

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780207

研究課題名（和文） クルマエビ腫瘍壊死因子のシグナル制御および免疫応答誘導能の解析

研究課題名（英文） Identification of TNF pathway modulator and implications for immune response in kuruma shrimp

研究代表者

米加田 徹（Tohru Mekata）

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所病害防除部・研究員

研究者番号：40597944

研究成果の概要（和文）：クルマエビにおいて腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor; TNF）の組換えタンパク質導入後や RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン後に発現量が変動する因子を探索した。また、病原体接種後のこれらの因子の発現動態を解析した。既報のプロテオーム解析の報告から S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素と推定されたタンパク質のスポットにおいて、TNF 導入時の発現量の上昇、ノックダウン時および病原体接種後の発現量の減少が認められた。

研究成果の概要（英文）：To gain an insight of the function of shrimp TNF at protein level, proteome analysis has been done in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) with recombinant TNF administration, gene silencing by dsRNA, and pathogen stimulation. Putative s-adenosylhomocysteine hydrolase were up-regulated after recombinant TNF injection and down-regulated after gene knockdown and exposure to pathogens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：水族生体防御

1. 研究開始当初の背景

世界のエビ類養殖は、年間約 300 万トン、生産額にして 2 兆円にも達するほど急激に発展している。これに伴い、ウイルス性、細菌性および真菌性疾病が蔓延しており、多大な経済的損失を被っている。しかし、エビ類における生体防御機構に関する知見は非常に乏しく、病原体の排除機構はほとんど解明されていない。そのため、エビ類における疾病防除のためにも、より詳細な生体防御機構の解明が望まれている。

脊椎動物における腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーリガンドは、アポトーシスの誘導や抗体産生の亢進など、恒常性の維持や感染防御に深く関与していることが証明

されている。魚類においても TNF に関する研究は盛んに行われており、生体防御機構に関与していることが報告されている。一方、無脊椎動物における TNF は、ショウジョウバエにおいて 2002 年に初めて確認され、アポトーシスを誘導することが証明されている。このように TNF は、生体防御機構を解明する上で、非常に重要な因子であると考えられる。本研究の標的因子であるクルマエビの TNF は 2010 年に甲殻類において初めて同定したが、これまでのところその機能については分かっていない。

2. 研究の目的

(1) クルマエビ TNF のスプライシングバ

リアントを把握するとともに、どの組織で発現しているかを把握する。

(2) クルマエビ TNF の受容体を同定し、TNF シグナル伝達経路の存在を明らかにする。

(3) クルマエビ TNF 組換えタンパク質を生体内に導入後、あるいは遺伝子ノックダウン後に発現が変動する因子の同定を行う。

(4) 発現が変動した因子に関して、病原性ウイルスおよび細菌を接種した後の発現量の変動を解析する。

3. 研究の方法

クルマエビ TNF の 5' および 3' 非翻訳領域において発現解析用のプライマーを設計し、各臓器における遺伝子発現を確認する。得られた複数のバンドはクローニング後、シーケンス解析を行う。

生体内で最も発現量が高く、かつ多くの組織で発現しているタイプをサブクローニングし、タンパク質発現ベクターを構築後、大腸菌の形質転換を行う。組換えタンパク質は His-tag 融合タンパク質として発現させ、タンパク質精製カラムにより精製する。

クルマエビ TNF の遺伝子ノックダウンには RNA 干渉法を用いる。クルマエビ TNF 遺伝子に特異的な T7 配列付加プライマーを設計し、RT-PCR 法により遺伝子を増幅する。T7 領域を利用した一本鎖 RNA の合成およびアニーリングによる二本鎖 RNA の作製を行う。作製した二本鎖 RNA を 10 µg/g shrimp で接種し、経時的に発現解析を行いノックダウン効果を測定し、ノックダウンの最適条件を検討する。

クルマエビ TNF 受容体の探索は two-hybrid 法を用いる。TNF のシグナルペプチドを除く領域の遺伝子を増幅し、発現ベクターに組み込みベイトの作製を行う。two-hybrid 用発現ベクターに組み込んだクルマエビの cDNA ライブラリーを構築し、ベイトとともに酵母へ形質転換を行い、ベイトと結合したタンパク質の同定を行う。

