

令和 3 年 2 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07860

研究課題名(和文) クルマエビの免疫様現象における生体応答因子の機能解明と定量測定系の最適化

研究課題名(英文) Functional elucidation and optimization of quantitative detection of biological response factors for quasi-immune response in *Marsupenaeus japonicus*

研究代表者

佐藤 純 (Sato, Jun)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長

研究者番号：10443350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血リンパ液の因子定量では、rVP28(100 ng/well)固相後、ブロッキング、1/200希釈血リンパ液、抗rFC家兔血清、二次抗体、発色の手順で検出できた。ネイティブに発現した組換え応答因子FC2およびFC4には、それぞれ、クルマエビ病原ウイルスの中和およびオプソニン効果に類似した機能が存在することが示唆された。FC2,4の発現抑制を人為的に行ったところ、FC2の抑制では死亡率が増加し、FC4の抑制では低下した。抑制群に組換えFC2および4を投与するとそれぞれの機能が回復する現象が確認され、免疫様現象を担う生体応答因子であることを裏付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、クルマエビの免疫様現象について数多くの例が報告され、本現象が認知されつつあが、病原ウイルスの組換えタンパク質の投与時の免疫応答因子や機序の解明については、タンパク質・細胞レベルで解明された例はなかった。研究の結果、ワクチン技術の確立に向けて必要とされるin vitro評価系が大きく進展した。さらに、因子の機能解明により、応答因子が免疫様現象の主要分子を担っていることが裏付けられ、中和活性やオプソニン機能との関連についての言及に繋げることができた。これらの成果により、クルマエビ類のワクチン開発が進展し、WSSVによる被害の大幅な軽減が期待される。

研究成果の概要(英文)：The factor of hemolymph was determined by ELISA solid phase rVP28 (100 ng / well), blocking, 1/200 diluted hemolymph, anti-rFC rabbit serum, secondary antibody, and AP coloring. It was suggested that the natively expressed recombinant response factors FC2 and FC4 have functions similar to the neutralization and opsonin effect of virus respectively. When recombinant FC2 and 4 were administered to the suppression group, the phenomenon of functional recovery was confirmed, and it was confirmed to be a biological response factor responsible for the quasi-immune response.

研究分野：水産増殖学

キーワード：ウイルス 生体防御 魚病 クルマエビ 免疫 感染症 養殖 水産

1. 研究開始当初の背景

クルマエビ類のホワイトスポット病: white spot disease (WSD) は、同ウイルス:white spot syndrome virus (WSSV) による感染症で、1990 年代初めに発生が認められた。WSD は、世界的規模で今なお甚大な被害を起こしており、WSD 対策の確立が急務である。一方、獲得免疫に類似した免疫様現象(quasi-immune response)の発見後、報告者らは、本免疫様現象を応用し、WSSV 表面構造タンパク質等をクルマエビに経口投与することで、WSSV に対する抵抗性を誘導することを見いだした。そして、抵抗性をもたらすと考えられる因子の特定をワクチン接種により血中に増加するタンパク質を見出し、本タンパク質の N 末端 10 残基のアミノ酸配列を決定した。さらに、抗原接種クルマエビの網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析を実施し、前述の免疫様応答因子の N 末端アミノ酸残基をコードする遺伝子の部分配列が認められ、これらの結果から、本因子は、レクチンファミリーに属する遺伝子の一つであると予測された (発表予定)。その後、組換え因子の回収・精製に成功した。

2. 研究の目的

クルマエビへのワクチン投与によって、エビ体内に誘導されるユニークな獲得免疫様現象を司る生体応答因子とその分子機構は未解明であったが、報告者らは、クルマエビ血リンパ液中に WSSV の組換え構造タンパク質を投与した際に発現するタンパク質群を二次元電気泳動により 5 つのスポットにより認めた。これらのアミノ酸解析により、2 スポットの N 末端アミノ酸配列を取得し、RNA-seq から当該アミノ酸配列をコードする遺伝子配列がそれぞれ取得され、さらに 2 種類の遺伝子も発見された。この結果から、免疫様現象を司っていると考えられる合計 4 つの遺伝子は相同性解析ならびにドメイン構造予測から、フィコリンファミリーに属するレクチンであると推定された (FC1 から FC4)。そこで、本研究では、1) ワクチン応答因子検出系の最適化、2) リフォールディング後の組換え応答因子の in vivo、in vitro における病原ウイルスに対する機序の解明、3) 因子の発現を担っている遺伝子の転写量を抑制後 (以下ノックダウン)、病原ウイルスへの抵抗性の関係を把握することとし、これらにより、特定された免疫様現象関連因子がウイルス感染に抵抗性をもたらすことを裏付けることを目的とした。

