

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850126

研究課題名(和文)エビ類のサイトカイン；MIFファミリーに着目した免疫応答の解析

研究課題名(英文)Characterization of Cytokine Homologue Gene, Macrophage Migration Inhibitory Factor, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*

研究代表者

稲田 真理 (INADA, Mari)

国立研究開発法人水産総合研究センター・増養殖研究所・任期付研究員

研究者番号：50723558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビにおいて、サイトカインの一種であるMIFファミリー(MIF(マクロファージ遊走抑制因子)およびDDT(MIF-2))の免疫応答の解析を行った。V. penaeicida注射後6時間における血リンパにおいてDDTの発現が増加し、注射後24時間では平常時の発現量まで減少した。RNA干渉法によってMIF遺伝子をノックダウンすると生存率が低下する傾向が認められた。in situ ハイブリダイゼーション法により、WSSV感染個体の生殖腺において発色が弱まる傾向が認められた。以上、MIFファミリーはエビ類の生体防御機構に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytokines are known as signaling protein molecules for intercellular communication. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) was discovered as a factor which controls the marmot macrophage migration in the culture supernatants of the marmot lymphocyte in vertebrates. In this study, we report the characterization of genes of MIF family such as MIF and D-dopachrome tautomerase (DDT; MIF-2) from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. The in silico analyses such as domain, homology and phylogenetic analyses were performed. In prediction of 3D structure, MIF family formed trimer. The gene expression of MjDDT increased at 6 hours after injection of heat-killed *Vibrio penaeicida* cells. These data suggested that MjDDT of MIF family may be important in innate immunity in kuruma shrimp.

研究分野：魚病

 キーワード：クルマエビ 生体防御因子 サイトカイン MIF マクロファージ遊走抑制因子 *Vibrio penaeicida* WSSV/PRDV RNA干渉

## 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) やビブリオ菌 (*Vibrio* sp.) による日和見感染が発生している。これまで哺乳類などの高等脊椎動物の疾病治療法を参考にして、世界中でエビ類の様々な疾病防除対策が立てられたが、無脊椎動物であるエビ類の免疫システムが哺乳類などの高等脊椎動物の免疫システムと大きく異なるため、期待する効果が発揮されず、有効な疾病防除対策の確立には至っていないのが現状である。エビ類の免疫システムについては知見が乏しく、病原体の排除機構についても不明な点が多く、問題を解決するためには、まず、エビ類の生体防御機構を十分に理解することが必要である。

サイトカインは、細胞間の情報伝達を担う一群のタンパク質であり、哺乳類において、免疫、炎症、細胞増殖・分化、細胞死などの多様な機能を担うことが知られている。哺乳類においてサイトカインの一種である MIF ファミリーが知られている。MIF ファミリーは、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) と D-ドーパクロム・タウトメラゼ (D-dopachrome tautomerase; DDT (MIF-2)) から構成されている。MIF は活性化 T リンパ球から産生されるリンフォカインとして 1960 年代に報告され、炎症部位にマクロファージを集め炎症、免疫反応を引き起こすほか、腫瘍細胞増殖や血管新生等を促す機能を有することが知られている。

無脊椎動物の MIF について、ダニ類では吸血後、中腸や唾液腺で遺伝子発現が増加し、吸血部位において宿主のマクロファージの遊走を阻止することで吸血を促進することが知られている。ヒトデにおいて、MIF は異物に集積する間充織組織の量を決定している可能性が示唆されている。アコヤガイ等の数種の貝類ではビブリオ属の細菌やリポ多糖、ペプチドグリカン等の刺激により遺伝子発現が増加し、生体防御に関与している可能性が示唆されている。甲殻類ではカニ類において、ビブリオ属の細菌の刺激により遺伝子発現が増加することが報告されている。研究計画当初においては、エビ類の MIF に関する知見は報告されていなかったが、その後、バナメイエビにおいてホワイトスポットシンドロームウイルス (white spot syndrome virus; WSSV/ penaeid rod-shaped DNA virus; PRDV) 感染時、中腸線において遺伝子発現が増加する傾向があると報告された。

