

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04970

研究課題名(和文) ウイルス耐病性責任遺伝子を用いた天然魚における遺伝子選抜育種技術の開発

研究課題名(英文) Development of the selection method using the virus disease resistance gene in natural population.

研究代表者

坂本 崇 (Sakamoto, Takashi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：40313390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメは重要な養殖魚の一種である。リンホシスチス病は、ヒラメ養殖に被害を与えており、対策が必要な疾病の一つである。本研究では、リンホシスチス病に対する耐病性責任遺伝子の同定を試みると共に、責任遺伝子を用いた天然魚からの選抜技術の開発を行った。

本研究の成果は、1)天然採捕した成魚や個別タグをつけることが出来ない稚魚において、それらを生かしたまま遺伝子型判別や塩基配列情報を入手し、選抜する技術開発に成功したこと、2)耐病性形質についても天然採捕した稚魚を用いた関連解析が可能であること、3)天然採捕した稚魚における耐病性形質の関連解析で相関が考えられる一塩基多型が検出されたこと、があげられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リンホシスチス病に対する耐病性責任遺伝子の同定を試みると共に、その責任遺伝子を用いた天然魚からの選抜技術の開発を行った。天然集団の中にリンホシスチス耐病性形質を保持する個体が少ないため、まだ統計的に有意な結果にはならなかったが、関連解析などの成果からこれまでの耐病性責任遺伝子候補がやはり有力な遺伝子候補であることが明らかになった。本研究成果により、天然魚において耐病性責任遺伝子を用いて直接的に耐病性個体を選抜し、新規耐病性系統を作れる可能性を示したと考えている。

研究成果の概要(英文)： Japanese flounder is an economically important aquaculture species in Asian countries such as Japan, Korea and China. Lymphocystis disease (LD) is one of important disease and causes serious damage to Japanese flounder aquaculture industry. In this study, we investigated the virus disease resistant gene for LD and tried to develop the selection method using the sequences of the gene in natural population.

This research mainly accomplished three things as follows, 1) the development of the genotyping method with short-term rearing in wild juvenile fish, 2) performing the genome wide association study of the disease resistant trait on wild fish, 3) the finding of SNPs related with the disease resistant trait. These results would be very useful information to have the evidence of Lymphocystis disease resistant gene in Japanese flounder.

研究分野：水族分子遺伝育種学

キーワード：ヒラメ リンホシスチス 耐病性 ゲノム 育種 遺伝子 養殖 選抜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

養殖魚類の耐病性形質の分子遺伝学的解析は、我々の研究グループにより世界初の成果としてニジマス IPN ウイルス耐病性遺伝子座 (Ozaki et al., 2001) が明らかとなり、さらにニジマス IHN ウイルス耐病性遺伝子座 (Khoo et al., 2004)、本研究課題の基盤となるヒラメリンホシスチス耐病性遺伝子座 (Fuji et al., 2006)、ブリの寄生虫抵抗性遺伝子座 (Ozaki et al., 2013) が明らかとなっている。国外においては、アメリカのグループによるニジマス IHN ウイルス耐病性研究 (Palti et al., 1999., 2001)、寄生虫症抵抗性研究 (Nichols et al., 2003)、ノルウェーおよびイギリスのグループによる太平洋サケ IPN ウイルス耐病性研究 (Houston et al., 2008, Moen et al., 2009) などがある。これらの研究は耐病性形質に関連する遺伝子座の報告である。最近、スコットランドの研究グループが、候補遺伝子の機能解析などから上記の太平洋サケ IPN ウイルス耐病性遺伝子の可能性のある遺伝子を単離した (Moen et al., 2015)。しかしながら養殖集団内での解析において、責任遺伝子として報告した遺伝子内に存在する変異と耐病性・感受性との間に相違がある個体が存在し、そのことは、著者らが当該論文で指摘しているように、耐病性遺伝子座領域内に他の責任遺伝子の存在を示唆している。研究開始当初では、養殖魚類において耐病性形質の責任遺伝子に関する報告は上記のみであり、耐病性形質と責任遺伝子との関連性を十分に明らかにした報告はない。本課題での耐病性形質の責任遺伝子同定は先駆的で、世界的に非常に競争的な課題であり、さらに、天然個体から耐病性個体を遺伝子選抜する技術の開発は、他に例がない独創的な研究課題である。

