

## PRESS RELEASE (2022-03-16)

海洋生物資源科学科  
〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866  
TEL・FAX：0466-84-3357  
E-mail: mano.nobuhiro@nihon-u.ac.jp  
URL: <http://www.msr-nihon-university.org>

# 各種飼育条件下（昇温ストレス・細菌感染・免疫賦活剤投与） におけるヒラメ粘膜組織中のヘモグロビンβ遺伝子発現の変化 を解析

### 研究成果のポイント

- 粘膜組織中に存在するヘモグロビンβ (Hbβ)の生理学的・免疫学的役割の情報を得ることを目的として、各種飼育条件下での Hbβ 遺伝子発現動態をリアルタイム PCR 解析にて解析した。
- 粘膜組織中の Hbβ 遺伝子発現は、昇温ストレス時において、特に鰓組織中で著しく減少した（皮膚組織でも減少傾向が認められた）。一方、感染初期ならびに免疫賦活剤投与時では皮膚組織において有意に上昇した。
- ヒラメ粘膜組織中の Hbβ 遺伝子発現動態は、魚体の健康状態と相関性がみられたことから、魚の健康指標としての利用が期待できる。

### 研究成果の詳細

#### **【背景】**

先行研究 (Mori *et al.*, 2021) において、免疫賦活剤の一つであるアスコルビン酸 (AsA) の高濃度投与を行ったヒラメ皮膚組織においてヘモグロビンβ (Hbβ) が上昇することを確認しました。ヘモグロビン (Hb) は赤血球中で酸素運搬能を有するタンパク質ですが、粘膜組織などの、ほ乳類や魚類の非赤血球細胞においても Hb が発現することが報告されています。ほ乳類では酸素運搬以外にも、鉄代謝の促進や抗菌活性など、Hb の機能は多岐にわたることが明らかとなっています。魚類でも Hb の分解産物（ペプチド）が抗菌能を有することが報告されていますが (Ullal *et al.*, 2008; 2010)、その機能や動態についての知見は乏しいのが現状です。

#### **【本研究のアプローチ】**

そこで本研究では、ヒラメを供試魚として、粘膜組織（皮膚、鰓、腸管）における Hbβ の生理学的・免疫学的役割の一端を明らかにすることを目的として、魚体の健康状

態が変化する各種飼育実験（昇温ストレス，細菌感染，免疫賦活剤投与）を行い、粘膜組織毎に  $Hb\beta$  遺伝子の発現変動を解析しました。

### 【研究成果】

昇温ストレスは 20°C から 30°C に水温を上昇させることにより行いました。また、細菌感染は、エドワジエラ症原因細菌 *Edwardsiella piscicida* を用いて実施しました。免疫賦活剤投与では、高濃度 AsA またはラクトフェリン (LF) を展着させた配合飼料を 3~7 日間与えた魚を用いて解析を行いました。各実験とも、経時的に魚体を取り上げ、粘膜組織（表皮，鰓，腸管組織）を採取して  $Hb\beta$  のリアルタイム PCR (qRT-PCR) ならびに *in situ* hybridization (ISH) 解析を行いました。

昇温ストレス下では、全ての粘膜組織において  $Hb\beta$  は減少傾向を示し、昇温 24 時間後の鰓組織において有意な減少が確認されました（図 1）。ISH により同時間の鰓組織を観察したところ、昇温させた魚体の 2 次鰓弁の上皮細胞ではシグナルが消失していました（図 2）。

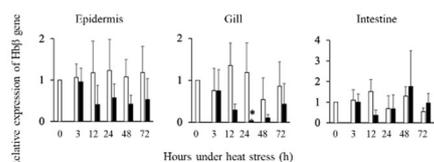


図 1 昇温実験の qRT-PCR 解析結果

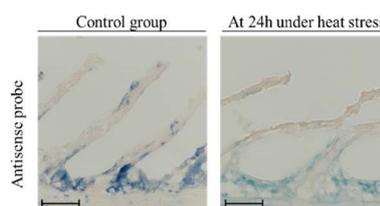


図 2 昇温下 24 時間の鰓組織における ISH 像（青い呈色反応： $Hb\beta$  陽性細胞）

次に、*E. piscicida* 菌液中に魚体を浸漬させることにより実施した細菌感染では、感染 3 時間後の表皮組織において  $Hb\beta$  の有意な発現上昇が確認され（図 3）、ISH を行ったところ、基底細胞において  $Hb\beta$  陽性シグナルの増加が確認されました（図 4）。

