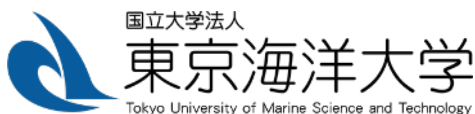


令和5年6月15日

Press Release



国立大学法人東京海洋大学
Tel : 03-5463-1609 (広報室)

国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)
Tel : 03-5214-8404 (広報課)

クルマエビ類におけるウイルス病感染死の要因を解明

細胞分類マーカー遺伝子も同定 養殖時の被害軽減に期待

ポイント

- 非モデル生物であるクルマエビ類は細胞分類に課題があり、どの血球細胞集団がウイルスによって影響を受けるのかわからなかった。
- 網羅的シングルセル mRNA 解析でウイルス感染時に変動する細胞集団および遺伝子を同定した。
- ウイルス感染で割合が減少する血球細胞集団が判明したため、クルマエビ類養殖で問題となっているウイルス病の克服に繋がると期待される。

東京海洋大学学術研究院の小祝敬一郎助教らは、マイクロ流体デバイス^{注1)}を用いた網羅的シングルセル mRNA 解析技術^{注2)}により、ウイルス感染によって影響を受ける細胞集団および遺伝子を同定することに成功しました。

クルマエビ類の養殖現場では、ウイルス病による被害が問題になっています。そこで、クルマエビがどのようにウイルスと戦っているのか、なぜウイルス感染により死んでしまうかを明らかにする必要があります。しかしながら、クルマエビ類の免疫を司る血球細胞の分類には課題があり、ウイルスによってどの細胞が影響を受けているのか、また、なぜウイルスに対抗できなくなってしまうのかわかりませんでした。

本研究グループは、ウイルスをクルマエビに人為感染させ、体液中に存在する血球細胞を網羅的シングルセル mRNA 解析に供し、健常時の個体と比較することで、ウイルスの感染が抗菌ペプチド^{注3)}産生細胞集団の割合を減少させることを世界で初めて明らかにしました。また、ウイルス感染の有無にかかわらずクルマエビの血球細胞を客観的に分類可能とするマーカー遺伝子を複数同定し、その発現パターンを顕微鏡観察することに成功しました。

本成果により、ウイルス感染時に割合が減少する血球細胞集団が判明したため、この集団を増やす、もしくは、減らさないようにする飼育法や飼料添加物を開発することで、クルマエビ類養殖で問題となっているウイルス病の克服に繋がると期待されます。

本研究成果は、2023年6月16日(英国時間)に Marine Biotechnology 誌「scRNA-seq analysis of hemocytes of penaeid shrimp under virus infection」のオンライン版で公開されます。

<研究の背景と経緯>

クルマエビやシロアシエビ（バナメイエビ）、ウシエビ（ブラックタイガー）など、日本の食卓を彩るクルマエビ類を養殖する現場では、ウイルス病による被害が問題になっています。無脊椎動物であるクルマエビ類は、抗体を持たず、脊椎動物である哺乳類や魚類で用いられるワクチンを使った予防を行うことができません。そこで、ウイルスの宿主であるクルマエビが、どのようにウイルスと戦っているのか、なぜウイルス感染により死んでしまうかを明らかにすることで、ウイルス病に対する効果的な対処法が立案できると考えられます。しかしながら、クルマエビ類の免疫を司る細胞である血球細胞（図1）は、顕微鏡観察では客観的に分類することが難しいという課題があり、どの細胞がウイルスによって影響を受けているのか、また、なぜウイルスに対抗できなくなってしまうのかわかっていませんでした。

<研究の内容>

学術研究院海洋生物資源学部門ゲノム科学研究室の小祝敬一郎助教らのグループはこれまでに、細胞分類マーカーがないクルマエビ類の血球細胞を客観的に分類するために、マイクロ流体デバイスを用いた網羅的シングルセル mRNA 解析技術の活用を進めてきました。市販の網羅的シングルセル mRNA 解析用マイクロ流体デバイスは、ヒトやマウスなどのモデル生物を対象にしているため、研究グループはクルマエビでも利用可能なマイクロ流体デバイスを研究室で作製し、それを用いることで健常時のクルマエビ血球細胞を客観的に分類するとともに、特定の遺伝子がマーカーとして活用できることを報告してきました¹⁾。今回、小祝助教らの研究グループは、先の研究を発展させるかたちでウイルス感染によって影響を受ける細胞集団および遺伝子を同定することに成功しました。

