

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23248029

研究課題名(和文) クルマエビ類の生体防御機構と病原微生物間の相互作用に関する免疫・ゲノム科学研究

研究課題名(英文) Immunological and genomic studies on interaction between kuruma shrimp immune and biodefense and microbial pathogens

研究代表者

廣野 育生 (Hirono, Ikuo)

東京海洋大学・その他部局等・教授

研究者番号：00270926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌タンパク質のc型リゾチウムおよびペナエジンはクルマエビの生存に必須のタンパク質であることが明らかになった。また、i型リゾチウムおよびクラスチンは生存に影響は無かった。遺伝子配列情報収集によりクルマエビのマイクロアレイを大幅にバージョンアップ出来ることができた。本研究で明らかにした配列を含む33種類のWSSV類似遺伝子のうち2種類(WSSV-H1および-H2)について解析を行い、WSSV類似遺伝子とWSSV感染との関連性について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that c-type lysozyme and penaeidin like peptide are necessary for normal living of shrimp. In contrast, shrimp can survive without i-type lysozyme and crustin in normal environmental condition. We succeeded to develop a kuruma shrimp microarray with about 10,000 unique sequences. We revealed that 2 of WSSV homologues WSSV-H1 and -H2 in shrimp genome have some roles for WSSV infection or replication in shrimp.

研究分野：魚介類分子免疫学

キーワード：クルマエビ WSSV RNA干渉 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

クルマエビ類は、生産効率が良いことから発展途上国を中心として養殖が盛んに行われている。FAO の統計によると 2006 年には世界の養殖エビの総生産量は 310 万トンに達し、その生産量は年々増加し、全養殖生産量の約 1 割で、生産額では 15% (約 1.2 兆円) を占めている。2005 年の世界の水産物の輸出量でみるとエビ類輸出量は全体の 5% で、輸出額では全体の約 16% を占めている。この数字を魚類と比較してみると、サケ類の輸出量は全体の 4.3% で、輸出額では約 11% を占めており、マグロ類では輸出量は全体の 6.6% で、輸出額は全体の約 8.6% である。これらの数字から、エビ類は食資源としても産業としても世界的に重要であることは明らかである。これまでに、クルマエビに関する大型の研究事業として、我々の研究ではないが、農業・食品産業技術総合研究機構の事業で、海産無脊椎動物のホルモンに関する研究やクルマエビ類であるバナメイエビの養殖技術開発やクルマエビの健苗育成技術開発が進められており、価値ある成果が輩出されている。しかし、クルマエビ類の養殖現場では種々の細菌やウイルスによる病原微生物感染症が多発し、経済的に多くの被害を関係企業に与えている。我が国の場合、クルマエビは養殖のみならず種苗放流もされているが、各地の水産種苗センター等で作られる放流用種苗の病原ウイルスキャリアー検査で陽性個体が見つかることと全廃棄となることもあり、その経済的な被害は多大なものである。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。このような背景のもと、微生物感染症をクルマエビ類の種苗生産場ならびに養殖場から撲滅させる防御対策・技術が世界中で望まれており、対策方法の開発研究は不可欠である。一般的にクルマエビ類の細菌感染症に対しては抗菌剤が使用されているが、薬剤残留や薬剤耐性菌の出現によるヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。ウイルス感染症に対しては有効な薬剤はなく、また、クルマエビ類は獲得免疫を持たないことからワクチンによる感染の防御は不可能である。クルマエビ類の免疫・生体防御機構を分子レベルで研究し、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方法の開発が出来ると考えられる。

近年のクルマエビ類養殖産業の拡大とともにクルマエビ類の生体防御に関する研究は世界中で増加して来ている。さらに、クルマエビ類の生体防御に関する研究が増加して来ている別の理由に、EST 解析等による遺伝子配列情報の蓄積がある。しかし、これまでに報告されている多くの研究は遺伝子の構造あるいは発現解析のみで、実際に機能解析に至っている研究はほとんどない。しかし、我々は RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン、すなわち解析対象遺伝子の機能阻害をクルマエビで可能にし、クルマエビ生体中での研究対象分子の免疫学的な重要性や役割についての研究を行って来ている。

