ml}$) を、ネガティブコントロールとして細菌を含まない緩衝液のみの区を用意し、培養後ポジティブコントロールおよび実験区の吸光度からネガティブコントロール区の吸光度を差し引いて差を計算した。リゾチームが抗菌活性を示せば、細菌の増殖が抑制され、濁度が全く上昇しない、または上昇が抑えられると考えられる。結果は細菌の増殖をほぼ完全に阻害したリゾチームの最小濃度 (最小発育阻止濃度、minimum inhibitory concentration, MIC) で表した。測定はそれぞれの細菌・緩衝液条件において duplicate で行い、また実験は 2 回行い ($n = 2$)、濁度の平均値をとった。

【結果】

マガキ外套膜抽出液のリゾチーム活性測定

Fig.18 は各個体のマガキ外套膜抽出液の各 pH でのリゾチーム活性を示している。それぞれの条件においてのリゾチーム活性の傾向から、2つのグラフに分けて示した。Fig.18A は pH 4.0 前後の酸性条件で高いリゾチーム活性を示す個体で、測定したうち 10 個体が該当した。Fig.18B は pH 7.0 でも高い活性を示すグループで、4 個体が該当した。

rCGL-1 および rCGL-3 の合成と精製

rCGL-1 の、陽イオン交換クロマトグラフィーでのタンパク質溶出のチャートレコード、および各フラクションのリゾチーム活性を Fig.19 に示す。Fig.20 および Fig.21 は、それぞれ rCGL-3 の 1 回目、2 回目の陽イオン交換クロマトグラフィーでのタンパク質溶出のチャートレコード、および各フラクションのリゾチーム活性を示している。緑色の枠線部分のフラクションはリゾチーム活性測定後にプールした溶出画分で、Fig. 19 および Fig. 21 においては濃縮して精製標品とし、Fig.20 においてはプール後に希釈して、次の精製に供した。

Fig.19 において、rCGL-1 はリゾチーム活性のピークと一致する大きなタンパク質の溶出ピークが確認された。ピークの前半部は夾雑タンパク質と思われる溶出ピークと重なっていた。これを除くためにピークの頂点から後半部を集めて濃縮し、SDS-PAGE に供した。

Fig.20, rCGL-3 の 1 回目のクロマトグラフィーでは、まず夾雑タンパクの大きな溶出ピークが現れ、その後にリゾチーム活性があるフラクションが夾雑タンパクのピーク後半部と被った形で溶出した。このリゾチーム活性のピーク部分だけを集めて行った、Fig.21 に示した 2 回目のクロマトグラフィーでは、タンパク質溶出とリゾチーム活性のそれぞれのピークがほぼ重なった状態となった。この頂点部分を集めてタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE に供した。

最終的に得られたサンプルのタンパク量は、rCGL-1 が約 570 μg , rCGL-3 が約 590 μg となった。二次培養時の培地 1 l 当たりの量に換算すると、それぞれ約 410 $\mu\text{g/l}$, 約 59.8 $\mu\text{g/l}$ であった。

SDS-PAGE 解析

濃縮後の rCGL-1 および rCGL-3 の SDS-PAGE 泳動像は Fig.22 である。どちらも単一のバンドとして得られた。アミノ酸配列から計算した rCGL-1,3 それぞれの分子量は約 13.1 kDa, 13.7 kDa であり (Itoh *et al.*, 2010)、マーカの移動距離との比較から rCGL-1, 3 の分子量を見積もると、それぞれ 12.3 kDa、18.9 kDa である。rCGL-3 の分子量がアミノ酸配列から推定した値よりも著しく大きくなった。

溶菌活性特性解析

測定した条件内での rCGL-1 および rCGL-3 の溶菌活性の至適条件はそれぞれ pH7.0、 $I = 0.005$ と pH8.5、 $I = 0.020$ で、活性の強さはそれぞれ 4.09 U, 8.83 U であった。このユニット数を 100%と定義したときの、各 pH・イオン強度条件でのユニットを%で表した図が Fig. 23 である。この図においては、青色が濃い条件程溶菌活性が高いことを意味している。どちらの rCGL 中性～塩基性の低イオン強度条件で高い活性を示すが、rCGL-1 は pH 7~8.5 の、極めてイオン強度が低い条件で高い活性を示しているのに対し、rCGL-3 は rCGL-1 以上に高い pH 条件においても高い溶菌活性を示し、またイオン強度条件も rCGL-1 より高い条件で高い溶菌活性を示すようになっていた。また、どちらの rCGL も酸性条件では中性条件よりも高いイオン強度条件で溶菌活性を示す傾向があるが、rCGL-1 は 3 に比べ活性を示す範囲が広く、pH4.0-5.5、 $I = 0.100-0.180$ の広い下条件において 40~50%程度の活性を示すという rCGL-3 には見られない特徴があった。

上記の至適条件下において、溶菌反応の温度を変えた場合の溶菌活性は、反応温度が高いほど活性は高くなった (Fig, 24)。rCGL-1 は rCGL-1 と比較して 20°C 以上での溶菌活性の上昇がより大きく、37°C では、rCGL-3 は rCGL-1 のほぼ 2 倍の活性を示した。

抗菌活性測定

rCGL-1, rCGL-3 とともに抗菌活性が観察されたのはグラム陽性菌の *M. halophilus* と *P. citreus* のみである。Table 2 では、対照区に比べ濃度依存的な抗菌作用が見られた実験区だけの、MIC の数値 ($\mu\text{g/ml}$) を表している。pH 7.2, I = 0.005 の条件における rCGL-1 のに *P. citreus* に対する抗菌活性の結果が >38.8 となっているのは、リゾチームの濃度依存的に細菌懸濁液の濁度が減少したことは認められたが、リゾチーム希釈系列の最高濃度である 38.8 mg/ml でも完全に細菌の増殖を抑制できなかったことを表している。グラム陽性菌 *S. aureus* および 3 種のグラム陰性菌に対しては抗菌活性が認められなかった (date not shown)。抗菌活性が観察された実験区の各リゾチーム濃度での ΔOD_{630} の値は Figs.25~28 に示す。グラフの下軸は細菌と混合したリゾチーム溶液の濃度で、右端の $0 \mu\text{g/ml}$ はリゾチームを含まないポジティブコントロールにおける ΔOD_{630} の値である。

Fig. 25 は rCGL-1、PBS pH7.2, I = 0.005 での抗菌活性の数値を示したものである。*M. halophilus* は rCGL-1 濃度 $19.4 \mu\text{g/ml}$ で細菌の増殖がほぼ完全に抑えられた。*P. citreus* は、最高濃度の $38.8 \mu\text{g/ml}$ では、完全ではないがコントロール ($0 \mu\text{g/ml}$) の約 $1/3$ 以下まで濁度の上昇が抑制できた。

rCGL-1 は海水のイオン強度に近似した PBS pH7.2, I = 0.700 では活性が見られなかったが、rCGL-1 が溶菌の至適活性条件の 50%程度の溶菌活性を示す条件である pH5.5, I = 0.172 においては、溶菌活性が至適条件の半分程度であるにもかかわらず *M. halophilus* に対する MIC が $4.85 \mu\text{g/ml}$ で、中性条件よりも強力な抗菌活性を示した。*P. citreus* に対しては完全には、菌の増殖が不安定な実験区が多く、グラフの形が歪んでいるが、酵素 $38.8 \mu\text{g/ml}$ においても完全な抗菌活性は示されていないのが読み取れる (Fig. 26)。

これらの結果に対し、rCGL-3 は rCGL-1 よりも強い抗菌活性を示した。PBS pH7.2, I = 0.020 においては、*M. halophilus*, *P. citreus* 両方に対し MIC $9.7 \mu\text{g/ml}$ を示した (Fig.27)。*P. citreus* は濃度 $19.4 \mu\text{g/ml}$ 以上においても duplicate で測定したうち片方だけに細菌の増殖

が認められるなど生育に不安定な所があったが、9.7 µg/ml ではほぼ完全に増殖が阻止されたため、こちらを MIC の値とした。またどちらの細菌に対しても、濃度 2.43 µg/ml 以下においては、コントロール (0 µg/ml) と比較して、濃度に非依存的に細菌の増殖が抑制されているという結果が得られた。この増殖抑制活性は $I = 0.700$ でも観察され、*M. halophilus* のみであるが濃度に関わらず細菌の生育を半分程度に抑制した (Fig. 28)。

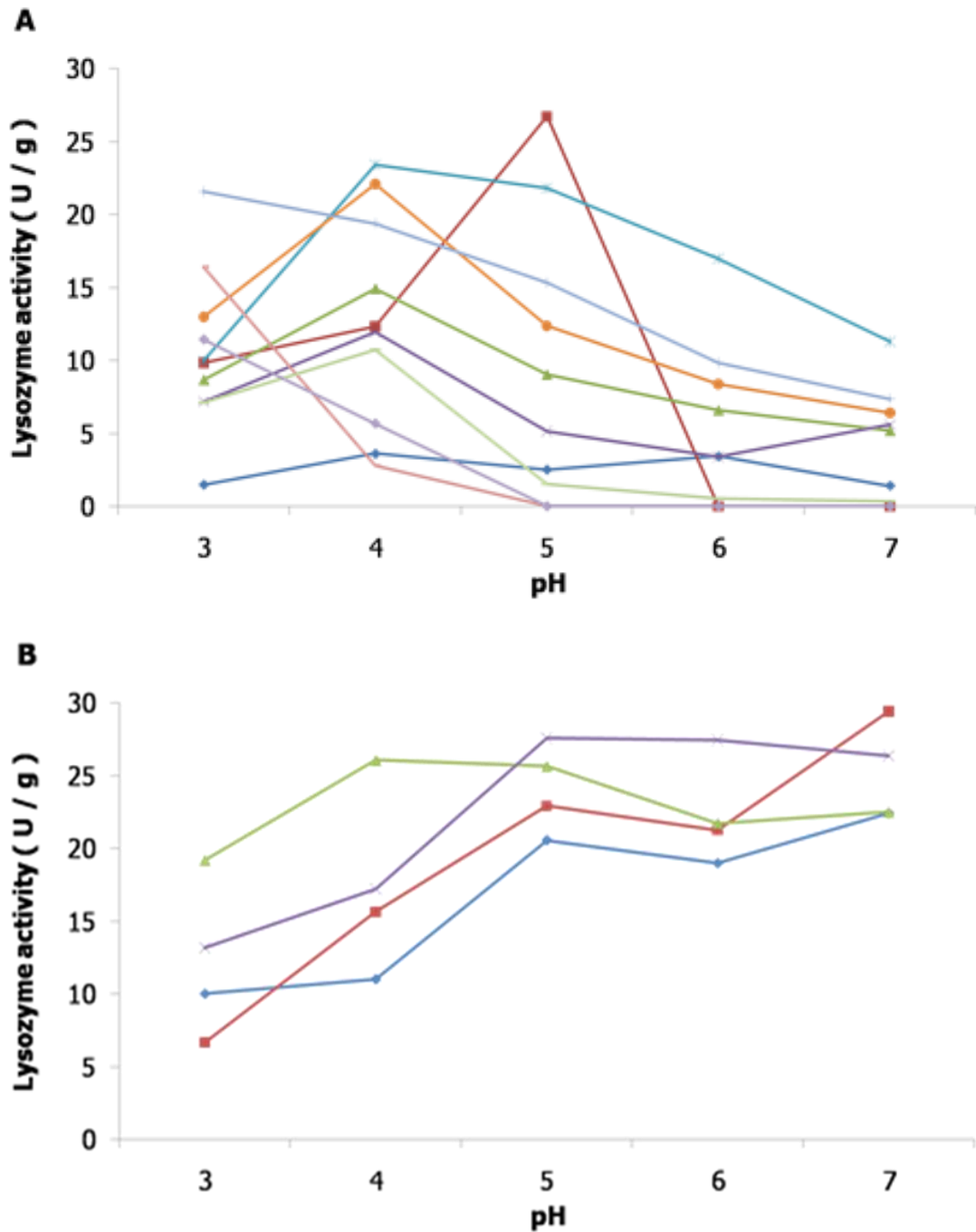


Fig. 18 Lysozyme activities of mantle extract of the Pacific oysters measured under various pH points by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min) per gram tissue. (A) Eight individuals showing higher lysozyme activity at only lower pH points. (B) Four individuals showing higher lysozyme activity even at higher pH ranges.

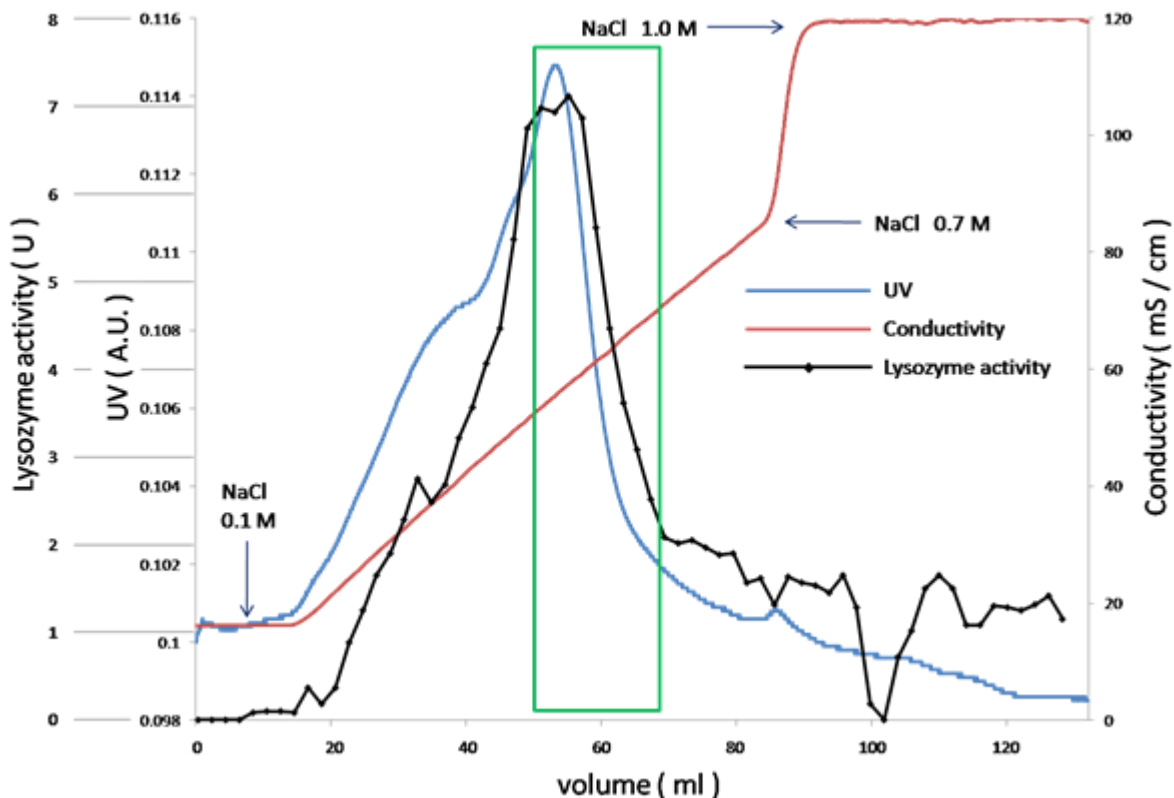


Fig. 19 IE chromatography for purifying rCGL-1 from lysozyme secreted in broth. It was performed in a HiTrap SP XL 5 ml column eluted with a liner gradient of 0.1–0.7 M NaCl solution in 0.02 M acetic buffer, pH 5.0 at a rate of 2 ml/min. The green frame region of the elution profile indicated fractions containing lysozyme activity and was collected for concentration.

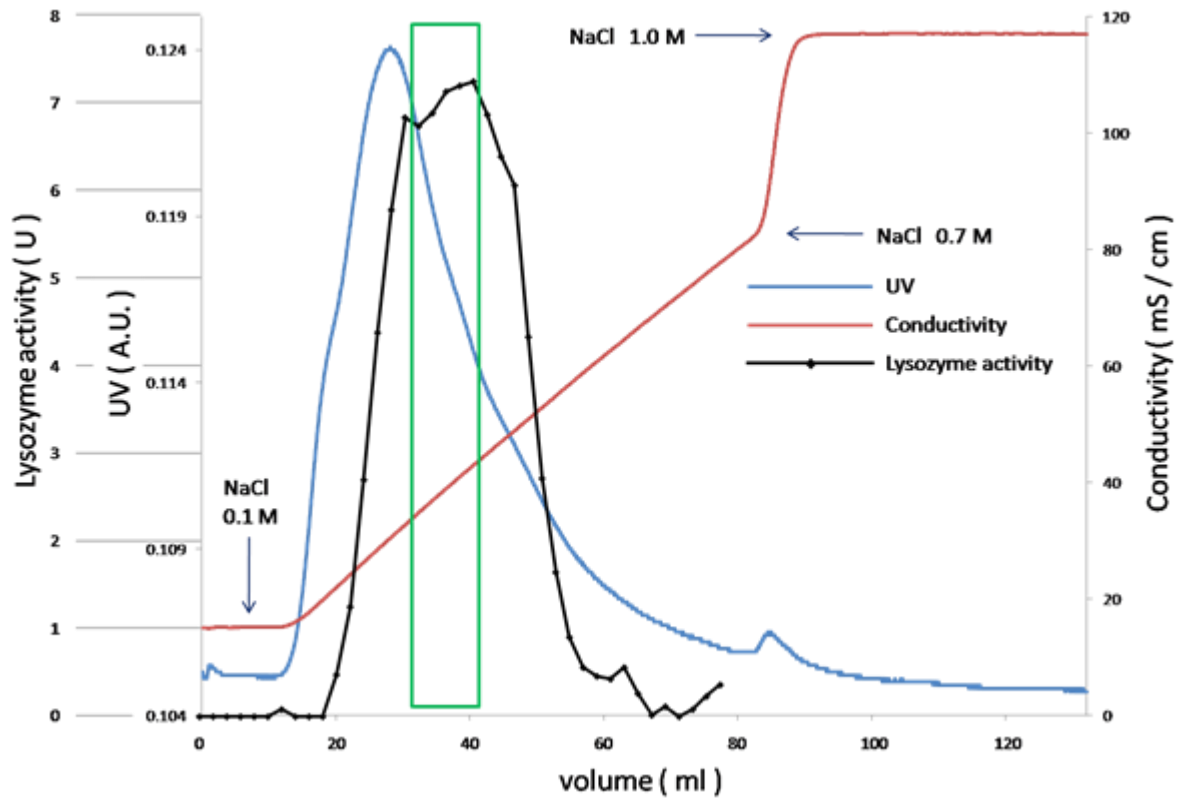


Fig. 20 First IE chromatography for purifying rCGL-3 from lysozyme secreted in broth. It was performed in a HiTrap SP XL 5 ml column eluted with a linear gradient of 0.1–0.7 M NaCl solution in 0.02 M acetic buffer, pH 5.0 at a rate of 2 ml/min. The green frame region indicated fractions containing lysozyme activity and was used for second IE chromatography.