また、遺伝子データベースを基とした、TNF 受容体の探索も試みる。

TNF 組換えタンパク質をクルマエビに投与し、標的器官よりタンパク質を抽出する。抽出タンパク質を二次元電気泳動法により分離し、各スポットの画像解析を行う。同様に、二本鎖 RNA 投与による TNF 遺伝子ノックダウン個体からもタンパク質を抽出し、二次元電気泳動による解析を行う。それぞれの解析の結果、タンパク質の発現量に変化が認められたスポットの同定を行う。

病原性ウイルスおよび細菌をクルマエビに接種した後に、それぞれのタンパク質の発現解析を行う。

4. 研究成果

クルマエビ TNF のスプライシングバリエーションの発現解析を組織別に行った結果、当初同定したタイプとは分子量の異なる 3 つのスプライシングバリエーション (v1, v2 および v3) が存在しており、v1 は鰓で、v2 は心臓、胃、リンパ様器官、腸および筋肉で、v3 は全組織で発現していた (図 1)。

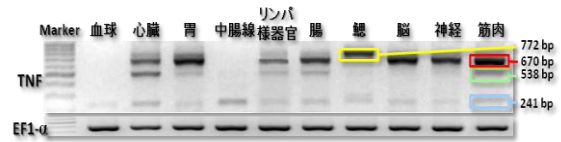


図1 クルマエビTNFの臓器別発現解析

TNF の膜貫通領域を除いた領域を増幅し、two-hybrid 用 発現ベクターに組み込みベイトおよびクルマエビの cDNA ライブラリーを構築した。クルマエビ TNF 組換え酵母とクルマエビ cDNA ライブラリーの組換え酵母との接合により得られた酵母のシーケンス解析を行ったが、TNF 受容体のホモログと推定される遺伝子配列は認められなかった。しかし、エビ類 EST データベースより TNF 受容体の全長を得ることに成功した (図 2)。

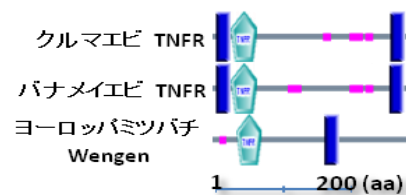


図2 TNFRのドメイン構造比較

クルマエビへの組換え TNF の投与および TNF の遺伝子ノックダウン後に発現が変動する因子について同定を試みたところ、6 つのタンパク質スポットが同定された。これらのスポットについて、病原体接種時の発現動態を解析したところ、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素や Rho グアニンヌクレオチド交換因子と推定されるスポットの発現量の変動が認められた。S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素は哺乳類において、サイトカインの分泌に関わることが報告されていることから、クルマエビ TNF も生体防御機構へ関与している可能性が高いと考えられる (図 3 および 4)。



図3 二次元電気泳動法によるクルマエビのリンパ様器官におけるスポット解析

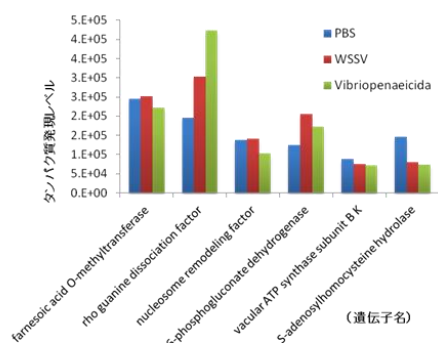


図4 病原体接種時のタンパク質発現レベルの変動

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Inada M, Kihara K, Kono T, Sudhakaran R, Mekata T, Sakai M, Yoshida T, Itami T. Deciphering of the Dual oxidase (Nox family) gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: full-length cDNA cloning and characterization. *Fish and Shellfish Immunology*, **34**(2), 471-85. (2013) doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.026. (査読有)
- 2) Okugawa S, Mekata T, Inada M, Kihara K, Shiki A, Kannabiran K, Kono T, Sakai M, Yoshida T, Itami T, Sudhakaran R. The SOCS and STAT from JAK/STAT signaling pathway of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: molecular cloning, characterization and expression analysis. *Molecular & Cellular Probes*, **27**(1), 6-14 (2013) doi: 10.1016/j.mcp.2012.08.003. (査読有)
- 3) M. Inada, R. Sudhakaran, K. Kihara, J. Nishi, M. Yoshimine, T. Mekata, T. Kono, M. Sakai, T. Yoshida and T. Itami. Molecular cloning and characterization of the NADPH oxidase from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: early gene up-regulation after *Vibrio penaeicida* and poly(I:C) stimulations *in vitro*. *Molecular & Cellular Probes*, **26**(1), 29-41 (2011) doi: 10.1016/j.mcp.2011.11.002. (査読有)
- 4) R. Sudhakaran, S. Okugawa, T. Mekata, M. Inada, M. Yoshimine, J. Nishi, C. Ozono, T. Kono, M. Sakai and T. Itami. Deciphering the DNA repair protein, Rad23 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Full-length cDNA cloning and characterization. *Letters in Applied Microbiology*, **53**(1), 63-72 (2011) doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03073.x. (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

