

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07555

研究課題名(和文) エビ類の疾病予防への新たなアプローチ 免疫系と内分泌系のクロストークの解明

研究課題名(英文) A cross talk between immuno-related genes and hormon-related genes

研究代表者

伊丹 利明 (Itami, Toshiaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エビ類において細胞等の活性化を制御するサイトカインとホルモンとのクロストークに着目し、エビ類特有の内分泌機構から見た新たな疾病予防対策を目指した。インスリン様成長因子群や窒息ストレス負荷時に発現するMjHIF-1、とその関連遺伝子が明らかとなった。その結果、MjHIF-1とMjVHLは腸管に高い発現を示した。MjHIF-1、はエビの腸管の上皮細胞に発現が見られた。アポトーシスに関わる細胞チェックポイント関連遺伝子については、H2O2添加海水にエビを暴露したところ、鰓細胞でこれらの関連遺伝子の発現が有意に上昇した。、基盤的知見は得られたので、現場への応用研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：In shrimp aquaculture, high-stocking farming with phytoplankton blooming decreases the dissolved oxygen concentrations in the pond water. Exposure of shrimp to hypoxia induces the molting and molted shrimp are susceptible to infection due to its physical and physiological weakness, e.g. soft shell and loss of energy. Hypoxia-inducible factor (HIF) is a transcriptional factor in the basic helix-loop-helix/PAS family and is activated in response to hypoxic stress. However, information of HIF and other related factors of the HIF pathway in crustaceans are not well known. In this study, we cloned MjHIF-1, an inhibitory factor, MjFIH-1, and MjVHL from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). MjVHL is the first crustacean VHL ortholog cloned in this study. MjHIF-1 and MjVHL were highly expressed in the intestine. MjHIF-1 expression in the hypoxic group increased significantly 24 h after the hypoxia exposure and expression of MjVHL decreased significantly 6 h after hypoxia stimulation.

研究分野：魚病学

キーワード：クルマエビ 生体防御因子 ホルモン WSSV ウイルス 細菌

1. 研究開始当初の背景

クルマエビをはじめとするエビ類の養殖産業は東南アジアをはじめ世界各地で盛んである。しかしながら、生産量増量のための高密度飼育がエビ類の免疫力低下を引き起こし、ウイルス病であるクルマエビ急性ウイルス血症 (PAV: penaeid acute viremia) や細菌性疾患であるピブリオ菌 (*Vibrio* sp.) や EMS/AHPND (Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) の被害が多発している。抗ウイルス作用を持つ抗体がエビ類は認められていない。また、細菌感染症に対しては「水産用医薬品」として認められたクルマエビ用の抗菌剤はない。したがって、クルマエビに対する有効な疾病防除対策はないのが現状である。そこで、科研等の支援を得て研究室で蓄積したエビ類の生体防御関連遺伝子の情報をもとに、新たに内分泌系の遺伝子とのクロストークを明らかにして、エビ類の免疫システムの全体像を把握し、トランスレショナル観点から現場で活用できる知見を集積する。

免疫機構はホメオスタシスという視点で考えると、免疫系は神経系や内分泌系とネットワークを形成してその機能を発揮している。免疫系で細胞間の情報伝達を担う一群の重要な生理活性物質であるサイトカインは、哺乳類においては免疫や炎症など、多機能な活性を持つことが報告されている。一方、ホルモンも生理活性物質であり、体内において特定の器官で合成・分泌され、特定の細胞でその効果を発揮し、多機能である。エビ類のサイトカインについては、近年、本研究室で多くのサイトカイン遺伝子を分離・同定している。そこで、本研究においてエビ類のサイトカインと脱皮に着目し、免疫機構と脱皮に関わる内分泌系のクロストークを明らかにして、エビ類の疾病予防に新たなトランスレショナルリサーチを構築する。

2. 研究の目的

本研究では、エビ類における免疫系や細胞の増殖・活性化などを調整するサイトカインとホルモンとのクロストークに着目し、疾病防除対策のため、脱皮などエビ類に特有の内分泌機構から見た新たなトランスレショナルリサーチを目指す。水産養殖の現場においてエビ類の疾病は大きな問題になっており、これまでもさまざまな対策が講じられてきた。しかし、根本的な解決には至っていない。この原因の一つとしてエビ類の免疫システムと、エビ類にとって「生死」が隣り合わせのイベントである脱皮における遺伝子・細胞レベルでの解明が進んでいないからである。そこで、今までに本研究室で蓄積したエビ類の生体防御関連遺伝子の情報を基盤にして、新たに脱皮関連因子との相互作用を明らかにすることにより、エビ類の疾病防除に関する新規のアプローチを行い、現場への応用を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 供試エビ：平均体重 5~25 g のクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) を用いた。エビはエアレーションをしながら室内水槽で飼育した。

