

研究終了報告書

「エビ体液中免疫細胞と細菌叢の相互作用解析と養殖産業への活用」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：小祝 敬一郎

1. 研究のねらい

クルマエビ類は世界中で盛んに養殖されているが魚病被害も大きい。クルマエビ類の生体防御には、血球細胞が重要である。しかしながら、クルマエビ類の血球細胞の分類には課題があり、いずれの免疫機能が養殖エビの魚病被害を軽減するために重要であるか、どのようにその免疫機能が制御されているかは未だ不明な点が多い。

水産養殖では細菌感染症対策に抗生物質が用いられてきたが、抗生物質に頼らない対策が強く求められている。魚類養殖ではワクチン接種による予防がすでに実施されており、経済的損失の減少に貢献している。一方で、エビやカニ、ホタテ、カキといった無脊椎動物の養殖では、感染症の直接的な予防が困難である。なぜなら無脊椎動物は、獲得免疫を有しておらずワクチンによる予防ができないからである。よって養殖業者は、病原菌が発生しないように環境整備に努め、病原菌を持ち込まないように努力することしかできないのが現状である。本研究はこの事態を打開するために、既存のワクチンとは根本的に異なる、無脊椎動物用の新しい形の病原菌防除法を開発するための基礎研究を実施した。

閉鎖循環系であり血液中が無菌である脊椎動物と異なり、開放血管系である無脊椎動物の血リンパ中には細菌が存在することが古くから知られている。しかしながら、宿主独自の免疫機能と比べ、細菌叢による病原体に対する定着抵抗性がどの程度重要な役割を果たすかの理解は進んでいない。水産養殖は今後も生産量の増加が見込まれている。しかしながら、魚病問題が甚大な経済的被害を関連企業・組織に与えている。魚病による斃死は、育成に使用した水資源・飼料タンパク質・電力・時間・人手すべてを無駄にしてしまう。さらに、斃死した死骸の処分さらなる人的・経済的・環境的負荷をかける。魚病問題の克服は、政府や国連が目標とするSDGsや温室効果ガス削減の達成に向けても重要な課題である。

無脊椎動物の魚病による被害を軽減するためには、病原体に対する自然免疫もしくは宿主内細菌叢の病原体に対する定着抵抗性を増強する方法を探ることが重要である。そこで、病原菌感染時のエビの血球細胞-血リンパ中の細菌叢間の相互作用を解析し、その機能を向上させるための手法をスクリーニングできる環境を整備することを目標とする。本課題の達成後には、免疫賦活剤のスクリーニングが容易に実施できるようになると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究期間内には、クルマエビ血球細胞の病原体感染時の集団変動解析および血リンパ内マイクロバイーム解析、魚病細菌に対する拮抗細菌スクリーニング手法の開発に取り組んだ。また、それら技術をもとにした共同研究および企業連携も積極的に実施した。

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 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 Drop-seq で網羅的シングルセル mRNA 解析に供した。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た。さらに、ウイルス感染の有無にかかわらず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 により顕微鏡観察し、細胞機能を分類可能なマーカーを得た。

血リンパ内マイクロバイーム解析のプロトコルを確立し、クルマエビの血リンパ内マイクロバイーム解析を実施した。その結果、他の臓器と比較すると少ないが、血リンパ内にも一定の密度での細菌の存在を示唆する結果を得た。ウイルス感染によってその細菌組成が大幅に変動することはなく、当初の目論見とは異なる結果となった。そこで、シングルセル mRNA 解析で培った MEMS 技術と微小液滴操作技術を汎用して魚病細菌の削減に貢献可能な新規拮抗細菌スクリーニング手法の開発を試みた。