- 1) 米加田 徹「クルマエビの MAPK カスケード不活性化関連遺伝子の同定」平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大

学品川キャンパス, 2013 年 3 月 29 日 (口頭発表)

- 2) 木原啓輔「multiplex RT-PCR 法を用いたクルマエビ生体防御関連遺伝子群の網羅的定量発現解析 I — 細菌感染 —」平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2013 年 3 月 29 日 (口頭発表)
- 3) 木原啓輔「multiplex RT-PCR 法を用いたクルマエビ生体防御関連遺伝子群の網羅的定量発現解析 II — ウイルス感染 —」平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2013 年 3 月 29 日 (口頭発表)
- 4) 木原啓輔「クルマエビ Tollip 遺伝子に関する研究」平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2012 年 3 月 29 日 (口頭発表)
- 5) 稲田真理「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の astakine 遺伝子ノックダウン時の血球数の変化と mRNA variant に関する研究」平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2012 年 3 月 29 日 (ポスター発表)
- 6) 西 純市「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) における RNA 干渉関連遺伝子の探索と機能解析」平成 24 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2012 年 3 月 29 日 (口頭発表)
- 7) 佐藤 純「PAV (=WSD) 防除のための電解海水を用いたクルマエビ受精卵の洗浄効果」平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2013 年 3 月 26 日 (口頭発表)
- 8) T. Mekata. Identification of the splice variants of RdRP and CP genes in betanodavirus. 8th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, マンガロール, インド (Nov, 2011), (ポスター発表)
- 9) 米加田 徹「ベータノダウイルスにおけるスプライシングバリエーションの解析」日本魚病学会秋季大会, 長崎大学文教キャンパス, 2011 年 10 月 2 日 (ポスター発表)
- 10) 稲田真理「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の活性酸素生成酵素 Nox ファミリーに関する研究」日本魚病学会秋季大会, 長崎大学文教キャンパス, 2011 年 10 月 2 日 (口頭発表)
- 11) 西 純市「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) 新規 Argonaute2 遺伝子の同定および発現解析」日本魚病学会秋季大会, 長崎大学文教キャンパス, 2011 年 10 月 2 日 (ポスター発表)
- 12) 吉峰 慎「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) における cytochrome c 遺伝子の同定および発現解析」日本魚病学会秋

- 季大会，長崎大学文教キャンパス，2011年10月2日（ポスター発表）
- 13) 木原啓輔「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の Toll 受容体シグナル経路抑制因子 (Tollip) 遺伝子の同定および発現解析」日本魚病学会秋季大会，長崎大学文教キャンパス，2011年10月2日（ポスター発表）
 - 14) 奥川翔吾「クルマエビにおける STAT と SOCS の発現動態の比較」日本水産学会秋季大会，京都大学総合人間学部・百周年時計台記念館，2010年9月26日
 - 15) 西 純市「クルマエビ新規 Dicer2 遺伝子の同定および発現解析」日本水産学会秋季大会，京都大学総合人間学部・百周年時計台記念館，2010年9月26日
 - 16) 吉峰 植「クルマエビにおける JNK 遺伝子の同定」日本水産学会秋季大会，京都大学総合人間学部・百周年時計台記念館，2010年9月
 - 17) 稲田真理「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の一酸化窒素(NO)合成酵素 mRNA の variant および血球における *in vitro* での NO 産生能に関する研究」日本水産学会秋季大会，京都大学総合人間学部・百周年時計台記念館，2010年9月22日
 - 18) 稲田真理「クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の astakine 遺伝子に関する研究」日本魚病学会大会，三重大学生物資源学部生物資源学科棟，2010年9月22日

〔その他〕

ホームページ等

<http://nria.fra.affrc.go.jp/AAHD/prg.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米加田 徹 (Tohru Mekata)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖
研究所病害防除部・研究員

研究者番号：40597944