

魚類等の筋肉中の多様な蛍光物質の機能解析と 分子栄養学的意義の解明

伊藤 太二（管理栄養学科・教授）・近藤 奈々絵（管理栄養学科・准教授）
大村 正史（管理栄養学科・教授）・河内 公恵（管理栄養学科・教授）
廣田 耕志（東京都立大学・教授）

概要

蛍光物質は、それぞれに固有のある範囲の波長の光を照射すると励起され、蛍光を発する物質のことである。生体に含まれる蛍光物質には、例えば、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 等、多種多様なものが知られている。これらは、励起波長と蛍光波長が様々に異なっており、医療をはじめ生命科学分野で応用されている。蛍光物質の中にはタンパク質で構成されたものもあり、こうした蛍光タンパク質として最初に同定されたものとして、1960年代に下村脩によって発見され2008年ノーベル化学賞の対象となった緑色蛍光タンパク質 GFP がある。そしてこれまでは、脊椎動物に由来する蛍光タンパク質は知られていなかったが、最近、鹿児島大学の研究グループが、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) から緑色蛍光タンパク質を単離した⁽¹⁾。そして、理化学研究所の研究グループは、そのタンパク質 UnaG がビリルビン依存的に緑色蛍光を発することを見出し、UnaG がビリルビンの高感度計測に応用できることを示した⁽²⁾。

令和4年度学術研究所助成研究では、食材等から、種々の励起・蛍光特性をもつ蛍光タンパク質を単離・同定し、これらを活用して様々な生体物質の高感度センサーとして応用することをめざした。まず、魚類等の筋肉に焦点を当て、蛍光実体顕微鏡を用いてこれらに由来する食材の蛍光特性を解析したところ、蛍光強度の違いは見られたものの、解析したタイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、ウナギ、イカのいずれにおいても青色励起による筋肉中の緑色蛍光が観察された。さらに、斑点状の緑色蛍光も観察されたため、緑色励起による赤色蛍光も解析したところ、極めて蛍光強度の強い赤色蛍光が斑点状に観察された。この赤色蛍光はカレイやサバの筋肉中ではランダムに分布していたことからカレイやサバの筋肉中の特定の構造体に特異的な蛍光物質によるものではなく、寄生体による感染の結果の可能性が高いと考えられた。

そこで、本年度は、寄生体としてサケ、サバ、イカ等への感染が多く報告されているアニサキス等の可能性を考え、この赤色蛍光に焦点を当て、タラから単離したアニサキス生体を用いて、種々の励起波長での蛍光特性について蛍光実体顕微鏡を用いて解析した。そして、メジナの内臓から単離したシュードテラノーバと考えられる寄生体についても同様に蛍光特性を解析した。さらにこれらから非変性条件下で抽出液を調製して Native-PAGE を行い、蛍光活性を持つタンパク質のバンドの検出を試みたので報告する。

緒言

可視光は通常、その波長が380～780nm の範囲であり、380nm 付近の紫色から780nm 付

近の赤色までとなっている。蛍光とは、ある物体が、ある波長の光を吸収し、それとは異なる波長の光を放出する物理的な性質をさす。ある分子がある波長の光を吸収し、それとは異なる波長の光（すなわち蛍光）を発する場合、この分子のことを蛍光物質と呼ぶ。通常、蛍光物質が放出する波長は、吸収した光よりも低エネルギーであり、例えば、青色の光を吸収して緑色の光を発する、または緑色の光を吸収して赤色光を発する、ということである。ほとんどの蛍光物質は、通常、ある範囲の波長を吸収および放出する。

アニサキスとは、アニサキス亜科に属する線虫の総称であり、その第3期幼虫が魚介類に寄生してアニサキス症の原因となる。アニサキス症の症例由来の幼虫は、形態学上 *Anisakis* Type I、*Anisakis* Type II、*Pseudoterranova* spp. の3群に分類することができ、*Anisakis* Type I がそのほとんどを占めている。遺伝子解析によると、*Anisakis* Type I は *Anisakis simplex*、*Anisakis* Type II は *Anisakis physeteris*、そして *Pseudoterranova* spp. は *Pseudoterranova azarasi* である。