我々はこれまでに科学研究費基盤研究等により、クルマエビの生体防御機構に関する研究として他の生物で同定されている免疫・生体防御関連因子がクルマエビにおいても生体防御に重要であるかどうかについてこれまでの研究の中でも新奇性の高い研究成果として、我々がクローン化した複数種類の抗菌タンパク質のうち、いずれか 1 種類をノックダウンするだけで、クルマエビは死に至ることを明らかにしたことである。今のところ、抗菌タンパク質を 1 種類ノックダウンするだけで、クルマエビが死に至るメカニズムは明らかではないが、このことを明らかに出来れば、クルマエビ類の免疫・生体防御機構を理解するための研究を飛躍的に発展出来るものと考えている。また、我々はクルマエビのゲノムレベルでの免疫・生体防御研究を展開するためにクルマエビの BAC ライブラリーを構築した。この BAC ライブラリーの解析過程で、クルマエビゲノム中には少なくとも数 100kbp を一つの単位とする巨大な繰り返し配列ユニットが存在することを明らかにした。この巨大な繰り返し配列ユニットはクルマエビゲノム中に少なくとも 100 コピー以上存在することも分かった。この繰り返し配列ユニットには多数の遺伝子がコードされていることを BAC クローンの塩基配列解析により明らかにしたが、興味あることに、この繰り返しユニットにはクルマエビ類の病原ウイルスであるホワイトスポットシンドロームウイルス(WSSV)のゲノムに存在する機能未知遺伝子の類似遺伝子(ホモログ)が複数存在することを明らかにした。さらに、別の BAC クローンを解析することにより現在までに 16 種類の WSSV 遺伝子のホモログ遺伝子を同定している。これら遺伝子の発現は、WSSV 感染により発現が上昇するものと減少するものが存在し、WSSV 感染と

何らかの関係がある結果を得ている(平成 22 年度日本水産学会秋季大会にて発表)。さらに、解析した BAC クローン中には種々のマイクロサテライト配列が存在しており、巨大ユニット毎にマイクロサテライトの繰り返し数が異なることも明らかにし、真にマルチコピーとしてクルマエビゲノム中に存在することを明らかにした。ゲノム解析が行われている節足動物のうち、カイコでは免疫・生体防御に関連する遺伝子が詳細に解析されている。カイコのゲノム中には病原ウイルスの類似遺伝子が存在することが明らかにされているが、そのような遺伝子のコピー数は 1~2 コピーで、我々がみつけたもののように 100 コピーも存在するものはカイコには存在していない。少なくとも、クルマエビのゲノムには、これまでにゲノム解析された生物には見られない特徴的な構造が存在し、そこにコードされている遺伝子の中には免疫・生体防御あるいは病原微生物の相互作用に関連する分子がコードされていることが、我々のこれまでの研究により強く示唆されている。

2. 研究の目的

クルマエビ類養殖は世界各地で行われ重要な産業となっている。しかし、クルマエビ類養殖が盛んになるとともに、病原微生物による感染症が発生し、その経済的な被害が問題となっている。感染症を撲滅するためには宿主となる生物の免疫・生体防御機構を知る必要があるが、クルマエビ類については、まだ詳細には明らかになっていない。さらに、宿主であるクルマエビの免疫・生体防御機構と病原微生物との相互作用についても不明であることから、本研究では RNA 干渉による遺伝子機能のノックダウンを駆使し、特に、抗菌タンパク質の生体内での役割について明らかにする。さらに、我々がその存在を明らかにしたクルマエビゲノム中にある巨大繰り返し配列とその中に存在するクルマエビ病原ウイルス遺伝子の類似遺伝子のウイルス感染における役割を調べ、クルマエビ免疫と病原微生物との相互作用について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クルマエビの抗菌タンパク質の生体内機能

RNA 干渉法によるノックダウンを行い、クルマエビの生存に必須であるかどうかを調べた。さらに、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、抗菌タンパク質のノックダウンによる他の遺伝子発現への影響についても調べた。

