

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06247

研究課題名(和文) クルマエビ抗微生物性ペプチド群の抗ウイルス応答時の挙動

研究課題名(英文) Behavior of antimicrobial peptides in kuruma shrimp during antiviral response

研究代表者

米加田 徹 (Mekata, Tohru)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40597944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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うち、抗微生物性ペプチド群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。抗ウイルス応答を誘導させたクルマエビの血リンパ液を採取し、限外ろ過カラムにより多含有タンパク質を除去したのち、質量分析や遺伝子解析により抗微生物性ペプチド群の検出を試みたところ、C型リゾチームや複数種の抗LPS因子が検出された。抗ウイルス応答時に、いずれの因子も発現量の増加が認められたことから、ウイルス感染時に当該因子群が重要な役割を担っていると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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世界的に望まれている。このような疾病の被害を未然に防ぐために、免疫賦活剤や感染防除対策に関する研究開発が行われている。このような研究の中で、エビ類の抗ウイルス免疫能を向上させる物質が発見されてはいるが、その作用機序は不明なままである。このような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 antimicrobial peptides among the factors related to the antiviral response in the hemolymph of shrimp, the identification of these factors and the construction of a detection system were conducted. After collecting the hemolymph from shrimp that had induced an antiviral response and removing Highly Abundant Proteins by ultrafiltration column, the detection of anti-microbial peptides was attempted by mass spectrometry and genetic analysis. The analysis revealed that C-type lysozyme and several anti-LPS factors were detected in the hemolymph. Furthermore, the expression levels of all factors were increased during antiviral response, suggesting that these factors play an important role during viral infection.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：抗微生物性ペプチド クルマエビ ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

世界のエビ類養殖生産は、年間約 550 万トン、生産額にして 3.7 兆円にも達し、この 20 年間で約 6 倍もの急激な成長を遂げ、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(図1)。ところが、このような急激な集約的生産の増加に伴い、細菌性やウイルス性疾患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、遺伝子検査、育成環境の改善のためのプロバイオティックスの投与などが実施されている。また、免疫力を増強させ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進められている。

エビ類の疾病の中でも最も深刻な疾病としてクルマエビ急性ウイルス血症(WSD)が世界的に知られており、非常に大きな問題である。多くの機関で本疾病の防除に関する研究が進められている。

さて、このような WSD の防除に向けた取り組みの中で非常に興味深い現象が見出された。それは、「WSD に感染耐過した個体が再感染に抵抗性を持つ」という現象である。エビ類は無脊椎動物であり、脊椎動物が有するような獲得免疫機構は有していないため、本現象は、特異抗体等による生体防御機構とは異なる機構が関与していると考えられる。

近年の生体防御機構に関する研究により、エビ類においてもパターン認識受容体が存在しており、適応免疫系に比べてその程度は低いものの、自然免疫系においてもある程度特異的に病原体を認識する機構が存在していると考えられている。また、昆虫類では、これらのパターン認識受容体を介するシグナル伝達により、抗菌ペプチドの産生が誘導されることも明らかとなっている。このような異物認識機構が、感染耐過時の一過的な抵抗性獲得に関与している可能性も考えられる。

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、これらの機構は解明されていない。この感染防御機構を把握するためにも、より詳細な研究が必要である。

これまで、脊椎動物やモデル生物であるショウジョウバエでは、多くの研究が報告されており、血リンパ液中の抗微生物性ペプチドの機能が明らかにされつつある。しかし、甲殻類においては、参考となるモデル生物がないことやゲノム情報が充分でないことから、遺伝子分離や遺伝子同定が困難である。クルマエビの血中に存在する抗微生物性ペプチドの同定や動態を把握することで、甲殻類の新たな生体防御機構が明らかとなり、また罹病時におけるこれらの生体防御因子の役割についても重要な知見が得られる事が期待される。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、ある種の細菌やウイルスの構成成分をクルマエビ生体に投与することで、抗微生物性ペプチド群の遺伝子発現量が顕著に変動すること、また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物質が分泌されることが明らかとなっている。このように、血リンパ液には明らかに病原体に対して対抗するペプチドが存在していると推察される。

本研究では、これらの抗微生物性ペプチド群について、それら遺伝子の同定ならびに当該分子の測定系を構築し、抗ウイルス性因子としての機能解明を図ることを目的とする。

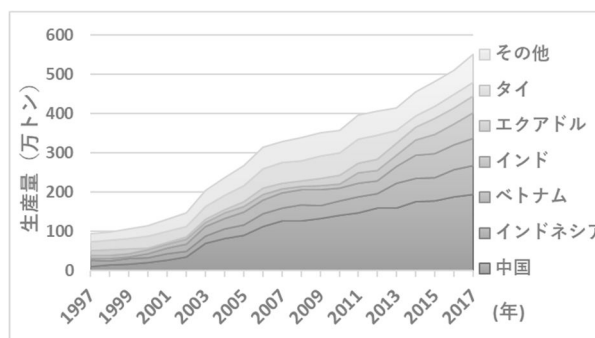


図1 国別エビ類生産量の推移 (FishStatJ)