アニサキスの感染予防には、生食を避ける以外に、60℃で1分以上の加熱処理や-20℃で24時間以上の冷凍処理が有効である。内臓に寄生するアニサキスの幼虫は、寄生している魚介類が死亡し、時間が経過すると内臓から筋肉に移動することが知られており、加熱や冷凍以外の方法として、魚介類の内臓を摘出することも感染予防に有効である。

アニサキス症の多くは急性胃アニサキス症である。急性胃アニサキス症では、アニサキス感染魚介類の生食後、数時間から十数時間を経て、みぞおちの激しい痛み、悪心、嘔吐を生じる。急性胃アニサキス症の可能性がある場合は、胃内視鏡検査で穿入した虫体を探索してその形態と遺伝子検査から確定診断できる。その治療法では効果的な駆虫薬の開発が待たれており、胃内視鏡検査時に胃粘膜に穿入している虫体を生検鉗子で摘出する。

魚類に寄生するアニサキスを目視で検出する技術として、370nmをピーク波長とするUV-Aを用いた方法が報告されている⁽³⁾。この方法では370nmで励起することで宿主である魚類の組織は蛍光を発せずアニサキスのみが発する青色蛍光を検出する。この蛍光物質はアニサキスに存在するリポフスチンであろうと推察されている。

リポフスチンは酸化されたタンパク質(30-70%)と脂質(20-50%)からなると考えられており、ヒトのリポフスチンでは糖残基も検出されている。リポフスチン生成機序としては、BrunkとTermanによる「ミトコンドリアーリソソーム加齢軸理論」がある⁽⁴⁾。この理論によると、リポフスチンはリソソーム内に蓄積し、それは酸化蛋白質分解の減少と細胞内フリーラジカル形成の増加によると考えられている。Fe、Cu、Zn、Al、MnおよびCaを含む金属はリポフスチンの2%までを構成しており、特にFeは蛋白質凝集体の更なる酸化反応に重要だと考えられており、「ミトコンドリアーリソソーム加齢軸理論」で重要な役割を果たす⁽⁴⁾。リポフスチンは、加齢黄斑変性(AMD)の病因に寄与する因子としても注目されている。網膜色素上皮(RPE)のリポフスチンを構成する蛍光発色団は、共焦点走査レーザー検眼鏡(cSLO)で撮像できる自己蛍光源となることが知られている。リポフスチン由来の自己蛍光源は短波長の照射により励起される。この短波長励起による自己蛍光は網膜疾患の臨床で活用されている。臨床では、短波長励起による眼底の自己蛍光は、cSLOで使用される488nmから、改良眼底カメラおよび蛍光適応光学検眼鏡で使用される535-580nmまでの範囲の波長で励起される。そして、分光光度法によって測定した眼底自己蛍光は、490-510nmの間でピークを示す広い励起スペクトルを有する。さらに、幅

の広い蛍光波長を有しており、約600nmを中心とする。

本研究ではこうした背景をふまえて、まず、アニサキスの感染が多く報告されているサケ、サバ、イカについて、青色励起、緑色励起、近赤外励起による蛍光を蛍光実体顕微鏡で解析した。そして、サバ筋肉から単離したアニサキス生体とメジナ内臓から単離したシュードテラノーバ生体についても青色励起、緑色励起、近赤外励起による蛍光を蛍光実体顕微鏡で観察した。さらにアニサキス生体とシュードテラノーバ生体について、非変性条件下で抽出液を調製して、Native-PAGE によるタンパク質単離と緑色励起による赤色蛍光検出を試みたので報告する。

方法

1. 蛍光実体顕微鏡を用いた種々の魚介類の筋肉等および種々の寄生虫生体における蛍光特性の解析

オリンパス製実体顕微鏡 SZX 7 に落射蛍光ユニット SZX-RFL 2 を装着し、青色励起－緑色蛍光検出のために SZX-MGFPA ミラーユニット（励起 BP 460-490／ダイクロイック DM 505／蛍光 BA 510-550）を用いた。倍率は×0.8および×5.6で観察を行った。蛍光画像の取得には3眼鏡筒に取り付けた Photometrics 社製 Prime 4.2 M pixel sCMOS モノクロカメラを用いた。魚介類として、サケ、サバ、イカを用いて観察を行った。さらに、緑色励起－赤色蛍光検出では、SZX 2-MRFP ミラーユニット（励起 BP 545-580／ダイクロイック DM 600／蛍光 BA 610 IF）、近赤外励起－近赤外蛍光検出では、オリンパス製空ミラーユニット SZX-MF に励起 BP 750-800／ダイクロイック DM 810／蛍光 BP 818-873 の Chroma 社製フィルターセットを組み込んだものを使用した。これらの場合も、倍率、蛍光画像の取得等は青色励起－緑色蛍光検出の場合と同様に解析した。