具体的には、クルマエビ類養殖に甚大な被害をもたらす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をクルマエビに人為感染させ、重篤な感染状態にある個体をリアルタイム PCR^{注4)}によりスクリーニングした後、体液中に存在する血球細胞をマイクロ流体デバイスで微小な液滴内に封入し、網羅的シングルセル mRNA 解析に供しました（図2）。健常個体由来の3,724細胞およびウイルス感染個体由来の3,064細胞分の遺伝子発現データを統合し、バイオインフォマティクス解析^{注5)}により比較することで、健常時には25%ほどを占める抗菌ペプチド産生細胞集団の割合がウイルス感染により15%ほどに減少することを明らかとしました（図3）。さらに、ウイルス感染の有無にかかわらずクルマエビの血球細胞を客観的に分類可能とするマーカー遺伝子を複数同定し、その mRNA 発現パターンを *in situ hybridization*^{注6)}により顕微鏡観察することに成功しました（図4）。また、シングルセル mRNA 解析は新鮮な細胞での実施が通常求められますが、ヒトの白血球で有効なメタノール保存法をクルマエビの血球細胞にも応用することで、サンプリング日と別日に網羅的シングルセル mRNA 解析に供することにも成功し、生細胞と遜色ないデータが得られることも確認しました。

<今後の展開>

本成果により、ウイルス感染時に割合が減少する血球細胞集団が判明したため、この集団を増やす、もしくは、減らさないようにする飼育法や飼料添加物の開発がウイルス病の克服に繋がると期待されます。また、メタノールによって固定した細胞が生細胞と遜色なく解析できることが明らかになったため、サンプリングと実験操作を離れた場所で実施できるようになりました。さらに、クルマエビのようなモデル生物と比較して細胞の分類に課題がある養殖対象魚介類の細胞でも、網羅的シングルセル mRNA 解析を実施することで、体を構成する細胞の図鑑（細胞アトラス）を構築可能で、新しい魚病対策法を開発する基盤となる可能性があることを明らかにしました。

<参考図>

クルマエビの体液中に存在する血球細胞

- 貪食作用や抗菌ペプチドの産生、病原体の包囲化を担う免疫担当細胞
- 顕微鏡観察のみでは客観的な分類ができない
- 細胞を分類するためのマーカー情報が不足している

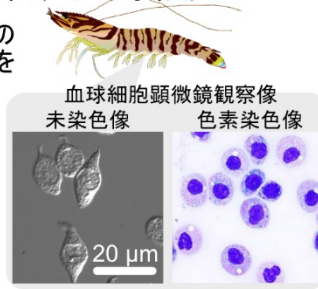


図1 クルマエビの体液中に存在する血球細胞

未染色のクルマエビ類の血球細胞は顕微鏡下でも形態が似ており、染色をしても細胞種間を明確に判別することは難しい。また、細胞種を判別するためのマーカー情報も不足している。

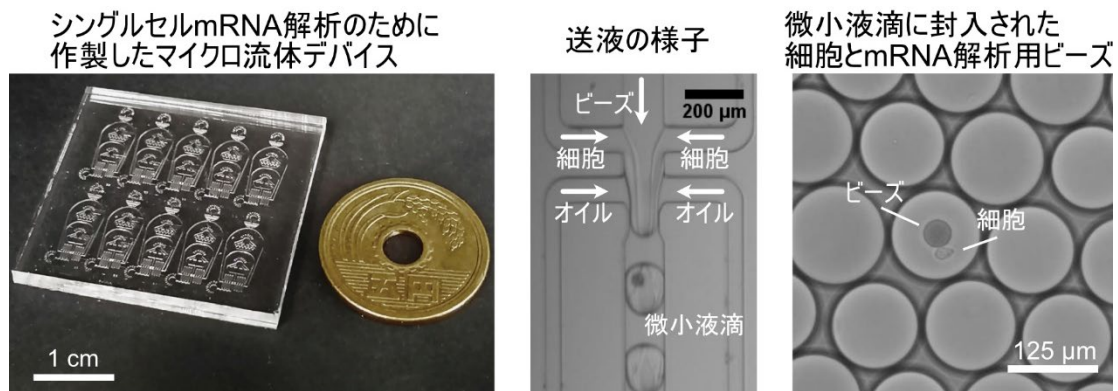


図2 マイクロ流体デバイスを用いたシングルセル mRNA 解析の様子

クルマエビ血球細胞のシングルセル mRNA 解析を実施するために作製したマイクロ流体デバイス。マイクロ流体デバイスを用いて細胞と mRNA キャプチャービーズを送液し、微小液滴中に封入することで、1つの細胞からの mRNA 情報を得る。

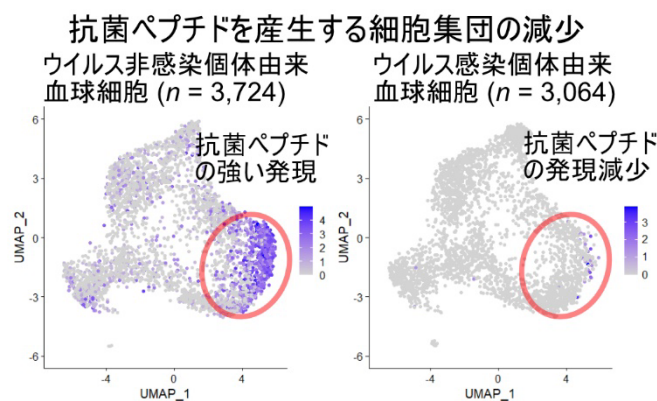


図3 抗菌ペプチド産生細胞集団の割合の減少

シングルセル mRNA 解析データを視覚化した図。一つ一つの点は1細胞由来のデータを表しており、点同士の距離は細胞同士の類似性を示している。青の濃淡は抗菌ペプチド遺伝子の発現量を表している。ウイルス感染前の健常個体では特定の細胞集団で抗菌ペプチドが強く発現しているが、ウイルス感染後にはその細胞集団が減少するとともに、抗菌ペプチドの発現量が減少している。