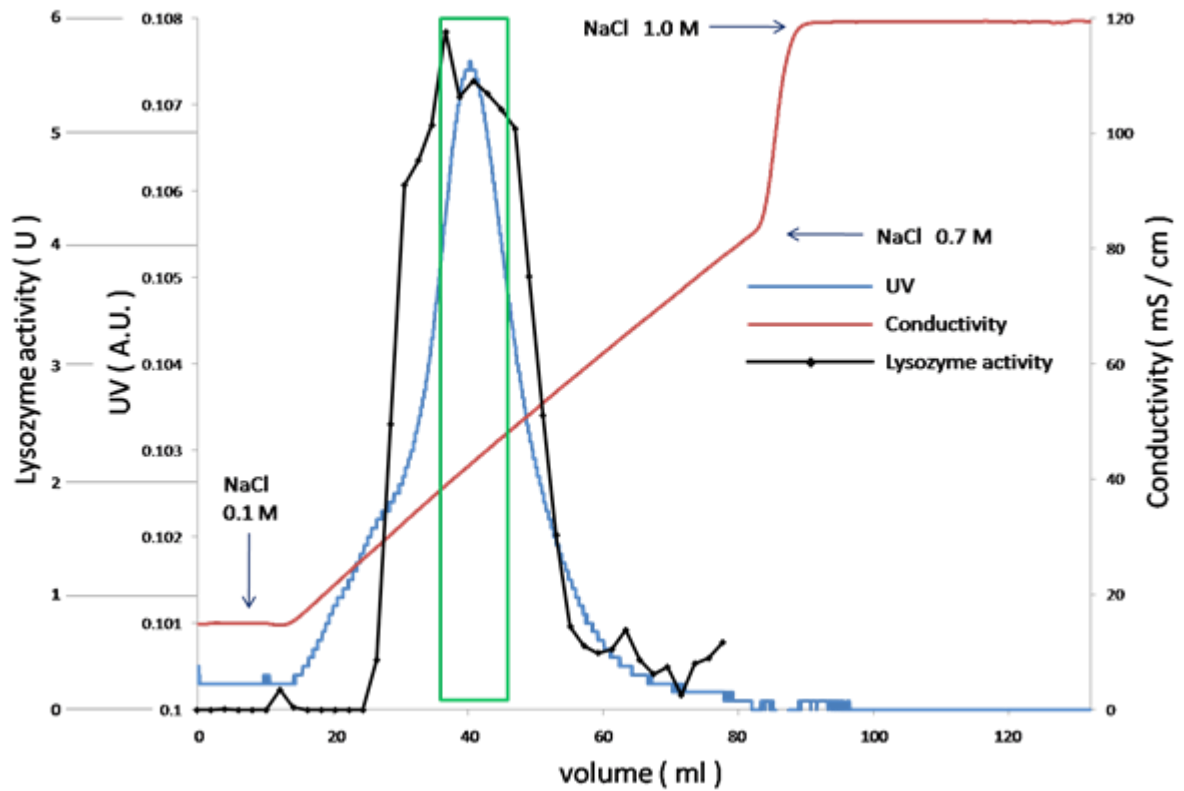


Fig. 21 Second IE chromatography for purifying rCGL-3. It was performed in a HiTrap SP XL 5 ml column eluted with a liner gradient of 0.1–0.7 M NaCl solution in 0.02 M acetic buffer, pH 5.0 at a rate of 2 ml/min. The green frame region was concentrated.

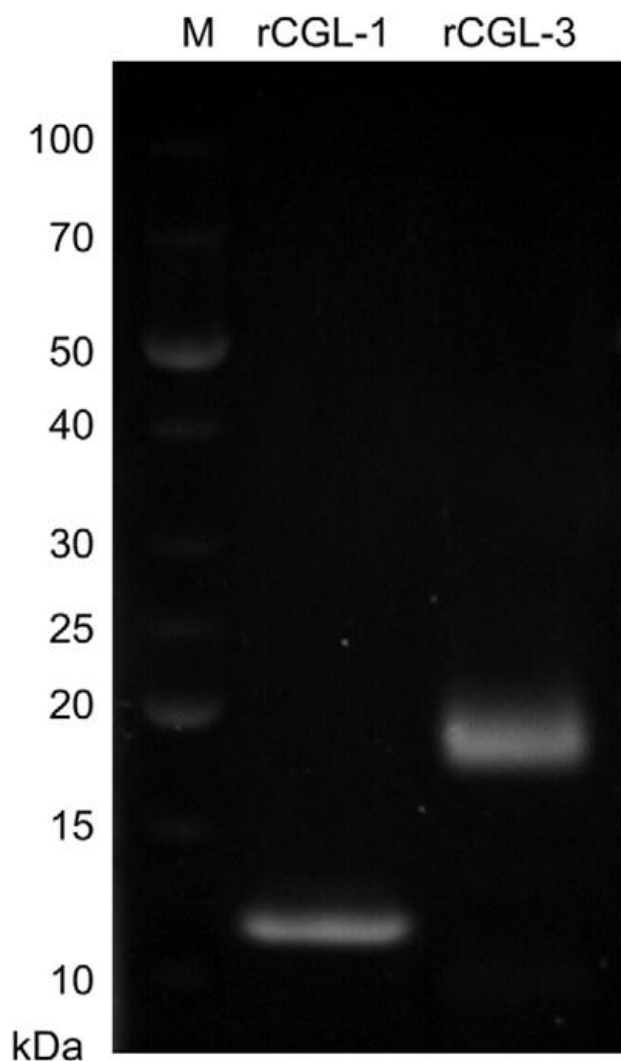


Fig. 22 SDS-PAGE of purified recombinant CGL-1 and CGL-3. Electrophoresis was carried out in a 4-12% gradient acrylamide/bis gel under reduced conditions. The gel was stained with Coomassie Fluor Orange protein gel stain and visualized under a UVtrans-illuminator. M: Protein standards with the molecular size indicated; rCGL-1: Purified rCGL-1; rCGL-3: Purified rCGL-3.

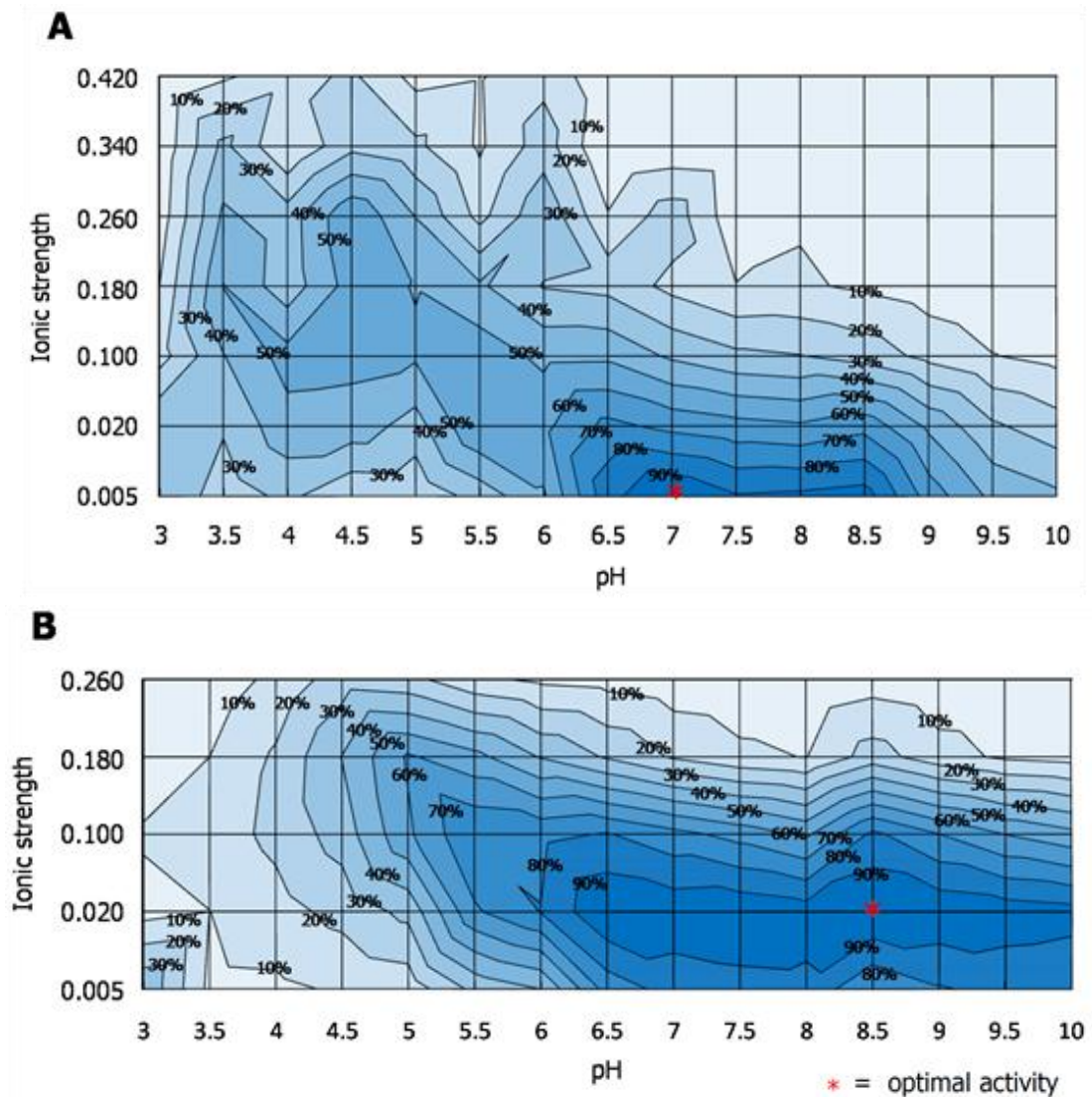


Fig. 23 Influences of pH and ionic strength on *M. luteus* lytic activity of rCGL-1 (A) and rCGL-3 (B). Data were obtained on the activities of rCGLs in 105 or 75 buffers covering a pH ranging from 3.0 to 10.0 and ionic strength ranging from $I = 0.005$ to 0.420 or 0.260. Maximum *M. luteus* lytic specific activities of 4.09 U (A) and 8.83 U (B) were observed at a combination of pH 7.0, $I = 0.005$ and pH 8.5, $I = 0.020$, respectively. Asterisks (*) indicates the point showing the highest lytic activities. Activities were expressed as a percentage of that observed at the highest activities and a contour plot of lysozyme activity in 10% increment was generated.

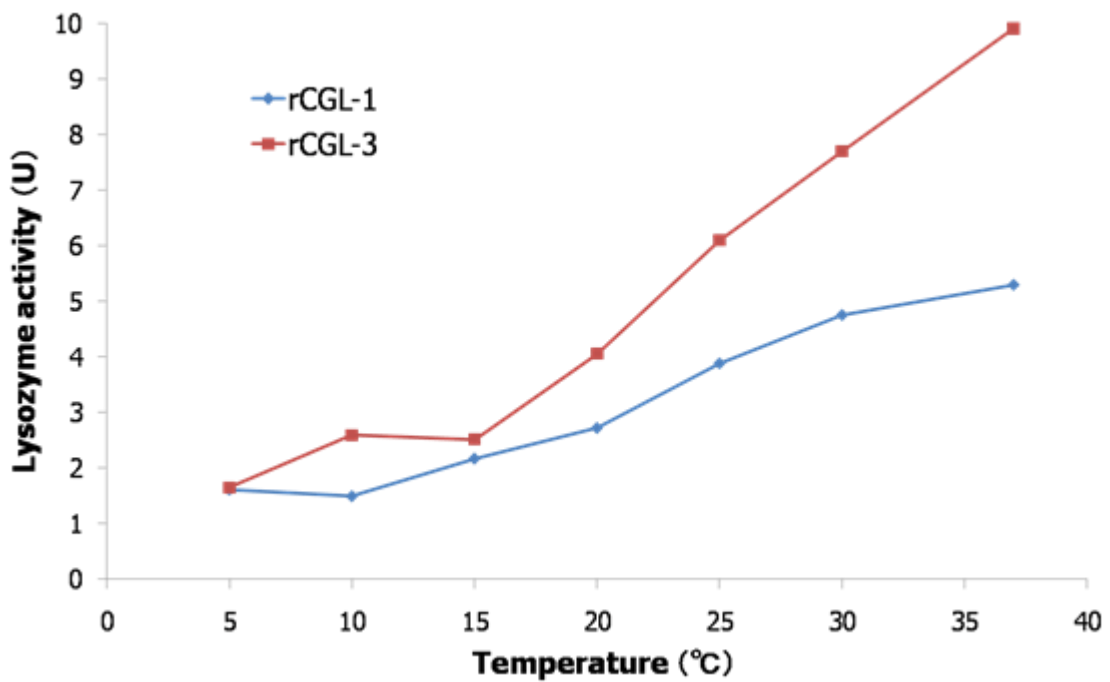


Fig. 24 Effects of temperature on the bacteriolysis activities of rCGL-1 and rCGL-3. Reacted conditions were adjusted at optimal pH and ionic strength of each rCGLs. Lysozyme activities are measured by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min).

Table 2 Antibacterial activity of recombinant lysozymes against gram positive bacteria

	rCGL-1		rCGL-3
	pH 7.2, I = 0.005	pH 5.5, I = 0.172	pH 7.2, I = 0.020
Gram positive bacteria			
<i>Marinococcus halophilus</i>	19.4	4.85	9.7
<i>Planococcus citreus</i>	>38.8	>38.8	9.7

minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$)

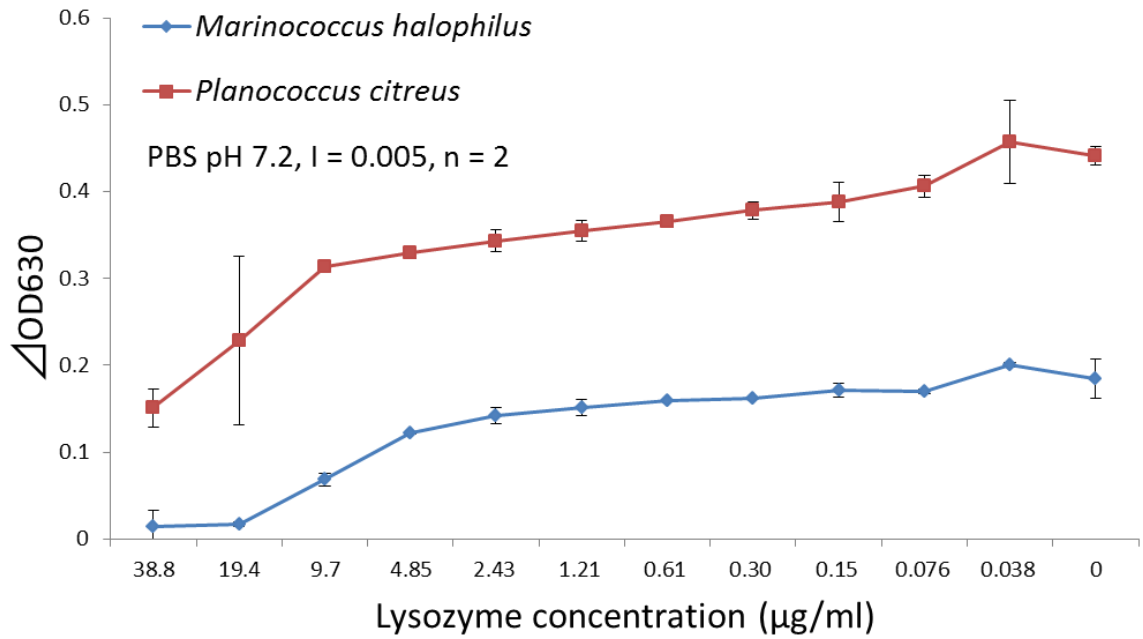


Fig. 25 Changes in ΔOD_{630} of broth mixed with bacterial suspension and 2-fold dilution series of rCGL-1 in PBS pH 7.2, ionic strength 0.005. $n=2$, and Means \pm SD are indicated. Samples were cultured in 96-well microplate at 26 °C for 24 hours. Sample of 0 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme concentration was positive control which mixed bacterial suspension with PBS.

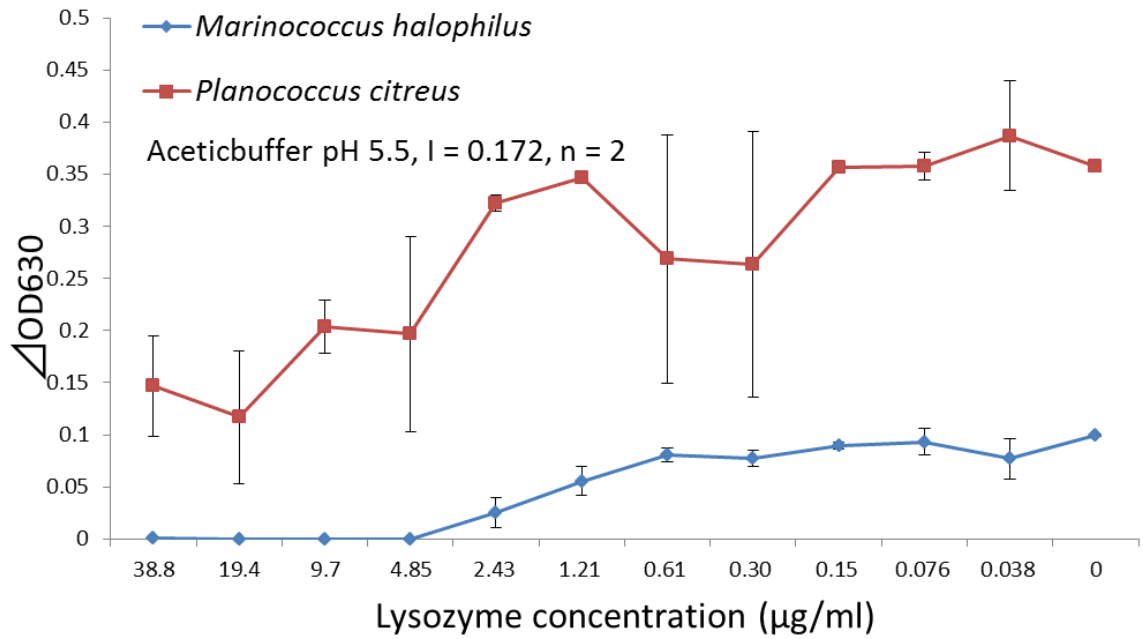


Fig. 26 Changes in ΔOD_{630} of broth mixed with bacterial suspension and 2-fold dilution series of rCGL-1 in acetic buffer, pH 5.5, ionic strength 0.172. n=2, and Means \pm SD are indicated. Samples were cultured in 96-well microplate at 26 °C for 24 hours. Sample of 0 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme concentration was positive control which mixed bacterial suspension with acetic buffer.

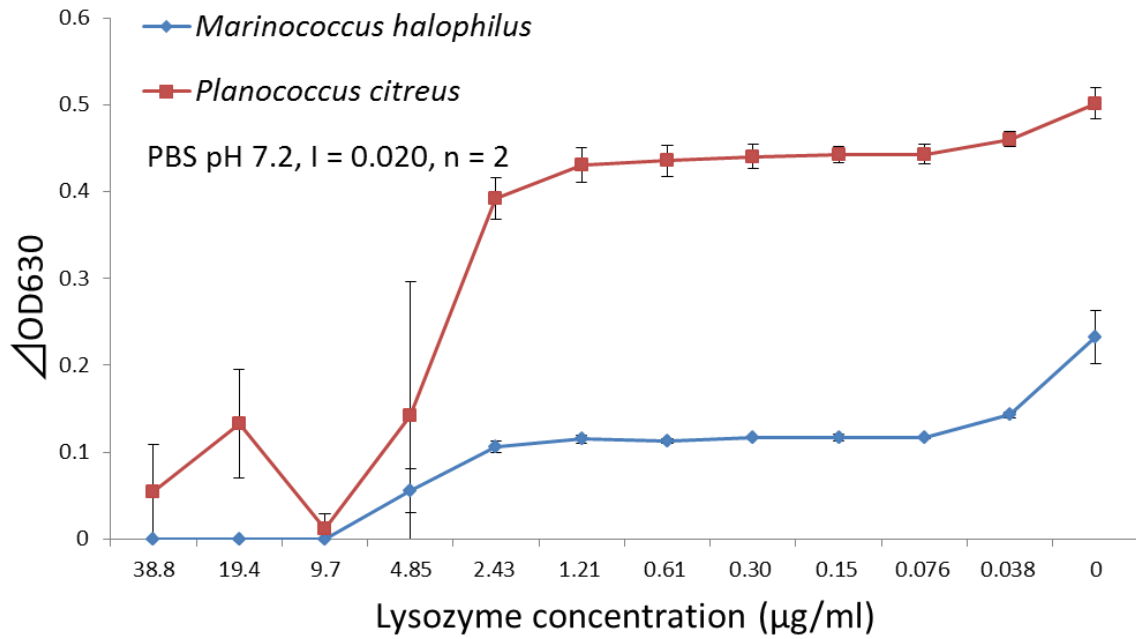


Fig. 27 Changes in ΔOD_{630} of broth mixed with bacterial suspension and 2-fold dilution series of rCGL-3 in PBS pH 7.2, ionic strength 0.020. $n=2$, and Means \pm SD are indicated. Samples were cultured in 96-well microplate at 26 °C for 24 hours. Sample of 0 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme concentration was positive control which mixed bacterial suspension with PBS.