2. 研究の目的

本研究課題では、養殖魚類において耐病性形質責任遺伝子の同定を行い、その遺伝子を用いた世界初となる天然個体から耐病性個体選抜を可能にする分子育種法を開発することを目的とする。我々の研究グループのこれまでの成果により、単独遺伝子座で支配されていることが明らかになったウイルス病 (ヒラメリンホシスチス病) 耐病性形質の責任遺伝子候補について解析し、その責任遺伝子を同定する。本研究課題では、遺伝育種学的な解析方法およびその結果に基づき責任遺伝子の同定を行うため、その成果は、水産分野における「天然個体から耐病性魚を遺伝子選抜する」ことを可能にする新規で実践的な応用研究と言える。さらに、本研究による耐病性責任遺伝子の特定は、未解明の耐病性メカニズムを明らかにすることが出来る基礎科学的にも大きな貢献が期待出来る。

3. 研究の方法

本研究課題では、魚病学、分子生物学、遺伝育種学の各手法を活用し、責任遺伝子の単離・同定を行う。これまでの研究成果によって絞り込まれた責任遺伝子候補において、耐病性系統と感受性系統との候補遺伝子内の塩基配列比較によって明らかになった変異 (一塩基多型: SNP) を選抜マーカーとして天然個体の遺伝子選抜を行う。その天然個体の次世代集団を作出し、その集団でリンホシスチス病の人為感染実験を行い、次世代集団が耐病性形質を有することを証明する。本研究課題の目的である「天然個体から耐病性魚を遺伝子選抜する」ことを可能な技術開発を行うためには、これまでの研究成果で絞り込んだ責任遺伝子候補と耐病性形質との関連性 (相関) について、天然魚を用いて証明する必要がある。そのために、以下の2つの実験項目を実施した。

(1) 実験項目1: 天然魚 (ヒラメ稚魚) を用いた耐病性責任遺伝子候補による相関解析

これまでの解析で絞り込んだ責任遺伝子候補において、機能ドメイン内に存在する耐病性系統と感受性系統との差異がある SNP は、予備実験の結果、天然集団では約 2-3% の個体が保有していることが明らかになった。そこで、天然魚 (ヒラメ稚魚) を採捕し、リンホシスチス病人為感染実験を行うことで、耐病性系統が保有する候補責任遺伝子の差異を有する天然魚が生存し、保有しない天然魚が死亡するかどうかを検討した (責任遺伝子候補の塩基配列・アミノ酸配列と耐病性形質との相関解析)。

毎年6月上旬に、京都府舞鶴市由良川河口の砂浜域砕波帯付近で、3-5cm 程度のヒラメ稚魚が生息していることが明らかになっていた。これまでの採捕実績のある場所において、京都大学舞鶴実験所の練習船を用いて、桁網により天然ヒラメ稚魚を採捕した。研究実施期間の3年間で、毎年200尾以上の稚魚を採捕し、飼育実験施設に搬入した。免疫機能を保持する考えられる5-8cm程度まで1ヶ月程度の飼育管理を行い、100尾程度を東京海洋大学品川キャンパスに運搬し、人為感染実験に供試した。

発症魚 (感受性魚) と非発症後 (耐病性魚) において、耐病性系統と同一の責任遺伝子候補の塩基配列との関連性を解析した。また、共著者として報告したヒラメ全ゲノム情報 (C. Shao et al., *Nature Genetics*, 2017) を利用して、次世代シーケンサーによるリシーケンス解析を実施し、責任遺伝子候補ゲノム領域に関して、相関解析を実施した。また、責任遺伝子候補の機能ドメイン内の全てのアミノ酸配列を対象として相関解析を実施するため、次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス解析法を開発し、相関解析を実施した。