(2) マイクロアレイを用いた大規模遺伝子発現による免疫機能の解明

抗菌タンパク質およびクルマエビゲノム中存在する WSSV ホモログ遺伝子をノックダウンした際における、他の遺伝子の発現への影響について、オリゴ DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を購入予定のスクリーナーにより行った。

本研究に用いるオリゴ DNA マイクロアレイを充実させるために、次世代シーケンサーを利用した各種組織・細胞の発現遺伝子配列情報の収集を行った。

(3) クルマエビゲノム中存在している病原ウイルス WSSV の遺伝子ホモログの機能解析

クルマエビ類のゲノム中に存在する巨大繰り返しユニットにコードされている WSSV の遺伝子ホモログと病原ウイルス感染との関係を明らかにすることを目的とし、以下のことを検討した。

これまでの研究により WSSV ホモログ遺伝子は少なくとも 22 種類はあることが分かっている。まず、これら WSSV ホモログ遺伝子をクルマエビゲノムから可能な限りクローン化し、構造を明らかにする。我々は既にクルマエビゲノムの BAC ライブラリーを構築していることから、このライブラリーを解析 (BAC エンドシーケンシング) することにより、網羅的に遺伝子を探索した。

これまでにクローン化し、構造を明らかにしている WSSV ホモログ遺伝子については、RNA 干渉によりノックダウンし、WSSV 感染実験によりウイルス感染に与える(ウイルスの増殖抑制あるいは増強効果)するかどうかをクルマエビの斃死率を調べた。

4. 研究成果

(1) クルマエビの抗菌タンパク質の生体内機能
我々がこれまでにノックダウンすることによりクルマエビが斃死することを確認している抗菌タンパク質の c 型リゾチウムおよびペナエジンについて遺伝子をノックダウンするとクルマエビは死に至ることから、生存に必須のタンパク質であることが明らかになった。また、i 型リゾチウムおよびクラステンをノックダウンしたところクルマエビの生存に影響は無かった。さらに、病原細菌である *Vibrio penaeicida* あるいはホワイトスポット病ウイルス(WSSV)を用いた感染実験において、対象区とした 2 本鎖 GFP-RNA 接種区と死亡率に差はなく、これら分子は免疫、生体防御にとって、重要ではないことが示唆された。

(2) マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイを用いた解析により、2本鎖RNAを接種した際に種々の遺伝子発現に変動があることを明らかにした。これら遺伝子は既知の配列と相同性を示すものは無く、新規の遺伝子群であることが示唆された。現在のマイクロアレイには約5千個の配列が搭載されているが、この数を増やすために大規模遺伝子発現配列解析を実施し、これまでに約1万5千のユニークな配列を同定した。クルマエビのマイクロアレイを大幅にバージョンアップ出来ることができた。

(3) クルマエビゲノムに存在している病原ウイルスWSSVの遺伝子ホモログの機能解析

本研究で明らかにした配列を含む33種類のWSSV類似遺伝子について予備的な試験を行い、WSSVの観戦増殖に関連することが示唆された2種類(WSSV-H1およびH2)について解析を行い、WSSV類似遺伝子とWSSV感染との関連性について探求することを目的とした。

2種類のWSSV類似遺伝子についてWSSV感染前後における発現動態の解析を行った。WSSV-H1はWSSV感染後のエラ、血球および胃においてmRNA蓄積量が有意に上昇し、WSSV感染後の肝臓においてmRNA蓄積量が有意に減少した。WSSV-H2はWSSV感染後のエラ、心臓、リンパ様器官および胃においてmRNA蓄積量が有意に上昇し、WSSV感染後の肝臓においてmRNA蓄積量が有意に減少した。しかし、WSSV感染前後における血球およびエラにおいてWSSV-H1およびWSSV-H2のタンパク質発現に変動は見られなかった。