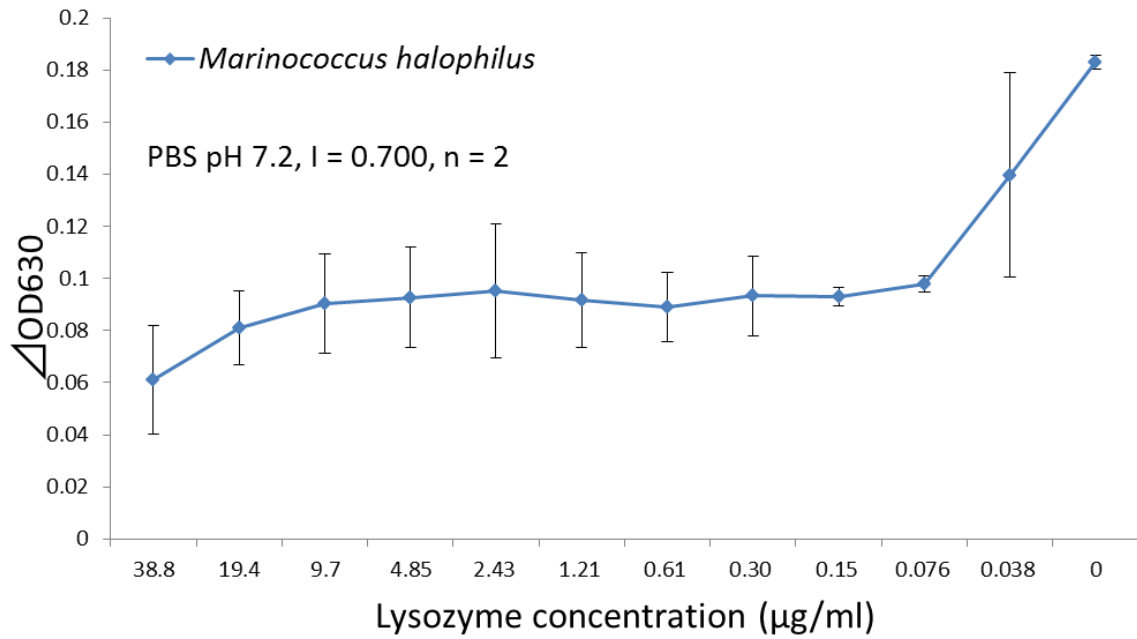


Fig. 28 Changes in ΔOD_{630} of broth mixed with bacterial suspension and 2-fold dilution series of rCGL-3 in PBS pH 7.2, ionic strength 0.700. n=2, and Means \pm SD are indicated. Samples were cultured in 96-well microplate at 26 °C for 24 hours. Sample of 0 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme concentration was positive control which mixed bacterial suspension with PBS.

第 2 節 マガキ外套膜中のキチナーゼの特性解析

マガキ外套膜抽出液のキチナーゼ活性測定

2011 年 7・8 月の新潟県加茂湖産の 2 歳のマガキを 5 個体ずつ採取し、外套膜を摘出して -30°C で保存し、順次解凍して実験に供した。

外套膜は室温で解凍後、第 1 節のリゾチーム活性測定時と同様に抽出液を調製した。ただし、抽出の為に外套膜に加えた緩衝液は 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に変更した。

キチナーゼ活性は、Yamada and Imoto (1981) の Schales 変法を基にした手法で測定した。基質溶液は 0.1 M の酢酸緩衝液 (pH 5.5), リン酸緩衝液 (pH 7.0), Tris 緩衝液 (pH 9.0) それぞれにエチレングリコールキチン (和光) を濃度 0.05% で溶解して用い、呈色液は 0.5 M 炭酸ナトリウム十水和物 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ にフェリシアン化カリウム $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を濃度 0.05% で溶解した溶液を用いた。

1.5 ml エッペンチューブ内で各 pH の基質溶液 150 μl に外套膜抽出液 15 μl を加え、コントロールにはサンプルの代わりに各緩衝液を用いた。混合したサンプルを 40°C で 30 時間インキュベートし、反応終了後フェリシアン化カリウム溶液を 300 μl 加えてブロックインキュベーターで 100°C で 15 分加熱した。加熱後直ちに氷水で冷却し、96 ウェルマイクロプレートにサンプルを 200 μl 入れ、マイクロプレートリーダーで波長 415 nm での吸光度を測定し、コントロールとの吸光度差 ΔOD_{415} を計算した。測定は triplet で行い、この測定において波長 415 nm での吸光度が 1 分間に 0.001 下がるキチナーゼ活性の強さを 1 U (ユニット) と定義し、結果はタンパク量 mg あたりの比活性 (U/mg) で示した。

外套膜抽出液のタンパク濃度は第 1 章と同様に、アルブミンスタンダードを用いたブラッドフォード法で測定した。また、抽出液のリゾチーム活性も第 1 章と同様の方法で測定した。リゾチーム活性を測定する理由は、リゾチームもキチナーゼ様活性を示す場合があるため外套膜抽出液にキチナーゼ活性があった場合でもそれがキチナーゼによるものであるとは断言できないが、それぞれの酵素活性の高さを比較

することで、マガキ外套膜にキチナーゼが存在することを確認できると考えたためである。

Cg-Chit1 の完全長 cDNA のクローニング

2010 年 4 月に宮城県松島湾よりサンプリングしたマガキより外套膜を摘出し、RNAlater (Qiagen) に浸して保存した。この外套膜サンプルより、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。さらに、PowerScriptReverse Transcriptase (BD Biosciences) と random hexamer (Invitrogen) を用いて、1 μ g の Total RNA から cDNA を逆転写した。

Cg-Chit1 の完全長 cDNA をクローニングするために、既知の配列である Cg-Chit (GenBank: AJ971238.1; Badariotti *et al.*, 2007) を基にプライマーを設計した (Table 3)。Chit-fwd プライマーは、合成した PCR 産物を pET151/D-TOPO vector (Invitrogen) に挿入するために、Cg-Chit 配列の 5' 側からシグナルペプチド配列を除いた末端部分を基に、CACC の配列を付加して設計した。

Cg-Chit1 の PCR 反応液は、KOD-Plus-Neo polymerase (1.0 U/ μ l) (Toyobo) を 1 μ l, 10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo を 5 μ l, 25 mM MgSO₄ を 3 μ l, 2 mM dNTPs を 5 μ l, 10 μ M のそれぞれの Chit プライマーを 1.5 μ l, テンプレートの cDNA 溶液を 2.5 μ l, 蒸留水を 30.5 μ l 混合した。PCR 条件は、最初に 94 $^{\circ}$ C, 2 分で DNA を変性させ、その後 98 $^{\circ}$ C, 10 秒の変性, 52 $^{\circ}$ C, 30 秒のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C, 1 分の伸長を 40 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長した。PCR サンプルは 1.5 %アガロースゲルで電気泳動し、SYBR Safe DNA gel stain (Molecular Probes) で染色して分離した。その後 QIAquick Gel Extraction Kit で PCR 産物を精製し、プラスミドベクター pET151/D-TOPO (Invitrogen) に挿入した。そのベクターを One Shot TOP 10 Chemically Component *E. coli* に導入した。菌を 15 ml 滅菌チューブを用いて、10 ml の 1 mg/ml アンピシリン塩酸塩添加 LB 培地 37 $^{\circ}$ C、200 rpm で振とうしながら一晩培養し、QIAprep SpinMiniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製し、シークエンスに供した

(Macrogen Japan)。Badariotti *et al.* (2007) においてシーケンスが明らかになってる Cg-Chit を、Cg-Chit1 として改めてクローニングし直したことになる。

Cg-Chit1 のアミノ酸配列解析

得られた Cg-Chit1 のアミノ酸配列と、NCBI に登録されている Cg-Chit (CAI96026.1) の配列を ClustalX を用いてマルチプルアライメントにかけ、Genetyx Mac Ver. 10.1.6 (Genetyx) により酵素の分子量と等電点を計算した。また、ExPASy のペプチドカッター (<http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>) により、Cg-Chit1 と Cg-Chit のトリプシン・サーモリシン・ペプシンの切断サイトと、アルギニン開裂サイトの数を計算した。

Cg-Chit1 組換え酵素合成用プラスミドの作成

得られたプラスミドの、N 末端側の His タグの後ろに HAT タグを、C 末端側に SEP タグを付加した組換え酵素を合成するためのプラスミドを作成した、これは精製したプラスミドそのまま用いて組換え酵素を合成した場合、不溶性の封入体として得られたためである。それぞれのタグは、酵素の溶解性と折りたたみを改善する機能を有する (Clontech Laboratories; Kato *et al.*, 2007; Rathnayaka *et al.*, 2011)。

SEP タグは 9 つのアスパラギン酸を含む 11 アミノ酸を C 末端側に付けたもので、Cg-Chit1-GGDDD-R と Cg-Chit1-D9Term-R の 2 つの 3' プライマーを設計し、用いることで付加した (Table 3)。最初の PCR での反応液の組成は、プライマーに 10 μ M Cg-Chit1-fwd および Cg-Chit1-GGDDD-R を用い、鋳型となる DNA をクローニングした Cg-Chit1 の完全長 cDNA に変更した以外は上記の Cg-Chit1 の cDNA の PCR と同様である。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C, 2 分の DNA 後、98 $^{\circ}$ C, 10 秒の変性, 54 $^{\circ}$ C, 30 秒のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C, 1.5 分の伸長を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長した。PCR 産物を先の方法と同様にして精製し、2 回目の PCR の鋳型 DNA として用いた。2 回目の PCR は、reverse プライマーに 10 μ M Cg-Chit1-D9Term-R を

用い、テンプレートの DNA を 1 回目の PCR の増幅断片とした以外は、PCR 反応条件・増幅産物の泳動・精製条件も含め全て 1 回目と同様である。これにより Cg-Chit の C 末端に SEP タグを付加した。得られた 2 回目の PCR の増幅断片を pET151/D-TOPO に挿入し、上記と同様の方法でコンピテントセルの形質転換・培養・プラスミドのクローニング・精製を行い、SEP タグを付加した Cg-Chit1 の cDNA を組み込んだプラスミドを得た。

続いて HAT タグの付加には HAT Protein Expression and Purification System (Clontech Laboratories) を用いた。pHAT10 ベクターに SEP タグ付加 Cg-Chit1 を挿入できるように Cg-Chit-fwd-HAT と Cg-Chit-rev-HAT を設計した (Table 3)。PCR 反応液は、Tks Gflex DNA polymerase (1.25 U/ μ l) (TaKaRa) を 1 μ l, 2 \times Gflex PCR Buffer を 25 μ l, それぞれのプライマー溶液 10 μ M を各 1 μ l, SEP タグ付加 Cg-Chit1 プラスミド溶液 100 μ g/ml を 2.5 μ l, 蒸留水を 19.5 μ l 混合した。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C, 2 分の DNA 後、98 $^{\circ}$ C, 10 秒の変性, 58.8 $^{\circ}$ C, 30 秒のアニーリング, 68 $^{\circ}$ C, 1 分の伸長を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長した。精製した PCR 増幅断片 1.5 μ g と pHAT10 ベクター 1 μ g を制限酵素 Kpn I と Sac I (TaKaRa) で、プロトコルに従って 37 $^{\circ}$ C で 1 h 処理し、制限酵素サイトを切断した。処理後、PCR 産物とベクターを QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製し、それぞれ 0.075 μ g, 0.05 μ g を、T4 DNA ligase (Invitrogen) を用いて 14 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、HAT タグと SEP タグが結合した Cg-Chit1 プラスミドを得た。得られたプラスミドは先述した方法でクローニングした。

この HAT タグと SEP タグが付加した Cg-Chit1 を、pHAT10 ベクターから pET151/D-TOPO ベクターに更に戻した。Cg-Chit1 を挿入した pHAT10 をテンプレートに、HAT タグ・SEP タグごと PCR で増幅し、PCR 産物を精製して pET151/D-TOPO に挿入した。プライマーは、3'側は Cg-Chit1-D9Term-R を再び用い、5'側は HAT タグ部分の塩基配列に CACC の配列を付加し、PCR 増幅断片を pET151/D-TOPO に挿入できるようにデザインした Cg-Chit-fwd-HAT-CACC を用いた

(Table 3)。PCR のメソッドは SEP タグ付加時と同様である。得られたベクターを先述した方法でクローニングした。これによって、組換え酵素合成に用いる、His タグ・HAT タグ・SEP タグが付加した Cg-Chit1 のオープンリーディングフレームが組み込まれたプラスミドが完成した。

リコンビナント Cg-Chit1 の合成

作成したプラスミドを用いて、大腸菌コンピテントセル TransformingBL21 (DE3) Star One Shot Cells (Invitrogen) をマニュアルに従って形質転換し、250 ml の SOC 培地 (Invitrogen) 中で 37 °C, 200 rpm で振とうしつつ 1 時間の培養を行った後、培地を 100 µM アンピシリン塩酸塩を含む LB agar プレートに塗布して 37 °C で一晩培養し、選択をかけた。形成されたコロニーはプライマー Cg-Chit-fwd-HAT-CACC と Cg-Chit1-D9Term-R を用いた PCR に供し、増幅断片を電気泳動で確認することで、Cg-Chit1 のオープンリーディングフレームが挿入されていることを確認した。

Cg-Chit1 の組換え酵素、recombinant Cg-Chit1 (rCg-Chit1) の合成は、コンピテントセルを形質転換し、SOC 培地で培養した後に、この培地を直接液体 LB 培地に加えて酵素産生の誘導をかけることで行った。上記の寒天培地上に形成させたコロニーや、一度培養して保存菌株としたものを用いてキチナーゼの合成を試みた場合、キチナーゼの産生量が著しく減少したか、最終的に得られた封入体の溶解が非常に困難になったためである。上記の形質転換したコンピテントセルを含む SOC 培地を、15 ml 滅菌チューブに入れた 1 mg/ml アンピシリン塩酸塩を含む LB 培地 10 ml に加え、37 °C, 200 rpm で振とうしながら一晩培養した。培養後、濃度が 1 mM になるようイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて組換え酵素の合成を誘導した。

培養した *E. coli* は 4 °C, 3,000 rpm, 15 分の遠心分離によって培地を除き回収した。これに BugBuster Protein Extraction Reagent (Merck) を 2 ml 加えて懸濁し、室温で 30 分間インキュベートして *E. coli* を溶菌させた。その後遠心分離 (4 °C, 17,000 ×g, 10 分間) し、上清を

捨て沈殿を得た。この沈殿をさらに、10 ml の 1 mM EDTA を含む 0.5 % Triton X-100 で懸濁し、室温・120 rpm の速度で 10 分振とうして洗浄し、遠心分離して上清を捨てた。この洗浄を 3 回繰り返して、rCg-Chit1 の封入体を得た。

rCg-Chit1 の精製およびリフォールディング

封入体は 8 M 尿素, 0.3 M NaCl, 5 mM DTT を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2 ml で溶解した。溶解しなかったものは 4 °C, 17,000 ×g, 10 分間の遠心分離で取り除き、上清を得た。

溶解した HAR タグ付き rCg-Chit1 の封入体を、Ni-NTA アガロース (Qiagen) によるアフィニティークロマトグラフィーで精製した。Ni-NTA アガロース 200 µl を、十分量の 8 M 尿素, 0.5 M NaCl, 20 mM イミダゾールを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え、遠心分離 (室温、250 ×g, 3 分) でアガロースを集め、上清を捨てる、という洗浄を 2 回行った。封入体溶液にはイミダゾールを 20 mM の濃度になるように添加し、アガロース担体に加え、4 °C、100 rpm で 60 分振とうし、rCg-Chit1 をカラムに結合させた。遠心分離して上清を除去し、5 ml の上記の Tris-HCl を加えて洗浄し、アガロースをカラム (0.5 × 5 cm econo-column; Bio-Rad) に詰めた。さらに 5 ml Tris-HCl 緩衝液で洗浄したあと、イミダゾールの濃度を 500 mM にした Tris-HCl 緩衝液 1 ml で結合したタンパクを溶出した。

続いてリフォールディングの操作も兼ね、透析で尿素を除去した。溶出した rCg-Chit1 を透析膜 Spectra/Por molecularporous membrane tubing (MWCO: 12,000 – 14,000) に入れ、尿素濃度を 4 M, 2 M, 1 M に減らした以外の組成は同じである前述のリン酸緩衝液を 500 ml ずつ用意し、4 °C においてスターラーで攪拌しながらこれらの緩衝液を用いて 1 時間ずつサンプルを透析し、段階的に尿素を抜いた。次に尿素と DTT を含まないリン酸緩衝液 500 ml を 2 つ用意し、サンプルを 1 時間、一晚と透析した。透析が完了したら、生じた沈殿を遠心分離で除き、rCg-Chit1 が溶解した上清を得た。

SDS-PAGE・ウエスタンブロッティング解析

rCg-Chit1 の精製の程度は、SDS-PAGE で確認した。泳動に供したサンプルは、rCg-Chit1 合成を誘導する前後の *E. coli* 菌体、封入体を 8 M 尿素で処理した溶液と不溶沈殿、透析後の rCg-Chit1 溶解液である。電気泳動は、パジェラン（アトー）を用いて行った。サンプルの処理方法・Antioxidant の使用・タンパク質マーカー・CBB 染色はこれまでの SDS-PAGE と同様に行い、ゲルは 10 %ポリアクリルアミドゲルを作成して用いた。また、エクセルラダーから、rCg-Chit1 の分子量を推定した。

更に、合成したタンパクが Cg-Chit1 であることを確認するために、HAT タグの特異抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE を行ったゲルを、セミドライブロッティング実験方法（アトー）に従い、ホライズブロット 4M（アトー）を用いて、プロトランニトロセルロース転写膜（Schleicher & Schuell Bioscience GmbH）に転写した。転写膜はブロッキング溶液（I-Block（Life Technologies）を TBST 緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.05% Tween 20）に溶解した溶液）で 1 万倍に希釈した一次抗体であるウサギ抗 HAT タグ抗体（GenScript Japan）と 4 °C で緩やかに振とうしながら一晩反応させた。反応後、ブロッキング溶液を捨て、膜を I-Block を含まない TBST 緩衝液に浸し、室温で 15 分間緩やかに振とうする洗浄を 3 回行った。次に、ブロッキング溶液で 1 万倍に希釈した二次抗体、HRP 標識ブタ抗ウサギイムノグロブリンポリクローナル抗体（Dako）を加え、室温で 2 時間緩やかに振とうして反応させた。続いて、反応後の膜を TBST 緩衝液で 2 回、Tween 20 を含まない TBS 緩衝液で 1 回洗浄し、発色試薬である EzWestBlue（アトー）を膜上に添加して 3 分間発色させた。

rCg-Chit1 のキチナーゼ活性測定

rCg-Chit1 溶液のキチナーゼ活性測定は、外套膜抽出液と同様の条件・手法で行った。ポジティブコントロールとして、放線菌

Streptomyces griseus のキチナーゼ (Sg-Chit) (Sigma-Aldrich) と、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) (Sigma-Aldrich) も用いた。rCg-Chit1, Sg-Chit, HEWL の濃度はそれぞれ 63 µg/ml, 60 µg/ml, 1 mg/ml に調整して用いた。それぞれの酵素の溶解・希釈および活性測定の対照区には、0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いた。結果は、タンパク質量当たりの比活性に換算した。