3. 研究の方法

1) ワクチン応答因子検出系の最適化: 免疫様現象が誘導されているクルマエビ生体由来の血リンパ液中の応答因子の検出を間接 ELISA 法にて実施することを目的にまず、大腸菌発現によって得られた組換え FC1、2、3、4 に対する家兎抗血清を作製し、一次抗体を作製した。間接 ELISA 法として、一相目に WSSV の構造タンパク質である組換え VP28 を固相して、ブロッキング、血リンパ液、一次抗体、二次抗体、発色の行程で検出する方法について検討を行った。また、2010 年に実施した免疫様現象の誘導試験で得られたクルマエビの血リンパ液を用いて、当該因子の ELISA 法での検出条件の検討を行った。ELISA の固相条件は、vp28 固相 (100 ng/well)、ブロッキング、血リンパ液 (DPBST)、抗 rFC poly 血清、二次抗体、発色とした。

2) リフォールディング後の組換え応答因子の in vivo、in vitro における病原ウイルスに対する機序の解明: クルマエビ由来の生体応答因子は、ネイティブで発現させるため、CHO (Chinese hamster ovary) 発現系を利用し、2 種類のクルマエビ生体応答因子を μg 単位で取得することに成功した。取得できた生体応答因子は FC2 と 4 であり、リフォールディング操作なしで以降の実験に供することが可能となった。得られた FC2、4 は試験管内で WSSV と 25°C で 3 時間穏やかに振盪させ、WSSV 感染歴のないクルマエビ生体に筋肉注射して、死亡率、感染率および生残個体の WSSV 遺伝子量の比較を行った。

3) 因子の発現を担っている遺伝子の転写量を抑制後 (以下ノックダウン) の病原ウイルスへの抵抗性の把握: FC1-4 の発現抑制を RNA 干渉により人為的に行うため、それぞれの発現遺伝子に対する dsRNA を市販キット (プロメガ、T7 RiboMAX[™] Express RNAi System) を用いて作製した。それぞれについて、クルマエビ生体を用いて、ノックダウン条件の検討を行った。遺伝子の検出は、濃度既知のターゲットテンプレートを用いる TaqMan probe 法による定量 PCR により絶対定量を行った。決定されたノックダウン条件下、クルマエビ生体に FC1-4 の dsRNA を筋肉注射し、48 時間後に組換え FC2 をノックダウン FC1、2 群に FC4 をノックダウン FC3、4 群に注射投与した。さらに 72 時間後 WSSV による浸漬攻撃を行い、死亡率、感染率および WSSV 遺伝子量の比較を行った。

4. 研究成果

1) 作製した大腸菌組換え FC に対する家兎血清の反応性を rFC を用いて確認したところ、FC1-4 全てに特異的に反応することが確認された (図 1-1)。次に、WSSV 由来の組換えタンパク質に組換え FC2 が反応するか否かを確認するため、一相目に rVP28、WSSV、BSA (bovine serum albumin)、*E. coli*、CB (炭酸バッファー) を固相 (100 ng/well)、ブロッキング、FC2 (100 ng/well DPBST (+))、抗 rFC poly 血清、二次抗体、発色の手順で検出を試みたところ、rVP28、WSSV、*E. coli* に反応することが確認された (図 1-2)。さらに、免疫様現象が誘導されたクルマエビ血リンパ液 (2010 年採取凍結保存) について、生体応答因子