このように、ヒトデを除いた水生無脊椎動

物の MIF についての報告の多くは、遺伝子レベルで留まっており、タンパク質の機能についての知見は乏しい。

## 2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえて、クルマエビの MIF ファミリーの免疫応答の解析を行い、サイトカインの側面からエビ類の生体防御機構の一端を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 供試エビ: 平均体重 5~10g のクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) を用いた。

(2) クルマエビの MIF ファミリーの全長解析: 縮重プライマーを作製し、得られた部分配列を RACE 法で伸長し、遺伝子配列の全長を決定した。

(3) 同定した MIF ファミリーのアミノ酸配列を用いた *in silico* 解析: MEGA6、Bio Edit、InterPro 等の遺伝子解析ソフトウェアおよびサーバーを用いて分子系統解析、相同性解析、ドメイン解析、SWISS MODEL による立体構造予測を行い、クルマエビの MIF ファミリーの特徴を明らかにした。

(4) クルマエビ MIF ファミリーの免疫応答の解析: WSSV/PRDV および *Vibrio penaeicida* を用いた病原体感染試験を行い、MIF および DDT の遺伝子発現量の定量を行った。また、ジゴキシゲニンを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、MIF ファミリーの組織局在性を調べた。

(5) クルマエビの MIF ファミリーのリコンビナントタンパク質の作製: 大腸菌用発現ベクター (pCold 等) のマルチクロニングサイトにクルマエビの MIF および DDT 遺伝子の ORF を挿入して発現用プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて宿主大腸菌を形質転換し、アンピシリンを含む選択培地プレート上で選択した。37℃ で振とう培養後、培養液を 15℃ に冷却し、IPTG を添加後、15℃ で 24 時間振とう培養し、培養終了後、SDS-PAGE で目的産物の有無、発現量や可溶性を確認した。

(6) 遺伝子ノックダウン: クルマエビの MIF および DDT 遺伝子の部分配列をもとに RNA 干渉法を用いてクルマエビ MIF ファミリーの遺伝子ノックダウンを行った。

## 4. 研究成果

(1) 同定されたクルマエビの MIF および DDT は、それぞれ、全長 894 bp および 559bp であり、120 および 115 アミノ酸残基をコードしていた。分子系統解析の結果、MIF ファミリーは MIF と DDT の 2 つのクラスターに分かれ、クルマエビの MIF は昆虫の MIF と近縁であり、無脊椎動物の MIF のクラスターに含まれた。クルマエビの DDT は無脊椎動物の DDT と近縁であり、DDT のクラスターに含まれた。立体構造解析において、クル

マエビの MIF と DDT は脊椎動物と同様に、3 量体を形成することが予測された。

(2) クルマエビ MIF ファミリーの免疫応答の解析について、WSSV/PRDV および *Vibrio penaeicida* を用いた病原体感染試験を行い、MIF ファミリーの遺伝子発現を定量した。結果、*V. penaeicida* 注射後 6 時間における血リンパにおいて DDT の発現が増加し、注射後 24 時間では平常時の発現量まで減少した(図 1)。

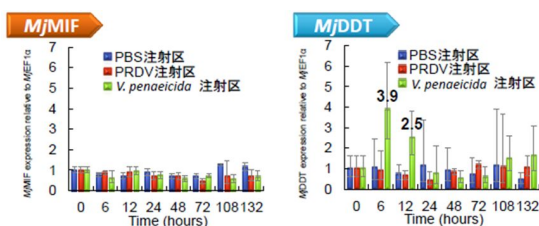
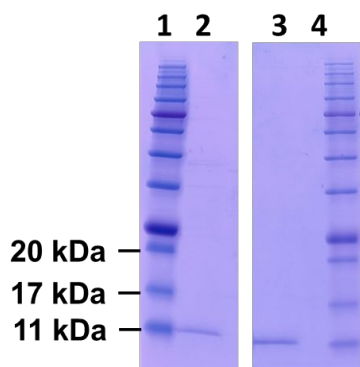