(2) 乳酸の定量：供試エビを低溶存酸素飼育水 (DO: 1.5ppm) に 6、12 時間暴露し、血中の乳酸量を乳酸定量キット (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定し、正常溶存酸素飼育水 (5.5 ppm) 暴露エビ血液と比較した。

(3) RNA の抽出と cDNA の合成：RNAiso Plus kit を用いて抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて cDNA を構築した。

(4) 遺伝子の検出：得られた遺伝子情報から縮重プライマーを作製して、常法により TA クローニングを行い、配列の全長を決定した。

(5) 遺伝子の発現解析：クルマエビの elongation factor 1 (MjEF1) 遺伝子を内部コントロールとして、各種遺伝子の発現を測定した。

(6) 遺伝子のノックダウン：double-stranded RNAs (dsRNA) と small interfering RNAs (siRNA) をエビに筋肉内注射をして、ノックダウンを試みた。

(7) in situ hybridization：組織内の遺伝子の局在を検討するために、in situ hybridization を行った。

(8) 免疫染色：HIF-1 と HIF-1 に対するペプチド抗体を作製し、タンパクレベルでの局在について検討した。

(9) 窒息から脱皮に至る経路を明らかにする基礎的な知見を得るために、脱皮に不可欠なアポトーシスについて、細胞周期チェックポイント関連遺伝子を明らかにした。

(10) アポトーシスを誘導するために、過酸化水素水を混合した飼育水にエビを暴露して、継時的に取り上げて、上記関連遺伝子の発現を測定した。

4. 研究成果

クルマエビの窒息に関する遺伝子 *MjHIF-1*、*MjVHL* および *MjFIH-1* について全塩基配列を明らかにした。その結果、*MjHIF-1* は ORF は 1040 アミノ酸で構成されており、推定分子量は 112.5kDa であった。本遺伝子は、HLH、PAS、および PAC の 3 つのドメイン構造から構成されており、各ドメインをヒトのそれと比較すると、67.8、76.1~82.1、84.1% と比較的高い相同性を示した。*MjVHL* 遺伝子の ORF は 169 アミノ酸で構成されており、推定分子量は 19.5kDa であった。この遺伝子は特徴的な VHL ドメインを有しており、甲殻類で初めて発見された。昆虫のクラスターに属していることが明らかとなった。*MjFIH-1* は 345 アミノ酸で構成されており、推定分子量は 40.2kDa であった。本遺伝子に特徴的な JmjC ドメインを有していた。

これらの3種類の遺伝子の各像での発現を検討した結果、*MjHIF-1* は腸管で最も発現が高く、鰓、心臓および血液の順に高かった。*MjVHL* も腸管での発現が高くリンパ様器官、鰓および心臓の順で高かった。*MjFIH-1* はリンパ様器官が一番高く、腸管、血液および心臓の順で高かった。これらの結果から腸管には窒息に関連する遺伝子が強く発現していることが明らかとなった。このことは、環境水中の溶存酸素が腸管に及ぼす影響が大きいことを示しているのではないかと考えられる。

