

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 24 年 5 月 15 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)

研究者番号：00270926

研究成果の概要（和文）：血球凝集因子を活性化する酵素 TGase の標的とした RNA 干渉により、血球凝集システムと免疫関連遺伝子発現制御に何らかの関連があることが分かった。クルマエビの抗菌タンパク質は体内に侵入して来た細菌の増殖抑制に重要であることが明らかとなった。非特異的 2 本鎖 RNA を接種したクルマエビでは非特異的に病原微生物に対してある程度の抗病性を示し、新規遺伝子が関与していることが示唆された。クルマエビ遺伝子の発現を網羅的に解析するマイクロアレイを開発した。

研究成果の概要（英文）：We identified that TGase is an important component of the shrimp immune response and is involved in the regulation of some immune-related genes particularly antimicrobial peptides. We also found the potential of non-specific dsRNA injection to shrimp to elicit antimicrobial response in shrimp. We developed the microarray of kuruma shrimp based on the EST analysis for further study of kuruma shrimp immune gene network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4400000	1320000	5720000
2009 年度	3500000	1050000	4550000
2010 年度	3500000	1050000	4550000
2011 年度	0	0	0
総計	11400000	3420000	14820000

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

FAO の統計によると 2001 年には世界の養殖エビの総生産量は 160 万トンに達し、その生産量は年々増加し、全養殖生産量の 1 割強を占めている。アジアならびに中南米で生産された養殖エビは欧米および日本に輸出されており、エビ養殖は開発途上国における重要な産業になっている。しかし、近年、微生物感染症が世界各地のエビ類養殖場で猛威を振るい、経済的に多大な被害を及ぼしている。我が国においては、高級食材としてクルマエビやイセエビの種苗生産および養殖技

術の開発が行われている。しかし、我が国も他の国と同様に養殖現場では種々の細菌やウイルスによる感染症が多発するようになって来ている。さらに、クルマエビ類（種苗を含む）は生体が国境を越えて行き来する事から、我が国に未侵入の病原微生物が何時、我が国のエビ類養殖場に発生するか分からない状況でもある。病原微生物の一部、特にウイルスは冷凍したのみでは死滅することではなく、冷凍後も生存し、冷凍エビが食品あるいは釣り餌として消費される際に、環境へ流出する可能性がある。実際、海外では釣り

餌用に輸入した冷凍エビによると思われる微生物感染症の発生例が国際学会で報告されている。これらのことより、クルマエビ類感染症の防除法の開発は急務であり、食糧資源を確保するために微生物感染症をエビ養殖場から激減あるいは撲滅させる防御対策が世界中で望まれている。そのためには、クルマエビ類の生体防御メカニズムを解明し、感染症に強いエビあるいはクルマエビ類の免疫システムを強化出来る技術を開発するための情報を蓄積する必要がある。一方、これらの感染症に起因する微生物は単一種ではなく種々細菌からウイルスに至る。細菌感染症は、特定の抗菌剤による治療が可能であるが、ウイルス感染症に対する治療薬はなく、ウイルス感染症が発生しても対処法がないのが現状である。また、抗菌剤の使用は薬剤残留や薬剤耐性菌の出現によるヒトの健康に及ぼすことが懸念されている。エビ類は獲得免疫を持たず、ワクチンによる防御は不可能である。しかし、感染症が発生した養殖場あるいは人為的に致死量の病原微生物を感染させても生存する個体が存在することがわかっている。このことは、特定の病原微生物の感染に対して耐性能を有する耐病性エビが存在する事を示唆している。クルマエビ類の生体防御メカニズムを分子レベルおよび個体レベルで研究し、情報を蓄積する事が出来れば、従来の微生物感染症の防除法とは異なる新しい防除法として病原微生物に対する耐病性を有するクルマエビ類の作出が考えられる。さらに、エビ類の生体防御機構の情報が蓄積されれば、将来、新たな感染症の防御法の開発や耐病性クルマエビ類の作出が可能になる。