(2) 実験項目2: リンホシスチス耐病性形質の責任遺伝子候補を用いて選抜された天然親魚の次世代集団を用いた連鎖解析

①リンホシスチス耐病性形質の責任遺伝子候補を用いた天然親魚の選抜と次世代集団の作出
責任遺伝子候補の機能ドメイン内に存在する耐病性系統と感受性系統との差異がある SNP について、神奈川県水産技術センターおよび千葉県水産総合研究センターが保有するヒラメ天然親魚や神奈川県や千葉県で水揚げされた活ヒラメを購入し、耐病性系統と同一配列を保有する個体を探索した。同一配列を保有する個体から次世代集団を作出すると共に、精子を採取し、液体窒素中で凍結保存した。

②遺伝子選抜された天然魚から作出された次世代集団の人為感染実験と連鎖解析
遺伝子選抜された天然魚から次世代家系を作出すると共に、リンホシスチス病人為感染実験を実施し、各個体の表現型と遺伝子型を連鎖解析した。

4. 研究成果

(1) 実験項目 1：天然魚（ヒラメ稚魚）を用いた耐病性責任遺伝子候補による相関解析

①採捕したヒラメ稚魚 100 尾（5cm 以上 50 尾、5cm 以下 50 尾）を人為感染実験に供試した。初年度は、採捕後すぐに運搬し人為感染実験に用いた。このため、感染実験初期に採捕時のスレや他疾病による死亡が半数程度あった。生残魚におけるリンホシスチス病発症の有無を確認し、非発症魚 1 尾、微発症魚が 3 尾だった。これらの個体において、リンホシスチス耐病性形質との関連性が予想されていた SNP を解析したが、耐病性形質との関連性は見られなかった。

②次年度は、初年度の経験から採捕後に京都大学舞鶴実験所内での 1 ヶ月程度の飼育期間を設け、ヒラメ稚魚のコンディションの回復、実験サイズの均一化を行うと共に、目的の SNP を保持する個体の選別方法を開発した（図 1）。最有力耐病性責任遺伝子候補の機能ドメイン内に存在する SNP と第 2 候補遺伝子内の SNP により、天然ヒラメ稚魚の遺伝子選抜を実施した。人為感染実験には、最有力耐病性責任遺伝子候補の当該 SNP を保持する個体を 5 尾、第 2 候補遺伝子の当該 SNP を保持する個体を 8 尾、両 SNP を保持する個体を 3 尾と陰性対象（上記 2 遺伝子の当該 SNP を持たない）として 12 尾を用いた。感染実験後の各個体の表現型（発症・非発症）と遺伝子選抜との間に、関連性は明らかにならなかった。そこで、感染実験終期まで生残していた 17 個体について、全ゲノムリシーケンス解析を実施した。共著者として報告したヒラメ全ゲノム情報（C. Shao et al., Nature Genetics, 2017）を利用して、さらに精密な耐病性責任遺伝子候補領域のリファレンス配列を作成した。Hiseq X ten（イルミナ社）によるシーケンスの結果、1 個体あたり平均 223 億リードの配列データを取得した。17 個体の集団内で、耐病性責任遺伝子候補ゲノム領域内に 7446 個の SNP が検出され、maf > 0.01、genotyping rate > 70% のフィルタリング条件を満たす総 SNP 数は、5665 個となった。これらの SNP マーカーにおいて、GWASpoly および PLINK の 2 つの異なるアルゴリズムを用いて、リンホシスチス耐病性責任遺伝子候補領域内関連解析を行った。GWASpoly および PLINK 共にボンフェローニの多重比較法による補正を行った後にゲノムワイド有意水準を超える SNP は得られなかったが、相関性が考えられる SNP が GWASpoly で 2 か所、PLINK で 1 か所認められた（図 2）。PLINK で検出された SNP は GWASpoly で検出された SNP の 1 か所と領域が近接しており、その領域は最有力耐病性責任遺伝子候補近傍に位置していることから、今後のさらなる解析が期待された。