【結果】

マガキ外套膜抽出液のリゾチームおよびキチナーゼ活性測定

外套膜抽出液のリゾチーム活性およびキチナーゼ活性の測定結果を Fig.29 に示す。Fig.29A はリゾチーム活性、Fig.29B はキチナーゼ活性のデータである。7 月・8 月のマガキ外套膜抽出液において、酸性～塩基性の広い条件下で安定したキチナーゼ活性が示された。また、8 月より 7 月のサンプルの方がキチナーゼ活性が高かった。これに対し、リゾチーム活性は 7 月より 8 月の方が高く、キチナーゼと逆の結果となった。

Cg-Chit1 の完全長 cDNA のクローニングおよびアミノ酸配列解析

マガキ外套膜より得られた Cg-Chit1 の cDNA と、GenBank に登録済みの Cg-Chit (AJ971238.1) のアミノ酸配列アライメントの結果を Fig. 30 に示す。シグナルペプチドを除いた Cg-Chit1 の ORF は 1608 残基、536 アミノ酸で構成され、Cg-Chit と比べると 392 番目のアスパラギン酸がグリシンに、402 番目のトレオニンがセリンに、500 番目のロイシンがバリンに変異していた。

Table 4 は Cg-Chit のシグナルペプチドを除いた ORF と Cg-Chit1 の分子量・推定等電点・アルギニン残基数・プロテアーゼ切断部位を比較したものである。分子量・等電点・切断部位に僅かに差異が見られた。

rCg-Chit1 の合成と精製

合成した rCg-Chit1 封入体の洗浄・変性・精製・透析により、推定分子量 60 kDa の rCg-Chit1 の部分精製品が得られた (Fig. 31)。CBB によりゲルを染色すると、夾雑タンパクのバンドも含まれていることがわかるが、Cg-Chit1 と思われる分子量のバンドが最も太くはっきりとしていた (Fig. 31A)。レーン 5 で泳動したサンプルが透析を終了した rCg-Chit1 を含むサンプルである。ウェスタンブロッティングにより、一次抗体に HAT 抗体を用いることで、CBB 染色で見られた分子量 60 kDa のバンドが発色し、これがやはり HAT タグを持つ rCg-Chit1 で

あることがわかった (Fig. 31B)。rCg-Chit1 の推定分子量 60 kDa は His タグ・HAT タグ・SEP タグを付加した rCg-Chit1 計算上の分子量 (約 68 kDa) よりもやや小さい値となった。

rCg-Chit1 のキチナーゼ活性測定

部分精製の Cg-Chit1, Sg-Chit1, HEWL のそれぞれのキチナーゼ活性を測定した結果が Fig. 32 である。いずれも全ての pH 条件下でキチナーゼ活性があり、酸性条件が最も活性が高かった。合成された Cg-Chit1 は、HEWL よりは活性が高いが、Sg-Chit と比べると著しく活性が低かった。

Table 3 Oligonucleotide primers used for this study

Primer	Usage	Direction	Sequence
Cg-Chit1-fwd	synthesis	sense	5'-CACCTGAAGTACAAACGAGTAT-3'
Cg-Chit1-rev	synthesis	antisense	5'-TTAGGACATTGAAATTGCTAGGAA-3'
Cg-Chit1-GGDDD-R	SEP-tag addition	sense	5'-GTCGTCATCACCACCGACATTGAAAT-3'
Cg-Chit1-D9Term-R	SEP-tag addition, insert to pET151/D-TOPO	antisense	5'-TTAATCATCATCATCATCGTCGTCATC-3'
Cg-Chit-fwd-HAT	HAT-tag addition	sense	5'-CGGGTACCCTGAAGTACAAACGAGTAT-3'
Cg-Chit-rev-HAT	HAT-tag addition	antisense	5'-CGGAGCTCTTAATCATCATCATCA-3'
Cg-Chit-fwd-HAT-CACC	insert to pET151/D-TOPO	sense	5'-ACCAAGGATCATCTCATCCACAATGT-3'

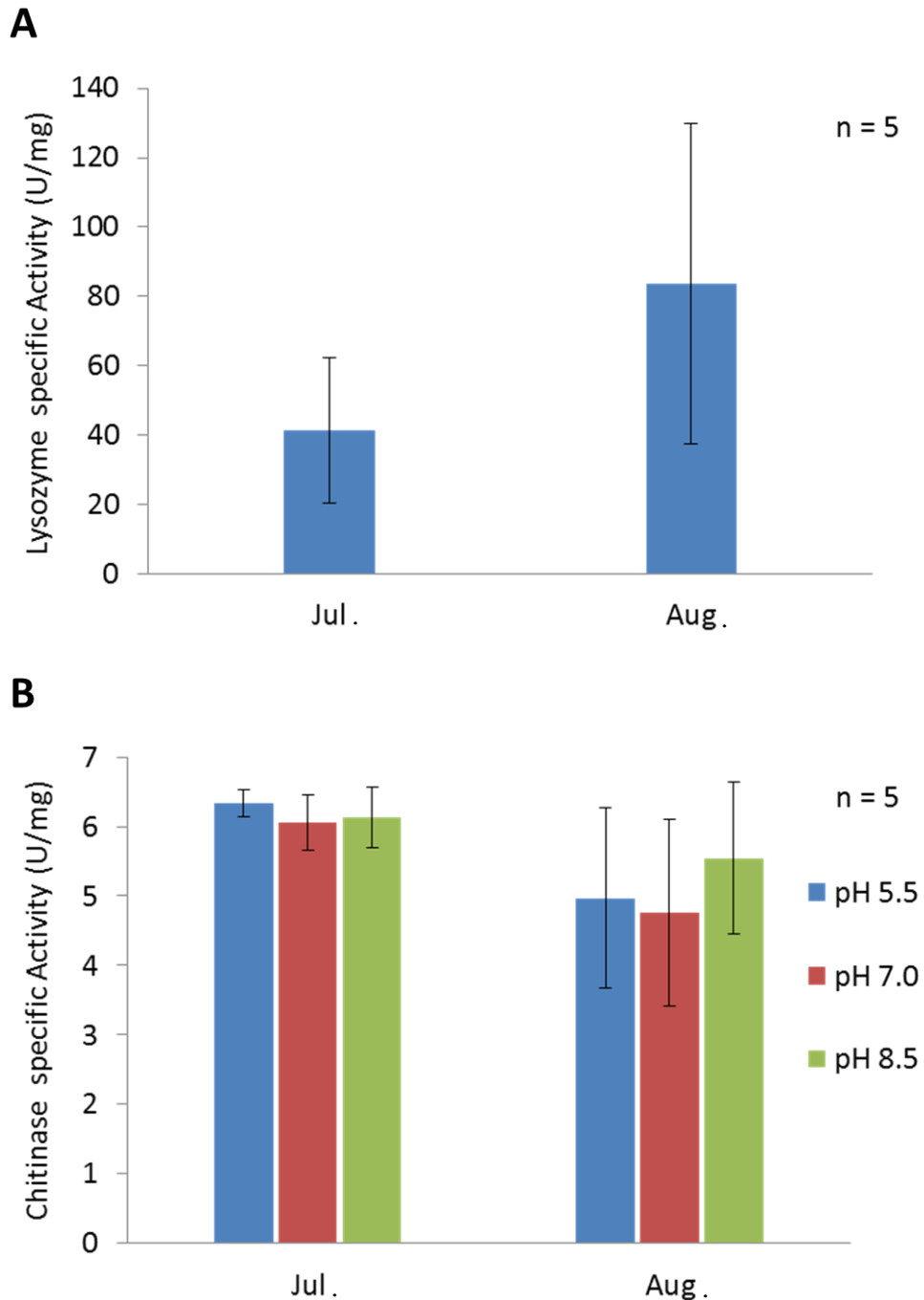


Fig. 29 Lysozyme and chitinase activities of mantle extract of the Pacific oysters collected in July and August 2011 A: Lysozyme activity measured under pH 5.0 by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min) per mg of protein concentration. B: Chitinase activity measured under pH 5.5, 7.0 and 8.5 by using ethyleneglycolchitin as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 415 nm per min) per mg of protein concentration.

AJ971238.1	1	MARLLFTFIYLTYLCHTAALKYKRVCCYYTNWAQYRNGIAKFEP SHIDPSLCTHIIYAFGK	60
Sample		-----.....	41
AJ971238.1	61	LEDNGITNFEWNETRYVEVNAFKRNNTGLKTLLAMGGWTAGSKPYSDMAASPENRRTFI	120
Sample	42	101
AJ971238.1	121	NASISWLRKYDFDGLDMDWEYPANRGGVPEDFNNFPIILLKEILEAFTEEAKTSGKSRLLL	180
Sample	102	161
AJ971238.1	181	TAAVGVGKSVADTAYNIPMSKYLDFISLMAYDLRGGWEKTTGFNAALYRSSADSSDEYN	240
Sample	162	221
AJ971238.1	241	VAFVDYWLKRGTPKEKLI LGLATYGRSFKLDENNFVGVGAPATGAGPQKGYVAEDGFLP	300
Sample	222	281
AJ971238.1	301	YYDICARQVQRVGETYRDEKAQTPFFVQENI WVGFDQLSIYTKVNDLVI SKQLGGAMIW	360
Sample	282	341
AJ971238.1	361	ALDFDDFNNICGYGKYPISRVMTDILLASESDISITPPSTHIPLSTVGTTRSPYPPPTG	420
Sample	342G.....S.....	401
AJ971238.1	421	DGGKTPDSGGGGSGHDGITSLDVDCGHEGDGLYRYSDCSKYIQCVKGTFRNCPTDLE	480
Sample	402	461
AJ971238.1	481	FNIAFSQCDWASNVCSSILVTIPKTTTSVYSKTDNSSLNITPINTGCQLSPYSHHLTLY	540
Sample	462V.....	521
AJ971238.1	541	TYMYLLIFFLAISMS	555
Sample	522	536

Fig. 30 Amino acid sequence alignment of the Cg-Chit1, the GenBank: AJ971238.1 and amplified cDNA. Red and green parts respectively delimit the catalytic domain and the chitin-binding domain (Badariotti *et al.*, 2007). The light blue parts were mutant amino acids in the obtained cDNA sample. (For interpretation of the references to colors in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4 Theoretically estimated characteristics of Cg-Chit1.

	CAI96026.1*	<i>Cg</i> -Chit1
Molecular weight	59579.88	59493.79
Predicted isoelectric point	5.08	5.15
Number of amino acid residues	536	536
Number of arginine residues	20	20
Protease cutting sites		
Trypsin	48	48
Thermolysin	141	142
Pepsin (pH > 2.0)	106	104

*Chit protein [*Crassostrea gigas*] GenBank: CAI96026.1

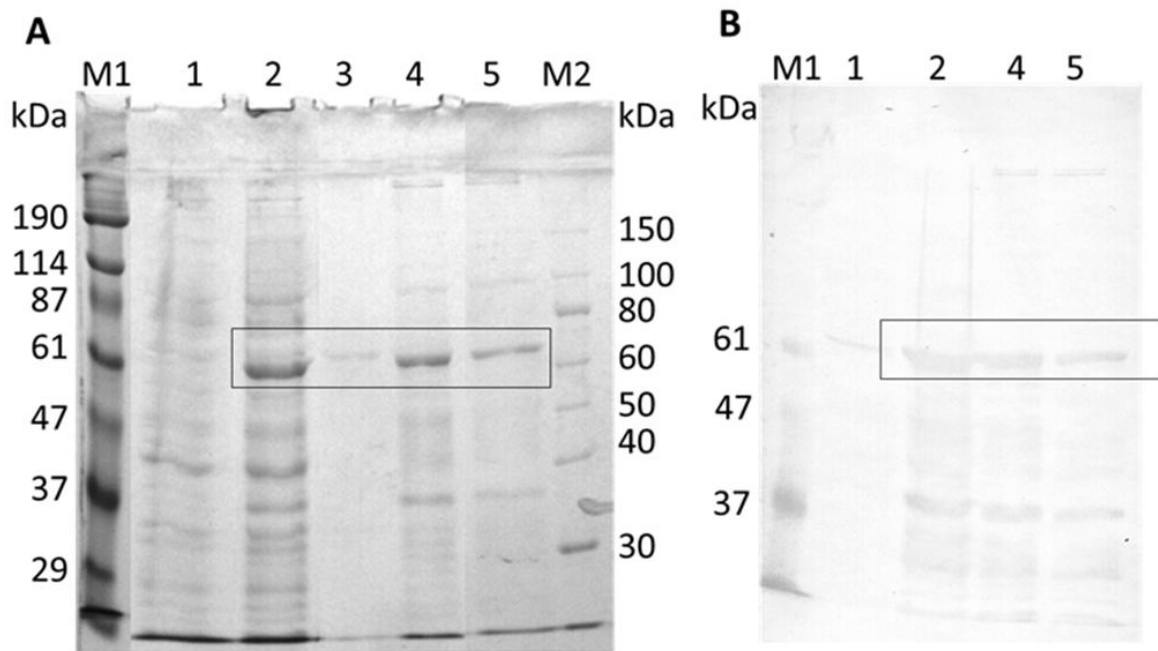


Fig. 31 SDS-PAGE of recombinant Cg-Chit1 and protein molecular markers after staining with CBB (A) and Western blot (B). Electrophoresis was carried out in a 10% polyacrylamide gel under reduced conditions. M1 and M2 were pre-stained protein markers (Broad Range) for SDS-PAGE and the XL Ladder broad range. Lanes 1 and 2: cultured cells before and after induction by IPTG. Lanes 3 and 4: insoluble precipitate and solubilized inclusion body. Lane 5: dialyzed sample (partially purified recombinant Cg-Chit1).

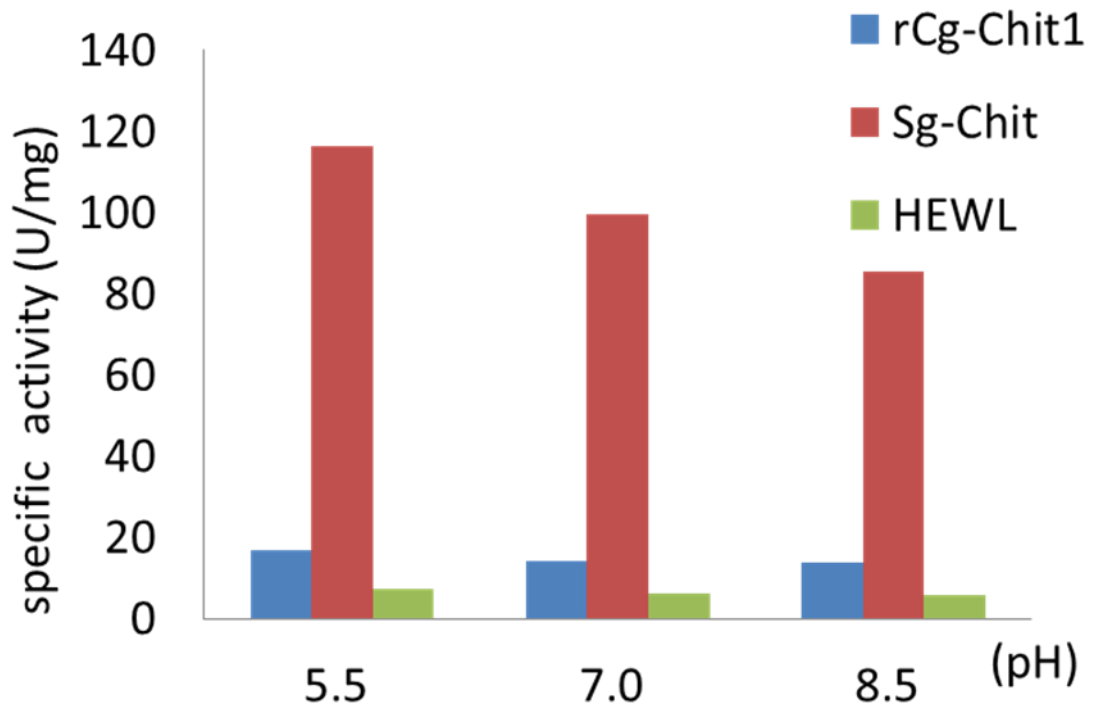


Fig. 32 Chitinase activities of rCg-Chit1, Sg-Chit and HEWL measured under pH 5.5, 7.0 and 8.5 by using ethyleneglycolchitin as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 415 nm per min) per mg of protein concentration.

考察

マガキ外套膜抽出液において抗菌酵素リゾチームおよび抗真菌酵素キチナーゼの両方の活性を検出し、またそれぞれ酵母および大腸菌によって組換え酵素を合成・精製し、機能解析を行った。SDS-PAGEにより推定した rCGL-3 分子量が CGL-3 のアミノ酸配列からの推定値より著しく大きくなっていたが、これは酵母によるタンパク質の発現によりタンパク質のハイパーグリコシレーションが起こったためであると考えられる。Nakamura *et al.* (1993) において酵母発現系によって合成したニワトリリゾチームがグリコシレーションしたことが報告されているが、リゾチーム活性には影響を与えなかった。従って、本研究においても rCGL-3 を特性解析に用いることに問題はないと判断した。

リゾチームにおいては、マガキ外套膜抽出液において酸性および中性の 2 点において高い溶菌活性を示したこと、および合成した rCGL-1 と rCGL-3 との間で高い溶菌活性を示す pH・イオン強度条件が異なっていること、グラム陽性菌に対し抗菌活性を示し、その特性も異なっていたことから、マガキ外套膜に存在する CGL-1 と CGL-3 の 2 つのリゾチームは何らかの役割分担をしている可能性が示唆された。rCGL-1・rCGL-3 共に中性条件下で高い溶菌活性を示すが、rCGL-1 は rCGL-3 に比べ酸性・高イオン強度条件においてもある程度のリゾチーム活性を発揮し、一方 rCGL-3 は塩基性かつ高イオン強度条件の広い条件下において rCGL-1 よりも高い溶菌活性を示した。これらリコンビナントリゾチームとマガキ生体内のリゾチームとの間で活性を表す条件に大きな違いはないと仮定すると、外套膜では酸性条件では主に CGL-1 が、中性～塩基性条件では主に CGL-3 が溶菌活性を示すように、互いに補完しながら幅広い条件で細菌に対し防御能を発揮している可能性が考えられる。単位量当たりの活性が rCGL-3 のほうが高いことも加えて rCGL の活性の特徴を第 1 節の Fig.18 に当てはめるなら、Fig.18A の酸性側で溶菌活性を示していたリゾチームは CGL-1 であり、Fig.18B の中性で高い活性を示していたリゾチームは CGL-3 である可能性が

高いと考えられる。また CGL-1 は消化盲嚢や血球での発現もあることから (Matsumoto *et al.*, 2006)、酸性条件でも溶菌活性を示しているのは消化酵素としての機能や貪食胞内の低 pH 条件での殺菌作用に適応していることも考えられ、rCGL-1, rCGL-3 とともに生体防御因子として重要な機能を持つ事が推測できる。

rCGL-1, rCGL-3 共に温度が高いほどリゾチーム活性が高くなるが、これはマガキリゾチームの至適温度が 50℃であるという高橋ら (1986) の結果と矛盾しない。今回の研究に用いたマガキの生育域の最高水温はおよそ 25℃であるが、マガキは潮間帯に生息する生物であるためにより高温の環境に晒されることも想定され、リゾチームが高い温度で高い溶菌活性を示すことは重要であると考えられる。二枚貝は温度ショックにより、酸化ショックや血球の貪食能、殺菌力の低下による生体防御能の減退を生じ、消耗や日和見菌の感染の原因となることが分かっている (Lang *et al.*, 2009)。リゾチームが高温で機能することは、このような状況において有効であろう。

