

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月27日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19284

研究課題名(和文) クルマエビ類の培養細胞株樹立法の開発

研究課題名(英文) Development of kuruma shrimp cell lines

研究代表者

廣野 育生(Hirono, Ikuo)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00270926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期や細胞増殖因子のホモログ遺伝子を収集することができ、これら遺伝子の配列を用いて培養細胞の状態を解析することが可能となった。血液中の血球細胞と組織中に存在する血球細胞は遺伝子発現パターンが異なり、各組織中で血液細胞の機能は異なることが示唆された。病原微生物の感染によりクルマエビ血液中で血球細胞は機能的に分化するか、あるいは病原微生物と戦うための細胞が分裂増殖あるいは他組織からの移動により血液中で特定の機能を有する血球細胞が増加することが示唆された。血液系以外の細胞培養を試みたところ、生殖系組織の細胞で2倍濃度L15に10%FBSを添加することにより細胞が分裂増殖することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞増殖や細胞周期に関する遺伝子のカタログ化ができ、今後、クルマエビの細胞に関する研究のツールが整備された。病原微生物感染によりクルマエビ血液内の血球細胞の機能が変化するかあるいは機能が異なる血液細胞のプロポーションが変化することがわかり、クルマエビの病原微生物感染に対する免疫応答研究の重要な知見になると考えられる。クルマエビの血液細胞には複数種類存在し、顆粒球においても機能が異なるタイプが存在することがわかった。

生殖系組織の細胞の継代培養が可能となり、今回の結果はクルマエビの細胞培養技術を進展させる重要な成果になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have collected several mRNA sequences including cell growth factors and cell cycle involving molecules from kuruma shimp *Marsupenaeus japonicus*. We found that gene expression patterns of hemocytes from hemolymph and sessile hemocytes from different organs were different. These results suggested that there are functionally different hemocytes in kuruma shrimp. Functional proportion of hemocytes in hemolymph were changed after microbial infections. We succeeded to culture reproductive tissue using 2xL15 containing 10% FBS.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：クルマエビ 血液細胞 培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

これまでにクルマエビ類の感染症克服を目指して、クルマエビ類の免疫・生体防御機構を分子レベルで解明するためにゲノム解析、大規模遺伝子発現解析、トランスジェニックエビ作出のための遺伝子導入技術開発ならびに RNA 干渉機構を利用した遺伝子機能阻害による遺伝子機能解析に関する研究を進めてきた。これらの研究はクルマエビ類個体を用いた研究で、実験可能なことは限られている。培養細胞を用いたクルマエビ類の微生物感染症や免疫・生体防御に関する研究をクルマエビ類でも展開することが出来れば、これまで以上に詳細な分子レベルでの研究が可能になると考えられる。さらに、培養細胞を用いることで実験数を、個体を用いた実験以上に実施することが可能になる。しかし、これまで世界中でクルマエビ類をはじめとする甲殻類の培養細胞株樹立が試みられ、研究論文も発表されているがそれらは一時的な培養あるいは組織培養として数日の培養が出来ているのみである。このような研究の背景から、クルマエビ類の培養細胞株樹立はクルマエビ類に関する研究を加速的発展させると考えた。

## 2. 研究の目的

クルマエビ類は、生産効率が良いことから発展途上国を中心として養殖が盛んに行われている。FAO の統計によると世界の養殖エビの総生産量は 400 万トンを超えている。さらに、クルマエビ類の養殖生産量は全養殖生産量の約 1 割で、生産額では全養殖生産生産額の 10% (約 1.2 兆円) を占めており、クルマエビ類は食資源としても産業としても世界的に重要であることは明らかである。世界的にクルマエビ類の養殖生産量は毎年増加して来たが、2011 年頃から新たな微生物感染症急性肝すい臓壊死症 (EMS/AHPND) の蔓延により養殖エビ類の生産量が減少し、2016 年において世界のクルマエビ類生産量は元には戻っていない。EMS/AHPND に限らず、微生物感染症がクルマエビ類養殖場で発生し、産業に影響を与えている。微生物感染症の原因を解明するためには対象生物の培養細胞はとても重要であることは、脊椎動物や農作物の感染症学の例をみても明らかである。さらに、免疫担当細胞として重要な血球細胞の種類や機能を明らかにすることは病原体感染と免疫応答と理解する上で不可欠である。しかし、クルマエビ類を含む海産甲殻類の株化された培養細胞は無く、血球細胞においても染色性のみで分類されているのみであり、宿主病原体相互作用等の免疫・生体防御研究等を展開するのが困難な状況にある。そこで、本研究ではクルマエビ類の細胞培養法確立を目的とし、最新の分子生物学的・遺伝子工学的技術を取り入れて実施するものである。