2. 研究の目的

本研究ではクルマエビ類の生体防御機構、特に血球凝集因子と生体防御関連遺伝子の発現調節に関するメカニズムの解明を行う。本研究費の交付を希望する期間内に、(1) 免疫・生体防御関連遺伝子を 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とそのメカニズムの解明ならびに生体内機能の解析を行うとともに、(2) 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し、最終的に(3)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を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(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

血球凝集因子あるいは血球凝集因子を活性化する酵素 TGase の標的とした RNA 干渉により、

血球凝集が抑制されたクルマエビを作出した。このクルマエビより血球、リンパ様器官および肝臓を摘出し、発現している mRNA を抽出精製した。次いで、我々が開発したクルマエビ類の遺伝子発現解析用マイクロアレイにて約 5,000 種類の遺伝子発現変動を調べた。マイクロアレイ解析により遺伝子発現変動した遺伝子を探索した。

(2) RNA 干渉(RNAi)法による生体防御関連因子の機能解析

クルマエビよりクローン化した抗菌タンパク質(c型 Lysozyme、Penaeidin および Crustin) 遺伝子の発現抑制を RNA 干渉(RNAi)法により行った。次いで、これら遺伝子の発現抑制を行ったクルマエビの生存について観察するとともに、クルマエビ類の病原細菌である *Vibrio penaeicida* およびホワイトスポット病ウイルス WSSV を用いた感染実験を行い、これら遺伝子の存在と病原微生物に対する感受性の変化を調べた。

(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

2本鎖 RNA を接種したエビは非特異的に病原微生物に対してある程度の耐性を示すことから、2本鎖 RNA を接種したクルマエビについて、遺伝子発現変動する遺伝子を明らかにするためにマイクロアレイを用いた大規模遺伝子発現プロファイリングを行った。

(4) クルマエビ類に生体防御関連遺伝子発現制御ネットワークの解明のための基盤技術の構築

マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な解析を可能にするためにクルマエビ各種組織(血球、リンパ様器官、肝臓、腸管、表皮、エラ)で発現している遺伝子の配列情報収集を次世代シーケンサーにより行った。

4. 研究成果

(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

血球凝集因子を活性化する酵素 TGase の標的とした RNA 干渉により、血球凝集が抑制されたクルマエビを作出し、このクルマエビ血球における遺伝子発現変動について、我々が開発したクルマエビ類の遺伝子発現解析用マイクロアレイにて遺伝子発現変動を調べたところ、いくつかの免疫関連遺伝子において発現に変化が見られた。このことから、血球凝集システムと免疫関連遺伝子発現制御に何らかの関連があることが分かり、今後、エビ類の免疫研究に重要な情報を得ることが出来た。

(2) RNA 干渉(RNAi)法による生体防御関連因子の機能解析

クルマエビよりクローン化した抗菌タンパク質 (Penaeidin, c 型 Lysozyme) 遺伝子のサイレンシングを行ったところ、病原微生物の感染無しにクルマエビの斃死がみられたことから (図 1)、抗菌タンパク質は通常のエビの生存に重要な因子であることが示唆された。さらに、これら遺伝子のサイレンシング後に血中の細胞数が減少することと、血中の細菌が増加していることが分かった。これらのことより、抗菌タンパク質は体内に侵入して来た細菌の増殖抑制に重要であることが明らかとなった。しかし、Crustin をノックダウンした場合にはクルマエビは斃死せず、通常の飼育環境においては本研究で調べた他の抗菌タンパク質程、生存に重要ではないことが示された。Crustin をノックダウンし、*Vibrio penaeicida* で感染試験を行ったところ、対象区と比較して感受性が高くなり、生体防御に重要であることが示された。