次にRNA干渉法を用いてWSSV類似遺伝子の機能を抑制し、WSSV感染後の累積死亡率について解析を行った。dsRNA接種後2日目にWSSVに感染させたところ、WSSV-H1の機能を抑制した試験区はコントロール区の累積死亡率とほぼ同様の傾向を示し、WSSV-H2の機能を抑制した試験区ではPBS接種区の累積死亡率に対し有意に抑制された。感染後3日目のエラにおけるWSSVコピー数はdsWSSV-H1接種区と対照区で差は見られなかったが、dsWSSV-H2接種区においては他のどの試験区に対しても有意に少なく、WSSVがWSSV-H2をサイレンシングしたクルマエビ内でWSSVが増殖していないことが示唆された。

本研究により、WSSV-H1およびWSSV-H2はWSSVの感染に何らかの形で関与していると考えられた。

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12件)

Hipolito SG, Shitara A, Kondo H, Hirono I. (2014) Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol.* 46:461-469.

Hung MN, Shiomi R, Nozaki R, Kondo H, Hirono I. (2014) Identification of novel copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) genes in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 40: 472-477.

Suraprasit S, Methatham T, Jaree P, Phiwsaiya K, Senapin S, Hirono I, Lo CF, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. (2014) Anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 from *Penaeus monodon* (ALFPM3) exhibits antiviral activity by interacting with WSSV structural proteins. *Antiviral Res.* 110C: 142-150.

Posiri P, Kondo H, Hirono I, Panyim S, Ongvarrasopone C. (2014) Successful yellow head virus infection of *Penaeus monodon* requires clathrin heavy chain. *Aquaculture*, 435: 480-487.

Maningas MB, Kondo H, Hirono I. (2013) Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish Shellfish Immunol*, 34:968-72.

Koyama T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2013) Identification of two penelope-like elements with different structures and chromosome localization in kuruma shrimp genome. *Mar. Biotechnol.* 15:115-23

Shitara A, Kondo H, Hirono I. (2013) New type of heat shock protein 70 homologue gene abunds in the genomic sequence of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Sci*, 79: 397-405.

Fagutao FF, Maningas MB, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2012) Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 32: 711-715.

Kaizu A, Fagutao FF, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2011) Functional analysis of a C-type lysozyme in Penaeid shrimp. *J Biol. Chem.* 286:

44344-44349.

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.

Aoki T, Wang HC, Unajak S, Santos MD, Kondo H, Hirono I. (2011) Microarray Analyses of Shrimp Immune Responses. Mar Biotechnol, 13: 629-638

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

〔学会発表〕(計 22 件)

小松真未・糸井史朗・杉田治男・**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* において二本鎖 RNA により誘導される遺伝子について、平成 26 年度日本水産学会秋季大会 九州大学、2014 年 9 月 19-21 日

設楽愛子・安池元重・中村洋路・藤原篤志・佐野元彦・**近藤秀裕・廣野育生**、次世代シーケンサーを用いたクルマエビゲノムの解析、平成 26 年度日本水産学会秋季大会 九州大学、2014 年 9 月 19-21 日

Shiomi R, Koiwai K, Taechavasonyoo A, Kato G, Nozaki R, Kondo H, and Hirono I. Molecular markers of fish and shrimp for understanding their immune systems. Joint 7th AOHUPO Congress/9th PST Symposium, Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand, August 6-8, 2014.

小松真未・糸井史朗・杉田治男・**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の二本鎖 RNA 応答遺伝子の網羅的発現解析、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、2014 年 5 月 31 日～6 月 1 日

塩見玲菜・**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビにおける Integrin 分子の血球マーカーへの利用について、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、2014 年 5 月 31 日～6 月 1 日

Hidehiro Kondo and Ikuo Hirono. Transcriptome analysis of fish and shellfish for development of prevention method against microbial pathogens, International Symposium on Aquatic Metagenomics 「Development of Aquatic Metagenomics and Perspective of the Studies on Aquatic Biodiversity」国際水圏メタゲノムシンポジウム「水圏メタゲノミクスの展開と水圏生物多様性研究の展望」、北里大学薬学部コ