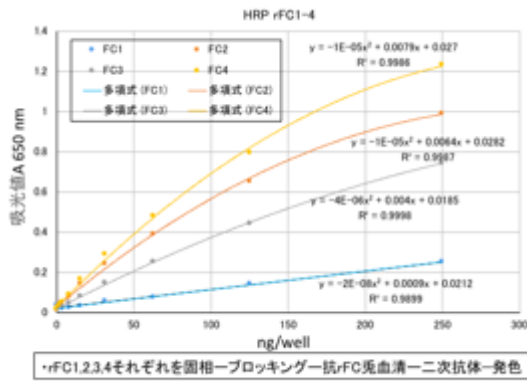


図1-1. クルマエビ生体応答因子のELISAによる検出の検討

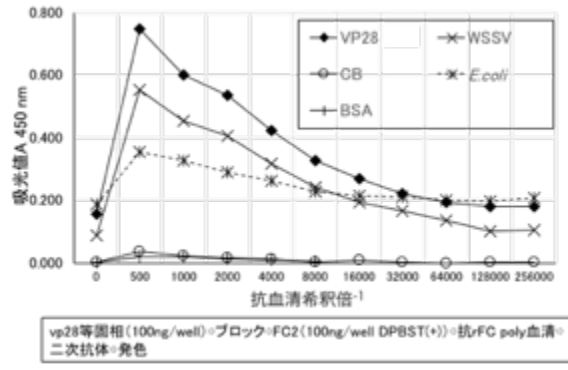


図1-2. クルマエビ生体応答因子のELISAによる検出の検討

(FC) の検出を試みたところ、血リンパ液を終濃度で 250 から 1,000 倍希釈することで、群間比較ができる検出法になり得ることが確認された (図1-3)。

2) CHO 発現による FC2 および 4 の取得により、大腸菌発現後のリフォールディング操作を行わず、よりネイティブに近い状態で組換え生体応答因子を確保した。試験管内で、組換え応答因子 FC2、FC4 および対照としてエビ生理食塩水 (以下 SBS) と WSSV を Ca²⁺ を含有する SBS 中で、25°C 3 時間穏やかに振盪し、その後、WSSV 感染歴のないクルマエビに筋肉注射した。その結果、FC2 反応群の累積死亡率が FC4 反応群に比較して有意に低下した。また、感染率は PBS、FC4 反応群が 100% に達したのに対し、60% に留まった (図2-1.)。今回同定されている、クルマエビ由来の生体応答因子 FC1, 2, 3, 4 は、立体構造予測から FC1, 2 と FC3, 4 に相同性が有り、機能的にも同等であることが予測されたことから、この 2 に種類のタンパク質に着目して機能の把握を試みた。以上の結果により、この 2 種の生体応答因子には異なる機能が存在する可能性が示唆された。

表1-1. 組換えタンパク質等の2回投与後のWSSVによる攻撃試験の結果 (2010年)

試験区	n=(尾)	累積死亡率 (%)	P値	生残個体の nested PCR結果	RPS (%)
rVP26 × 2	15	26.7	<0.0009	9/11	69.2
rVP26-rVP28	15	6.7	<0.0001	6/14	92.3
rVP28 × 2	15	26.7	<0.0009	6/11	69.2
rVP28-rVP26	15	26.7	<0.0009	1/11	69.2
E. coli × 2	15	40.0	<0.0060	2/9	53.8
PBS-rVP26	15	20.0	<0.0003	4/12	76.9
PBS-rVP28	15	0	<0.0001	2/14	100
PBS × 2	15	86.7		2/2	
RGNNV × 2	15	46.7	<0.2690	7/8	30.0
L-15-2 × 2	15	66.7		3/5	

