

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07953

研究課題名(和文) クルマエビ抗ウイルス因子の挙動および産生誘導機構の解明

研究課題名(英文) Induction mechanism of antiviral factors in Kuruma shrimp

研究代表者

米加田 徹 (Mekata, Tohru)

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

研究者番号：40597944

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)：クルマエビの血リンパ液中に存在する抗ウイルス応答関連因子の挙動を把握することを目的として、その因子の特定や検出系の構築を試みた。血リンパ液中の多含有タンパク質の除去を試みたところ、高分子化合物を血リンパ液と混合することにより、除去し得る可能性が見出された。抗ウイルス応答時の血球の遺伝子オントロジーエンリッチメント解析により、リボソーム生合成やタンパク質分解などに関わる遺伝子群の挙動が大きく変動していることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クルマエビのウイルス病を防ぐために、免疫賦活剤や抗ウイルス薬が研究開発されている。エビ類の養殖では様々なウイルス病が蔓延しており、一刻も早い防除対策が望まれている。クルマエビの抗ウイルス作用を持つ物質が発見されているが、その作用機序は不明である。免疫賦活剤の実用化を進めていく上でも、その作用機序の解明が望まれている。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the behavior of antiviral response-related factors in the hemolymph of kuruma shrimp, the identification of the factors and construction of a detection method were examined. It was revealed that highly abundant proteins can be removed by mixing a certain polymer compound with hemolymph. Gene ontology enrichment analysis of hemocytes during the antiviral response confirmed that the transcript levels involved in ribosome biosynthesis and proteolysis was significantly altered.

研究分野：魚病学、生体防御学

キーワード：クルマエビ 抗ウイルス応答

1. 研究開始当初の背景

世界のエビ類養殖生産は、年間約 450 万トン、生産額にして 2700 億円にも達するほど急激に成長しており、特にアジア諸国では経済発展においても貴重な産業となっている。ところが、急激な集約的生産の増加に伴い、細菌、真菌やウイルス性疾病による甚大な被害が相次いで報告されている。これらの疾病防除対策として、受精卵の洗浄、稚エビの中間育成方法の改善およびプロバイオティックスの投与などの取組がなされている。また、免疫系を強化するための餌料添加物、抗菌薬や抗ウイルス薬などの研究開発も行われている。しかし、エビ類における生体防御機構に関する知見は未だ非常に乏しく、これらの免疫増強効果を評価する手法は確立されていない。そのため免疫応答を把握するために、より詳細な機構解明に関する研究が望まれている。

これまでのエビ類の研究において、細菌やウイルス感染時の遺伝子発現動態については多くの知見が得られているが、タンパク質動態に関する研究については非常に情報が少ないのが現状である。甲殻類は未だモデルとされる生物が無く、質量分析の情報からではタンパク質情報が得難いということもその要因として挙げられる。昆虫類では、パターン認識受容体が病原体構成成分を認識すると細胞内シグナルが活性化し、抗菌ペプチドの産生および分泌が促されることが明らかとなっている。エビ類においても昆虫類と類似した免疫機構を有していることが明らかとなっている。

申請者はこれらの情報を基に、エビ類においてこの細胞内シグナルの一部をノックダウンすることで、抗菌ペプチドの遺伝子発現レベルが低下することを明らかとした。また、細菌の構成成分をクルマエビに投与することで、リンパ様器官や鰓などで発現量が変動する生体防御関連遺伝子の同定を実施してきた。さらに、このような異物で刺激を受けた個体の血リンパ液中には、抗ウイルス作用を示すタンパク質が分泌されることも明らかにした。このように、血リンパ液には病原体に対して対抗する物質が存在していると推察される。

2. 研究の目的

血リンパ液中には酸素を運搬するヘモシアニンと呼ばれるタンパク質が存在しており、血リンパ液中総タンパク質の 9 割以上を占めている。そのため、血リンパ液中の微量タンパク質の検出において、これらの因子はヘモシアニンのような多含有タンパク質にマスクされてしまう。微量タンパク質の検出のためには血リンパ液からの多含有タンパク質の除去が必要不可欠である。哺乳類においても血中の微量タンパク質を検出するために、多含有タンパク質である IgG やアルブミンなどを除去するキットが市販されている。そこで本研究では、エビ類の血リンパ液中のヘモシアニンの除去法の検討を試みた。