図1. ヒラメ稚魚の短期個別飼育による遺伝子型解析方法

用いた。感染実験後の各個体の表現型（発症・非発症）と遺伝子選抜との間に、関連性は明らかにならなかった。そこで、感染実験終期まで生残していた 17 個体について、全ゲノムリシーケンス解析を実施した。共著者として報告したヒラメ全ゲノム情報（C. Shao et al., Nature Genetics, 2017）を利用して、さらに精密な耐病性責任遺伝子候補領域のリファレンス配列を作成した。Hiseq X ten（イルミナ社）によるシーケンスの結果、1 個体あたり平均 223 億リードの配列データを取得した。17 個体の集団内で、耐病性責任遺伝子候補ゲノム領域内に 7446 個の SNP が検出され、maf > 0.01、genotyping rate > 70% のフィルタリング条件を満たす総 SNP 数は、5665 個

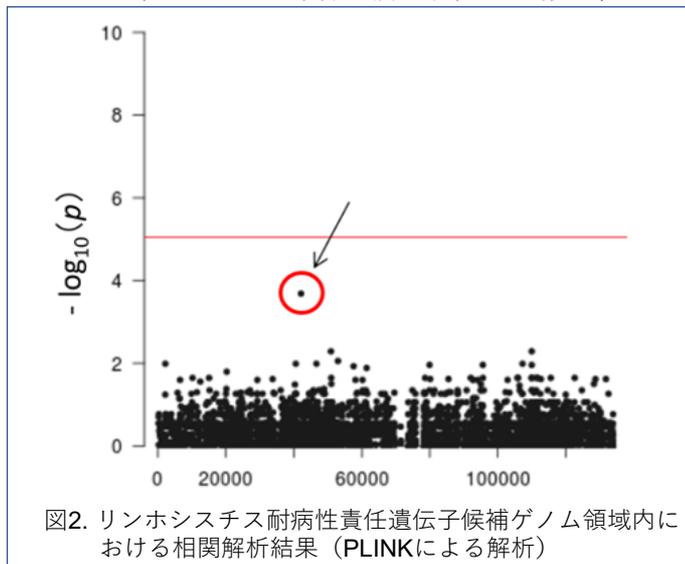


図2. リンホシスチス耐病性責任遺伝子候補ゲノム領域内における相関解析結果（PLINKによる解析）

③3 ヶ年にわたって京都大学舞鶴実験所で採取された天然ヒラメ稚魚を用いた人為感染実験サンプル合計 33 尾（発症個体 25 尾、非発症個体 8 尾）について、リンホシスチス耐病性責任遺

伝子候補内に存在する SNP と耐病性形質との相関解析を行った。本課題開始時には、最有力耐病性責任遺伝子候補の機能ドメイン内に存在する SNP が耐病性形質との関連性があるのではないかと考えていた。しかしながら、これまでの実験項目 1 および 2 の研究成果から、責任遺伝子候補内に存在するアミノ配列の変化を伴う複数の SNP (非同義置換 SNP) の組み合わせが耐病性形質に関連しているのではないかと推定された。そこで、各個体において耐病性責任遺伝子候補のゲノム領域を PCR 増幅し、その PCR 産物を次世代シーケンサーで解析するターゲットリシーケンス法を開発した。このゲノム領域では相同染色体のそれぞれから得られる塩基配列 (アレル) に複数の SNP が存在した。そこで、各配列におけるアミノ酸配列の組み合わせを明らかにするためには、そのゲノム領域全長をクローニングにより単離・解析する必要があった。しかしながら、ゲノム領域全長は長くクローニングには適さないため、ターゲットリシーケンス法を開発した。なお、一部の個体については、クローニングおよびサンガー法により塩基配列情報を入手した。次に、各アレルのアミノ酸配列情報を用いて、近隣接合法および最尤法の 2 つの手法によって分子系統樹を作成し、非発症個体が多く存在するクラスターの検出を試みた。その結果、非発症個体 8 個体中の 6 個体が存在するクラスターを検出した (図 3)。また、6 個体中 4 個体に共通する特有のアミノ酸残基があることが明らかになった。