2. 寄生虫生体からの蛍光物質の抽出と Native-PAGE による分画

アニサキス生体やシュードテラノーバ生体をそれぞれ冷やしたマイクロチューブにとった。これに冷却した 20 mM Na phosphate (pH7.4)－1 mM EDTA buffer をそれぞれ40uL 加え、滅菌したホモジナイザーペッスルを用いて30秒間すりつぶした。これを微量高速冷却遠心機を用いて4℃、13,000xg、2分間遠心した。上清を冷却した別のマイクロチューブに移しこれを抽出液とした。抽出液をそれぞれ10uL ずつ、マイクロチューブにとり、これらにアプロサイエンス製 Native-PAGE サンプルバッファーを10uL ずつ加え、よく混合し Native-PAGE のウェルに、20uL ずつ注入し20分間電気泳動した。電気泳動後、緑色 LED トランスイルミネーターを用いて、波長550nm の緑色光を照射し、赤色蛍光バンドの有無を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、法令等に基づく手続きが必要な研究（患者から提供を受けた試料の使用、個人情報に伴うアンケート調査・インタビュー調査、ヒトゲノム研究、動物実験）には該当しない。

結果

1. 蛍光実体顕微鏡を用いた種々の魚介類の筋肉等における蛍光特性の解析

サケ、サバ、イカについて、図1に倍率×0.8で明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光、緑色励起(図中にGreen ex.と表示)による赤色蛍光、近赤外励起(IR ex.と表示)による近赤外蛍光を観察した結果を、図2に倍率×5.6で明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光、緑色励起(図中にGreen ex.と表示)による赤色蛍光、近赤外励起(IR ex.と表示)による近赤外蛍光を観察した結果をそれぞれ示す。青色励起においては、サケ、サバ、イカについていずれも蛍光強度の違いはあるものの、筋肉全体にわたる緑色蛍光が観察された(図1および図2)。血管部分については蛍光は観察されなかった。そしてサケとサバとイカでは蛍光強度は弱いながらも、緑色蛍光が斑点状に観察された。従って最大励起波長が青色域でない別の蛍光物質も存在している可能性が考えられた。そこでさらに、緑色励起(図中にGreen ex.と表示)による赤色蛍光も観察した。その結果、青色励起で弱い斑点状の緑色蛍光を示した箇所は緑色励起によって極めて蛍光強度の強い赤色蛍光として観察された。従って、これらの斑点状に検出される蛍光物質は青色域よりも緑色域においてより効果的に励起されたと考えられた。さらに、こうした斑点状の蛍光はサケ、サバ及びイカではそれらの筋肉中にランダムに観察され、特定の組織には依存していないと考えられることから、寄生虫等、何らかの感染によるものである可能性が考えられた。