次に、これまでの研究で、ウイルスの構造タンパク質の組換え体をクルマエビに投与することで、ウイルスに対して抵抗性が高まることが明らかとなっている。しかし、この抗ウイルス応答の誘導機構に関わる因子は不明であるため、本研究において網羅的な遺伝子解析を実施し、本機構に関わる因子の探索を行った。

3. 研究の方法

血液中の多含有タンパク質の除去には様々な技法が報告されているが、哺乳類の多含有タンパク質の除去には抗体を利用した方法がしばしば用いられている。本課題では多検体処理を行う必要があることから、モノクローナル抗体 (mAb) を作製し、アフィニティーカラムや磁気ビーズ等を利用し、血リンパ中の多含有タンパク質の除去を試みた。抗原としてクルマエビの血リンパによるマウスの免疫を実施し、ヘモシアニンに対する mAb を産生するハイブリドーマを取得した。ハイブリドーマのスクリーニングはヘモシアニンの組換えタンパク質を合成し、ELISA 法により行った。

次に、高分子化合物を用いた沈殿法による多含有タンパク質の除去を試みた。様々な分子量の高分子化合物を複数の濃度で血リンパ液と混合し、遠心分離によりタンパク質を沈殿し、SDS-PAGE により、沈殿したタンパク質を評価した。

4. 研究成果

クルマエビの血リンパ液中に存在する抗ウイルス応答関連因子の挙動を把握することを目的として、検出系の構築やその因子の探索を試みた。血リンパ液中の多含有タンパク質であるヘモシアニンを認識する mAb を産生するハイブリドーマの作成を試みたところ、複数クローンが取得され、ELISA 吸光値が高い順に 8 クローンを選抜した。モノクローナル抗体をプロテイン G が標識された磁気ビーズに結合させ、血リンパ液中から当該タンパク質の除去を試みたが、標的タンパク質の含有量が著しく多く、ほとんど除去効果を示さなかった (図 1)。本来はポリクローナル抗体の使用が望ましいため、精製したヘモシアニンに対するポリクローナル抗体を利用した除去効果についても検討する必要があると考えられた。

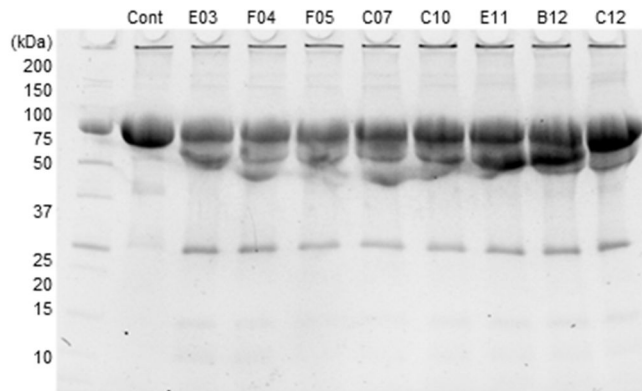


図1 抗体を用いたヘモシアニン除去の検討

次に、高分子化合物を血リンパ液と混合することにより、高分子側のタンパク質を沈殿させて除去する方法を試みた。結果として、ポリエチレングリコール (PEG) の分子量の大きさ、またその濃度が上がるにつれてより多くのタンパク質を沈殿する傾向が見られた (図2)。しかしながら、分子量 1000 から 4600 の範囲の PEG ではヘモシアニンはほとんど沈殿せず、分子量 6000 あるいは 8000 の 24%濃度において多くのヘモシアニンの沈殿が認められた。このように PEG を利用してヘモシアニンを除去し得る可能性が見出された。しかしながら、当該処理を施した血リンパ液のプロテオーム解析では微量タンパク質を検出するには至らず、より詳細な処理条件の検討が必要であると考えられた。