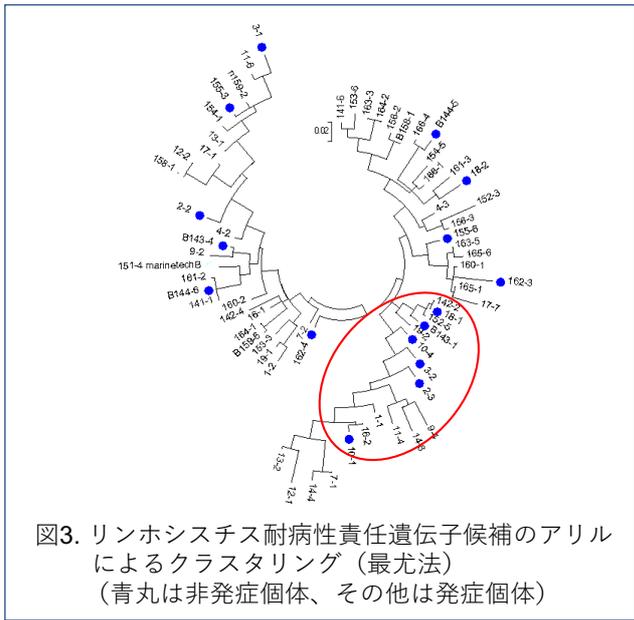


図3. リンホシスチス耐病性責任遺伝子候補のアレルによるクラスタリング (最尤法)
(青丸は非発症個体、その他は発症個体)

(2) 実験項目 2 : リンホシスチス耐病性形質の候補責任遺伝子を用いて選抜された天然親魚の次世代集団を用いた連鎖解析

① 神奈川県水産技術センターおよび千葉県水産総合研究センターが保有するヒラメ天然親魚において、それぞれ 1 尾と 2 尾がリンホシスチス耐病性責任遺伝子候補の当該 SNP を保持することが明らかになった。神奈川県水産技術センターが保有する当該ヒラメ天然親魚と感受性系統を交配し、次世代解析家系を作出した。千葉県水産総合研究センターが保有する当該ヒラメ天然親魚 2 尾からは精子を採取し、次世代作出を試みたが作出できなかった。これは、全国的に問題となっているウイルス疾病による種苗生産不調が続いているためだった。また、協力機関での新規天然魚の利用および種苗生産協力が困難となったため、実験項目 2 では上記 1 家系の解析のみとし、実験項目 1 に集中することとした。

② 神奈川県水産技術センターで作出された天然ヒラメ親魚由来の解析家系において、人為感染実験を実施した。感染実験に用いるウイルス濃度を 2 区設け、各区 50 尾程度で実施した。感染実験後に、解析家系の各個体からゲノム DNA を抽出し、各個体の表現型 (発症・非発症) とリンホシスチス耐病性責任遺伝子候補の当該 SNP 保有の有無 (遺伝子型) との関係連鎖解析した。残念ながら、感染実験中の機器トラブルによる事故などがあり実験期間が短縮され、発症個体が十分に得られない中で解析となった。今回の解析では、当該 SNP と耐病性形質との関連性は明らかにならなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 C. Shao et al.,	4. 巻 49 (1)
2. 論文標題 The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Genetics.	6. 最初と最後の頁 119-127.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1038/ng.3732	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saki Kabayama, Ayana Nakajima, Masatoshi Nakamoto, Tsubasa Uchino and Takashi Sakamoto
2. 発表標題 SNP detection within the region related to lymphocystis disease resistance in Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>
3. 学会等名 The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations"（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本 崇
2. 発表標題 国内外の水産養殖における 育種の現状と将来展望について
3. 学会等名 第42回 全国養鱒技術協議会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本 崇
2. 発表標題 養殖魚類における遺伝情報を活用した育種研究の現状と展望
3. 学会等名 第14回 種苗生産技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----