拮抗細菌スクリーニングには、Drop-seq で利用している微小液滴を用いて、病原細菌と環境微生物を微小液滴内で共培養する手法を構築することとした。2.5 年の研究期間内に、クルマエビ類魚病細菌の 1 種である *Vibrio harveyi* の染色体中に eGFP 配列を組み替えた eGFP-*V. harveyi* の作出および微小液滴内での培養に成功した。また、エビ飼育海水や土壌からの環境由来微生物の液滴内培養も成功しているため、これらを組み合わせることにより *V. harveyi* に対して拮抗作用を有する微生物のスクリーニングが実施可能な状態となった。染色体遺伝子組み換えには、大腸菌の接合伝達によるプラスミド伝播およびプラスミド-染色体相同組み換え系を利用した。これら手法は古典的であるものの、グラム陰性細菌に幅広く活用できるため、自身の研究室で同手法を運用可能な状況にできたことは、魚病細菌として報告が多いグラム陰性菌を今後より詳細に解析可能とする。

ACT-X で取り組んだシングルセル mRNA 解析が評価され他研究者との共同研究も積極的に実施した。また、同技術が企業からも評価され、共同研究を実施することとなった。企業連携予算をもとに、試験データ取得および量産型マイクロ流路の試作を実施しており、実際の販売に向けてのデータ取得等を実施した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「病原菌感染時の免疫細胞応答解析」

本研究テーマでは、クルマエビ血球細胞の免疫反応時における細胞集団変動を解析することを目標に研究を実施した。クルマエビ類の養殖場で常に問題となっているホワイトスポット病を解析対象に選定し、原因ウイルスであるホワイトスポットウイルスに感染した際のクルマエビ免疫担当細胞である血球細胞の挙動を明らかにするため、人為的にホワイトスポットウイルスに感染させたクルマエビの血球細胞を材料に、Drop-seq による 1 細胞トランスクリプトーム解析 (scRNA-seq) を実施した。健全なクルマエビおよびホワイトスポットウイルスを注射し 48-72 時間経過したクルマエビそれぞれから血球細胞を採取し、氷冷メタノールで固定した。ホワイトスポットウイルスの感染強度を、エラから抽出した DNA をもとにしたリアルタイム PCR によるコピー数定量により計測した。感染強度が高かった個体から Drop-seq により血球細胞 1 細胞由来の cDNA テンプレートを調整し、全 cDNA の PCR 増幅および NexteraXT によるタグメンテーションにてライブラリーを調整した。イルミナシーケンスで得られた配列を、STARsolo を用いてクルマエビゲノム配列にマッピングし、1 細胞当たりの遺伝子発現データを得た。遺伝子発現データを Seurat により可視化した。感染および非感染全 9 個体由来の血球細胞 6,788 個の遺伝子発現データを得た (図 1A)。1 細胞当たりの mRNA および遺伝子検出数の中央値は、それぞれ 852 および 443 であった。ホワイトスポットウイルス感染は、特定細胞集団の割合を増減させ、特に抗菌ペプチドを発現する細胞集団の割合を減少させていた (図 1B)。ホワイトスポット病への対策にはこれら抗菌ペプチドの発現を減少させない、もしくは、これらタンパク質発現細胞集団を減少させないことが重要であることが示唆された。さらに、それぞれの細胞集団を客観的に分類可能なマーカー遺伝子を推定し、*in situ* hybridization により顕微鏡観察した (図 1C)。すなわち、クルマエビ血球細胞の分類を客観的に可能とするマーカーを得た。また、メタノール固定した血球細胞を scRNA-seq に用いることに成功した。本固定による手法は、サンプリングおよび解析を別日に行えるため、他の水産生物への適用も期待される。

