

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780169

研究課題名（和文） 二本鎖 RNA がマガキに引き起こす急性生体防御反応の解明

研究課題名（英文） Studies on acute immune responses against dsRNA in Pacific oyster

研究代表者

伊藤 直樹 (NAOKI ITOH)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30502736

研究成果の概要（和文）：

近年、二枚貝にも異物を認識して生体防御反応を誘起するメカニズムが備わっていることが明らかになりつつある。本研究により、ウイルスを表現する dsRNA に対してマガキが血液中の血球数を増加させることが分かった。しかし、この反応は他の二枚貝であるアサリでは見られず、二枚貝の種によって認識メカニズムに違いがあると考えられた。また、dsRNA に対して特段の反応を示さないアサリは、dsRNA 導入による RNA 干渉 (RNAi) を利用した遺伝子ノックダウンに適した生物と考えられ、アサリを用いた RNAi 法の標準化と生理学的研究への応用を試みている。

研究成果の概要（英文）：

Recently, it has been known that bivalve mollusks possess immune recognition systems against foreign materials. This study revealed that the Pacific oyster increased hemocyte numbers as immune reactions to dsRNA which represents virus invasion. On the other hand, another bivalve species, the Manila clam, does not show this response, suggesting that there are variations of dsRNA recognition systems among bivalve species. Moreover, the Manila clam without apparent responses against dsRNA is considered to be an ideal model organism for RNA inference experiments by dsRNA, and currently we conduct optimization and standardization of RNAi for the clam host defense studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：生理、生体防御、パターン認識受容体、病原体関連分子パターン、二枚貝、自然

免疫

1. 研究開始当初の背景

二枚貝は水産業において養殖対象として重要な種を多く含んでいる。生産量の増加に伴い、疾病問題が大きな影響を引き起こしているが、薬剤やワクチンによる対策が不可能である二枚貝では、生体防御反応の理解とその亢進が疾病対策に直結する。しかしながら、二枚貝類の生物学的・生理学的理解はあまり進んでいないのが現状である。

近年、遺伝子解析技術の進展に伴い、二枚貝類においても遺伝子情報が多く得られるようになってきた。これら遺伝子の生理機能を解明するための手法として、多くの生物では遺伝子を特異的にノックアウトする RNAi 法が広く用いられており、二枚貝類を用いた研究でも重要なツールとなりうる。

ところが、マガキを用いた研究で RNAi 法を行うために用いる二本鎖 RNA (dsRNA) 自体が生体防御反応を誘起する可能性が、最近になり示唆されている。従って、RNAi 法を二枚貝に応用した場合、観察の対象外である生体防御反応が誘起される可能性があり、生体防御研究への応用は困難であることが予想された。

2. 研究の目的

遺伝子の機能解明が広く進められている脊椎動物において、長鎖 dsRNA は生体防御反応を誘起することが知られている。これは、脊椎動物が dsRNA を RNA ウイルスが侵入したと認識するためである。一方、脊椎動物では 30 塩基対ほどの短鎖 dsRNA は認識の対象としないために生体防御反応が誘起されないため、遺伝子機能の解明にはこの短鎖 dsRNA を用いた RNAi が応用されることが多い。

二枚貝マガキでは短鎖 dsRNA 注射に対し、

循環血球が急激に増加する反応が引き起こされたとする観察結果があり、これは二枚貝が RNA ウイルスの侵入と判断して生体防御反応を誘起させている可能性が考えられる。本研究では、この血球増加を引き起こすメカニズムを解明することを第一目標とした。また、脊椎動物とは逆、つまり長鎖 dsRNA に対して生体防御反応を誘起しないのであれば、長鎖 dsRNA を利用するなどした水産無脊椎動物に生体防御反応を誘起しない RNAi 法開発の礎とすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、マガキで観察された血球増加現象は、dsRNA が特異的に引き起こすのか、それとも類似物質も本現象を引き起こすのかを明らかにするべく、dsRNA の他に RNA の類似物質とされる Poly I:C、および dsRNA と構造が類似するであろう dsDNA を注射して反応を観察した。

(2) マガキを用いた実験では個体差が大きくあらわれてしまい、データ解析に困難が生じる。そこで、血球を多く含むと考えられる組織片を採取し、刺激源(dsRNA、poly I:C、または dsDNA)を加えた培地にて培養、遊出する血球数を計測し、刺激源の影響を推測する in vitro 系の実験系確立を目指した。