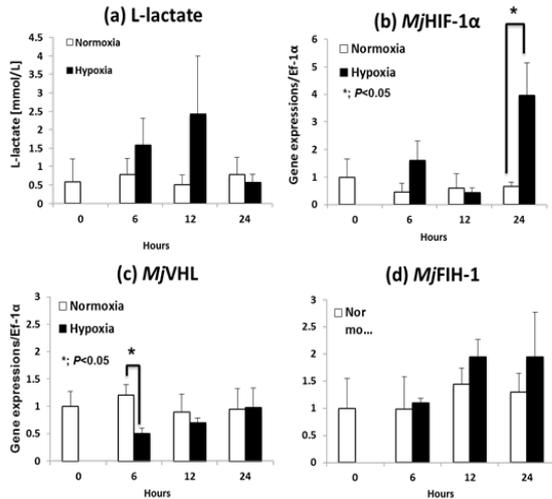


図1. 窒息時における乳酸(a)の血中濃度と*MjHIF-1α* (b)、*MjVHL* (c) および*MjFIH-1* (d) の遺伝子発現の推移

窒息時における生理変化と遺伝子発現を検討するために、血液中の乳酸濃度並びに各種遺伝子の変化を測定した。血中の乳酸濃度は低溶存酸素飼育水にクルマエビを暴露して6時

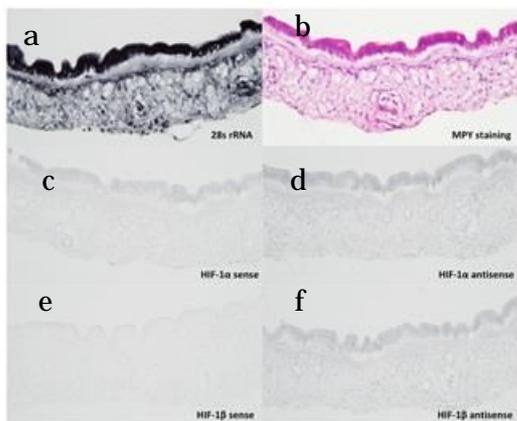


図2. 窒息時における腸管の *MjHIF-1* と *MjFIH-1* の遺伝子の局在。a: 28s rRNA 染色、b:MPY 染色、c: *MjHIF-1* センスプローブ、d: 同アンチセンスプローブ、e: *MjFIH-1* センスプローブ、f: 同アンチセンスプローブ

間並びに12時間後に2~5倍に上昇した(図1-a)。遺伝子の発現は暴露後24時間で、

MjHIF-1 (図1-b)は有意に増加した。また、*MjFIH-1*(図1-e)は有意な差は見られなかったが、上昇する傾向を示した。これに対して、*MjVHL*(図1-d)は暴露後6時間で有意に低下し、24時間でほぼ正常なレベルに回復した。窒息によって *MjHIF-1* の発現が上昇したのと同時に、その下流にある VEGF(血管内皮細胞増殖因子)の発現も上昇した。

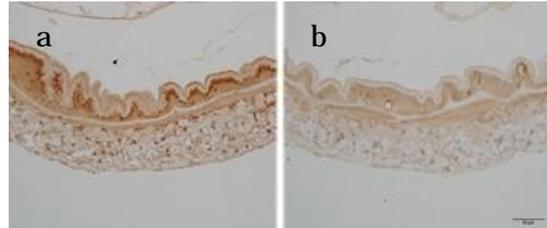


図3. 窒息時における腸管の抗 *MjHIF-1* ペプチド抗体による検出。a: 抗 *MjHIF-1* ペプチド抗体、b: ウサギ正常血清

in situ hybridization を用いて、窒息時と正常時の腸管における *MjHIF-1* と *MjFIH-1* 遺伝子の発現と局在性を検討した。28S rRNA と RNA 染色であるメチルグリーン・ピロニン (MPY) 染色を施したところ、いずれも濃染されたことから RNA は適正に残存していることが示された。また、対照区としてのセンスプローブの染色性とアンチプローブの染色性に差が見られたことから適正にプローブが機能していると考えられた。しかし、低 DO と正常 DO に暴露したクルマエビの腸管を比較したところ、差異が見られなかった。また、抗 *MjHIF-1* のペプチド抗体を作製して比較検討した結果も同様に、窒息区と正常区では差は見られなかった。このことから、*MjHIF-1* と *MjFIH-1* 遺伝子並びにタンパクレベルでの解析には再度試料を調整して検討する必要がある。

次に、疑似的な窒息状況を作るために、*MjVHL* と *MjFIH-1* のノックダウンを行った。まず、従来成功している dsRNA によるノックダウンを *MjVHL* について行ったところ、注射後24時間で *MjVHL* の発現は約30倍に増加した。

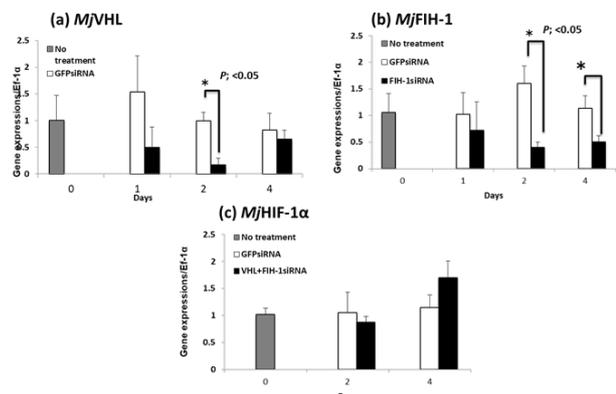


図4. *MjVHL* と *MjFIH-1* に対する siRNA による腸管におけるノックダウン効果。 *MjVHL* (a)、*MjFIH-1* (b) および *MjHIF-1α* (c) の遺伝子発現の推移。対照区として GFP の siRNA を用いた。