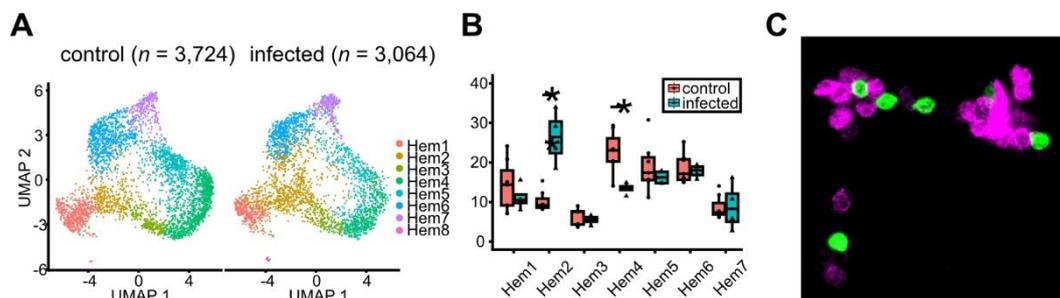


図 1. ホワイトスポットウイルス感染試験後の scRNA-seq 解析結果。感染の有無による UMAP 像 (A)。各細胞集団が占める割合。Hem4 がウイルス感染により割合を減らしていることがわかる (B)。異なるマーカーで染色された血球細胞。マゼンタと緑の色が被らず、異なる細胞を染色していることがわかる (C)。

研究テーマ B 「宿主血リンパ中細菌叢解析」

クルマエビ血リンパ中の細菌叢が生体自身に対してどのような影響を与えるかを解析するため、血リンパ内の細菌叢解析を試みた。クルマエビ 1 個体から採血可能な血リンパは最大でも 1mL と液量が少なく、また、菌数も少ないことが予測されたため、フィルターによる拿捕およ

び市販のキットを用いて核酸抽出手法の確立を試みた。検討の結果、血球細胞を遠心により除去した後 Millipore 社の $0.22 \mu\text{m}$ フィルターで細菌を拿捕し、ZYMO RESEARCH 社の BIOMICS DNA Microprep Kit による物理的な破碎を行うことで、PCR グレードの核酸を抽出できることが明らかとなった。得られた DNA をテンプレートに血リンパ内細菌叢由来の 16S rDNA V3-4 領域の増幅に成功した (図 2A)。また、他の臓器由来の DNA と比較すると、電気泳動によりバンドが目視できる増幅産物を得るには多くのサイクル数が必要であり、血リンパ中の細菌数が少ないことが推察された。得られた血リンパ中細菌叢由来 DNA をテンプレートにした 16S rDNA 解析の結果、血リンパ内に一定の細菌が存在することは確認された (図 2B)。一方で、ウイルス感染により血リンパ内の血球細胞数が減少することから、血リンパ内の細菌叢組成も変化すると考えていたが、少なくともウイルス感染時には、血リンパ中の細菌組成に変動がないことが明らかとなった (図 2C)。また研究当初は血リンパ中細菌を殺菌し、新たな菌を定着させる実験を試みたが、同手法の開発には及ばなかった。カイコの体内を無菌化する手法を有する研究者に相談した結果、カイコでは卵から孵化した段階から餌に抗生物質を加え、全飼育過程において無菌環境かつ餌からの菌の摂餌を防ぐことでこれを達成しているとの情報を得た。研究室内でクルマエビの産卵・飼育は極めて難しく、また、海水を完全に無菌化して飼育できる環境が研究室には存在しないため、現時点で当研究を実施することは困難であると判断した。そこで、シングルセル mRNA 解析で培った MEMS 技術と微小液滴操作技術を汎用して魚病細菌の削減に貢献可能な新規拮抗細菌スクリーニング方法の開発を試みた。