(3) 東日本大震災の影響により研究遂行に適したマガキ入手が困難となったため、入手が用意な二枚貝アサリを用い、dsRNA 接種に対する反応性を検討した。検討校区として、マガキの場合と同様に、短鎖と長鎖 dsRNA 摂取による血球増加反応の有無を検討した。

(4) 上記の研究を行ったところ、アサリにおいては dsRNA の導入による生体防御反応が認められなかった。そこで、dsRNA 注射による RNAi の導入が可能であると考え、種々の遺伝子をノックダウンの対象とした RNAi 法確立を試みた。

4. 研究成果

(1) オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の一部配列をもった短鎖 dsRNA を合成し、マガキに注射したところ、顕著な循環血球数増加が認められた。また、GFP の配列を持つ dsDNA を注射した際にも循環血球の増加が観察されたが個体差は大きく、統計的な有意さは確認できなかった。一方、脊椎動物等で dsRNA と同様に認識される Poly I:C を注射しても同様な反応は観察されなかった。以上のことより、二枚貝マガキには RNA や DNA といった核酸の種類ではなく、二本鎖といった核酸構造を認識し、生体防御反応を誘起させるシステムが存在していることが示唆された。また、脊椎動物に対して Poly I:C は dsRNA と同様に作用するが、マガキではないことから、dsRNA 受容・認識機構は脊椎動物等とは大きく異なることが想像された。

(2) 循環血球が増加する原因として、組織内に浸出している血球が循環系に遊走してくる可能性が考えられた。そこで、血球が多く浸出しているとされる胃周囲の組織を摘出し、培地中に置いた。次に、培地内に上述の実験で用いた dsRNA、dsDNA 及び Poly I:C を添加し、組織から遊走する血球を観察した。その結果、どの条件においても血球は摘出組織より遊走してきたもののその数に明らかな差はみられなかった。組織を切り出すこと自体が、培地中添加した刺激源よりも組織内血球にとっては十分な刺激となった可能性が考えられた。また、多量な血球が郵送し

てきたために、計数することが困難であり、実験区間の微小な差を検出できなかった可能性も否定できなかった。

(3) マガキが入手困難となったため、入手が容易なアサリを用い、dsRNA 注射に対する感受性を検討した。その結果、アサリでは短鎖 dsRNA に対して循環血球が増加するなどの反応は観察されなかった。しかし、dsRNA の長さ、もしくは配列に応じて循環血球が増加する可能性も考えられた。

そこで、GFP 配列の他にアサリが本来保有する生体防御タンパク質であるリゾチームとレクチン配列をもつ長鎖 dsRNA、計 3 種類を合成してアサリに注射した。注射後に計時的に循環血球を採取、血球数を測定した。しかし、長鎖 dsRNA 注射においても循環血球の増加反応は一切観察されることは無かった。

このことから、同じ二枚貝類に属するアサリとマガキであっても、dsRNA の認識システムには顕著な違いがあることがまず考えられた。さらに、今回、観察・検討した生体防御反応は循環血球数のみであったため、循環血球数に変化は見られなくとも他の生体防御反応に対しては何らかの影響が表れていた可能性も否定できない。それでも、大きな変化が見られなかったアサリは、二枚貝生体防御機能における dsRNA による RNAi 法を実施するのに適した生物であることが考えられた。

(4) 上述のように考え、長鎖 dsRNA 注射による RNAi 法で、アサリ生体防御因子のノックダウンを試みた。ノックダウンの対象とする遺伝子として、タンパクレベルで活性を評価することが容易で、かつ遺伝子が同定されているリゾチームとレクチンを選んだ。

まず、各因子の RNA をコードする長鎖 dsRNA

を合成し、1 個体あたり各 30 マイクログラムを閉殻筋に注射した。遺伝子ノックダウンの評価は循環血球における発現量をモニタリングして行ったが、注射 7 日後に至るまで両因子とも遺伝子ノックダウンの効果は認めることができなかった。

次に、30 マイクログラムでは導入量が少なかつたと考え、5 倍の 1 個体あたり 150 マイクログラムを注射した。その結果、標的遺伝子の発現量が低下したと思われる個体が少ないながらも現れた。これらの個体において疾病に対する生体防御能が実際に低下したかは不明であるが、RNAi 法によって二枚貝生体防御における遺伝子機能解明が可能であることが本研究によって示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

①伊藤直樹：生体防御関連因子からみる二枚貝の防御システム、平成 23 年度日本比較免疫学会シンポジウム講演（神奈川・海洋研究開発機構）2011 年 8 月 23 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 直樹 (ITO NAOKI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30502736