このことから、dsRNA によるノックダウンはできないと考えた。そこで、siRNA によるノックダウンを試みた。その結果、図 4 に示すように、*MjFIH-1* と *MjVHL* の siRNA を作成して、エビに注射した。対照区には GFP の siRNA を作製して、エビに注射した。その結果、注射 2 日後に *MjFIH-1* の発現が約 80% 低下し、4 日目には少し上昇して、約 30% の低下となった。同時に注射した *MjVHL* の siRNA の効果は有意な差はなく、2 日目に若干発現が低下したものの、4 日目には対照区と差が無くなった。*MjHIF-1* の発現を測定したところ、若干の発現の上昇が見られた。これらのことから、クルマエビの *MjFIH-1* と *MjVHL* のノックダウンを行うときは、dsRNA ではなく siRNA を用いるべきであると結論された。また、*MjFIH-1* をノックダウンしたところ、VEGF (血管内皮細胞増殖因子) の発現も低下したことから、*MjFIH-1* のノックダウンによって、その下流にある VEGF にも発現が低下した影響を及ぼしたものと考えられる。

さらに、低酸素暴露から脱皮に至る経路を明らかにするために、強制的にアポトーシスを誘導する 2mM に過酸化水素を含有する海水にクルマエビを暴露した。その結果、暴露開始後 6~24 時間に鰓の細胞に DNA ラダーがみられ、アポトーシスを確認した。同時に *MjChk1*, *Mjp53* および *MjPP2A* 遺伝子の発現が有意に高くなった。このことから細胞周期に関連する ATR-Chk1 経路が働いて、遺伝子レベルでも細胞内でのアポトーシス誘導が明らかとなった。

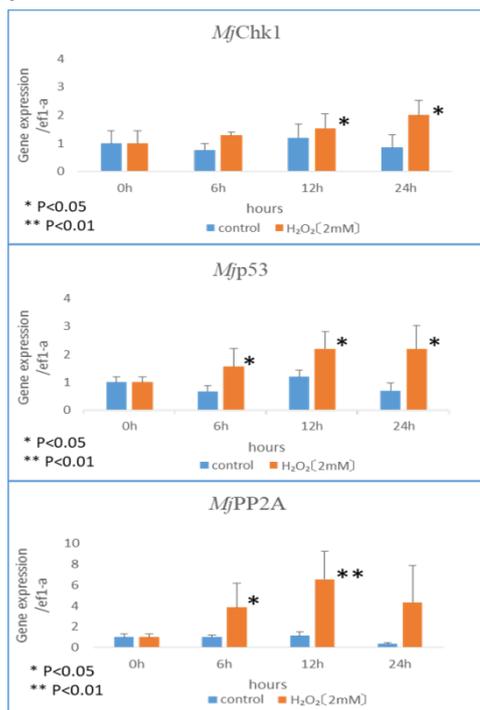


図 5. クルマエビに人為的にアポトーシスを誘導した場合の細胞周期チェックポイント関連遺伝子の動態

以上の結果から、飼育水の溶存酸素低下によって HIF-1 とその関連遺伝子が発現して、VEGF のようなサイトカイン遺伝子が発現して、細胞周期チェックポイント関連遺伝子に作用して、アポトーシスを起こし、脱皮に結びつくものと考えられた。脱皮に係るエネルギー消費と脱皮直後の物理的および生理的な生体防御能力の低下により細菌感染等に感染しやすくなるものと考えられる。したがって、今回の研究により今まで着目されなかった腸内の遺伝子 *MjHIF-1*、*MjVHL* や *MjFIH-1* の動態を観察することにより、窒息やこれによって誘導される脱皮さらにはサイトカイン遺伝子の誘導を推測することができる。これにより、エビ類における新たな感染防止対策が樹立することが可能となった。

今後、脱皮直後の生体防御関連遺伝子の変化とエネルギー消費に関するデータを取るとともに、養殖現場でのエビの遺伝子発現の変化を追跡することによって、溶存酸素低下による感染と発病に至る経路を明らかにして、感染防止のための対策を確立したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)【すべて査読有】

Okamura Y., Mekata T., Elshopakey G., Itami T. Molecular characterization and gene expression analysis of hypoxia-inducible factor and its inhibitory factors in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, Fish and Shellfish Immunology, 79, 168-174, 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.05.015

Okamura Y., Inada M., Elshopakey GE, Itami T., Characterization of xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase of *Marsupenaeus japonicus* and their response to microbial pathogen. Molecular Biology Reports, in press, 2018. DOI: 10.1007/s11033-018-4177-9.