抗菌活性に関しては、rCGL-1, rCGL-3 とともにリゾチーム活性を強く発揮する条件において、グラム陽性菌にのみ抗菌活性を示していたことから、この抗菌活性はリゾチームとしての溶菌活性に基づくものであり、CGL-1 および CGL-3 もマガキ外套膜においてグラム陽性菌に対しての生体防御因子として機能すると考えられた。二枚貝外套膜における抗菌作用は様々な二枚貝で報告されているが (McDade and Tripp 1967; Haug *et al.*, 2004; Defer *et al.*, 2009)、マガキ外套膜においてはグラム陽性菌に対してリゾチームによる細菌防除が成されていることが示された。第 1 章におけるマガキ外套腔内および採取した粘液の抗菌作用にリゾチームが関わっていることを推測したが、これを強く支持するデータが rCGL の抗菌活性の解析から得られたと言えるであろう。マガキ rCGL-1 は pH 5.5 の条件では、リゾチーム活性が至適条件の 50% 程度であったにも関わらず至適条件に近い pH 7.2, I = 0.005 の実験区よりも強い抗菌活性を示した。rCGL-1 が酸性条件においてある程度の活性を示すということは CGL-1 が酸性条件での生体防御因子として重要である証拠であると考えられ、マガキ血球の貪食胞内での酸性条件

における殺菌や、酸性の環境条件に曝されたときに効果を発揮するものと思われる。rCGL-3 は rCGL-1 よりも中性条件における抗菌活性が強く、これは溶菌活性の強さに起因するものと考えられ、マガキ生体における CGL-3 も中性条件における生体防御因子としては CGL-1 以上の機能を示すのだと考えられる。過去に本研究室の伊木 (2004) がマガキ外套膜抽出液の殺菌活性について調べており、それによると外套膜抽出液はグラム陽性菌に対して殺菌活性を発揮するとされていた。本研究で明らかになったグラム陽性菌に対するこの抗菌活性は、リゾチームがマガキの液性防御因子として重要な働きをしている事を裏付けるものであると考える。また、rCGL-3 は $I = 0.020$ での低濃度条件において、さらに溶菌活性が認められない $I = 0.700$ においてもある程度細菌の増殖を抑制しており、さらにその効果は溶菌活性と違い濃度に非依存的であった。rCGL-1 では単純に濃度依存的な抗菌活性を示し、リゾチームが一定の濃度以下になると抗菌活性を示さなくなっていたが、rCGL-3 のこの抗菌活性は rCGL-1 のそれとは明らかに異なっている。rCGL-3 は rCGL-1 には無い、おそらく単純な溶菌活性とは別の何らかの抗菌作用も有しており、このために低濃度でも抗菌的な作用を示すことができたという可能性が考えられる。この結果も CGL-3 がマガキの重要な生体防御因子であることを支持するデータであると言える。全身で遺伝子の発現が見られる CGL-1 に対し (Matusmoto *et al.*, 2006)、CGL-3 は特に外套膜で遺伝子が発現する (Itoh *et al.*, 2010) という特徴、および Fig. 19 において外套膜抽出液のリゾチーム活性が中性条件でも高かった個体が少なかったことから、CGL-1 は恒常的に遺伝子が発現するのに対して、CGL-3 は一部の二枚貝リゾチームに見られるように、病原体やストレスなどの条件によって遺伝子発現が誘起される (Allam *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008) タイプの生体防御因子である、というような形で機能分担をしていることも考えられる。このことに関しては、細菌感染などの刺激と CGL 遺伝子の発現量、リゾチーム活性の変化との関係をより詳しく研究していくことが必要であろう。しかし、あくまでグラム陰性菌にしか作用を示さないマガキリゾチームの抗菌活性は、グラム

陰性菌に対しても作用を示したオーロラニシキガイやアメリカガキ (Nilsen *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2007) よりも限られた機能であるといえるだろう。

マガキのキチナーゼに関しては、まずリゾチームという酵素自体がキチナーゼ活性を示すことが知られているため (林ら、1974)、マガキ外套膜抽出液においてリゾチーム活性とは異なるキチナーゼ活性が存在することを確認するために、7月と8月のマガキサンプルを用いてリゾチーム活性とキチナーゼ活性の両方を測定した。結果、リゾチーム活性とキチナーゼ活性の高さが一致しないことから、マガキ外套膜抽出液にはリゾチームとは独立してキチナーゼが存在することが示唆された。これは Badariotti *et al.* (2007) においてマガキ外套膜でキチナーゼの遺伝子の発現が報告されていることから支持される。キチナーゼの活性は酸性から塩基性まで広い pH 領域において安定であり、これはヒトのキトトリオシダーゼ (Boot *et al.*, 2001)、タバコスズメガ *Manduca sexta* のキチナーゼ (Zhu *et al.*, 2001) などとも近い性質であると考えられる。

本研究において扱ったマガキキチナーゼ Cg-Chit1 は Badariotti *et al.* (2007) において既にクローニングされていた Cg-Chit をクローニングし直した物だが、アミノ酸配列において変異が生じていた。しかし、マガキ外套膜抽出液においてキチナーゼ活性が存在していたことや、アミノ酸配列から計算した等電点、アルギニン残基数、プロテアーゼ切断サイト数などの要素は Cg-Chit と近かったことから、Cg-Chit1 を機能解析に用いることは問題ないと判断した。Cg-Chit1 の等電点 5.15 は、マウスの AMCcase やヒトキトトリオシダーゼの等電点と近く (Boot *et al.*, 2001)、マウス AMCcase は胃で遺伝子がの発現が高いことが明らかである (Boot *et al.*, 2001)。また、アルギニン残基数やプロテアーゼ切断サイトの数はリゾチームの様なタンパク質においてはその存在する組織によっては重要な特徴であることが示されており (Xue *et al.*, 2004; Itoh and Takahashi., 2007)、これらの残基数あるいは切断部位が少ない酵素は消化器官に適応したものと考えられる。Cg-Chit1 のアルギニン残基数や切断サイトはそのアミノ酸数からすると多数であり、消化

器官における消化酵素ではなく外套膜組織における防御因子としての適応をした分子であると考えられた。

キチナーゼの合成においては、当初 Cg-Chit1 の N 末端に 6xHis タグのみを付加した組換え酵素を合成したが、この場合酵素は封入体として得られ、しかも 8 M 尿素や 6 M グアニジン塩酸塩の変性剤にも不溶であった。大腸菌で合成したタンパクが凝集し不溶化する事例は報告されていたが (Chatterjee and Esposito, 2006)、本研究では溶解性の改善のため rCg-Chit1 に HAT タグと SEP タグを付加した。これにより封入体の溶解性が改善され、8 M 尿素を含む緩衝液により封入体の 70%以上を溶解することに成功した。

得られた組換え酵素のキチナーゼ活性は、酸性から塩基性の条件下で安定した活性を示し、これは外套膜抽出液と同様であった。しかし、ポジティブコントロールとして用意した Sg-Chit に比べると rCg-Chit1 は約 1/6 ~ 1/5 と非常に低く、それもあってリゾチーム程詳細な特性解析はできなかった。この活性の低さの原因として想定されるものに付加した HAT タグと SEP タグの影響が考えられるが、これらのタグは酵素活性の再生も助けるとされており (Clontech Laboratories; Kato *et al.*, 2007; Rathnayaka *et al.*, 2011)、rCg-Chit1 の活性が非常に低い理由ははっきりとはわからない。ヒトのキトトリオシダーゼや AMCase の組換え酵素では *Mucor rouxiya* や *Candida albicans* 等の真菌類に対する抗真菌活性があることが調べられているが (van Eijk *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008)、本研究で得られた rCg-Chit1 においては抗真菌活性が見られなかった (date not shown)。これらの原因として、酵素のリフォールディングがうまくなされていないのではないかと考えられた。本研究で酵素のリフォールディングは、酵素をニッケルカラムも結合させて変性剤を段階的に除去することで行ったが、これがうまくいっていないとすれば、リフォールディング法の改善、あるいは今回は用いなかったが酵素の合成に酵母を用いるなどの方法で、より活性の強い、特性解析にも用いることができるキチナーゼを合成できると考えられる。そのうえで改めてキチナーゼの生体防御における役割を

解析できればマガキ外套膜・粘液の生体防御に関して有用な知見となるだろう。

第 2 章で調べた酵素の活性において、キチナーゼに関してはは課題が残ったが、リゾチームの性質に関しては第 1 章の実験結果との符号を示唆する結果が得られた。すなわち、マガキ外套腔内および組織における細菌排除、マガキ体表面粘液がグラム陽性菌 *M. luteus* に対して有意に抗菌活性を示すのは、マガキ外套膜で遺伝子が発現し、酵素が存在するリゾチームが重要な役割を担い、*M. luteus* に対して作用しているためであるということである。そして、第 1 章でマガキ粘液がグラム陰性菌に対しても抗菌活性を示す傾向があったこと、リゾチームがグラム陰性菌に抗菌作用を示さなかったことは、マガキ体表面粘液にはグラム陰性菌に対して抗菌活性を示すリゾチーム以外の防御因子が存在するという意味する。マガキ粘液は、グラム陽性菌・グラム陰性菌の両方に対して抗菌活性を示す、サーフェスバリアとしての細菌防除機能を担うことが示されたといえるだろう。

第 3 章 二枚貝の体表面粘液の生体防御機能の検討

第 1 章において、マガキ体表面粘液にグラム陽性菌 *M. luteus* に対して抗菌活性が示され、グラム陰性菌 *V. tapetis* に対しても不安定ながら抗菌的な作用を示すサンプルが見られた。第 2 章において、マガキ外套膜で遺伝子が発現し活性が認められる溶菌酵素リゾチームの組換え酵素がグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すことを確かめ、リゾチームがマガキ体表面におけるグラム陽性菌に対する防御因子として重要だと考えられること、第 1 章のマガキ粘液のグラム陽性菌に対する抗菌作用がリゾチームによるものと思われること、粘液にはリゾチームとは異なるグラム陰性菌に対する防御因子が存在することが想定された。

第 3 章では、このマガキにおいて想定された粘液の防御機能がマガキ以外の二枚貝においても共通するものかを明らかにしようと試みた。この粘液の特性がマガキのみの特異的なものであるならば、必然的に将来的な応用の可能性の幅も狭まるが、粘液による生体防御、粘液の性質が他の多くの二枚貝類にも共通するものであれば、今後の研究や得られたデータは増養殖技術などへの利用にもそれぞれの二枚貝における結果や成果が相互に役立つものとなるだろう。マガキとは粘液の分泌能が異なる 2 種類の二枚貝を用いて、粘液の抗菌活性を測定し、マガキと比較検討を行った。実験に用いた二枚貝は、マガキ以上に大量の体表面粘液を分泌するヒオウギガイ *Mimachlamys nobilis*、体表面粘液をほとんど分泌しないが血リンパに抗菌活性を持つアカガイ *Scapharca broughtonii* である。粘液の分泌能がマガキとは異なるこれらの二枚貝においても粘液の抗菌活性が認められ、体表面粘液のサーフェスバリア機能は二枚貝類に一般的に共通するものであるのか、粘液の分泌量が少ない二枚貝の場合どのように細菌防除を行っているのかを検討した。

【材料と方法】

ヒオウギガイ・アカガイ

ヒオウギガイは 2013 年 10 月に三重県伊勢湾より購入したものを
用いた。人工海水中での飼育は行わず、購入後にそのまま粘液・
血リンパを採取した。

アカガイは 2012 年 10 月に京都府舞鶴湾産のものを購入し、12 °C の
人工海水中で無給餌飼育し、順次使用した。

粘液・血リンパサンプリング

ヒオウギガイの血リンパおよび粘液は 15 個体からサンプリングした。
血リンパは心臓より注射針付きツベルクリンシリンジを用いて採取
した。貝殻の耳から幅白い部分に切りかわるところの後ろ側を少し削り、
心臓に針を刺すことで血リンパを採取し、これを 3 個体分ずつプールし、
5 つの血リンパプールを得た。これを遠心分離 (4 °C, 150 ×g, 15 分) し、
血球や組織片等を除いた上清を得た。上清は孔径 0.20 μm のフィルター
で濾過滅菌し、分注して -30 °C で冷凍保存した。粘液は、閉殻筋を
切断し貝殻を開けた後、外套膜を切り取り、これを絞ることで付着して
いた粘液を得た。粘液も 3 個体分ずつプールし、5 つの粘液プールを
得た。粘液は粘性が非常に強く、また夾雑物が多く混じっていたため、
次にこれを除去した。得られた粘液を遠心分離 (4 °C, 15,000 ×g, 25 分)
すると、比較的白色あるいは透明である上部と茶・黒の色が付いた下部
の 2 層にある程度分離したので、上部の白い分画をできるだけ回収した。
回収した粘液を 4 倍量の滅菌人工海水に加え、ボルテックスミキサーで
よく混合し、遠心分離 (4 °C, 15,000 ×g, 15 分) して固形物や溶解しき
らなかった成分を分離し上清を回収することで、粘液を 5 倍に希釈した。
これを孔径 0.20 μm のフィルターで濾過滅菌し、分注して -30 °C で
冷凍保存した。

アカガイの血リンパおよび粘液は 5 個体からサンプリングした。
閉殻筋を切断し貝殻を開けた後、外套血洞に溜まっている血リンパを
マイクロピペットで採取した。採取した血リンパは全てまとめてプール

し、遠心分離 (4 °C, 15,000 ×g, 25 分) して血球を分離し上清を得て、孔径 0.20 μm のフィルターで濾過滅菌し、分注して−30 °C で冷凍保存した。粘液は、血リンパを採取した後に貝をしばらく静置し、外套膜の表面に僅かに染みだしたものを滅菌綿棒でこすり取った後、500 μl の人工海水中で綿棒を洗うことで得た。5 個体分の粘液を 1 つの人工海水で洗浄して粘液の人工海水希釈液を得て、孔径 0.20 μm のフィルターで濾過滅菌し、分注して−30 °C で冷凍保存した。

リゾチーム活性測定・タンパク濃度測定

リゾチーム活性測定・タンパク濃度測定ともに、第 1 章でのマガキ粘液の測定と同様の方法で行った。それに加え、ヒオウギガイ粘液・血リンパのリゾチーム活性測定は、*M. luteus* の懸濁に酢酸緩衝液ではなく人工海水 (pH 8.0) を用いて行った実験区を用意し、これを測定した。ヒオウギガイに関しては、対照区は一つしか用意しなかった。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 電気泳動による解析は、第一章と同じ手法で行った。ヒオウギガイは粘液・血リンパ共に 5 サンプルを、タンパク濃度 1 mg/ml に調整してから SDS-PAGE 泳動用サンプルを調整し、泳動に供した。アカガイは血リンパのみを、希釈はせずにそのまま泳動用サンプルを調製して実験に供した。

抗菌活性測定

抗菌活性は、第 1 章第 2 節の、*in vitro* での抗菌活性測定と同様の手法で行った。アカガイに関しては、サンプリングした粘液は抗菌活性測定に用いなかった。抗菌活性測定に用いた *V. tapetis* であるが、粘液・血リンパと反応後に培地プレートに塗布して培養する際、ヒオウギガイの粘液・血リンパでは滅菌人工海水で 10 倍希釈して塗布し、アカガイの血リンパでは 100 倍に希釈してプレートに塗布した。ヒオウギガイの測定では、コントロールである人工海水と細菌懸濁液を混合した対照区が 1 つのみで、それに対し実験区は 5 サンプルを用いている。アカガイ

血リンパでは、対照区・実験区ともに $n = 5$ であり、測定結果は Student の片側 t 検定により、それぞれのサンプル・細菌において実験区の CFU の平均値が対照区の平均値より有意に増加あるいは減少しているかどうかを判定した。危険率は 5%とした。

【結果】

ヒオウギガイ 粘液・血リンパ リゾチーム活性測定・タンパク濃度測定

ヒオウギガイ体表面粘液および血リンパのタンパク質濃度を Fig. 33 に示す。比較対象として第 1 章第 2 節で採取したマガキ体表面粘液のデータを共に載せている。ヒオウギガイ粘液はサンプリングの時点で 5 倍希釈しているため、元の濃度に換算している。ヒオウギガイ粘液のタンパク濃度は約 6.4 mg/ml であり、マガキ粘液が約 1 mg/ml であるのに対し 6 倍以上の濃度であり、非常に濃い粘液を大量に分泌していた。また、血リンパも約 1.2 mg/ml と、マガキ粘液よりも濃度が高かった。

ヒオウギガイ粘液・血リンパのリゾチーム活性は、酢酸緩衝液 (pH 5.0) 条件下における ml 当たりの活性はそれぞれマガキ粘液の約 8 倍、約 2 倍であったが、人工海水中 (pH 8.0) では殆ど活性を示さないという特徴があった (Fig. 34)。

ヒオウギガイ SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 電気泳動でサンプルを分離すると、体表面粘液と血リンパでバンドパターンに異なる特徴が見られた (Fig. 35)。粘液は、15 kDa, 20 kDa, 40 kDa, 70 kDa などの大きさのやや濃いタンパク質バンドが見られ、マガキの粘液や血リンパに見られたように特定のタンパク質だけが大量に存在するようなパターンではなかったが (Fig. 14), 血リンパは 70 kDa に非常に太いバンドがあり、それ以外のバンドが薄いというタンパク質組成の偏りが強いパターンであった。粘液に存在した 50 kDa 以下の大きさのやや濃いバンドは、血リンパにも同じ位置にバンドが存在するようだが、全体的には血リンパに比べ薄くなっていた。

ヒオウギガイ 抗菌活性測定

ヒオウギガイは粘液・血リンパともに、*M. luteus* は対照区よりも実験区で CFU/ml が増加し、*V. tapetis* には CFU/ml 減少する傾向があった (Fig. 36~37)。対照区が一つしかないため統計解析による有意差

は検出できないが、実験に供したすべてのサンプルで同様の傾向が示されたことから、ヒオウギガイ粘液・血リンパ共に *M. luteus* に対しては抗菌作用を示さず、*V. tapetis* に対して抗菌作用を示す傾向が強いといえる。コントロールに対し、どちらのサンプルでも *M. luteus* の CFU は 20%程増加し *V. tapetis* の CFU は半分程の値となった。

アカガイ 粘液・血リンパ リゾチーム活性測定・タンパク濃度測定

アカガイ体表面粘液および血リンパのタンパク質濃度を Fig. 38 に示す。こちらにも比較対象としてマガキ体表面粘液のデータを共に載せている。アカガイ粘液のタンパク濃度が約 18.7 mg/ml と非常に高いが、これは本実験でのアカガイ粘液の採取方法が、体表面に僅かに分泌される粘液を綿棒で集め、少量の人工海水中で溶解させるというやり方であったため、この時体表面に僅かに付着していた赤血球も一緒に集めてしまい、それが人工海水中で溶解し、血球中のタンパク質も溶出してしまった結果である。実際、得られた粘液サンプルはアカガイ血球の赤い色で染まっていた。アカガイ血リンパ自体は問題なく採取でき、タンパク濃度は約 2.0 mg/ml、マガキ粘液の約 2 倍の濃度があった。

アカガイ粘液・血リンパのリゾチーム活性は、粘液はほとんど活性が無く、血リンパはマガキ粘液より多少低い活性を有していた (Fig. 39)。

ヒオウギガイ SDS-PAGE 解析

アカガイでは粘液は血球とコンタミを起こしてしまったため、SDS-PAGE 電気泳動での分離は血リンパのみで行った。バンドパターンは 80 kDa に非常に濃いタンパク質バンドがあるという特徴が見られた (Fig. 40)。

アカガイ抗菌活性測定

アカガイ血リンパは、*M. luteus* に対してはほぼ完全に生育を抑制し、抗菌活性を示したが、*V. tapetis* に対しては有意な抗菌活性を示さなかった (Fig. 41)。すなわち、マガキ粘液の抗菌活性と傾向は同様だが (Fig. 15)、*M. luteus* に対する作用はより強かった。*V. tapetis* に対する

抗菌活性はばらつきが大きく不安定であった。Table 5 では測定した 5 回の *V. tapetis* に対する抗菌活性の個々の結果を表した。マガキ粘液の Table 1 と同様の表だが、こちらでもそれぞれの実験において対照区の CFU を 100%とした場合は、CFU が大きく増減していた。すなわち、抗菌的な作用が見出せることもあれば、逆に CFU が増加している場合もあった。

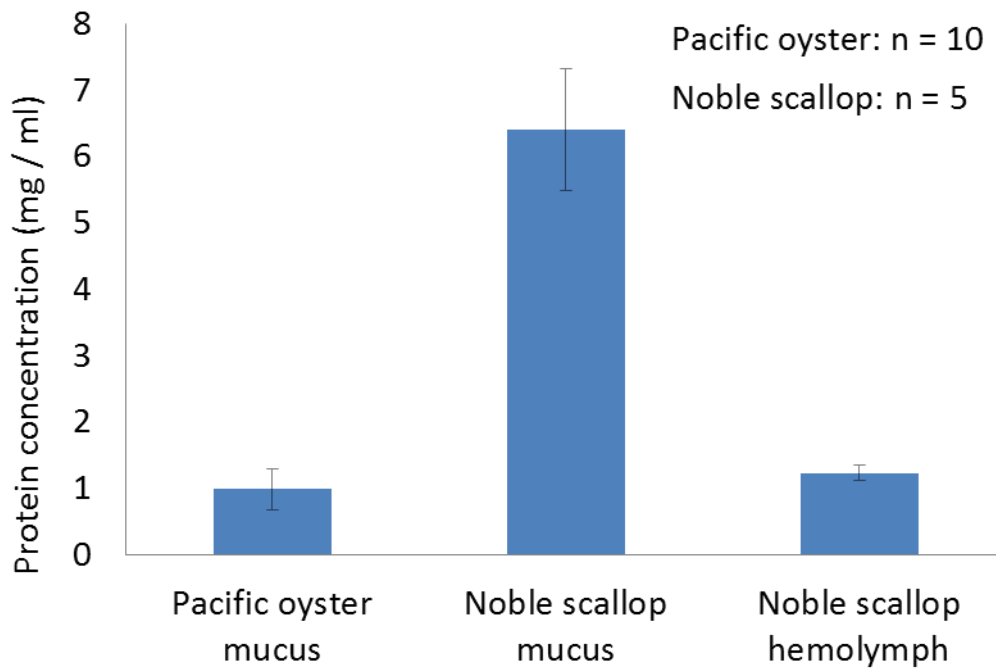


Fig. 33 Protein concentrations of mucus from the Pacific oysters, mucus and hemolymph from the Noble scallops. Means \pm SD are indicated. Protein concentration are measured by Bradford protein assay.