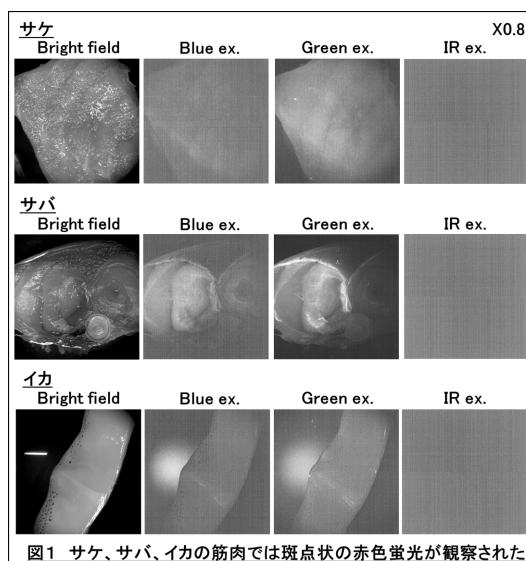


図1 サケ、サバ、イカの筋肉では斑点状の赤色蛍光が観察された

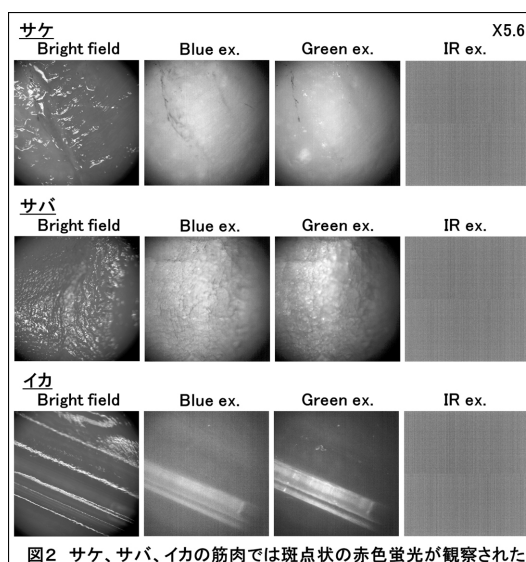


図2 サケ、サバ、イカの筋肉では斑点状の赤色蛍光が観察された

2. 蛍光実体顕微鏡を用いた種々の寄生虫生体における蛍光特性の解析

アニサキス生体について、図3上段に倍率×0.8で明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光、緑色励起(図中にGreen ex.と表示)による赤色蛍光、近赤外励起(IR ex.と表示)による近赤外蛍光を観察した結果を、図3下段に倍率×5.6で明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光、緑色励起(図中にGreen ex.と表示)による赤色蛍光、近赤外励起(IR ex.と表示)による近赤外蛍光を観察し

た結果をそれぞれ示す。

観察に用いたアニサキス個体は、生細胞と死細胞が共存する個体であった。アニサキスの生細胞では弱いながら緑色蛍光が検出され同じ部分についてやや強い赤色蛍光が検出された。近赤外蛍光は検出されなかった（図3上段および下段）。驚いたことに、死細胞では、生細胞に比べて強い緑色蛍光が観察され、特に、赤色蛍光が極めて強く検出された。この場合も近赤外蛍光は検出されなかった（図3上段および下段）。すなわち、アニサキスでは組織が死滅することで極めて強い赤色蛍光を発することが明らかになった。図1および図2でサケ、サバ、イカで観察された強い斑点状の赤色蛍光はアニサキスが穿入したのち、凍結によりアニサキスが死滅して死細胞が発する赤色蛍光を検出している可能性が高いと考えられた。

シュードテラノーバ生体について、図4上段に倍率×0.8で明視野観察した結果と青色励起（図中に Blue ex.と表示）による緑色蛍光、緑色励起（図中に Green ex.と表示）による赤色蛍光、近赤外励起（IR ex.と表示）による近赤外蛍光を観察した結果を、図4下段に倍率×5.6で明視野観察した結果と青色励起（図中に Blue ex.と表示）による緑色蛍光、緑色励起（図中に Green ex.と表示）による赤色蛍光、近赤外励起（IR ex.と表示）による近赤外蛍光を観察した結果をそれぞれ示す。観察に用いたシュードテラノーバ個体は生細胞と死細胞が共存せず、生細胞のみであった。シュードテラノーバではアニサキスと比べて生細胞で強い赤色蛍光を検出した。さらに驚いたことに、強い近赤外蛍光も検出した。この近赤外蛍光はシュードテラノーバの外皮で発していることも明らかになった（図4上段および下段）。