Elshopakey G., Risha E., Abdalla O., Okamura Y., Hanh V., Ibuki M., Sudhakaran R., Itami T., Enhancement of immune response and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) by dietary supplementation of -1,4-mannobiose. Fish and Shellfish Immunology, 74, 26-34, 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.12.036

Karthikeyan K., Sharma A., Mekata T., Itami T., Sudhakaran R., Rapid and sensitive real-time loop mediated isothermal amplification for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* of shrimp, Aquaculture, 481, 119-123, 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.036

Kesavan K., Mani R., Itami T., Sudhakaran R. Quick report on prevalence of shrimp microsporidian parasite

Enterocytozoon hepatopenaei in India. Aquaculture Research, 48, 3980-3984, 2017. DOI: 10.1111/are.13078

Inada M., Mekata T., Itami T., White spot disease: WSD (= penaeid acute viremia: PAV), Fish Pathology, 52, 115-119, 2017. DOI: 10.3147/jfsfp.52.115

Sundaram D., Kesavan K., Kumaravel H., Mohammed R., Tohru M., Itami, T., Raja S. Protective efficacy of active compounds from *Phyllanthus amarus* against white spot syndrome virus in freshwater crab (*Paratelphusa hydrodomous*), Aquaculture Research, 47, 2061-2067, 2016. DOI: 10.1111/are.12660

Sudharsana, S., Rajashekar Reddy, C.B., Dinesh, S., Itami, T., Sudhakaran, R., Molecular docking and simulation studies of 3-(1-chloropiperidin-4-yl)-6-fluoro benzisoxazole 2 against VP26 and VP28 proteins of white spot syndrome virus. Journal of Fish Diseases, 39, 1231-1238, 2016. DOI: 10.1111/jfd.12454

Roohi Fatima, M., Dinesh, S., Mekata, T., Itami, T., Sudhakaran, Therapeutic efficiency of *Portieria hornemannii* (Rhodophyta) against *Vibrio parahaemolyticus* in experimentally infected *Oreochromis mossambicus*. Aquaculture, 450, 369-374, 2016. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.010

Rajashekar Reddy, C.B., Dinesh, S., Anusha, N., Itami, T., Rajasekhara Reddy, S., Sudhakaran, R. Antiviral activity of 3-(1-chloropiperidin-4-yl)-6-fluoro benzisoxazole 2 against white spot syndrome virus in freshwater crab, *Paratelphusa hydrodomous*. Aquaculture Research, 47, 2677-2681, 2015. DOI: 10.1111/are.12704

Kono, T., Biswas, G., Fall, J., Mekata, T., Hikima, J., Itami, T., Sakai, M. Adjuvant effects of poly I:C and imiquimod on the immunization of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) with a recombinant protein, VP28 against white spot virus. Aquaculture, 446, 236-241, 2015. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.033

[学会発表](計20件)

岡村洋, 米加田徹, 稲田真里, Narantsog Chojjookhuu, 菱川善隆, 引間順一, 酒井正博, 伊丹利明, クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の HIF 経路関連遺伝子群の同定および低酸素暴露による同経路活性化機構の解明, 第20回 マリンバイオテクノロジー学会 宮崎大会, 宮崎, 2018年5月26日~27日

岡村洋, 米加田徹, 稲田真里, Narantsog Chojjookhuu, 菱川善隆, 伊丹利明, クルマ

エビ (*Marsupenaeus japonicus*) の HIF (hypoxia-inducible factor) 経路関連遺伝子群の同定および腸管における局在の証明, 平成30年度 日本魚病学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 東京, 2018年3月3日~4日

土屋晃史, 岡村洋, 高橋良枝, 伊丹利明, クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) における細胞周期チェックポイント関連遺伝子群の同定と発現動態, 平成30年度 日本魚病学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 東京, 2018年3月3日~4日

Yo Okamura, Mari Inada, Toshiaki Itami, ROS generating genes of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Xanthine dehydrogenase and Aldehydeoxidase, and their gene expression analyses, Aquaculture America 2018 (453), Las Vegas, Nevada, USA, February 19 - 22, 2018.