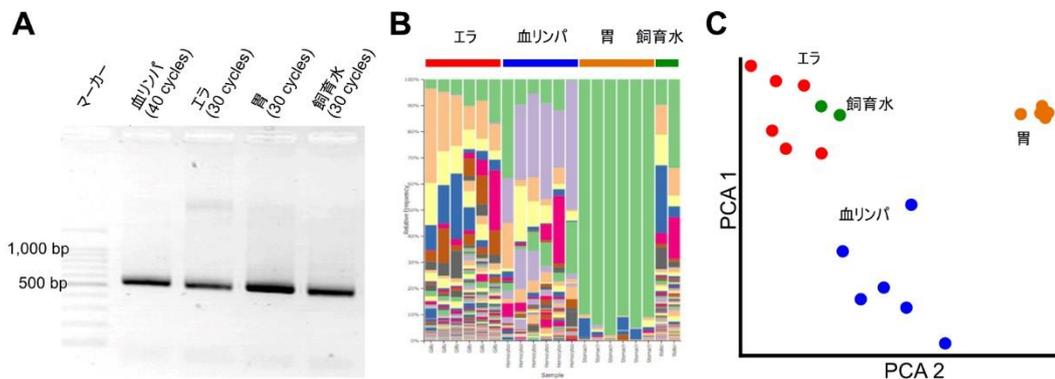


図 2. 血リンパ中に存在する細菌の細菌叢解析結果。血リンパ中の細菌由来 16S rDNA 配列の増幅には、他の臓器より多くの PCR サイクルが必要であった (A)。感染試験を実施した後の血リンパ中の細菌叢は、健常個体のもものと比較して優位に変動を示す細菌叢を示さなかった (B, C)。

研究テーマ C 「新規プロバイオティクス微生物のスクリーニング方法の開発」

クルマエビ類養殖場ではウイルス感染症の他、各種細菌による疾病が数多く報告されている。なかでも *Vibrio* 属細菌による被害は多く、その対策が求められている。現場では抗生物質による抑制や飼育環境水の清純化による防除が試みられているが、薬剤耐性菌の発生や残留薬物問題などを引き起こしている。そこで、特定の病原細菌に対して競合的に生育阻害を引き起こす細菌をスクリーニングするため、scRNA-seq で用いているマイクロ液滴を応用したスクリーニングを実施することとした。具体的には、現場で問題となっているクルマエビ病原細菌 *Vibrio* 属細菌の染色体 16S rRNA のプロモーター領域下に eGFP 配列を組換えることで、恒常

的に eGFP を発現する *Vibrio* 属細菌を作製し、eGFP 発現細菌をマイクロ液滴中に封入し培養する。その際に、拮抗細菌が存在すると考えられる環境水などを混合し培養することで、*Vibrio* 属細菌の生育を阻害する細菌をスクリーニングすることとした。これまでに、スーサイドベクターおよびトランスポゾンを用いた系により、クルマエビ魚病細菌である *Vibrio harveyi* の染色体上に eGFP を挿入することに成功している。染色体上の挿入位置は GridION にてシーケンスすることで確認している。eGFP 恒常発現 *V. harveyi* の液滴内での培養にも成功しており、これらを用いて拮抗細菌スクリーニングを実施できる環境を構築した。

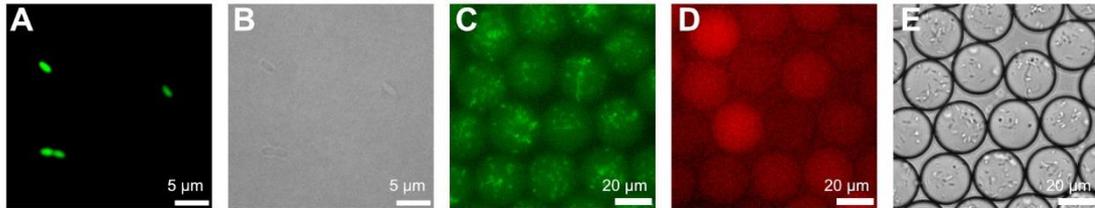


図 3. 拮抗細菌スクリーニングに向けた細菌株調整および液滴内培養試験。染色体上に eGFP を有する *V. harveyi* の蛍光観察像 (A) と明視野像 (B)。eGFP 発現 *V. harveyi* が増殖した微小液滴の蛍光画像 (C, D) および明視野像 (E)。細菌の増殖に伴い、液滴内の蛍光強度も増強していることが観察できた。