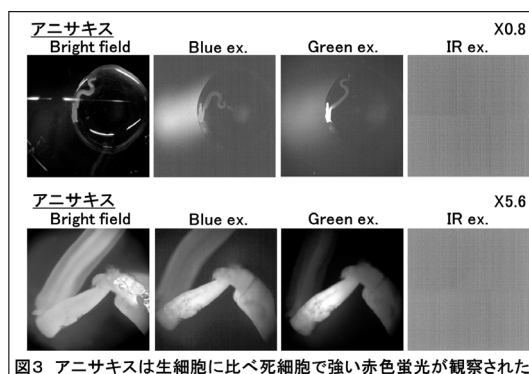


図3 アニサキスは生細胞に比べ死細胞で強い赤色蛍光が観察された

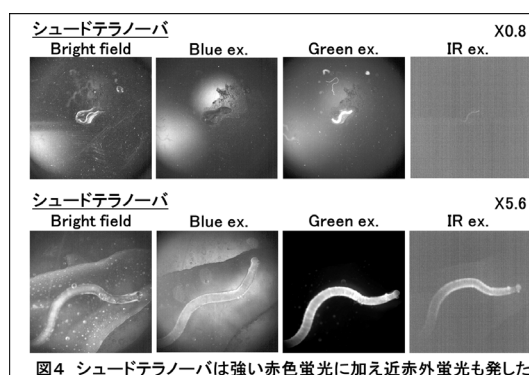


図4 シュードテラノーバは強い赤色蛍光に加え近赤外蛍光も発した

3. 寄生虫生体からの蛍光物質の抽出と Native-PAGE による解析

種々の寄生体から非変性条件下で抽出液を調製し Native-PAGE によってタンパク質を変性させずにポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。図5にアニサキス生体抽出液に対して Native-PAGE を行い、緑色励起による赤色蛍光を観察した結果と、シュードテラノーバ生体抽出液に対して Native-PAGE を行い、緑色励起による赤色蛍光を観察した結果をそれぞれ示す。図5中の矢印は電気泳動に用いたサンプルバッファ

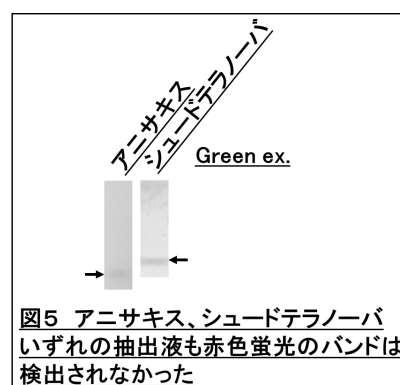


図5 アニサキス、シュードテラノーバいずれの抽出液も赤色蛍光のバンドは検出されなかった

中のプロモフェノールブルー（BPB）由来の赤色蛍光である。アニサキス生体抽出液、シュードテラノーバ生体抽出液ともに蛍光タンパク質のバンドは検出されなかった。この結果から、図3～図4で観察された蛍光物質がタンパク質でなく水溶液に可溶性物質である可能性と蛍光物質はタンパク質であるが未知のリガンドと結合して蛍光活性を獲得する可能性などが考えられた。

考察

本研究の結果から、魚介類等の筋肉で斑点状に検出される強い赤色蛍光はアニサキスが穿入し冷凍処理等で死滅した痕跡であると推測された。現在、魚介類等の筋肉で観察される赤色蛍光部分を切り取り、PCR法や質量分析法を用いてアニサキスに由来するものであるか検証する予定である。赤色蛍光によりアニサキスの存在を明らかにできれば、食中毒のリスクを軽減する新たな手法の開発も期待される。アニサキスは370nmをピーク波長とするUV-A励起によって青色蛍光を発する性質が報告されており⁽³⁾、そしてこの青色蛍光はリポフスチンによるものと考えられている。本研究では、観察されたアニサキス死細胞での強い赤色蛍光がリポフスチンによるものであるかをNative-PAGEで分析することを試みたがタンパク質によるバンドは検出できなかった。リポフスチンの分子構成については未知の部分も多い。従って今後は、ゲルろ過クロマトグラフィー等、電気泳動でない手法を用いて赤色蛍光活性を保ったまま精製度を高めることができないか検証するとともに、リポフスチン以外の蛍光物質である可能性も検証したい。本研究で明らかになったアニサキスとシュードテラノーバの赤色蛍光物質と近赤外蛍光物質を同定しその特性を活用すれば、アニサキスとシュードテラノーバを簡易的に判別することも可能になると期待される。

謝辞

本研究の実施にあたり、令和5年度 鎌倉女子大学学術研究所助成研究によって支援をいただきました。心より感謝いたします。鎌倉女子大学名誉教授 吉田啓子先生には、本研究にあたり、多大なるご助言を賜りました。心より感謝いたします。

参考資料・引用文献

- 1) Hayashi S et al. A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fish Sci.*, 75, 1461-1469 (2009)
- 2) Kumagai A et al. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell*, 153, 1602-1611 (2013)
- 3) 大日本水産会「アニサキスを中心とした食中毒対応。～正しい知識でリスクを低減し、魚食文化を守る～」平成30年度 第1回国産水産物流通促進事業セミナー講演録
- 4) Brunk U.T. and Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging : accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis, *European Journal of Biochemistry* 269, 1996-2002 (2002)