ンベンションホール、平成 25 年 11 月 24 日

西原史晃、井上僚、野崎玲子、**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビ I 型リゾチーム遺伝子の発現解析、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会 那覇市、平成 25 年 6 月 1-2 日

小祝敬一郎・野崎玲子・**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビ血球マーカー開発のための受容体分子の探索、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、三重県津市、平成 25 年 9 月 19-22 日

塩見玲菜・野崎玲子・**近藤秀裕・廣野育生**、クルマエビにおけるシクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼ遺伝子の同定と発現解析、平成 25 年度日本水産学会秋季大会、三重県津市、平成 25 年 9 月 19-22 日

Sheryll G. Hipolito, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot virus infection. 国際比較免疫学会 2012、福岡、平成 24 年 7 月 10-13 日

Aiko Shitara, Takashi Koyama, Kana Goto, Yuya Shigenobu, Takuma Sugaya, Motohiko Sano, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Identification of WSSV homologues in the genomic DNA of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. アジア太平洋マリンバイオテクノロジー会議 2012、高知、平成 24 年 7 月 13-15 日

Ryo Inoue, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Non-specific immune activation against double stranded RNA in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. アジア太平洋マリンバイオテクノロジー会議 2012、高知、平成 24 年 7 月 13-15 日

Hirono I. Antimicrobial proteins of shrimp、アジア太平洋マリンバイオテクノロジー会議 2012、高知、平成 24 年 7 月 13-15 日

Hirono, I. Shrimp genome science and immunology, 38th Annual Convention of the Philippine Society of Biochemistry and Molecular Biology, フィリピン、平成 23 年 12 月 6-7 日

Hirono, I. Molecular immunology and genomic science of shrimp, 8th Symposium of Diseases in Asian Aquaculture, インド、平成 23 年 11 月 21-24 日

Shitara A, Yamada H, Kondo H, Hirono I, Identification of 22 genes homologous to WSSV genome in the genomic DNA of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. The Crustacean Society Summer Meeting 2011 (9 月 5-8 日、八

ワイ)

H Yamada, A Shitara, A Kaizu, MBB Maningas, H Kondo and I Hirono. Functional analysis of WSSV genes homologues in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. The Crustacean Society Summer Meeting 2011 (9月5-8日、ハワイ)

R. Inoue, T. Nagayoshi, H. Kondo, I. Hirono, A. Tassanakajon. Cloning and gene expression of invertebrate type lysozyme from Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. The Crustacean Society Summer Meeting 2011 (9月5-8日、ハワイ)

Hirono, I. Recent advances in shrimp immunology and genome science, 2012 Taiwan-Japan Symposium on Prospective Biotechnology for Aquaculture, 台湾、平成24年2月21-22日

Keiichiro Koiwai, Reiko Nozaki, Hidehiro Kondo and Ikuo Hirono. IDENTIFICATION OF RECEPTOR MOLECULES FOR THE DEVELOPMENT OF HAEMOCYTE CLASSIFICATION MARKER IN KURUMA PRAWN *Marsupenaeus japonicus*, 第3回国際水産学シンポジウム (International Fisheries Symposium 2013) タイ、2013年11月28-30日

Shitara A, Goto K, Koyama T, Kai W, Shigenobu Y, Sugaya T, Sano M, Kondo H, Hirono I. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF WSSV HOMOLOGUES IN THE GENOMIC DNA OF KURUMA SHRIMP, *Marsupenaeus japonicus*, 第1回国際魚介類免疫学会(1st International Conference of Fish and Shellfish Immunology)、スペイン、2013年6月25-28日

Hipolito SG, Kondo H, Hirono I. ROLE OF *Marsupenaeus japonicus* CRUSTIN-LIKE PEPTIDE AGAINST *Vibrio penaeicida* AND WHITE SPOT VIRUS INFECTION, 第1回国際魚介類免疫学会(1st International Conference of Fish and Shellfish Immunology)、スペイン、2013年6月25-28日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者

廣野 育生 (Ikuo HIRONO)
東京海洋大学・学術研究院・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・学術研究院・准教授
研究者番号：20314635

糸井 史朗 (Shiro ITOI)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：30385992