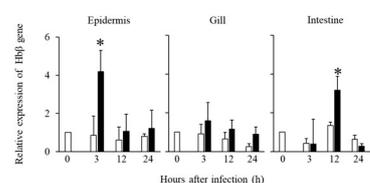


図 3 細菌感染の qRT-PCR 結果

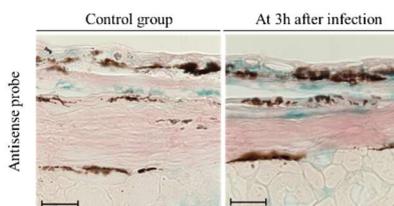


図 4 感染後 3 時間の表皮組織における ISH 像（青い呈色反応： $Hb\beta$  陽性細胞）

免疫賦活剤投与では、7 日間毎日連続で投与すると、高濃度 AsA では 500mg 以上で、LF はいずれの濃度でも  $Hb\beta$  の有意な上昇がみられました（図 5）。そこで、両免疫賦活剤ともに、高い  $Hb\beta$  発現を示したヒラメ（AsA 5,000 mg/kg 飼料、LF 1,000 mg/kg 飼料）から皮膚組織を採取して ISH を行った結果、対照魚と比較して表皮層の基底膜に局在する上皮細胞において強いシグナルが観察されました（図 6）。

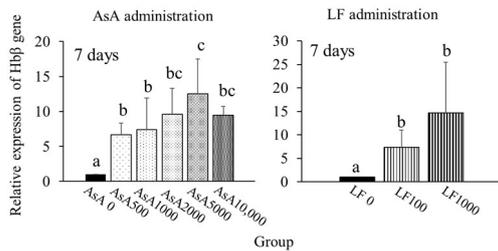


図 5 免疫賦活剤投与時の qRT-PCR 結果

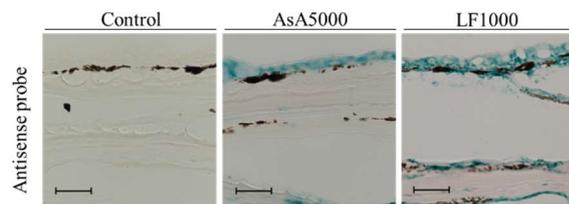


図 6 免疫賦活剤投与時の表皮組織における ISH 像（青い呈色反応：Hbβ 陽性細胞）

急激な水温変動は、ストレスとなり、魚体の免疫能低下をもたらすことが知られています。また魚類の皮膚粘液中に含まれる生体防御因子の多くは、細菌感染後、病原体の付着・侵入に対して一時的に分泌量や活性が上昇することが報告されています。Hbβ の発現も細菌感染を実施後、一時的に増加したことから、同因子がヒラメの皮膚組織における主要な生体防御因子として機能しているものと推察されました。また自然免疫を向上させる免疫賦活剤投与でも Hbβ の発現が上昇したことから、皮膚組織から分泌される Hbβ は魚体の抗病性を左右する主要な生体防御因子であると考えられ、粘膜組織における同因子の遺伝子発現や分泌量は魚の健康指標として利用できることが期待されます。

#### 発表論文の概要

##### 【研究論文名】

Alteration of hemoglobin β gene expression in mucosal tissues of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in response to heat stress, *Edwardsiella piscicida* infection, and immunostimulants administration

##### 【著者】

Misato Mori	(日本大学生物資源科学研究科 博士課程 3 年)
Yasuhiro Shibasaki	(日本大学生物資源科学部 助教)
Aki Namba	(日本大学生物資源科学部 研究員)
Takeshi Yabu	(日本大学生物資源科学部 研究員)
Noriko Wada	(日本大学生物資源科学部 研究員)
Hajime Shiba	(日本大学生物資源科学部 教授)
Hiroshi Anzai	(日本大学生物資源科学部 教授)
Nobuhiro Mano	(日本大学生物資源科学部 准教授)

【公開雑誌】

Fish & Shellfish Immunology Reports, Volume 3, 2023, 10049

<https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100049>

【公表日】

2022年1月12日

お問い合わせ先

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 水圏生物病理学研究室

間野 伸宏 (まの のぶひろ)

TEL・FAX: 0466-84-3357

E-mail: [mano.nobuhiro@nihon-u.ac.jp](mailto:mano.nobuhiro@nihon-u.ac.jp)

文責: 水圏生物病理学研究室 博士後期課程3年 森美里

准教授 間野伸宏