各試験区とも10~15mL程度の5倍希釈の血リンパ液を回収できた。

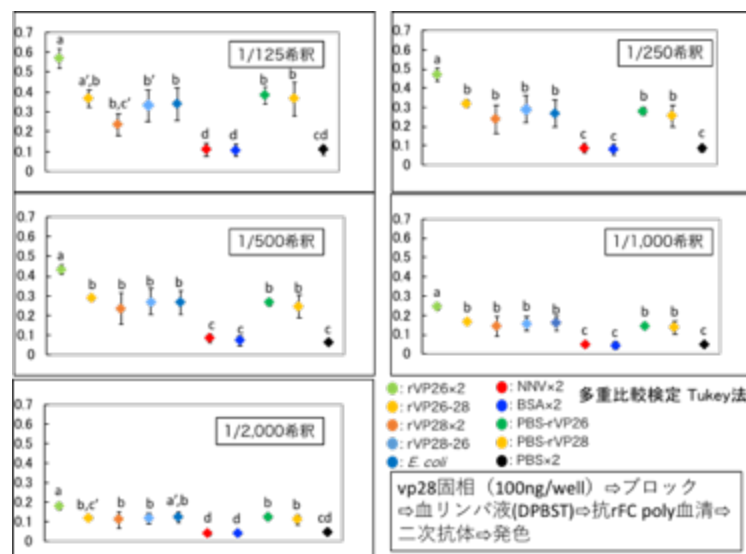
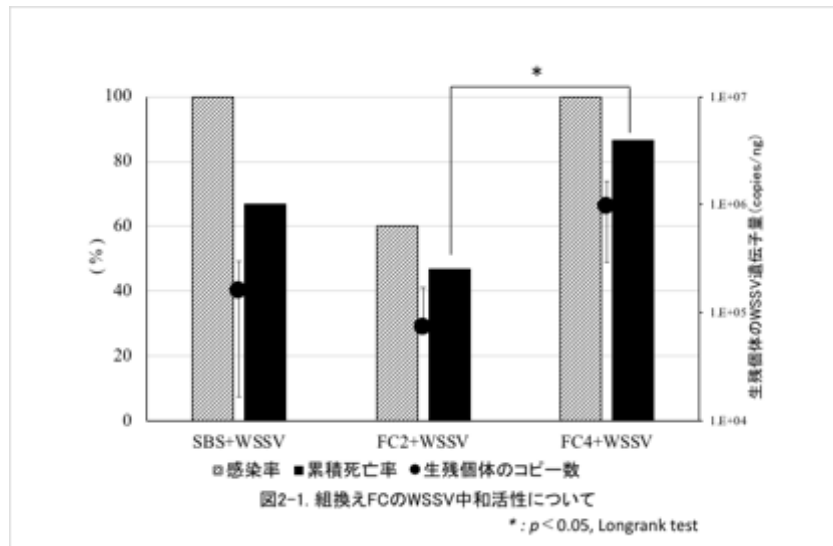


図1-3. クルマエビ生体応答因子のELISAによる検出の検討



3) クルマエビ由来の生体応答因子 4 種の遺伝子発現解析により、rVP28 投与時に心臓において生体応答遺伝子の発現量が増加することが分かっていた。ここでは、当該遺伝子のノックダウン条件を把握するため各応答因子に対する dsRNA 投与時の経過時間ごとの心臓における応答因子遺伝子の発現量の把握を行った。その結果、FC1 のノックダウンでは、5 および 25 μ g/shrimp 投与群いずれにおいても、投与

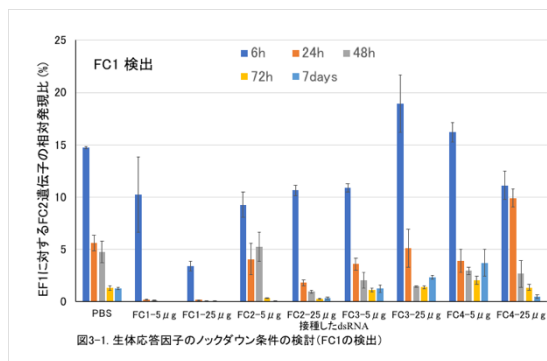


図3-1. 生体応答因子のノックダウン条件の検討 (FC1の検出)

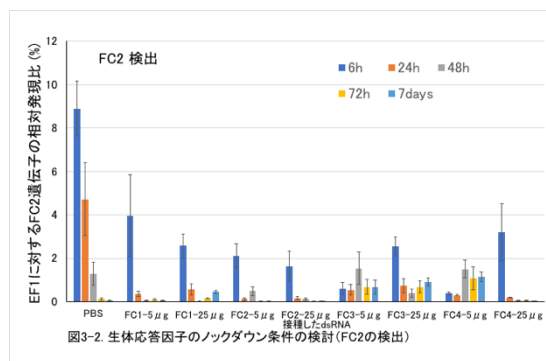


図3-2. 生体応答因子のノックダウン条件の検討 (FC2の検出)

