

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 8 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380109

研究課題名（和文） クルマエビの病原微生物感染に対する防御機構に関する研究

研究課題名（英文） Study on shrimp immune system against microbial pathogens

研究代表者

廣野 育生 (HIRONO IKUO)

東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：00270926

研究分野：魚介類免疫学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：クルマエビ、免疫、生体防御、RNA 干渉

1. 研究計画の概要

(1) 血球凝集因子の発現を RNA 干渉(RNAi)法により抑制した際に、遺伝子発現が抑制される遺伝子の特定と、そのメカニズムの解明

(2) RNA 干渉(RNAi)法により、これまでにクローン化して来た生体防御関連遺伝子をノックダウン(遺伝子産物発現抑制)し、これら生体防御関連遺伝子の生体内機能の解析を行うとともに、

(3) 2 本鎖 RNA 投与による微生物感染に対する感受性変化の検討ならびに耐病性との関係について検討

(4) クルマエビ類の生体防御関連遺伝子発現制御ネットワークの解明

2. 研究の進捗状況

クルマエビの抗菌タンパク質リゾチウムを RNA 干渉によりノックダウンすると病原微生物の攻撃試験しなくともエビが死亡することを明らかにした。そのメカニズムについて検討したところ、抗菌タンパク質をノックダウンすると血球数が減少することが分かった。リゾチウムをノックダウンすると他の抗菌タンパク質を発現する細胞の比率が増加することが明らかとなった。また、血液中の細菌数は増加し、2 日目に最大になることがわかった。さらに、抗菌剤入りの飼育水で抗菌タンパク質をノックダウンしたクルマエビを飼育すると死亡が抑制された。RNA 干渉法によりクルマエビリゾチウムの機能が抑制されても他の遺伝子の発現は抑制されないことを、マイクロアレイを用いて網羅的に確認した。リゾチウムノックダウンクルマエビでは体内の大腸菌に対する排除能を低下させ、さらにクルマエビ血リンパ中での増殖を可能にした。以上のことから、クルマエ

ビリゾチウムは生体内で少なくともグラム陰性菌の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。抗菌タンパク質のクラスチン様タンパク質あるいはプロフェノールオキシダーゼをノックダウンするとリゾチウムのノックダウンの際と同じような結果が見られたことから、クルマエビ類では一つ一つの抗菌タンパク質が免疫に重要な役割を果たしていることが示唆された。

クルマエビの血球凝集活性化因子であるトランスグルタミナーゼをノックダウンすると複数の免疫関連遺伝子の発現が抑制されることがマイクロアレイによる大規模遺伝子発現解析で明らかとなった。このことから、トランスグルタミナーゼは何らかの形で、免疫関連遺伝子の発現を調整していると考えられた。

クルマエビ類の遺伝子配列情報を蓄積するために大規模 EST 解析を行い、約 8 万配列を得た。これらを基にマイクロアレイを作製することが可能となった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進んでいる。計画している研究について、毎年研究成果を発表出来ている。

4. 今後の研究の推進方策

平成 23 年度から基盤研究(A)で研究が継続されることとなった。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Hirono I, Fagutao FF, Kondo H, Aoki T. (2011) Uncovering the Mechanisms of Shrimp Innate Immune Response by RNA Interference. Mar Biotechnol, in press
 2. Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. (2011) PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. Dev Comp Immunol. 35:115-124.
 3. Pongsomboon S, Tang S, Boonda S, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. (2010) A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. Fish Shellfish Immunol. 30: 439-446.
 4. Wang HC, Kondo H, Hirono I, Aoki T. (2010) The *Marsupenaeus japonicus* voltage-dependent anion channel (MjVDAC) protein is involved in WSSV pathogenesis. Fish Shellfish Immunol, 29:94-103
 5. Koyama T, Asakawa S, Katagiri T, Shimizu A, Fagutao FF, Mavichak R, Santos MD, Fuji K, Sakamoto T, Kitakado T, Kondo H, Shimizu N, Aoki T, Hirono I. (2010) Hyper-expansion of large DNA segments in the genome of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. BMC Genomics, 11:141
 6. Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. (2010) Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol, 28: 490-498.
 7. Dang LT, Koyama T, Shitara A, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2010) Involvement of WSSV-shrimp homologs in WSSV infectivity in kuruma shrimp; *Marsupenaeus japonicus*. Antiviral Res 88: 217-226.
 8. Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2009) Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. FEBS J. 276: 5298-5306
 9. Fagutao FF, Yasuike M, Santos MD, Ruangpan L, Sangrunggruang K, Tassanakajon A, Takahashi Y, Ueno R, Kondo H, Hirono I, Aoki T. (2009) Differential gene expression in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following administration of oxytetracycline and oxolinic acid. Dev Comp Immunol. 33: 1088-1092.
 10. Fagutao FF, Yasuike M, Caipang CM, Kondo H, Hirono I, Takahashi Y, Aoki T. (2008) Gene expression profile of haemocytes of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* following peptidoglycan stimulation. Mar Biotechnol, 10: 731-740.
 11. Pongsomboon S, Tang S, Boonda S, Aoki T, Hirono I, Yasuike M, Tassanakajon A. (2008) Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. BMB Rep. 41:670-677.
 12. Maningas MBB, Koyama T, Kondo H, Hirono I, Aoki T. (2008) A peroxiredoxin from Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* inhibited by peptidoglycan. Dev Comp Immunol., 32: 198-203.
 13. Maningas MBB, Kondo H, Hirono I, Taki T, Aoki T. (2008) Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. Mol. Immunol. 45:1269-1275.
- 〔学会発表〕(計 22 件)
主なもの 3 件のみを示した。
1. 古宮謙太・海津彰弘・近藤秀裕・廣野育生、RNA 干渉法を用いたクルマエビペナエジン様遺伝子の機能解析、平成 23 年度日本水産学会春季大会、2011 年 3 月 27-29 日、東京海洋大学
 2. I Hirono, T Koyama, A Kaizu, A Shitara, MBB Maningas, FF Fagutao, H Yamada, K Komiya, T Aoki, H Kondo, Molecular immunology on kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, Sixth International Symposium on Aquatic Animal Health、2010 年 9 月 5-8 日、タンパ、フロリダ
 3. 海津彰弘, 近藤秀裕, 青木宙, 廣野育生, クルマエビリゾチームの生体内での役割について、第 13 回マリンバイオテクノロジー学会、2010 年 5 月 29-30 日、広島大学