岡村洋, 米加田徹, 稲田真里, 伊丹利明, クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の低酸素ストレスまたは VHL (Von Hippel-Lindau) ノックダウン時における HIF 関連遺伝子の発現動態, 平成29年度 日本魚病学会秋季大会 (207), ホテルメリージュ, 宮崎, 2017年9月12日~13日.

岡村洋, 稲田真里, 伊丹利明, クルマエビにおけるキサンチンデヒドロゲナーゼとアルデヒドオキシターゼ遺伝子の同定及び微生物感染時における遺伝子の発現動態, 平成29年度 日本魚病学会秋季大会 (311), ホテルメリージュ, 宮崎, 2017年9月12日~13日.

末吉拓夢, 岡村洋, 沖原清司, 原田清佑, 伊丹利明, 野菜発酵物 (FVP) の経口投与によるクルマエビ微生物感染に対する予防効果, 平成29年度 日本魚病学会秋季大会 (316), ホテルメリージュ, 宮崎, 2017年9月12日~13日.

稲田真里, 酒井正博, 伊丹利明 クルマエビの IL-17 および IL-17 受容体の免疫応答と組織局在性に関する研究 (2017/08/25), 日本比較免疫学会第29回学術集会, 北海道大学 2017年8月25日~26日.

稲田真里, 酒井正博, 伊丹利明 クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の IL-17 および IL-17 受容体の組織局在性に関する研究 (2017/09/12), 平成29年度日本魚病学会秋季大会, ホテルメリージュ (宮崎市). 2017年9月12-13日.

Gehad E. Elshopekey, Engy F. Risha, Osama A. Abdalla, Yo Okamura, Vu Duc Hanh, Masahisa Ibuki and Toshiaki Itami, Enhancement of Immune Responses and Resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) by Dietary Supplementation of -1, 4-Mannobiose, The 13th International Conference "ASIAN Community Knowledge Networks for the Economy, Society, Culture,

and Environmental Stability”, Miyazaki, Japan, July 10-11, 2017.

稲田真理、松山友正、米加田徹、伊丹利明、クルマエビのIL-6ホモログの免疫応答と組織局在性に関する研究、平成29年日本水産学会春季大会、東京海洋大学(東京) 2017年3月26日~3月30日

稲田真理、米加田徹、伊丹利明、クルマエビのIL-6前駆体に関する研究、平成29年日本水産学会春季大会、東京海洋大学(東京) 2017年3月26日~3月30日

岡村 洋、米加田徹、稲田真理、伊丹利明、クルマエビ(*Marsupenaeus japonicus*)のHIF(低酸素誘導因子)遺伝子とその関連遺伝子、平成29年日本魚病学会春季大会、日本大学(藤沢市) 2017年3月11日~3月1日2

Y. Okamura, V. D. Hang, T. Itami, Gene expression of Kuruma shrimp during hypoxia The 10th IMT-GT UNINET conference 2016, IMT-GT UNINET, Prince of Songkla University, Thailand, Dec. 1-2, 2016.

伊丹利明、「クルマエビの疾病とその防除」、第一回水産増殖懇話会、東京海洋大学(東京) 2016年3月26日~3月27日

M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, Macrophage migration inhibitory factor family, cytokine homologue genes, in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, Aquaculture 2016, World Aquaculture Society, Las Vegas, USA, Feb. 22-26, 2016.

T. Kono, R. Sudhakaran, J. Hikima, M. Sakai, Vu Duc Hanh, T. Itami, Efficacy of Vaccination against White Spot Syndrome Virus in Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*): real or false? The Second Symposium between Myanmar and Japan, Patheingyi University, Patheingyi, Myanmar, Dec. 5-6, 2015.

M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, MIF family, Cytokine Homologue Genes, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*, The 13th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, International Society of Developmental and Comparative Immunology, Murcia, Spain, June 29-July 3, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称：クルマエビ科生物の急性ウイルス血症に対するワクチン

発明者：酒井正博、伊丹利明、河野智哉

権利者：宮崎大学

種類：

番号：5649188号

取得年月日：2014年11月21日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~fishery/staff/staff07/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊丹 利明 (ITAMI, Toshiaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

(2) 研究分担者

酒井 正博 (SAKAI, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20178536