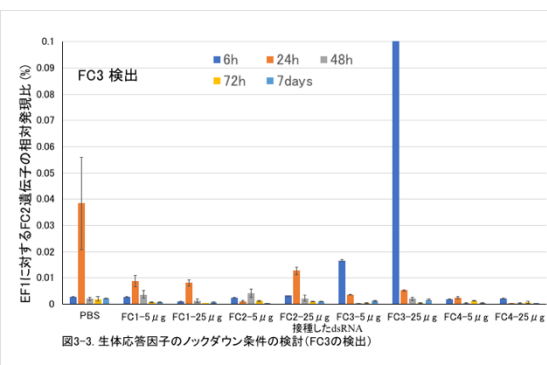


図3-3. 生体応答因子のノックダウン条件の検討 (FC3の検出)

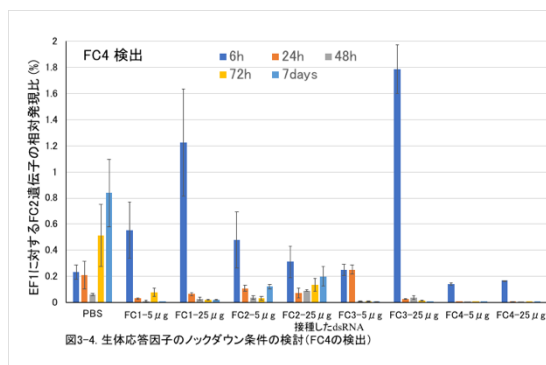
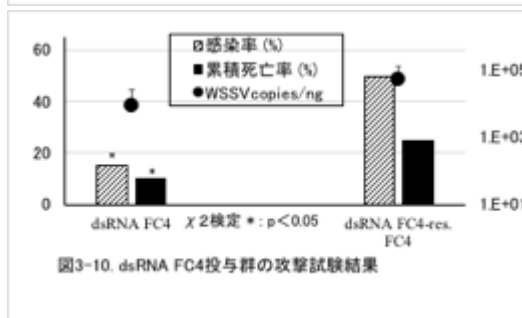
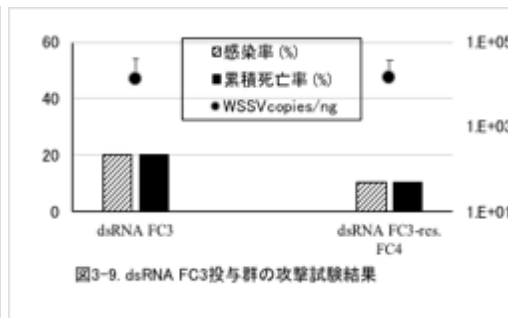
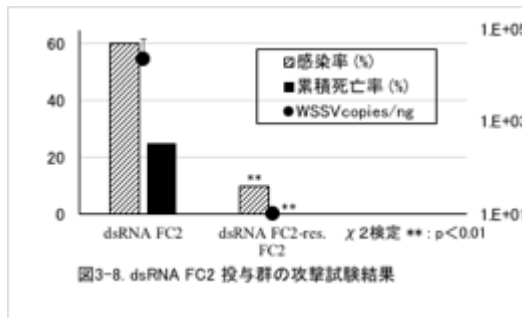
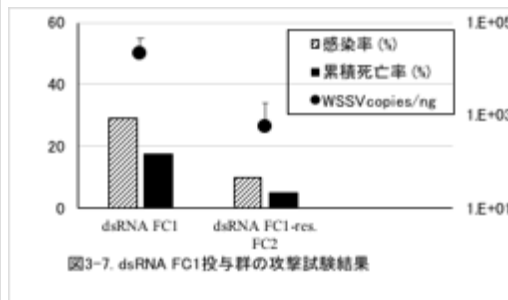
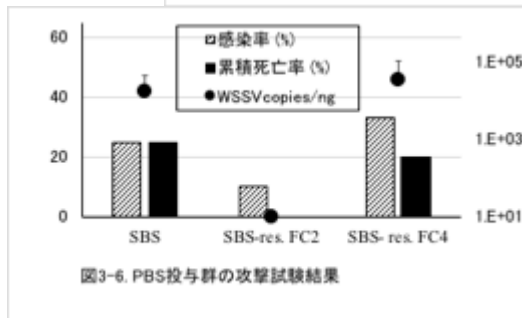
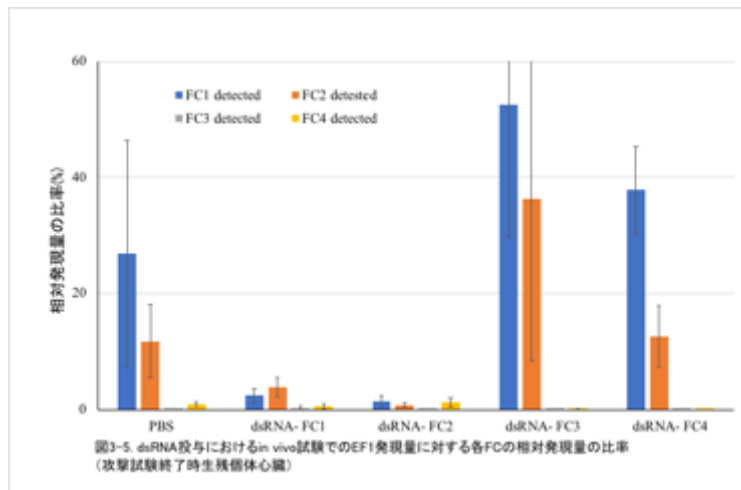