クルマエビ類養殖は産業的にも重要であることから、繁殖、生理、免疫、感染症と幅広い分野で研究が実施されて来ているが、多くの研究は個体あるいは遺伝子を材料とした研究である。生物学研究において培養細胞を使えるのと使えないのでは、研究の進め方や、発展性が大きく異なる。例えば、クルマエビ類と同じ無脊椎動物である昆虫ではショウジョウバエ等の実験動物の培養細胞がいくつも構築され研究に利用されている。また、水生生物では種々の魚種でいくつもの異なる組織や細胞の培養技術が確立され、魚病学、生理学や細胞生物学研究に利用されている。培養細胞を樹立する上で重要な因子として細胞増殖因子があげられる。近年のゲノム解析から魚類においても細胞増殖因子が同定され、遺伝子工学的に組換え型の増殖因子を複製し、細胞培養に用いて成功している例もある。しかし、クルマエビ類においては細胞を分裂増殖させる技術も無く、また、ゲノムも解読されていないことから、培養細胞は未だ樹立されていない。

本研究では、クルマエビ類の細胞培養法を確立するために、造血組織に存在する血液細胞と抹消血中に存在する細胞において発現する遺伝子について大規模遺伝子発現解析な次世代シーケンサーにより発現遺伝子の量的な比較解析し、どのような遺伝子が細胞の増殖に重要であるかを明らかにすることと細胞培養に用いる培地を検討しクルマエビ類の細胞培養を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 血液中の血球細胞と組織中に存在する血球細胞の遺伝子発現プロファイリング

クルマエビのエラなどの組織中に存在する血球細胞を比重、貪食能や糖結合タンパク質への結合性などで分離し、次世代シーケンサーにて遺伝子発現プロファイリングを実施した。細胞周期や細胞増殖に関連する遺伝子のカタログ化を行った。

### 2. クルマエビ細胞の培養法の確立

使用する培地について市販の L15、MEM、昆虫細胞用培地など持ちいるとともに、人工海

水をベースとした L15 培地を用いた。クルマエビの体液成分を分子量分画ができる遠心チューブにて分子量 (50K、100K) で分け、血球培養時に培地に添加し、細胞の増殖性を確認した。ウシ胎児血清の添加についても検討した。

試験に用いた細胞・組織は血球細胞、心臓細胞、生殖細胞、表皮組織、筋肉細胞、神経管細胞とした。

#### 4. 研究成果

##### 1. 血液中の血球細胞と組織中に存在する血球細胞の遺伝子発現プロファイリング

細胞周期や細胞増殖因子のホモログ遺伝子を収集することができ、これら遺伝子の配列を用いて培養細胞の状態を解析することが可能となった。

血液中の血球細胞と組織中に存在する血球細胞の大規模な遺伝子発現プロファイリングと発現パターン比較を行うことにより、組織中に存在する血球細胞は血液中に存在する血液細胞とは遺伝子発現パターンが異なることがわかった。さらに、異なる組織に存在する血液細胞はそれぞれ遺伝子発現パターンが異なることがわかり、組織毎に存在する血液細胞は異なる機能を発揮していると考えられた。免疫・生体防御に関連するタンパク質であるレクチンや抗微生物タンパク質においても、異なる組織に存在する血球細胞で発現パターンは異なっていた。