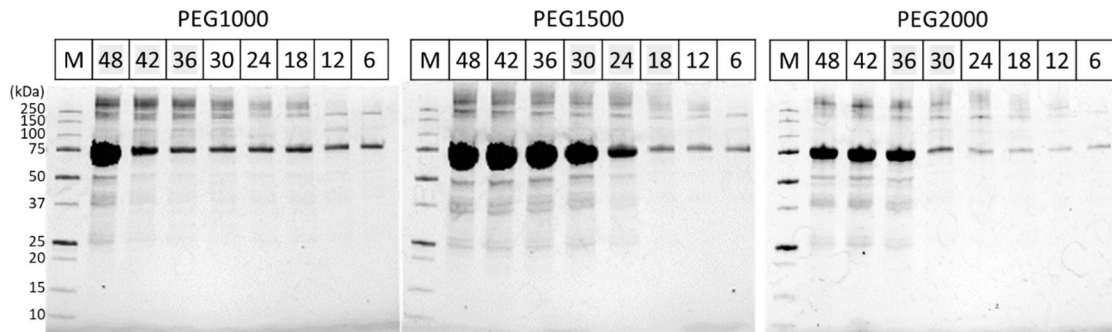


図2 PEG を用いた高分子タンパク質の沈殿 (還元 SDS-PAGE)

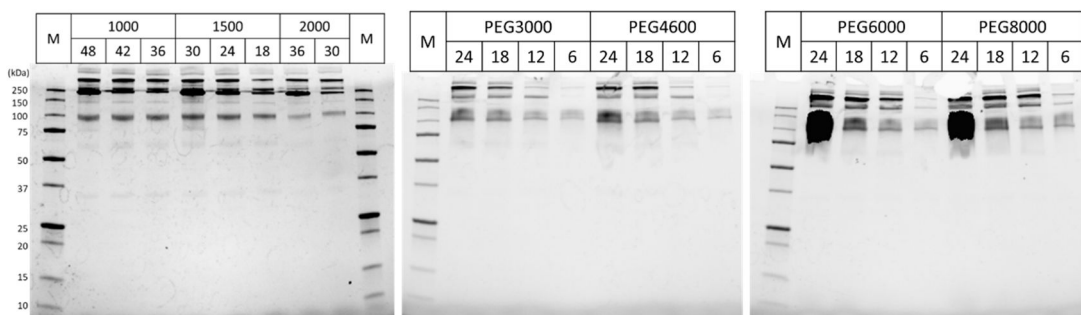


図3 PEG を用いた高分子タンパク質の沈殿 (非還元 SDS-PAGE)

次に、クルマエビの血リンパ液中には血球から分泌される抗ウイルス応答因子も存在すると考えられることから、抗ウイルス応答時の血球における網羅的遺伝子発現を実施した。抗ウイルス応答時の血球の遺伝子オントロジーエンリッチメント (GO) 解析により、リボソーム生成、リボソーム構築、あるいはタンパク質分解などに関わる遺伝子群の挙動が大きく変動していることが確認された (ボンフェローニ補正, $P < 0.05$)。

また、コントロールと比較して、マトリックスメタロプロテアーゼ群 (MMPs)、抗 LPS 因子、セリンプロテアーゼおよびフェノール酸化酵素活性化因子などの遺伝子発現が顕著に増加していた。一方で、アスタカイン、グルコース脱水素酵素、クラスチン、ファシクリン、カスパーゼなどの遺伝子発現は顕著に減少していた (図4)。

哺乳類の MMP-13 はウイルスの侵入により顕著に発現が増加することが知られているが、エビ類にも類似した機構が備わっている可能性も考えられた。抗 LPS 因子やクラスチンは抗菌性ペプチドとして報告されているが、細菌感染とウイルス感染において挙動が異なることがこれまでに報告されており、本結果の挙動の変化とも合致していた。アスタカインは甲殻類に特有の