Lysozyme activities of pacific oyster and noble scallop

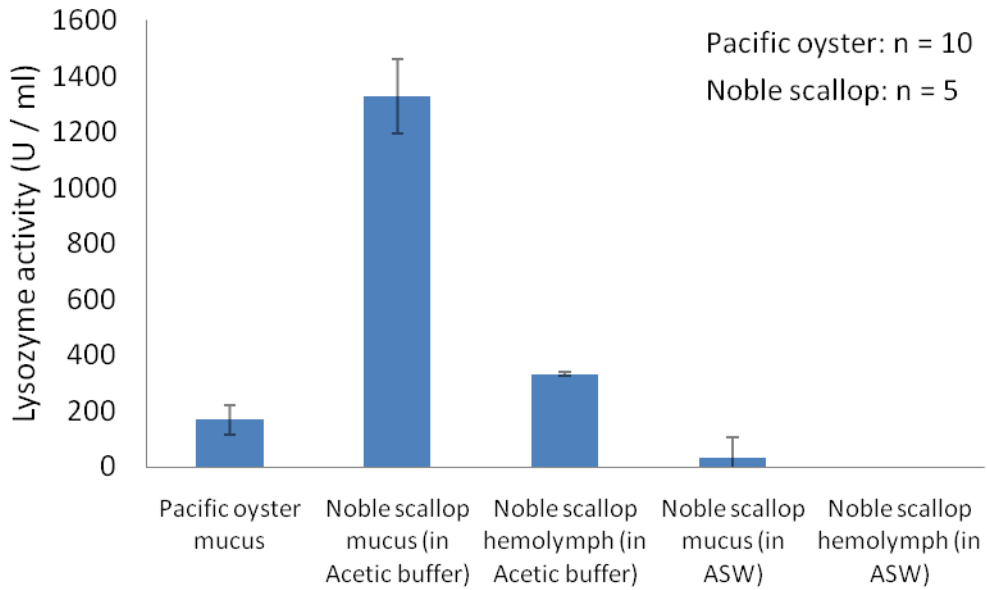


Fig. 34 Lysozyme activities of mucus from the Pacific oysters, mucus and hemolymph from the Noble scallops. Means \pm SD are indicated. Lysozyme activities are measured at pH 5.0 or in artificial seawater by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min).

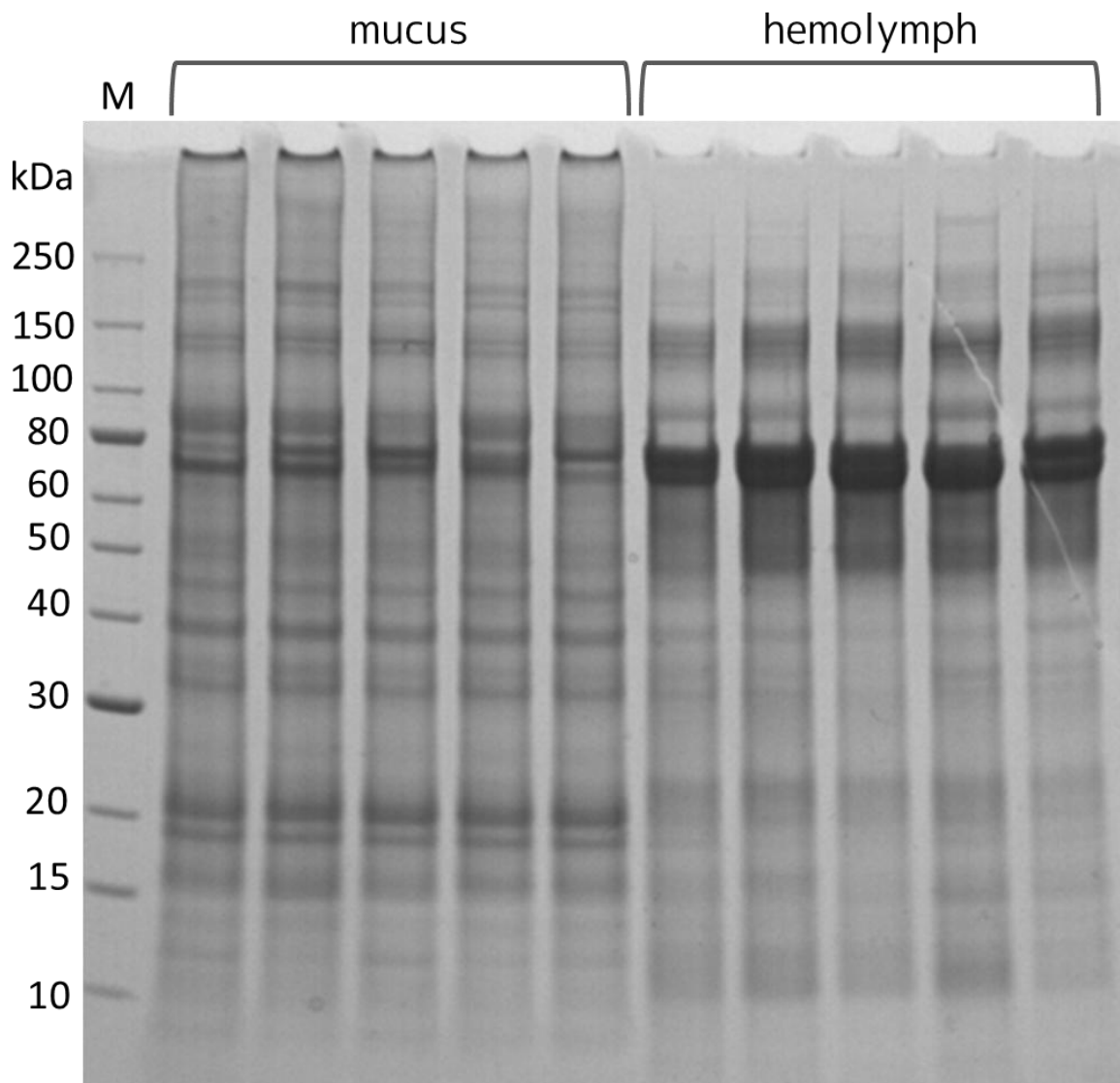


Fig. 35 SDS-PAGE of mucus and hemolymph from noble schallops. Electrophoresis was carried out in a 4-12% gradient acrylamide/bis gel under reduced conditions and the gel was stained with CBB. M was XL Ladder broad range. Each samples were adjusted to 1 mg / ml protein concentration.

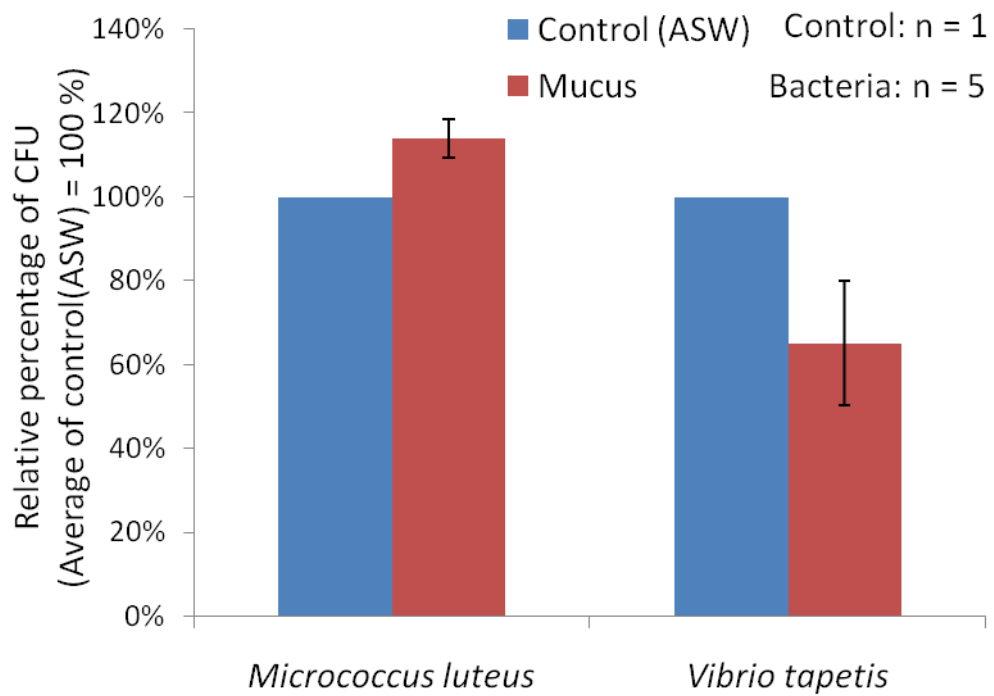


Fig. 36 Antibacterial activity of the mucus from noble scallops. Means \pm SD are indicated. CFU of control (Artificial seawater) were defined as 100% on each bacteria.

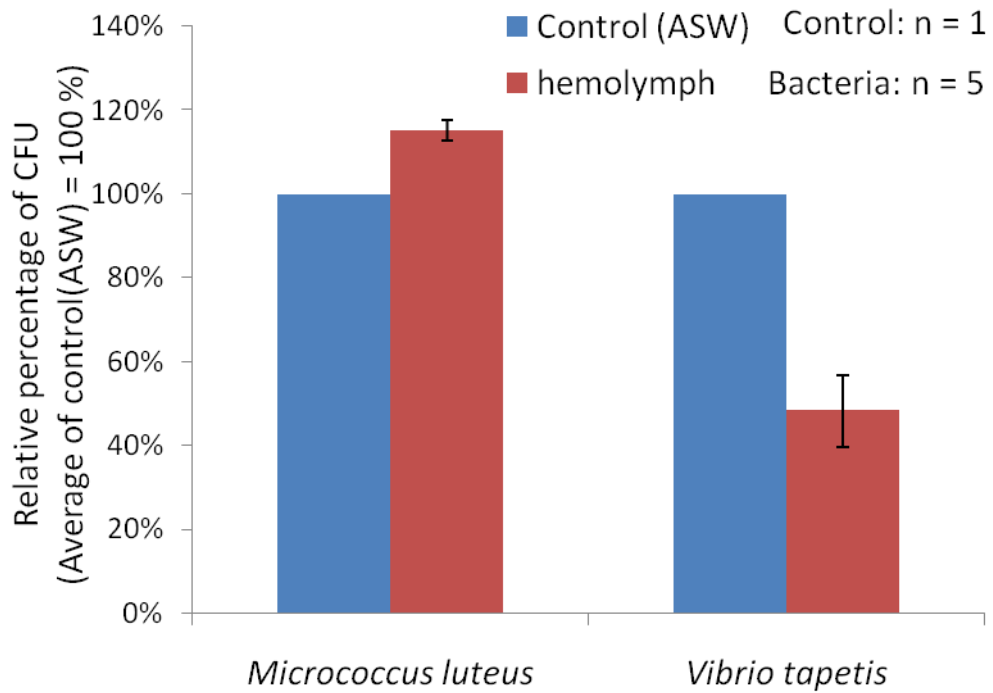


Fig. 37 Antibacterial activity of the hemolymph from noble scallops. Means \pm SD are indicated. CFU of control (Artificial seawater) were defined as 100% on each bacteria.

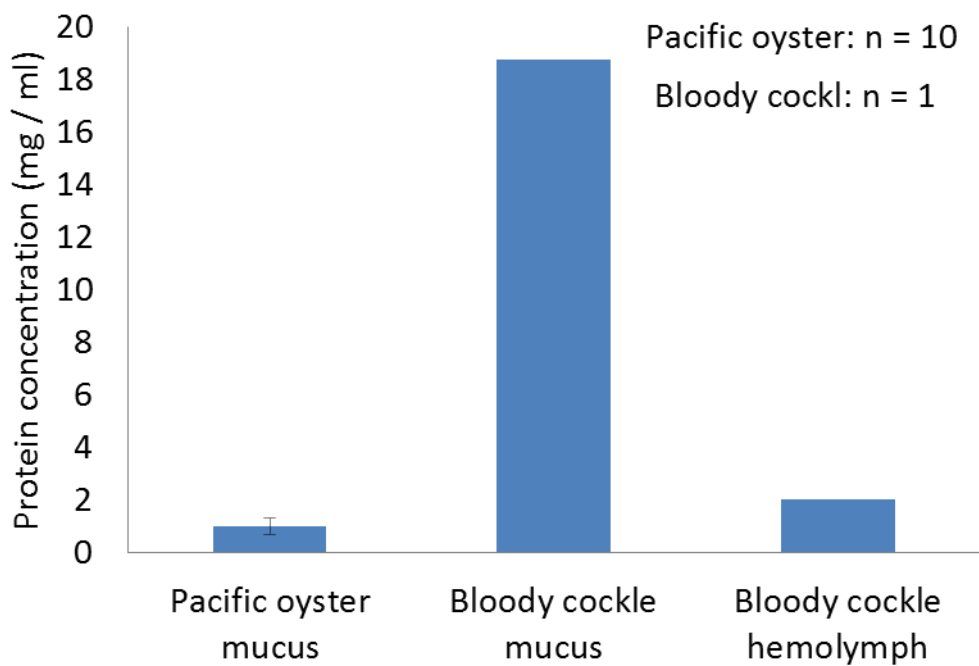


Fig. 38 Lysozyme activities of mucus from the Pacific oysters and hemolymph from bloody cockles. Means \pm SD are indicated. Lysozyme activities are measured at pH 5.0 by using dried cells of *M. luteus* as a substrate. Results are shown as unit (0.001 decrease of absorbance at 540 nm per min).

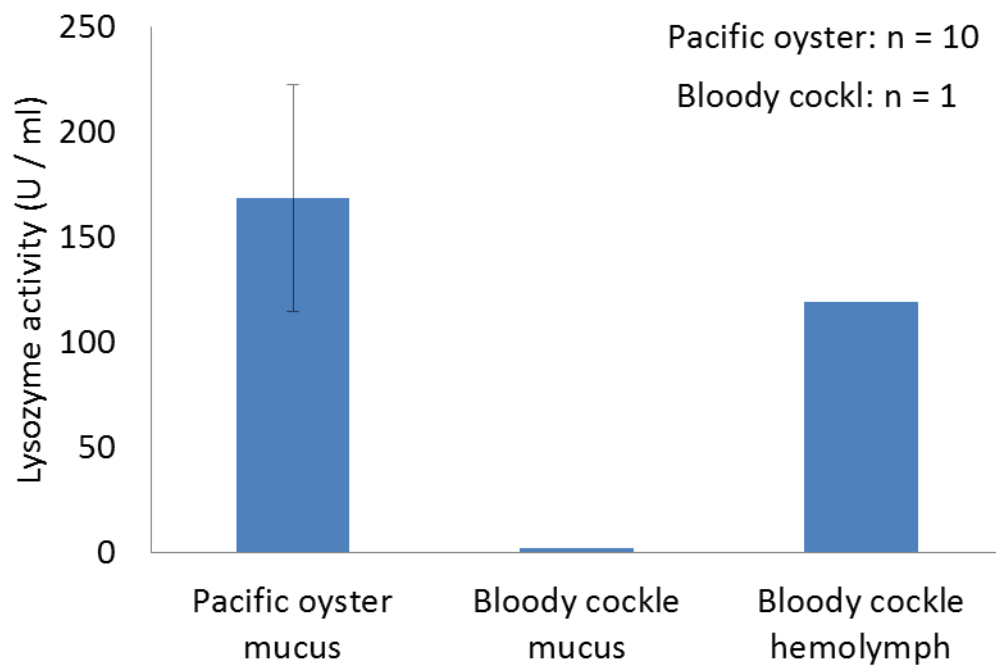


Fig. 39 Protein concentrations of mucus from the Pacific oysters and hemolymph from bloody cockles. Means \pm SD are indicated. Protein concentration are measured by Bradford protein assay.

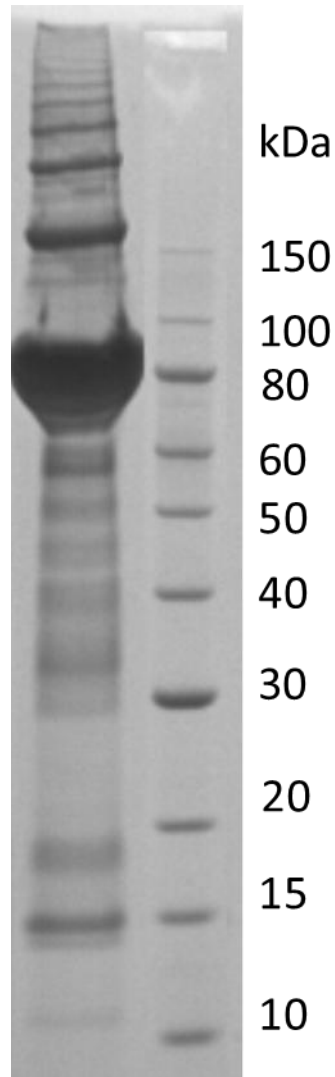


Fig. 39 SDS-PAGE of hemolymph from bloody cockles. Electrophoresis was carried out in a 4-12% gradient acrylamide/bis gel under reduced conditions and the gel was stained with CBB. M was XL Ladder broad range.