3. 今後の展開

これまでに実施してきたクルマエビ類免疫担当細胞のデータ拡充はもちろん、その他の養殖主要産業生物のデータも拡充し、特異抗体が存在しない生物での病原菌感染時の細胞集団の変動を追跡可能にし、魚病被害軽減を目指す。すでに、自身の対象であるクルマエビ類 4 種、他、棘皮動物マナマコ、頭足類クロアワビ、魚類ニジマス、昆虫カイコの免疫担当細胞の 1 細胞データ取得に成功している。今後数年をかけて、統合的解析に向けた手法の構築に取り組む。また、1 細胞解析運用体制の簡略化には企業連携を実施しているほか、その他企業が開発販売しているキット等の積極的な試用も実施している。いまだスタンダード手法が存在しないため、これら研究は今後 5 年ほど試行錯誤を続けていく必要があると考えている。

1 細胞解析のデータ精度を向上させるためには、各生物のゲノムデータを拡充する必要がある。共同研究者らと実施した花粉 1 細胞トランスクリプトーム解析データが、ゲノム断片配列の染色体レベルでのアセンブルに有効であることを確認している。現在、ドロップレット技術を基盤としたゲノム染色レベルでのアセンブルに向けた研究費への公募も果たしており、本技術を基盤とした水産生物のゲノム情報の拡充を自身の基盤研究として今後も続けていく。

液滴を用いた拮抗細菌スクリーニングは、新しく発生した疾病にも素早く対応可能とするため現場での応用の可能性が高いと考えられる。本課題では 1 種の *Vibrio* 属細菌に対してのみスクリーニングを実施したが、今後はその他細菌でも同様のスクリーニングを実施するほか、細菌以外の例えばファージのスクリーニングにも取り組みたい。染色体への eGFP 組み換えが困難な場合も存在するため、すでに細菌自体の染色や遺伝子組み換えを得意とする研究者と共同し新規スクリーニング手法の開発にも取り組んでいる。また、スクリーニングした拮抗細菌が生体に与える影響を、本課題で発見した血球細胞マーカーを用いて解析することで、拮抗阻害のみならず免疫賦活効果を有する有用細菌もスクリーニング可能となると考えている。

4. 自己評価

研究成果としては、現在までに1本の国際論文の投稿を完了している。次論文の執筆も進んでおり、2.5年間の研究活動を成果として発表できる見通しが立っている。また、本研究課題が礎となり、期間中に科研費若手研究および民間の助成金を獲得できた。これも、本課題の進展が評価されたためと考えている。幅広い研究コネクションを構築するため、他研究者と積極的にコミュニケーションを図った。その結果、共同研究が増加し、現段階で10件の共同研究ベースの公募研究費への申請に向けて動いている。公募研究費への応募をまだ行っていないものの、基礎データ取得が目的の共同研究はACT-X研究者とも実施している。さらに、タイ国研究者と二国間交流事業への公募も果たした（昨年度不採択 A・本年度も応募済み）。よって、当初計画をしていた幅広い研究コネクションの構築は一定のレベルで達成できたと考えている。水産分野やACT-X内の研究者に限らず、全くの外部の研究者から評価を受けて共同研究を実施できていることは、ACT-Xという制度をうまく活用できた結果なのではないかと自負している。自身の研究を促進させるために所属学会若手の会や、大学での研究生リクルート活動に積極的に参加した。また、研究室学生のモチベーションアップを目的とした、ACT-X研究者を招待しての学内講演や、外部研究室見学会の企画も実施した。その結果、現在、学部学生2名および修士学生2名を主指導教員として指導する機会を得られている。指導学生4名の学会発表もすでに実施しており、研究を通じた人材育成も達成できている。内1名は博士課程への進学を希望しており、今後も人材教育に力を入れていく所存である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. **Keiichiro Koiwai***, Hidehiro Kondo, Ikuo, Hirono, “scRNA-seq analysis of hemocytes of penaeid shrimp under virus infection”, *Marine Biotechnology* (2023), 25, 488-502.