サイトカイン様因子であり、造血に関与することが知られているが、新たに生体防御機構への関与が示唆された。

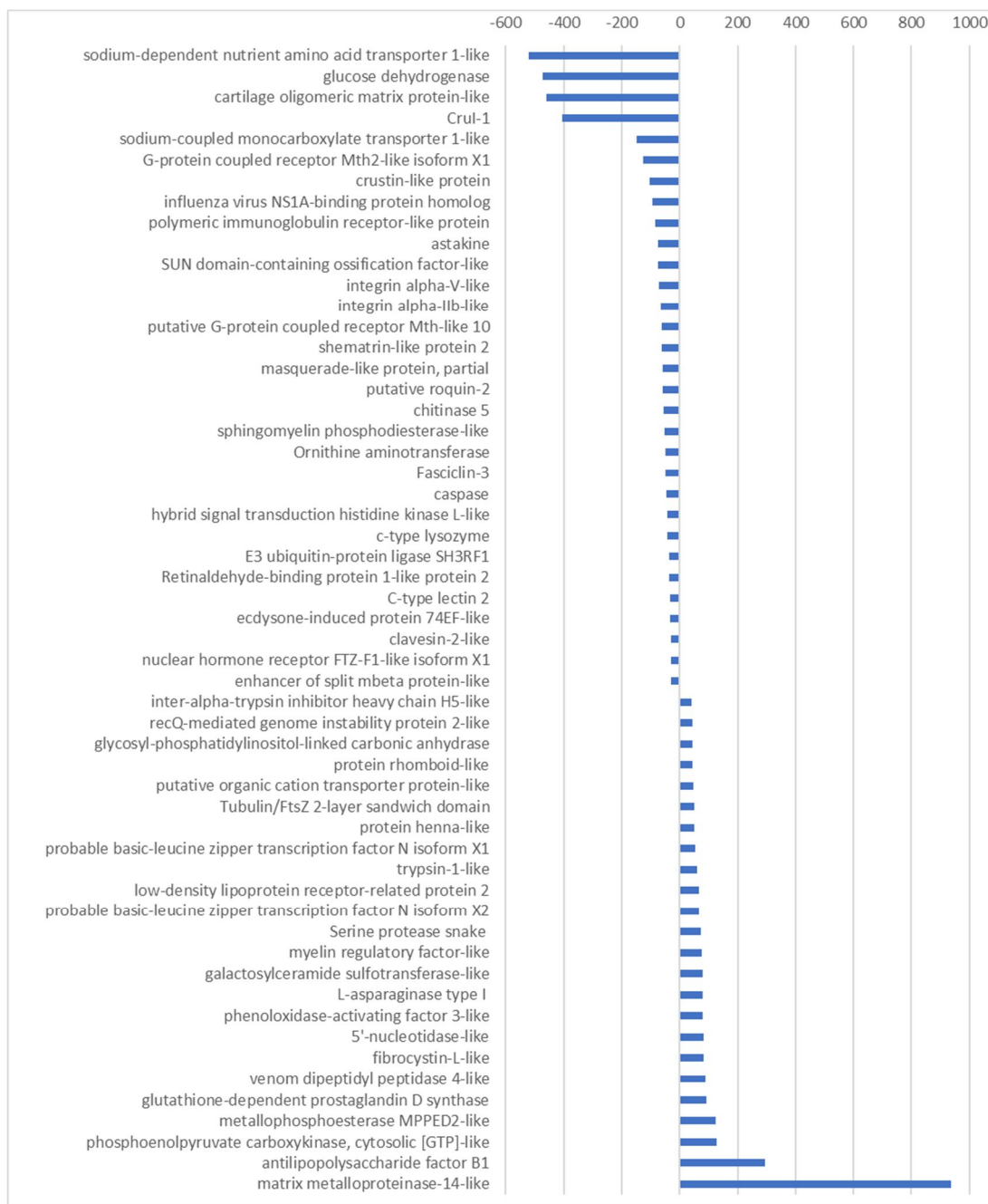


図4 発現量が30倍以下もしくは40倍以上に変動した遺伝子のリスト

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamura Y, Mekata T, Elshopakey GE, Itami T.	4. 巻 79
2. 論文標題 Molecular characterization and gene expression analysis of hypoxia-inducible factor and its inhibitory factors in kuruma shrimp <i>Marsupenaeus japonicus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fish and shellfish immunology	6. 最初と最後の頁 168-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2018.05.015	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 該当する

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） 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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村 洋、米加田 徹、Narantsog Choijookhuu、菱川善隆、引間順一、酒井正博、伊丹利明
2. 発表標題 クルマエビ(<i>Marsupenaeus japonicus</i>)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
3. 学会等名 平成30年度マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡村 洋、米加田 徹、稲田真理、Narantsog Choijookhuu、菱川善隆、伊丹利明
2. 発表標題 クルマエビ(<i>Marsupenaeus japonicus</i>)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
3. 学会等名 平成30年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2018年

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
---------	---------------------------	-----------------------	----