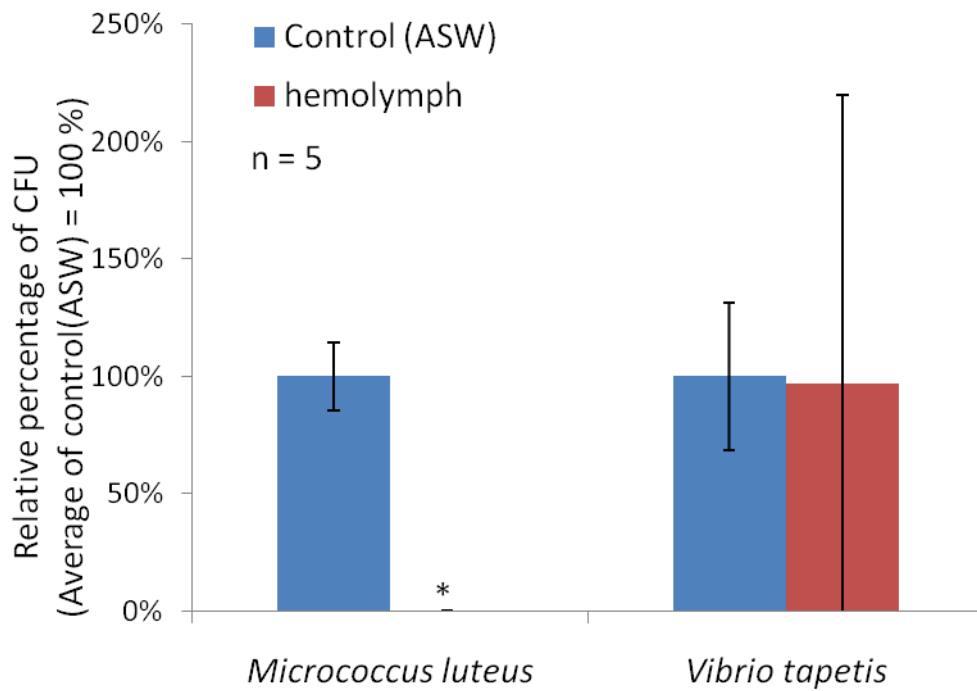


Fig. 40 Antibacterial activity of the hemolymph of bloody cockles. Means \pm SD are indicated. Mean of CFU of control (Artificial seawater) were defined as 100% on each bacteria. Asterisks indicate statistical significant differences respect to control ($p < 0.05$).

Table 5 Relative percentage (RP) of CFU by each antibacterial assay by each hemolymph samples of bloody cockles.

Sample	RP of CFU
1	219.6%
2	121.2%
3	18.7%
4	31.7%
5	33.1%

*Control = 100%

考察

ヒオウギガイ粘液は分泌量の多さや粘性の強さ、リゾチーム活性の強さから、マガキと同様にサーフェスバリアとしての機能が想定され、抗菌活性測定においてグラム陰性菌に対する抗菌活性が示唆された。血リンパでも同様の活性が示され、体内における細菌防除機能も想定されるが、粘液の原液の濃度が非常に濃く、粘性も強く外套膜を覆っていたことから考えて、粘液のサーフェスバリアによる防御が重要であると考えられる。測定したすべてのサンプルにおいて *V. tapetis* の生育を抑制したことは、マガキ粘液で考えられた *V. tapetis* に対する抗菌因子、抗 *V. tapetis* 因子と呼ぶべきものがヒオウギガイにも存在する可能性を示していると言えるであろう。ヒオウギガイおよびマガキの 2 種類の二枚貝粘液中に存在が考えられたこの *V. tapetis* に対する抗菌因子の正体に関しては本研究では解明できなかったが、そのための実験サンプルとしてヒオウギガイは粘液が大量に得られ、しかも明確な抗菌作用を示すことから非常に扱いやすいということが考えられた。今後はヒオウギガイを用いた *V. tapetis* に対する抗菌因子の解明と、それに基づく二枚貝粘液のサーフェスバリアとしての機能の解明が重要な研究課題となるであろう。

ヒオウギガイ粘液および血リンパにおいて、マガキやアカガイと対照的であったのは、高いリゾチーム活性が認められたにも関わらずグラム陽性菌 *M. luteus* に対する抗菌活性が示されなかったことである。第 1 章・第 2 章から、マガキ粘液においてはリゾチームの溶菌活性がグラム陽性菌に対する抗菌作用として機能すると結論したが、ヒオウギガイにおいて *M. luteus* に対する抗菌活性が示されなかったのは粘液・血リンパ中のリゾチームが人工海水の条件では溶菌活性を示さなかったためではないかと考えられる。pH 5.0 の酢酸緩衝液条件と pH 8.0 の人工海水条件でのリゾチーム活性の測定の結果を見る限り、酸性条件のみで溶菌活性を示し、人工海水中では溶菌活性がほとんど無い。これは酸性から中性まで広い pH 条件で溶菌活性を示すマガキ外套膜抽出液および精製した rCGL とは大きく異なった性質といえる。

リゾチームの一般的な性質として、消化酵素的に機能するものは酸性条件下で強い活性を示すように適応しているとされているが (Imoto 2009)、pH 8 の海水に接する粘液中に分泌されるリゾチームが酸性条件下のみで活性を示すことの生理学的な意義は今回の実験結果からはよくわからない。ヒオウギガイ粘液が海水とは大きく異なる pH・イオン強度条件を持ち、その条件下ではリゾチームが有効に機能する可能性や、アサリリゾチームで示されるようにリゾチームが溶菌活性とは異なる条件下で溶菌活性とは異なる酵素活性を示す可能性 (Takeshita *et al.*, 2003) なども考え、ヒオウギガイ粘液リゾチーム、ひいては二枚貝粘液リゾチームの生体防御因子としての意義をより深く解明する必要があると思われる。

ヒオウギガイやマガキに対し、アカガイは粘液の分泌・性状において対照的であった。分泌量自体が少なく、また何とかリゾチーム活性を測定しても溶菌活性を示さなかったことから、マガキやヒオウギガイで想定された粘液によるサーフェスバリア機能は想定し難いと考えられる。しかし、血リンパではグラム陽性菌 *M. luteus* に対し極めて強力な抗菌作用を示したこと、グラム陽性菌 *V. tapetis* に対しても不安定ながら抗菌的な作用を示したことから、アカガイ、ひいては粘液の分泌量が少ない二枚貝では、体内への細菌の侵入はあるものの体内の血リンパによる細菌防除が強力であり、これによって侵入した細菌に対処するという生体防御が考えられる。アカガイ血リンパのリゾチーム活性がマガキ粘液より低いにも関わらず *M. luteus* に対する抗菌活性がマガキ粘液よりも強力であることは、今回のリゾチーム活性測定では測定していないが pH 8.0 海水中ではより高いリゾチーム活性を示す可能性や、血リンパ中のグラム陽性菌に抗菌作用を示すリゾチーム以外の防御因子の存在が想定される。アカガイの血リンパにはディフェンシンが、血球や各種組織には透過性増強タンパク質 (BPI) や LPS 結合タンパク (LBP) などが存在することが報告されている (Li *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2013)。アカガイがグラム陽性菌 *M. luteus* に対し強力な抗菌作用を示す理由として、これらの要素が重要な機能を担っているのかもしれない。これに対し、アカガイのグラム陰性菌 *V. tapetis* に

対する抗菌的な作用が不安定ながら示されることはマガキ粘液の性状と似る。しかし、粘液の分泌能が弱い二枚貝においても血リンパでグラム陰性菌に対し抗菌的な作用を示す傾向が見られたことは、二枚貝の普遍的な防御因子として粘液だけでなく体内、血リンパにも *Vibrio* を抗菌し得る物質が存在することを示唆している。この物質の解明は、やはり今後の大きな課題となるであろう。

これらのことから、二枚貝に共通する細菌排除のための生体防御として、(1)体表面粘液を大量に分泌する二枚貝は、粘液がサーフェスバリアとして機能する。特に、粘液中のリゾチームはグラム陽性菌に対する防御因子として重要な機能を果たし、またグラム陰性菌に対してもリゾチームとは異なる抗菌作用を示す因子が存在する。(2)体表面粘液の分泌が少ない二枚貝は、粘液で細菌を防ぎきれず、体内への細菌の侵入が予想される。しかし血リンパによる体内での防御能が強力であり、これによって細菌を排除している。という粘液の性質を基準とした2通りの防御戦略の分類が想定された。粘液というサーフェスバリアが二枚貝の生体防御において重要な役割を担っていることが示唆されたと共に、サーフェスバリアに依らない防御戦略が存在することは二枚貝体内における防御機構の性質や有効性を考えるうえで注目すべきことであると考えられる。

第3章の結論として二枚貝の生体防御戦略として粘液の分泌能に基づいた2通りの分類を想定し、体表面粘液のサーフェスバリアとしての有効性を推測したが、この仮説を体系化するためにはより多くのデータが必要である。本研究で用いた3種類の二枚貝以外の種の二枚貝においても粘液の性質を研究するとともに、それぞれの二枚貝が生息する環境中の細菌の種類や病原性の有無、それぞれの二枚貝の体構造や生態の研究をも交え、二枚貝の体表面粘液がサーフェスバリアとしてどれほど生体防御において重要であるかを研究することが今後の課題となると考えられる。

総合考察

本研究において想定された二枚貝体表面粘液のサーフェスバリアとしての役割、リゾチーム等の抗菌因子の機能は、これらの要素が実際に細菌防除に役立っていることを強く支持したという点で、二枚貝生体防御の研究において重要な知見となったと考えられる。特に種によって、あるいは同じ種内でも個体によって *Vibrio* 属細菌に対する防御能が強いものが存在すると考えられることは、二枚貝においてしばしば重篤な斃死をもたらす致死的な細菌性感染症に対しても有効な対策を講じることができる可能性を示したという点で非常に重要であろう。

本研究で明らかになった、粘液機能の重要性、リゾチームや抗菌因子の機能の重要性を将来的に増養殖に活かすのであれば、以下の様な利用法が考えられる。1 つは、粘液を用いた二枚貝の活力診断である。すなわち、少量の粘液を採り、そこに含まれるリゾチーム等の抗菌因子の活性を調べることで、個体を殺傷することなく貝の生理状態や生体防御能力の変化を把握することができる。第 1 章ではマガキ体表面粘液中のリゾチーム活性が細菌の曝露に対する応答反応の様に上下したことを示したが、これは養殖環境中における二枚貝に影響を与える細菌の有無の判定、病原性細菌による汚染の指標として利用が可能であると考えられる。また、第 1 章の *in vitro* 実験において、粘液の *M. luteus* と *V. tapetis* それぞれに対する抗菌活性に相関が見られたことから考えて、粘液中のリゾチーム活性の高さを、その個体の生体防御能の強さの指標とできる可能性がある。マガキリゾチームはグラム陰性菌に対する抗菌活性を示さないが、リゾチーム活性が高い個体は、本研究で存在が推定された抗 *Vibrio* 因子ともいふべき生体防御因子もまた強く発現しているのではないかと考えられる。粘液であれば個体を殺傷することなく二枚貝の生理状態の把握や防御能を比較する基準に使用することが可能であると考えられ、またリゾチームは活性測定が容易であることから、研究および増養殖において利用できると思われる。また、個体の生体防御機能を殺傷することなく簡単に測定できることから、高い生体防御機能を持つ個体を選抜しての耐病性品種の作出に利用すると

いった応用が考えられる。二枚貝の耐病性品種の例としては、QX 病耐性シドニーイワガキ *Saccostrea glomerata* (Green *et al.*, 2008) があるが、このように品種として確立された例は二枚貝には未だ少ない。粘液という生体防御に重要な役割を果たし、且つ個体を傷つけずに機能を解析できる因子を見出したことは、今後の二枚貝研究や養殖において有用な結果が得られたと言えるであろう。本研究で 3 種類の二枚貝において存在が推定された抗 *Vibrio* 因子を同定し、この因子の活性の高さによって個体選抜を繰り返せば、*Vibrio* 病耐性二枚貝という系統を確立できることが期待される。

二枚貝増養殖における抗 *Vibrio* 因子のもう一つの利用法は、二枚貝人工種苗生産における二枚貝幼生に投与可能な *Vibrio* 病の予防・治療薬としての利用である。*Vibrio* 属細菌感染症による大量斃死が最も問題となるのは幼生期であり、限られた水槽内で飼育される二枚貝種苗に感染が広まると文字通り致命的な被害をもたらす (中村 1993; 高橋 2003)。ビブリオ等有害細菌の排除には各種の抗生物質や *Vibrio* 属細菌が分泌するプロテアーゼに対する阻害剤を用いることで対処をするわけであるが、この時用いるのは二枚貝の幼生や環境に対する負荷が低いものであることが望ましい。この *Vibrio* 属細菌に対して用いる薬剤として、本研究で存在が考えられた抗 *Vibrio* 因子が利用できるのではないかと考えられる。この因子がいかなるものであるのかを解明するのは今後の課題であるが、その同定・特性解析を行い、大量に合成・精製して人工種苗の飼育水槽に投入し *Vibrio* 属細菌による感染症を予防・治療することができる可能性がある。その二枚貝由来の生理活性物質であるために、二枚貝幼生への負荷や環境への汚染は抗生物質等よりも少なく、人工種苗生産技術における応用が期待できるであろう。

また、ヒオウギガイやマガキ粘液が *Vibrio* 属に対し抗菌活性を示す因子を持つことを明らかにしたことで、広く水産動物の病原体のみならず、ヒトの食中毒の原因ともなる *Vibrio* 属細菌の新たな防除法につながる可能性がある。*Vibrio* が二枚貝を含む水産動物の病原体であることはこれまで述べてきたことであるが、ヒトに対する食中毒の原因としても *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 等が汚染された

魚介類を通じヒトに感染することが知られている (Su and Liu 2007; Normanno *et al.*, 2006)。二枚貝に存在すると考えられる *Vibrio* 属細菌に対する 防御因子を解析すれば、これら *Vibrio* による食中毒の予防や治療に応用できることが考えられる。

二枚貝粘液のサーフェスバリア機能、それを担う抗菌因子の研究は、大きな将来性を持つ研究分野であろう。二枚貝増養殖業の高度化・発展化のため、あるいは医学・疫学的な方面への発展を期待し、より研究を進めていくことが必要である。

要約

マガキの外殻腔内および組織表面では細菌が速やかに死滅することが考えられ、組織表面での殺菌には体表面粘液の関与が推測された。

マガキ体表面粘液を採取し抗菌活性を測定したところ、グラム陽性菌 *M. luteus* に対して抗菌作用を示し、またグラム陰性菌 *V. tapetis* に対しても不安定ながら抗菌作用を示す傾向が見られた。このことからマガキ体表面粘液はサーフェスバリアとして細菌を排除する重要な生体防御因子であると考えられた。グラム陽性菌に対し抗菌作用が特に有効であったことから、溶菌酵素リゾチームの関与が考えられた。

マガキ外殻膜で発現する溶菌酵素リゾチームの組換え酵素の機能解析から、マガキ粘液のグラム陽性菌に対する抗菌活性にはリゾチームが重要な役割を担っていると考えられた。また、マガキ粘液にはグラム陰性菌に抗菌活性を示すリゾチーム以外の因子が存在することが示唆された。

マガキ体表面粘液の抗菌活性と、マガキとは粘液の性状が異なるヒオウギガイおよびアカガイの粘液および血リンパの抗菌活性を比較した。その結果、体表面粘液を大量に分泌する二枚貝は、粘液がサーフェスバリアとして機能し細菌を排除していること、体表面粘液の分泌が少ない二枚貝は、血リンパによる体内での防御が強力であり、これによって細菌を排除していること、という二枚貝の 2 通りの生体防御の仕組みが想定された。このとき、グラム陽性菌に対して作用する防御因子にはリゾチームが存在し、グラム陰性菌に対してもリゾチームとは異なる抗菌作用を示す因子が存在することが考えられた。グラム陰性菌に対する抗菌因子が二枚貝粘液に一般的に存在し得ることは、二枚貝養殖技術の発展や *Vibrio* 属細菌によるヒトの食中毒に対しての新たな防除法への応用等が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教員として終始適切な御指導を賜りました東北大学大学院農学研究科水圏動物生理学分野の高橋計介准教授に謹んで御礼申し上げます。また、副査の労をおとり下さった鈴木徹教授ならびに片山知史教授に深謝いたします。加えて、審査委員をして下さった先生方にも厚く御礼申し上げます。また、本研究において適切な御助言・御指導を下さり、研究者としての意識を御指導頂いた尾定誠教授ならびに伊藤直樹助教に心から感謝申し上げます。最後に、本研究は東北大学大学院農学研究科水圏動物生理学研究室の皆様との激励と御協力のもとに進めることができました。深く感謝申し上げます。

引用文献

- Allam, B, C Paillard, A Howard, and M Le Pennec. 2000a. "Isolation of the Pathogen *Vibrio Tapetis* and Defense Parameters in Brown Ring Diseased Manila Clams, *Ruditapes philippinarum*, Cultivated in England." *Diseases of aquatic organisms* 41(2): 105–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10918978>.
- Allam, Bassem, Christine Paillard, and Michel Auffret. 2000b. "Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*." *Journal of Invertebrate Pathology* 76(1): 63–69.
- 青木宙. 2007. "魚介類の生体防御に関する研究." 日本水産学会誌 73(3): 400–407.
- 浅川牧夫. 1996. "魚類体表面粘質物の生体防御における役割: ウナギシアル酸含有糖タンパク質の構造と機能." 日本水産学会誌 62(2): 291–92.
- Badariotti, Fabien, Christophe Lelong, Marie-Pierre Dubos, and Pascal Favrel. 2011. "Identification of Three Singular Glycosyl Hydrolase Family 18 Members from the Oyster *Crassostrea gigas*: Structural Characterization, Phylogenetic Analysis and Gene Expression." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 158(1): 56–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868765>.
- Badariotti, Fabien, Romain Thuau, Christophe Lelong, Marie-Pierre Dubos, and Pascal Favrel. 2007. "Characterization of an Atypical Family 18 Chitinase from the Oyster *Crassostrea gigas*: Evidence for a Role in Early Development and Immunity." *Developmental and comparative immunology* 31(6): 559–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056114>.
- Beninger, P. G., and S. D. St-Jean. 1997. "The Role of Mucus in Particle Processing by Suspension-Feeding Marine Bivalves: Unifying Principles." *Marine Biology* 129(2): 389–97.

- Boettcher, K J, B J Barber, and J T Singer. 1999. "Use of Antibacterial Agents To Elucidate the Etiology of Juvenile Oyster Disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and Numerical Dominance of an Alpha-Proteobacterium in JOD-Affected Animals." *Applied and environmental microbiology* 65(6): 2534–39.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Boettcher, K J, B J Barber, and J T Singer. 2000. "Additional Evidence That Juvenile Oyster Disease Is Caused by a Member of the Roseobacter Group and Colonization of Nonaffected Animals by *Stappia Stellulata*-Like Strains." *Applied and environmental microbiology* 66(9): 3924–30.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Boot, R G, E F Blommaart, E Swart, K Ghauharali-van der Vlugt, N Bijl, C Moe, A Place, and J M Aerts. 2001. "Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase." *The Journal of biological chemistry* 276(9): 6770–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085997>.
- Boot, R G, G H Renkema, A Strijland, a J van Zonneveld, and J M Aerts. 1995. "Cloning of a cDNA Encoding Chitotriosidase, a Human Chitinase Produced by Macrophages." *The Journal of biological chemistry* 270(44): 26252–56.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592832>.
- Brun, N T, N W Ross, and a D Boghen. 2000. "Changes in the Electrophoretic Profiles of Gill Mucus Proteases of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Response to Infection by the Turbellarian *Urastoma Cyprinae*." *Journal of invertebrate pathology* 75(2): 163–70.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772329>.
- Burreson, Eugene M., and Susan E. Ford. 2004. "A Review of Recent Information on the Haplosporidia, with Special Reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX Disease)." *Aquatic Living Resources* 17(4): 499–517.