3. 研究の方法

クルマエビの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ものの、ペプチド分子そのものの動態に関する研究については非常に情報が少ない。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ペプチド分子情報が得難いということもその要因として挙げられる。しかしながら、近年になり、複数種のエビ類のゲノム情報が徐々に明らかになりつつあり、質量分析によるタンパク質の同定精度も格段に向上している。そこで、本研究課題では抗ウイルス免疫応答時に発現量が変動する抗微生物性ペプチド群の同定を質量分析により試みた。また、抗ウイルス免疫応答の誘導については、クルマエビ急性ウイルス血症原因ウイルス（WSSV）のエンペロープを構成する VP28 の組換えタンパク質の接種により行うこととした。

同定された抗微生物性ペプチドについては、抗体等を作製し、ELISA 法やウエスタンブロットリングなどにより、病原体による攻撃後の血リンパ中濃度の変化を捉え、その生体防御機構への関与について評価を行う。生体防御への関与が認められたペプチド分子については、免疫組織染色等の手法により産生・分泌される組織あるいは細胞を探索する。これらの情報から、罹病時にどの組織からどのようなペプチド分子が血リンパ中に分泌されるのか明らかとなる。抗微生物性ペプチド群の産生誘導機構の一端を把握するために、抗ウイルス免疫応答時の個体から採取した血球より RNA を抽出し、経時的に遺伝子発現の変化を解析する。

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うち抗微生物性ペプチド群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。クルマエビの血リンパ液にはヘモシアニンと呼ばれる酸素を運搬するタンパク質が存在しているが、ヘモシアニンの血リンパ液中の存在量は極めて多く、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、存在量の少ないタンパク質の量を測定することは非常に困難であるため、解析の際にはヘモシアニンをできる限り除去する必要がある。高分子ポリマーや硫酸アンモニウムなどを活用したタンパク質の凝集沈殿等により多含有タンパク質の除去を試みたが、異なるサンプル間で安定した処理を行うことが極めて困難であった。そこで、さらなる方法により多含有タンパク質の除去を試みたところ、複数の限外ろ過カラムを使用することで、効率的かつ安定的にヘモシアニンを含む高分子側の多含有タンパク質を除去可能であることが明らかとなった。本解析系により、血リンパ液中の微量タンパク質の量的把握がより高精度に実施可能となった（図 2）

抗ウイルス応答時に変動するタンパク質を捉えるために、ウイルス構造タンパク質を接種し、抗ウイルス応答を誘導させたクルマエビの血リンパ液を採取し、血球分画および高分子側多含有タンパク質を除去した後、ショットガンプロテオーム解析を実施した。解析の結果、抗微生物ペプチドとして知られる C 型リゾチームが検出され、ウイルス接種後 48 時間後に対照区と比較して約 1.5 倍の発現量の増加を認めた。このようにウイルスの感染を受けて血清中に C 型リゾチームの分泌が促進されることが明らかとなった。

ところが、これまでの網羅的遺伝子発現解析では、抗菌ペプチドとして知られる抗 LPS 因子の増加が認められていたが、血リンパ液のプロテオーム解析ではこれらの因子は不検出となり、その挙動をとらえるには至らなかった。そこで、血リンパ液ではなく、血球中のタ

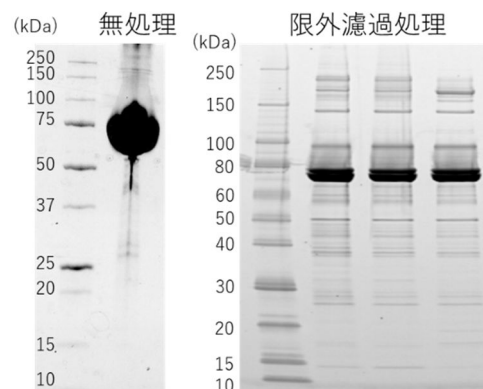


図2 多含有タンパク質の除去

ンパク質も併せてさらなる解析を実施した。その結果、3種の抗LPS因子ファミリーが検出され、またこれらのタンパク質の抗ウイルス応答誘導群の発現量は対照群よりも高い値を示した(表1)。

表1 抗ウイルス応答誘導時に産生量が増加した抗微生物ペプチド群

GenBank ID	遺伝子名	相対定量値	
		対照区	VP28接種区
ASR74829	antilipoplysaccharide factor B1	250.4	1050.6
XP_042869033	anti-lipoplysaccharide factor-like	ND	1066.6
XP_042869048	anti-lipoplysaccharide factor-like	106.1	813.0