病原微生物であるピブリオと WSSV をクルマエビに感染させ、血液中の血球細胞における免疫・生体防御に関連する遺伝子の発現を調べると、発現量が上昇しているように思われる遺伝子が見つかった。そこで、このような遺伝子発現が上昇する遺伝子を発現している血液中の血球細胞の割合をフローサイトメトリで測定したところ、病原微生物感染前と感染後でこれら遺伝子を発現する細胞数が増加していることがわかった。このことは、病原微生物の感染によりクルマエビ血液中で血球細胞は機能的に分化するか、あるいは病原微生物と戦うための細胞が分裂増殖あるいは他組織からの移動により血液中で特定の機能を有する血球細胞が増加することが示唆された。

##### 2. クルマエビ細胞の培養法の確立

クルマエビ血液系細胞の培養基礎培地として 2 倍濃度 L-15 培地と人工海水に細胞培養培地 L-15 に含まれるアミノ酸とビタミンを 2 倍量添加し培地を使用した。クルマエビの血漿成分について、全血漿と 50kD あるいは 100kD で分子量分画したものを組織培養に用いたが細胞の生存に特に違いは見られなかった。クルマエビ血漿を 60 度で 30 分処理することにより、メラニン化による培地の黒化を軽減することができることがわかった。

血液系以外の組織、細胞の培養を試みたところ、生殖系組織の細胞ではウシ胎児血清を 10% 添加することにより細胞が分裂増殖することを確認できた。細胞増殖については市販の細胞増殖アッセイキットを用いて確認し、細胞が増殖していることを確認できた。細胞が増殖する際の細胞周期マーカーとなる遺伝子群のホモログ遺伝子の発現を調べたところ、増殖している細胞が存在するフラスコと細胞が増殖している状態ではないと考えられる細胞が存在するフラスコから細胞を回収し、遺伝子発現を調べたところ発現パターンに違いが見られた。本実験では生殖系組織由来の細胞を 2 倍濃度の L15 培地と 10%ウシ胎児血清を添加した培地で培養に成功した。さらに、この細胞を別のフラスコに植え継いでも細胞増殖が見られた。今後、この細胞について継続して継代培養をするとともに、液体窒素で凍結保管したのちに、細胞が増殖するかとクルマエビの病原ウイルス WSSV に対して感受性があるかどうかについても確かめる必要がある。

本研究では生殖組織以外の組織由来の細胞ではこれまでに検討した培地条件では細胞増殖は認められなかったことから、さらなる培地と培養条件の検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Koiwai K, Kondo H, Hirono I. (2018) RNA-seq identifies integrin alpha of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* as a candidate molecular marker for phagocytic hemocytes. Dev Comp Immunol. 81:271-278. doi: 10.1016/j.dci.2017.12.014.
2. Koiwai K, Kondo H, Hirono I. (2018) The immune functions of sessile hemocytes in three organs of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* differ from those of circulating hemocytes. Fish Shellfish Immunol. 78:109-113. doi: 10.1016/j.fsi. .2018.04.036.

3. Koiwai K, Kondo H, Hirono I. (2019) Isolation and molecular characterization of hemocyte sub-populations in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fisheries Science, 85:521–532. doi.org/10.1007/s12562-019-01311-5

〔学会発表〕(計 4件)

1. 小祝敬一郎、近藤秀裕、廣野育生 (2018) クルマエビ組織中血球細胞の濃縮および網羅的発現遺伝子解析、平成 30 年度日本水産学会春季大会
2. 小祝敬一郎、近藤秀裕、廣野育生 (2018) Cell-SELEX 法によるクルマエビ血球に結合する DNA アプタマーの探索、第 20 回マリンバイオテクノロジー学会
3. Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono (2018) The functional characterization of sessile and circulating hemocytes in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*、国際比較免疫学会 2018 (国際学会)
4. 小祝敬一郎・近藤秀裕・廣野育生 (2019) レクチンを利用したクルマエビ血球細胞亜集団の分離および網羅的遺伝子転写産物解析、平成 31 年度日本水産学会春季大会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。