Callewaert, Lien, and Chris W Michiels. 2010. "Lysozymes in the Animal Kingdom." *Journal of biosciences* 35(1): 127–60.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413917>.

Carnegie, Ryan B and Eugene M Burreson. 2012. "Perkinsus marinus and *Haplosporidium nelsoni*" Woo, P. T. K. and Buchmann, Kurt(Eds.) *Fish Parasites: Pathobiology and Protection*. Paulo Pessoa: 92-109

Carnegie, Ryan B, Eugene M Burreson, P Mike Hine, Nancy a Stokes, Corinne Audemard, Melanie J Bishop, and Charles H Peterson. 2006. "*Bonamia perspora* N. Sp. (Haplosporidia), a Parasite of the Oyster *Ostreola equestris*, is the First *Bonamia* Species Known to Produce Spores." *Journal of eukaryotic microbiology* 53(4): 232–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872291>.

Carnegie, Ryan B., and Nathalie Cochenec-Laureau. 2004. "Microcell Parasites of Oysters: Recent Insights and Future Trends." *Aquatic Living Resources* 17(4): 519–28.

Chatterjee, Deb K, and Dominic Esposito. 2006. "Enhanced Soluble Protein Expression Using Two New Fusion Tags." *Protein expression and purification* 46(1): 122–29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025575>.

Chen, L, Z Shen, and J Wu. 2009. "Expression, Purification and *in vitro* antifungal Activity of Acidic Mammalian Chitinase Against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* Strains." *Clinical and experimental dermatology* 34(1): 55–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076793>.

Cheng, T C, G E Rodrick, D a Foley, and S a Koehler. 1975. "Release of Lysozyme from Hemolymph Cells of *Mercenaria mercenaria* During Phagocytosis." *Journal of invertebrate pathology* 25(2): 261–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1117169>.

Chintala, Marnita M, David Bushek, and Susan E Ford. 2002. "Comparison of *in vitro*-Cultured and Wild-Type *Perkinsus marinus*. II. Dosing Methods and Host Response." *Diseases of aquatic organisms* 51(3): 203–16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12465878>.

Clontech. “HAT™ Protein Expression and Purification System User Manual.”

Defer, Diane, Nathalie Bourgougnon, and Yannick Fleury. 2009. “Screening for Antibacterial and Antiviral Activities in Three Bivalve and Two Gastropod Marine Molluscs.” *Aquaculture* 293(1-2): 1–7.

Egidius, Emmy. 1987. “Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review.” *Aquaculture* 67(1-2): 15–28.

van Eijk, Marco, Cindy P a a van Roomen, G Herma Renkema, Anton P Bussink, Laura Andrews, Edward F C Blommaart, Alan Sugar, Arthur J Verhoeven, Rolf G Boot, and Johannes M F G Aerts. 2005a. “Characterization of Human Phagocyte-Derived Chitotriosidase, a Component of Innate Immunity.” *International immunology* 17(11): 1505–12.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214810>.

van Eijk, Marco, Cindy P a a van Roomen, G Herma Renkema, Anton P Bussink, Laura Andrews, Edward F C Blommaart, Alan Sugar, Arthur J Verhoeven, Rolf G Boot, and Johannes M F G Aerts. 2005a.. 2005b. “Characterization of Human Phagocyte-Derived Chitotriosidase, a Component of Innate Immunity.” *International immunology* 17(11): 1505–12.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214810>.

Elston, R. 1997. “Bivalve Mollusc Viruses.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(4): 393–403.

Fisher, William S. 1992. “Occurrence of Agglutinins in the Pallial Cavity Mucus of Oysters.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 162(1): 1–13.

Ford, S E, and F J Borrero. 2001. “Epizootiology and Pathology of Juvenile Oyster Disease in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*.” *Journal of invertebrate pathology* 78(3): 141–54.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812117>.

- Foster-Smith, R. L. 1975. "The Role of Mucus in the Mechanism of Feeding in Three Filter-Feeding Bivalves." *Journal of Molluscan Studies* 41(6): 571–88.
- Gonzalez, M, Y Gueguen, G Desserre, J de Lorgeril, B Romestand, and E Bachère. 2007. "Molecular Characterization of Two Isoforms of Defensin from Hemocytes of the Oyster *Crassostrea gigas*." *Developmental and comparative immunology* 31(4): 332–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962661>.
- Gonzalez, Marcelo, Yannick Gueguen, Delphine Destoumieux-Garzón, Bernard Romestand, Julie Fievet, Martine Pugnière, Françoise Roquet, Jean-Michel Escoubas, Franck Vandenbulcke, Ofer Levy, Laure Sauné, Philippe Bulet, and Evelyne Bachère. 2007. "Evidence of a Bactericidal Permeability Increasing Protein in an Invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(45): 17759–64. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2077063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Green, Timothy J., Brian J. Jones, Robert D. Adlard, and Andrew C. Barnes. 2008. "Parasites, Pathological Conditions and Mortality in QX-Resistant and Wild-Caught Sydney Rock Oysters, *Saccostrea glomerata*." *Aquaculture* 280(1-4): 35–38.
- Gueguen, Yannick, Romestand Bernard, Fievet Julie, Schmitt Paulina, Destoumieux-Garzón Delphine, Vandenbulcke Franck, Bulet Philippe, and Bachère Evelyne. 2009. "Oyster Hemocytes Express a Proline-Rich Peptide Displaying Synergistic Antimicrobial Activity with a Defensin." *Molecular immunology* 46(4): 516–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18962895>.

- Gueguen, Yannick, Amaury Herpin, André Aumelas, Julien Garnier, Julie Fievet, Jean-Michel Escoubas, Philippe Bulet, Marcelo Gonzalez, Christophe Lelong, Pascal Favrel, and Evelyne Bachère. 2006. "Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant Production, Folding, Solution Structure, Antimicrobial Activities, and Gene Expression." *The Journal of biological chemistry* 281(1): 313–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246846>.
- Haug, Tor, Klara Stensvåg, Ørjan M Olsen M, Erling Sandsdalen, and Olaf B Styrvold. 2004. "Antibacterial Activities in Various Tissues of the Horse Mussel, *Modiolus modiolus*." *Journal of invertebrate pathology* 85(2): 112–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050841>.
- Hauton, C, L E Hawkins, and S Hutchinson. 2000. "The Effects of Salinity on the Interaction Between a Pathogen (*Listonella anguillarum*) and Components of a Host (*Ostrea edulis*) Immune System." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 127(2): 203–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079374>.
- 林勝哉, 井本泰治, 1974 "第1章 リゾチームの研究の歴史." *化学の領域選書 9 リゾチーム* 南江堂: 1-29
- 飯塚真生. "マガキ PGRP-S1S による大腸菌の凝集と脱顆粒の誘起." 東北大学農学研究科修士論文.
- Imoto, Taiji. 2009. "Lysozyme." *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Isikawa, Haruhiko, Keisuke Takahashi, and Katsuyoshi Mori. 1997. "Occurrence of Bactericidal Factors in the Tissues of the Japanese Rock Oyster, *Crassostrea nippona*." *水産増殖* 45(4): 505–11.
- Itoh, Naoki, Hideki Komiyama, Noriyuki Ueki, and Kazuo Ogawa. 2004. "Early Developmental Stages of a Protozoan Parasite, *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxia), the Causative Agent of the Ovary Enlargement Disease in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*." *International journal for parasitology* 34(10): 1129–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380684>.

- Itoh, Naoki, Tadashi Oda, Kazuo Ogawa, and Hisatsugu Wakabayashi. 2002. "Identification and Development of a Paramyxean Ovarian Parasite in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*." *魚病研究* 37(1): 23–28.
- Itoh, Naoki, and Keisuke G Takahashi. 2007. "cDNA Cloning and in Situ Hybridization of a Novel Lysozyme in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 148(2): 160–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584512>.
- Itoh, Naoki, and Keisuke G Takahashi. 2008. "Distribution of Multiple Peptidoglycan Recognition Proteins in the Tissues of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 150(4): 409–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538602>.
- Itoh, Naoki, and Keisuke G Takahashi. 2009. "A Novel Peptidoglycan Recognition Protein Containing a Goose-Type Lysozyme Domain from the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*." *Molecular immunology* 46(8-9): 1768–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246096>.
- Jollès, Pierre, and Jacqueline Jollès. 1984. "What's New in Lysozyme Research?" *Molecular and Cellular Biochemistry* 63(2): 165–89.
- Kato, Atsushi, Kosuke Maki, Teppei Ebina, Kunihiro Kuwajima, Kunitsugu Soda, and Yutaka Kuroda. 2007. "Mutational Analysis of Protein Solubility Enhancement Using Short Peptide Tags." *Biopolymers* 85(1): 12–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16948129>.
- Kleeman, S N, R D Adlard, and R J G Lester. 2002. "Detection of the Initial Infective Stages of the Protozoan Parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and Their Development through to Sporogenesis." *International journal for parasitology* 32(6): 767–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062495>.

- Kramer, K J, and S Muthukrishnan. 1997. "Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides." *Insect biochemistry and molecular biology* 27(11): 887–900. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501415>.
- Labreuche, Yannick, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Viviane Boulo, Arnaud Huvet, and Jean-Louis Nicolas. 2006. "Cellular and Molecular Hemocyte Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Following Bacterial Infection with *Vibrio aestuarianus* Strain 01/32." *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8(12-13): 2715–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978900>.
- Lamont, J T. 1992. "Mucus: The Front Line of Intestinal Mucosal Defense." *Annals of the New York Academy of Sciences* 664: 190–201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1456650>.
- Lang, R. Paul, Christopher J. Bayne, Mark D. Camara, Charles Cunningham, Matthew J. Jenny, and Christopher J. Langdon. 2009. "Transcriptome Profiling of Selectively Bred Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Families that Differ in Tolerance of Heat Shock." *Marine Biotechnology* 11(5): 650-668.
- Li, Hui, Maria-Giovanna Parisi, Mylène Toubiana, Matteo Cammarata, and Philippe Roch. 2008. "Lysozyme Gene Expression and Hemocyte Behaviour in the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after Injection of Various Bacteria or Temperature Stresses." *Fish & shellfish immunology* 25(1-2): 143–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495491>.
- Li, Meng, Ling Zhu, Chun-ya Zhou, Shan Sun, Yan-jun Fan, and Zhi-meng Zhuang. 2012. "Molecular Characterization and Expression of a Novel Big Defensin (Sb-BDef1) from Ark Shell, *Scapharca broughtonii*." *Fish & shellfish immunology* 33(5): 1167–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000749>.
- Majeau, Nathalie, Jean Trudel, and Alain Asselin. 1990. "Diversity of Cucumber Chitinase Isoforms and Characterization of One Seed Basic Chitinase with Lysozyme Activity." *Plant Science* 68(1): 9–16.

- Mao, Yuze, Chunya Zhou, Ling Zhu, Yao Huang, Tingru Yan, Jianguang Fang, and Wei Zhu. 2013. "Identification and Expression Analysis on Bactericidal Permeability-Increasing Protein (BPI)/lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) of Ark Shell, *Scapharca broughtonii*." *Fish & shellfish immunology* 35(3): 642–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742867>.
- Matsumoto, Toshie, Akifumi M. Nakamura, and Keisuke G. Takahashi. 2006. "Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145(3-4): 325–30.
- McDade, J. E., and M. R. Tripp. 1967. "Lysozyme in oyster mantle mucus." *Journal of Invertebrate Pathology* 9(4): 581-582.
- Meyer-Hoffert, U, M W Hornef, B Henriques-Normark, L-G Axelsson, T Midtvedt, K Pütsep, and M Andersson. 2008. "Secreted Enteric Antimicrobial Activity Localises to the Mucus Surface Layer." *Gut* 57(6): 764–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250125>.
- Miyazaki, Teruo, Kuniko Goto, Tatsuya Kobayashi, Tetsushi Kageyama, and Masato Miyata. 1999. "Mass Mortalities Associated with a Virus Disease in Japanese Pearl Oysters *Pinctada fucata martensii*." *Disease of Aquatic Organisms* 37(1): 1–12.
- 森勝義, 2005. "10. マガキ" 森勝義 (編) *水産増養殖システム 3 貝類・甲殻類・ウニ類・藻類* 恒星社厚生閣: 171-268
- 森勝義, 刀根靖幸, 鈴木敏和, 笠原恵介, 野村正. 1980. "ホタテガイ組織における殺菌素と凝集素の活性." *日本水産学会誌* 46(6): 717–22.
- 室賀清邦, 高橋計介. 2007. "総説: 二枚貝の液性生体防御因子に関する研究の歴史と現状." *魚病研究* 42(1): 1–17.
- 中村昭文. 1993. "マガキ幼生におけるビブリオ病発症の制御に関する研究." 東北大学農学研究科博士論文

- Nakamura, S, H Takasaki, K Kobayashi, and A Kato. 1993. "Hyperglycosylation of Hen Egg White Lysozyme in Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 268: 12706–12.
- 奈良和俊. 1992. "世界のサケ・マス類養殖の現状と問題点." 北海道さけ・ます孵化場「魚と卵」 161: 59–68.
- Nilsen, I W, K Overbø, E Sandsdalen, E Sandaker, K Sletten, and B Myrnes. 1999. "Protein Purification and Gene Isolation of Chlamysin, a Cold-Active Lysozyme-Like Enzyme with Antibacterial Activity." *FEBS letters* 464(3): 153–58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618496>.
- Normanno, G., A. Parisi, N. Addante, N.C. Quaglia, A. Dambrosio, C. Montagna, and D. Chiocco. 2006. "*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and Microorganisms of Fecal Origin in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) Sold in the Puglia Region (Italy)." *International Journal of Food Microbiology* 106(2): 219–22.
- Oliver, Leah M, William S Fisher, Aswani K Volety, and Ziad Malaeb. 2003. "Greater Hemocyte Bactericidal Activity in Oysters (*Crassostrea virginica*) from a Relatively Contaminated Site in Pensacola Bay, Florida." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 64(4): 363–73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878408>.
- Paillard, C., P. Maes, and R. Oubella. 1994. "Brown Ring Disease in Clams." *Annual Review of Fish Diseases* 4: 219–40.
- Paillard, Christine. 2004. "A Short-Review of Brown Ring Disease, a Vibriosis Affecting Clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*." *Aquatic Living Resources* 17: 467–75.
- Paillard, Christine, Frédérique Le Roux, and Juan J. Borrego. 2004. "Bacterial Disease in Marine Bivalves, a Review of Recent Studies: Trends and Evolution." *Aquatic Living Resources* 17(4): 477–98.

- Paillard, Christina, Ashton-Alcox, Kathryn A, and Susan E. Ford. 1996. "Changes in Bacterial Densities and Hemocyte Parameters in Eastern Oysters, *Crassostrea virginica*, Affected by Juvenile Oyster Disease." *Aquatic Living Resources* 9: 145–58.
- Potasman, Israel, Alona Paz, and Majed Odeh. 2002. "Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: a Worldwide Perspective." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(8): 921–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355378>.
- Rathnayaka, Tharangani, Minako Tawa, Takashi Nakamura, Shihori Sohya, Kunihiro Kuwajima, Masafumi Yohda, and Yutaka Kuroda. 2011. "Solubilization and Folding of a Fully Active Recombinant Gaussia Luciferase with Native Disulfide Bonds by Using a SEP-Tag." *Biochimica et biophysica acta* 1814(12): 1775–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945374>.
- Renault, Tristana, and Beatriz Novoa. 2004. "Viruses Infecting Bivalve Molluscs." *Aquatic Living Resources* 17(4): 394–409.
- Ringø, Einar, and François-Joël Gatesoupe. 1998. "Lactic Acid Bacteria in Fish: a Review." *Aquaculture* 160(3-4): 177–203.
- Saulnier, Denis, Sophie De Decker, Philippe Haffner, Laetitia Cobret, Maeva Robert, and Céline Garcia. 2010. "A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity." *Microbial Ecology* 59(4): 787–798.
- Shephard, Kerry L. 1994. "Functions for Fish Mucus." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4(4): 401–29.
- Su, Yi-Cheng, and Chengchu Liu. 2007. "*Vibrio parahaemolyticus*: A Concern of Seafood Safety." *Food Microbiology* 24(6): 549–58.
- 杉野浩二郎, 吉田幹英, 伊藤輝昭, 松井繁明. 2009. "有明海福岡県地先におけるタイラギ斃死要因に関する研究Ⅱ." 福岡県水産海洋技術センター 研究報告 19: 83–90.

高橋計介. 2003. “二枚貝幼生の細菌性壊死症を抑制するための生体防御と生物学的防除の相互作用機構.”平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

高橋計介. 2008. “生体防御分子の発現解析と活性測定に基づくマガキ属有用3種の健康評価と活力診断.”平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(3))研究成果報告書

高橋計介,室賀清邦. 2008. “総説:二枚貝の細胞性生体防御機構.” 魚病研究 43(1): 1-17.

Takeshita, K, Y Hashimoto, T Ueda, and T Imoto. 2003. “A Small Chimerically Bifunctional Monomeric Protein: *Tapes japonica* Lysozyme.” *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 60(9): 1944-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523554>.

Takeshita, Kouhei, Yoshio Hashimoto, Yoshiyuki Thujihata, Takanori So, Tadashi Ueda, and Taiji Iomoto. 2004. “Determination of the Complete cDNA Sequence, Construction of Expression Systems, and Elucidation of Fibrinolytic Activity for *Tapes japonica* Lysozyme.” *Protein expression and purification* 36(2): 254-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249048>.

Toranzo, Alicia E., Beatriz Magariños, and Jesús L. Romalde. 2005. “A Review of the Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture Systems.” *Aquaculture* 246(1-4): 37-61.

Tubiash, H S, P E Chanley, and E Leifson. 1965. “Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. I. Etiology and Epizootiology.” *Journal of bacteriology* 90(4): 1036-44. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=315773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Villalba, Antonio, Kimberly S. Reece, M. Camino Ordás, Sandra M. Casas, and Antonio Figueras. 2004. “Perkinsosis in Molluscs; A Review.” *Aquatic Living Resources* 17(4): 411-32.

- Xue, Q-G, N Itoh, K L Schey, Y-L Li, R K Cooper, and J F La Peyre. 2007. "A New Lysozyme from the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Indicates Adaptive Evolution of i-Type Lysozymes." *Cellular and molecular life sciences* □ : *CMLS* 64(1): 82–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160350>.
- Xue, Qinggang, Michael E Hellberg, Kevin L Schey, Naoki Itoh, Ron I Eytan, Richard K Cooper, and Jerome F La Peyre. 2010. "A New Lysozyme from the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, and a Possible Evolutionary Pathway for i-Type Lysozymes in Bivalves from Host Defense to Digestion." *BMC evolutionary biology* 10: 213. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3020801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yamada, H, and T Imoto. 1981. "A Convenient Synthesis of Glycolchitin, a Substrate of Lysozyme." *Carbohydrate research* 92(1): 160–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664878>.
- 山内英男, 前原紀敏, 高梨琢磨, 中島忠一. 2010. "微生物に対する生体防御分子としてのディフェンシン: 節足動物, 軟体動物及び菌類に由来するディフェンシンの特性." 森林総合研究所研究報告 9(1): 1–18.
- Zhao, Jianmin, Linsheng Song, Chenghua Li, Huibin Zou, Duoqiao Ni, Wan Wang, and Wei Xu. 2007. "Molecular Cloning of an Invertebrate Goose-Type Lysozyme Gene from *Chlamys farreri*, and Lytic Activity of the Recombinant Protein." *Molecular immunology* 44(6): 1198–1208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16911829>.
- Zhu, Xiahui, Hong Zhang, Tamo Fukamizo, S Muthukrishnan, and Karl J. Kramer. 2001. "Properties of *Manduca sexta* chitinase and its C-terminal deletions." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31(12): 1221–1230.