このように、抗LPS因子は血球中で産生され、抗ウイルス応答時にはその産生量が増えることが明らかとなった。そこで、抗LPS因子に対するペプチド抗体を作製し、イムノアッセイによる検出系の構築を試みた。しかしながら、今回作製した抗体による検出は特異性や感度が低く、抗LPS因子を検出するには至らなかった。

抗ウイルス免疫応用に関わる抗微生物性ペプチドの血中濃度の測定は困難であったため、抗ウイルス応答を誘導したクルマエビの血球からRNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析による当該因子の遺伝子検出を試みた。

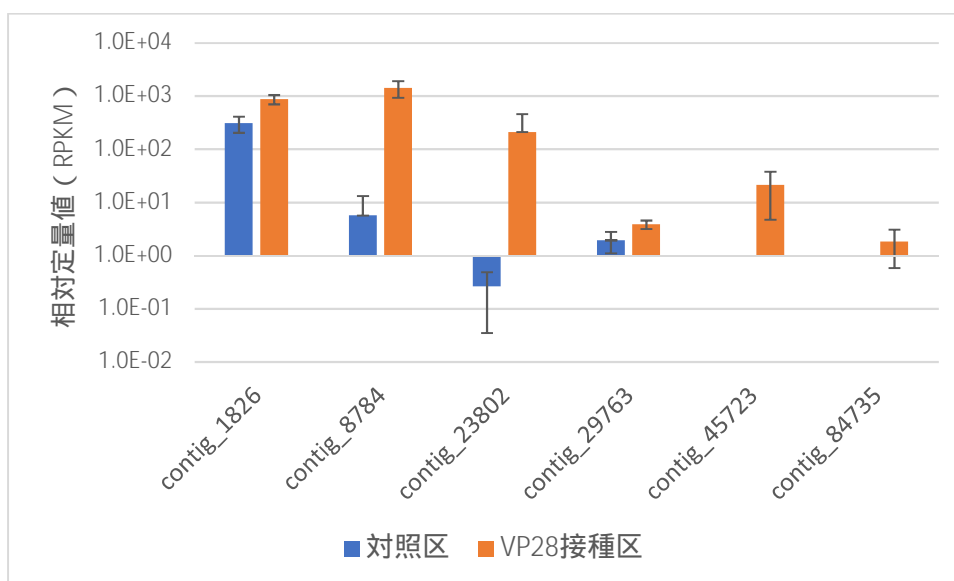


図3 抗LPS因子群の発現量の比較

解析の結果、抗LPS因子と推定されるコンティグが6つ確認され、少なくとも血球において6つの抗LPS因子が発現していることが明らかとなった。質量分析および遺伝子解析により検出された抗LPS因子の遺伝子配列の相同性解析を行ったところ、contig_1826はXP_042869048、contig_8784とcontig_23802はASR74829のホモログで、その他のコンティグは質量分析によって検出された抗LPS因子とは別の遺伝子であることが示された。さらに、抗ウイルス応答を誘導した区での遺伝子発現量を対照区と比較したところ、いずれも有意に高い値 ($p\text{-value} < 0.05$, FDR補正) となった(図3)。以上の事から、抗ウイルス応答に関わる抗微生物性ペプチドとして、複数の抗LPS因子が重要な役割を担っていると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mekata Tohru	4. 巻 125
2. 論文標題 Strategy for understanding the biological defense mechanism involved in immune priming in kuruma shrimp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 104228 ~ 104228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2021.104228	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 Boonyakida Jirayu, Xu Jian, Satoh Jun, Nakanishi Takafumi, Mekata Tohru, Kato Tatsuya, Park Enoch Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of antigenic domains and peptides from VP15 of white spot syndrome virus and their antiviral effects in Marsupenaeus japonicus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12766 ~ 12766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92002-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Boonyakida Jirayu, Xu Jian, Satoh Jun, Nakanishi Takafumi, Mekata Toru, Kato Tatsuya, Park Enoch Y.	4. 巻 101
2. 論文標題 Antigenic properties of VP15 from white spot syndrome virus in kuruma shrimp Marsupenaeus japonicus	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
1. 著者名 Ito Mana, Satoh Jun, Hano Takeshi, Mekata Tohru, Ito Katsutoshi	4. 巻 208
2. 論文標題 Immune toxicity of phenanthrene and its combined effects of white spot syndrome virus on the survival of kuruma shrimp (Penaeus Japonicus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 111640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.111640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jirayu Boonyakida, Jian Xu, Jun Satoh, Takafumi Nakanishi, Toru Mekata, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park
2. 発表標題 Identification of Effective Peptide Derived from WSSV-VP15 for Protection of Masupenaeus Japonicus Against WSSV
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 純・米加田徹
2. 発表標題 クルマエビの免疫様現象関連因子の発現抑制によるWSSVへの抵抗性について
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------