図3-4. 生体応答因子のノックダウン条件の検討 (FC4の検出)

24 時間以降有意に 1/2 以上発現量の低下が観察された。FC2 においても同様の傾向が見られたが、72 時間以降 PBS 投与群でも FC2 発現量が低下し、有意差は確認されなかった。FC3 については、元々の発現量が少なく dsRNA 投与の効果を確認することができたものの、低下傾向ではあった。FC4 は 24 時間以降 7 日目まで、SBS 群に比較して有意に 1/2 以上低下せしめた。dsRNA FC1, 2 および FC3, 4 の投与でそれぞれ、FC1, 2 あるいは FC3, 4 のいずれをも発現量の調整に働くことが確認されたことから、立体構造予測の結果と同様に FC1, 2 および FC3, 4 の類似性を反映する結果となった。これにより、ノックダウンの持続期間が把握できた。



次に、FC 遺伝子 1, 2, 3, 4 のノックダウンと組換え応答因子 FC2 (FC1, 2 ノックダウン群) および 4 (FC3, 4 ノックダウン群) 投与によるレスキュー後の WSSV 攻撃試験により、FC2 遺伝子ノックダウン群の感染率が 60% になったのに対して、レスキュー群は 10% と有意に低くなった ($p < 0.01$) (図 3-7)。累積死亡率もそれぞれ、25 および 0% ($n=20$) となった。一方、FC4 遺伝子ノックダウン群は、同様に感染率が 15 および 50% と組換え FC4 によるレスキュー後に有意 ($P < 0.05$) に上昇した (図 3-9)。累積死亡率も 10 および 25% となった。対照となる SBS 投与群 (ノックダウン無し群) の感染率は、25%、組換え FC2 投与後に 10%、FC4 投与後に 33.3% となり、死亡率は、それぞれ、25, 0, 20% となり、有意差は確認されないものの組換え FC2 あるいは FC4 投与時の感染率および累積死亡率に類似の変化が観察された (図 3-6)。なお、同様の傾向は、FC1 および 3 ノックダウン時に FC2 あるいは FC4 でレスキューした際にも観察された (図 3-8, 10)。以上より、上述の組換え応答因子の WSSV 中和活性の結果からも FC2, 4 には異なる働きがあることが予想された。即ち、FC2 には WSSV を不活性化する機能、FC4 には WSSV を認識するが不活性化には関与しない機能が備わっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jirayu Boonyakidaa, Jian Xub, Jun Satoh, Takafumi Nakanishi, Toru Mekata, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park.	4. 巻 101
2. 論文標題 Antigenic properties of VP15 from white spot syndrome virus in kuruma shrimp <i>Marsupenaeus japonicus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 152 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米加田 徹・佐藤 純
2. 発表標題 クルマエビにおける免疫様現象関連因子の探索-1
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 純・米加田 徹
2. 発表標題 クルマエビにおける免疫様現象関連因子の探索-2
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 純, 米加田徹, 稲田真理	4. 発行年 2018年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 5
3. 書名 「養殖ビジネス」臨時増刊号 よくわかる! 魚病対策と水産用医薬品 2018年版	

〔産業財産権〕

[その他]

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	米加田 徹 (MEKATA TOHRU) (40597944)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任 研究員 (82708)	