図 1. 病原体感染時の MIF ファミリーの遺伝子発現動態

クルマエビの MIF について、ジゴキシゲンを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法では、WSSV/PRDV 感染個体の生殖腺において発色が弱まる傾向が認められた。

(3) クルマエビの MIF ファミリーのリコンビナントタンパク質の作製について、クルマエビの MIF、DDT を大腸菌の系を用いて作製した結果、SDS-PAGE によって、可溶性画分において約 12 kDa(目的のサイズ)のバンドが確認された(図 2)。



Lane 1; マーカー  
Lane 2; リコンビナントクルマエビ MIF  
Lane 3; リコンビナントクルマエビ DDT  
Lane 4; マーカー

図 2. クルマエビ MIF ファミリーのリコンビナントタンパク質作製

得られた MIF および DDT のリコンビナントタンパク質を精製し、器官培養でシャーレに広げたリンパ様器官の細胞に添加したが、細胞死や細胞増殖等の変化は認められなかった。

RNA 干渉法により MIF 遺伝子をノックダウンした結果、MIF 遺伝子のノックダウン効

果は試験開始後、2.5~7.5 日間続き、平常時の 10 分の 1 以下まで発現量は低下した(図 3)。

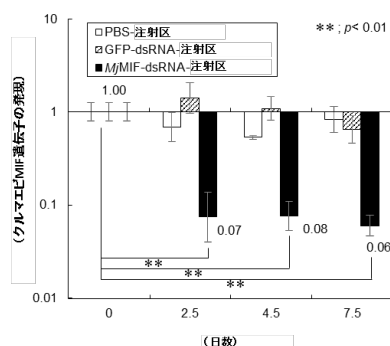


図 3. 遺伝子ノックダウン時におけるクルマエビ MIF 遺伝子発現量の変化

また、MIF 遺伝子ノックダウン区において生存率が低下する傾向が認められた。

(1)~(3)の結果より、MIF ファミリーはエビ類の生体防御機構に参与している可能性が示唆された。機能解析について、大腸菌の系で作製したリコンビナントタンパク質のリフォールディングが適正になされなかった可能性があるため、今後は昆虫細胞や無細胞の系でリコンビナントタンパク質を作製し、また、リンパ様器官の他、造血器などの幼弱な細胞や血球を用いて機能解析を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

- (1) M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, 「New cytokine homologue genes, macrophage migration inhibitory factor family, in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『PSU-UoM Joint Seminar』 Hat Yai, Thailand, (March, 2016)
- (2) M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, 「Macrophage migration inhibitory factor family, cytokine homologue genes, in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『Aquaculture 2016』 Las Vegas, USA, (February, 2016)
- (3) 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』 Murcia, Spain, (June, 2015)
- (4) M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, 「Cytokine Homologue Genes in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*: VEGF, MIF, Astakine」 『JSPS-NRCT Asian Core Program Symposium 2014 Tokyo』 Tokyo, Japan, (December, 2014)
- (5) M. Inada, T. Yui, M. Sakai, T. Itami, 「Cytokine Homologue Genes, VEGF, MIF and Astakine, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus*

*japonicus*: Simulation of 3D structure, Gene Expression Analysis during WSSV Infection and Gene Knockdown」『9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture』 Ho Chi Minh City, Vietnam, (November, 2014)

( 6 ) 稲田真理、米加田徹、酒井正博、伊丹利明、近藤秀裕、廣野育生 「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) 血球における各種サイトカインおよびサイトカイン受容体の発現」, 『平成 26 年度 日本魚病学会秋季大会』、福岡、(9 月、2014 年)

〔その他〕

受賞：

( 1 ) M. Inada, 「Furuta Travel Award」, 『Japanese Association for Developmental and Comparative Immunology』, Fukui, Japan, (August, 2015)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

稲田 真理 ( INADA Mari )

国立研究開発法人水産総合研究センター・  
増養殖研究所・任期付研究員

研究者番号：50723558