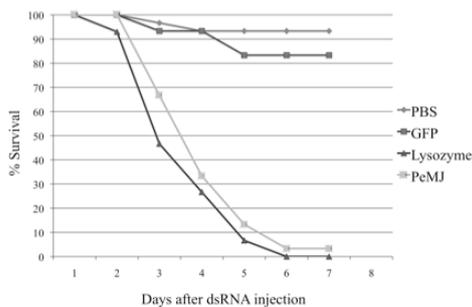


図 1 抗菌タンパク質 (Penaeidin, c 型 Lysozyme) 遺伝子のサイレンシングによるクルマエビの死亡観察

(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

2 本鎖 RNA を接種したクルマエビは非特異的に病原微生物に対してある程度の耐性を示すことから、2 本鎖 RNA を接種したクルマエビ血球で発現する遺伝子についてマイクロアレイで解析を行い (図 2)、発現上昇が見られた遺伝子の cDNA 断片をクローン化し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列は既知の配列とは相同性がみられなかったことから、新規遺伝子であることが示唆された。

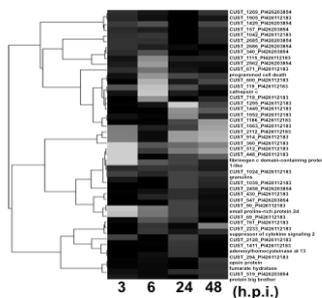


図 2 マイクロアレイ解析の結果

(4) クルマエビ類に生体防御関連遺伝子発現

制御ネットワークの解明のための基盤技術の構築

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。これらを基に約 5,000 のユニークな配列をスポットしたマイクロアレイを作製することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(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 10 件)

- ①. Fagutao FF, Yasuie 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. DOI: 10.1007/s10126-008-9110-0
- ②. 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 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x
- ③. Fagutao FF, Yasuie M, Santos MD, Ruangpan L, Sangrungruang 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. DOI: 10.1016/j.dci.2009.05.010
- ④. 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. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.08.017
- ⑤. 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. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.01.003
- ⑥. 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.
DOI:10.1186/1471-2164-11-141

- ⑦. 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.
DOI: 10.1016/j.fsi.2010.02.020
- ⑧. 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.
DOI: 10.1016/j.fsi.2010.10.015
- ⑨. Hirono I, Fagutao FF, Kondo H, Aoki T. (2011) Uncovering the Mechanisms of Shrimp Innate Immune Response by RNA Interference. Mar Biotechnol, 13: 622-628.
DOI: 10.1007/s10126-010-9292-0
- ⑩. Danwattananusorn T, Fagutao FF, Shitara A, Kondo H, Aoki T, Nozaki R, Hirono I. (2011) Molecular characterization and expression analysis of heat shock proteins 40, 70 and 90 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish Sci, 77: 929-937.
DOI: 10.1007/s12562-011-0394-z

[学会発表] (計 21 件)

- ①. Ikuo Hirono, Molecular biology of shrimp, 2010 Symposium on Biotechnology Development in Taiwan, 2010年4月20日, National Cheng Kung University(台南市、台湾)
- 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6-8日, タンパマリオートウオーターサイドホテル(タンパ、フロリダ)
- ③. A Kaizu, H Kondo, T Aoki and I Hirono, Shrimp lysozyme is important to regulate gram-negative bacteria in haemolymph, Sixth International Symposium on Aquatic Animal Health, 2010年9月6-8日, タンパマリオートウオーターサイドホテル(タンパ、フロリダ)

- ④. 古宮謙太・海津彰弘・近藤秀裕・廣野育生、クルマエビのペナエジン様 cDNA 構造および RNA 干渉による機能解析、平成 22 年度日本水産学会秋期大会、2010 年 9 月 22 日、京都大学(京都府)

- ⑤. Ikuo Hirono, Molecular Immunology and Genomics of Shrimp, ABIC 2009: Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment, 22~25 September 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣野 育生 (Ikuo HIRONO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：00270926

(2)研究分担者

近藤 秀裕 (Hidehiro KONDO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号：20314635