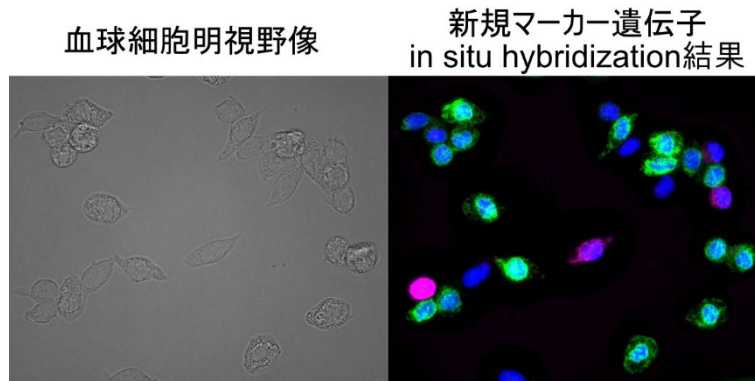


図 4 新規マーカー遺伝子の in situ hybridization による血球細胞中 mRNA 発現確認
 明視野像では分類が困難な血球細胞が、新規マーカー遺伝子によって複数種の細胞集団に分類されている。右の蛍光写真の青色は細胞の核を示し、緑色とマゼンタ色はそれぞれ異なるマーカー遺伝子の発現を示す。これらマーカー遺伝子は同一の細胞で発現しておらず、本マーカーによって血球細胞は 3 種類（緑色陽性-マゼンタ色陰性/緑色陰性-マゼンタ色陽性/緑色陰性-マゼンタ色陰性）の細胞集団に分類可能であった。

<用語解説>

注 1) マイクロ流体デバイス

1mm の 100 分の 1 ほどの小さな細胞を個別に解析するために設計された、液体や液体中の細胞をマイクロスケールで混合することが可能なチップ。

注 2) 網羅的シングルセル mRNA 解析技術

生物の体を構成する細胞ひとつひとつの中に含まれる mRNA を細胞ごとに解析する技術。マイクロ流体デバイスを用いることで、一度に数千を超える細胞の解析を可能とする。

注 3) 抗菌ペプチド

病原細菌やウイルスに対して作用する数十個ほどのアミノ酸からなるペプチド。抗体を持たない甲殻類では、外来の異物に対して働く重要な生体防御因子であると知られている。

注 4) リアルタイム PCR

配列特異的なプライマーを使用して、特定の DNA または RNA 配列のコピー数の決定ができる機器。PCR サイクル中の各ステージにおいて生成される増幅産物の量を測定することにより、試料中のウイルス量などが定量できる。

注 5) バイオインフォマティクス解析

生物学と情報科学の融合分野であり、DNA や RNA、タンパク質をはじめとする、生命が持つ様々な情報を、情報科学や統計学などのアルゴリズムを用いて解析することを目的とした学問分野。シングルセル解析のバイオインフォマティクス解析では、遺伝子発現量の解析や細胞種の同定などが行われる。

注 6) in situ hybridization

標的の mRNA 配列に対して相補的な配列を用いて、細胞内に存在する標的 mRNA の局在や存在量を検出する実験手法。

<関連文献>

1) Koiwai K, Koyama T, Tsuda S, Toyoda A, Kikuchi K, Suzuki H, Kawano R. Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process. *eLife*. 2021;10: e66954. doi:10.7554/eLife.66954

<論文タイトル>

“scRNA-seq analysis of hemocytes of penaeid shrimp under virus infection”
doi : 10.1007/s10126-023-10221-8

<研究助成>

本研究は、科学技術振興機構 ACT-X(JPMJAX21B5)、科学技術振興機構 国際協力機構 SATREPS プロジェクト(JPMJSA1806)、日本学術振興会若手研究(20K15603)および基盤研究(A) (22H00379)の支援により実施されました。

お問い合わせ

< 研究に関すること>

東京海洋大学 学術研究院 助教 小祝 敬一郎 (コイワイ ケイイチロウ)
Tel : 03-5463-0663 / E-mail : koiwai@kaiyodai.ac.jp

< J S Tの事業に関すること>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 先進融合研究グループ 宇佐見 健 (ウサミ タケシ)
Tel : 03-6380-9130 / E-mail : act-x@jst.go.jp

<報道担当>

東京海洋大学 総務部 総務課 広報室
Tel : 03-5463-1609 / E-mail : so-koho@o.kaiyodai.ac.jp

科学技術振興機構 広報課
Tel : 03-5214-8404 / E-mail : jstkoho@jst.go.jp