クルマエビ類養殖で大きな問題となっているホワイトスポット病の原因ウイルスが感染した際の免疫細胞の応答を世界で初めて1細胞レベルで解析した。その結果、ウイルス感染は抗菌ペプチドの産生が盛んな特定の細胞集団を減少させることを明らかとした。これは、ウイルス病の対策法を考えるうえで重要な指標となる。また、クルマエビ類のような非モデル生物でも1細胞RNA-seq解析を実施することで細胞集団の変容を追跡できることも明らかにしたことは、他の非モデル研究への1細胞RNA-seqの活用に向けた指針となる。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

Keiichiro Koiwai. “Single Cell RNA-Seq in Aquatic Organisms”, (2023), FAOBMB2023.

小祝敬一郎, 原田真知, 近藤秀裕, 廣野育生. “無脊椎動物シングルセル解析でなにがわかりそうか?”, (2023), 第2回核酸研究会.

小祝敬一郎. “非モデル生物での 1 細胞トランスクリプトーム解析の活用事例”, (2022), DROPLET 2022.

小祝敬一郎. “水産生物へのシングルセル解析の適用と課題”, (2022), 令和4年度日本水産学会秋季大会内水産学若手の会シンポジウム.

小祝敬一郎. “非モデル生物へのハイスループットシングルセルトランスクリプトーム解析適用事例”, (2022), シングルセルゲノミクス研究会 2022.

小祝敬一郎. “シングルセル解析で挑む非モデル生物の細胞分類”, (2022), 令和4年度日本水産学会春季大会内水産学若手の会シンポジウム.

国際学会発表

Masachika Harada, Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. “Integration of hemocyte scRNA-seq data from two penaeid shrimps”, (2023), FAOBMB2023.

Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. “scRNA-seq analysis of hemocytes of penaeid shrimp reveals virus infection reduces AMP-expressing hemocytes”, (2023), 13th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference.

Keiichiro Koiwai, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. “Towards single cell mRNA analysis using fixed shrimp hemocytes”, (2022), The 13th Asian Fisheries and Aquaculture Forum.

国内学会発表

湯浅 壱, 小西佳代, 古川美穂, 野崎玲子, 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生. “クルマエビ類病原性 *Vibrio harveyi* に対する拮抗細菌の微小液滴を用いた高速スクリーニング法の開発”, (2024), 令和 6 年度日本魚病学会大会春季大会

湯浅 壱, 小祝敬一郎, 野崎玲子, 近藤秀裕, 廣野育生. “クルマエビ類病原細菌に対する拮抗細菌液滴スクリーニング法の開発”, (2023), NGS EXPO 2023.

小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生. “WSSV に感染したクルマエビ血球細胞の scRNA-seq 解析”, (2023), 第 23 回マリンバイオテクノロジー学会大会.

原田真知, 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生. “バナメイエビ血球細胞の分類と分類マーカーの探索に向けた一細胞トランスクリプトーム解析”, (2023), 令和 5 年度日本水産学会大会春季大会.

原田真知, 小祝敬一郎, 近藤秀裕, 廣野育生. “クルマエビ類横断的な血球細胞の分類に向けた一細胞 mRNA シーケンシング解析”, (2023), シングルセルゲノミクス研究会 2022.

書籍

小祝敬一郎. “1 細胞解析が拓く非モデル生物の研究”, *月刊細胞 6 月号* (2023).

プレスリリース

JST および東京海洋大学からの共同プレスリリース. “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～”, 2023 年 6 月 16 日.

みなと新聞. 上記プレスリリースを受けての記事掲載, 2023 年 6 月 20 日.

公開

日本経済新聞オンライン. 上記プレスリリースを受けての記事掲載, 2023年6月22日.
日経産業新聞. 上記プレスリリースを受けての記事掲載, 2023年6月30日.