

令和元年6月21日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21208

研究課題名(和文) 魚類の健康コンディション評価のための血液中ノンコーディングRNA網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of ncRNA in blood for evaluation of fish health condition

研究代表者

清水 園子(山口園子)(Shimizu, Sonoko)

愛媛大学・南予水産研究センター・准教授

研究者番号：90531369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エドワジエラ症は、マダイ養殖において慢性的に発生しており、早期発見および対策が被害低減に重要である。本研究では、エドワジエラ症感染および健常マダイの全血で発現しているmiRNAを網羅的に解析した結果、それぞれの全血に存在するmiRNAの配列が明らかになった。それらの配列を他の生物種と比較した結果、生体防御や免疫関連の機能を持つと考えられるmiRNAと同一性が見られた。このうちの7種について、定量PCRにて未感染魚および感染に伴う発現量の詳細な変動を解析した結果、エドワジエラ症の感染が認められた9月に変動するmiRNAが見られ、これらが本症感染の早期検出マーカーに有用となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の魚類養殖において、魚病の発生は慢性化しており、安定的な養殖生産を行う上で大きな障害となっている。魚病による大量斃死や養殖魚の品質劣化を低減させるには、早期検出および早期対策が重要になる。本研究課題では、マダイの血液を用いて、マイクロRNA(miRNA)を網羅的に解析し、マダイ養殖で問題となっているエドワジエラ症感染時に発現が変化するmiRNAを明らかにした。本研究で得られたmiRNAのデータを分子マーカーとして用いることで、将来的には、魚類の血液を用いた簡便かつ定量的に魚病の早期発見や健康状態の把握が可能となり、被害の大幅軽減に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Edwardsiellois is a bacterial infection and causes mass mortality and quality deterioration of red seabream. Hence this disease become serious problem for aquaculture of Red seabream in Japan. To reduce the terrible damages, it is important for early detection and counterpart for this disease. In this research, we comprehensively analyzed the micro RNA (miRNA) expressed in blood of infected and non-infected red seabream by NGS. In analysis using NGS, some miRNA significantly expressed in blood of infected fish in comparison with non-infected fish. Decrease of expression also showed in a few miRNA in infected fish. We also detected significant differences of some miRNA expression between non-infected and infected fish using quantitative PCR methods. These results suggest that miRNA expression in blood of red seabream changes after infection of edwardsiellosis, and these miRNA may be useful as a molecular marker for early detection of infection with minimal invasive diagnostic procedure.

研究分野：養殖環境学

キーワード：miRNA マダイ 魚病 早期検出

1. 研究開始当初の背景

養殖漁業は、全世界において今や必要不可欠な食料供給源となっており、世界的に養殖漁業が増加している。我が国では養殖生産量のうち約96%が海面養殖であり、魚類養殖では9割以上をブリ類とマダイが占める(平成23年漁業・養殖業生産統計、農林水産省)。こうした養殖漁業において、魚病による漁業被害は毎年慢性的に発生しており、安定的かつ持続的な養殖生産を行う上で、大きな妨げとなっている。全国での魚病被害額は年間約100億円(平成25年水産白書)で推移しており、甚大な被害となっている。

魚病に関しては、近年のワクチン開発により、特定の病気を効果的に予防することが可能となった。しかし、マダイ養殖で最も被害の多いエドワジエラ症やブリ類で多発しているノカルジア症などのワクチン対象外の魚病については、いまだ有効な手段がない。また、マダイイリドウイルスによるイリドウイルス症などワクチンが開発されている病気についても、高価で、接種に対する助成も無いために広く普及していないのが現状である。このように、魚病が、効率的かつ安定的な養殖生産の最大の妨げとなっており、生産者にとっては死活問題である。そこで、養殖現場における魚病の早期発見が、早期対策・被害低減に繋がることを期待される。

我々の研究グループでは、魚病の早期発見を目的として、魚病病原体6種について、遺伝子情報を利用した検出系を確立しており、海洋環境中から、魚病の発生前に病原体を検出することに、実海域で初めて成功した。しかしながら、魚病の発生には、病原体の存在だけではなく、病原体の宿主となる魚類の生体防御機能や、代謝や抗酸化ストレス反応などの生理状態も魚病の発生に重要であると考えられている。近年、哺乳類などの研究により、ノンコーディングRNAと呼ばれるRNAが、がんのバイオマーカーとして患部や血液、尿などから検出する研究が進められており、現在、乳がんや肺がん、胃がんなどで血清中のマイクロRNA(miRNA:短鎖のノンコーディングRNA)の発現が変化することが明らかとなっている(Hauptman and Glavac, 2011, *Radiology and Oncology*, 47)。さらに、近年では、ウイルス感染によりncRNAの発現が変化することが示唆されており、感染症のマーカーとしての応用も期待されている(Zhang and Jeang, 2013, *Biomedicine*, 3)。しかし、魚類において、これらncRNAと魚病発生や健康状態に関する研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

我が国の魚類養殖において、魚病の発生は慢性化しており、安定的な養殖生産を行う上で大きな障害となっている。本研究課題では、マダイ血液中で発現しているノンコーディングRNA(ncRNA)を網羅的に解析し、魚類の免疫や代謝、ストレス耐性などで機能的な働きをもつncRNAを探索する。さらに、魚病感染時や、水温などの環境変化に伴うマーカーncRNAの発現の変動を解析する。本研究成果により、魚類の血液で発現しているncRNAが持つ、免疫系や生理状態における機能が明らかとなれば、簡便かつ定量的に魚病の早期発見や健康状態の把握が可能となり、被害の大幅軽減に繋がると期待される。持続的かつ安全・安心な水産物の供給体制を構築する上で必要不可欠な研究である。

3. 研究の方法

愛媛県で盛んに養殖がおこなわれているマダイをモデル魚として、魚類の血液中で発現している、ノンコーディングRNA(ncRNA)を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、BLASTなどのバイオインフォマティクスを用いて、その情報の位置づけを行い、ストレス応答、代謝、免疫等に関する機能を予測する。

その情報を基にして、養殖環境下で飼育されているマダイを定期的に採取し、血液中のncRNAの挙動、特にイリドウイルス症やエドワジエラ症などの魚病が多く発生している時期の変動を明らかとする。これらの結果を併せることにより、魚類の生体内におけるncRNAの機能が明らかとなるとともに、魚類の生理学的・免疫学的コンディションを簡便に定量する方法を確立することを目指す。

4. 研究成果

(1) エドワジエラ症感染時に伴う血液中miRNAの網羅的解析

本実験では、マダイ養殖において大きな問題となっている細菌性疾病のエドワジエラ症を対象として研究を行った。愛媛県宇和島市のマダイ養殖場において、養殖場に導入直前の未感染魚および、養殖過程で体内から*Edwardsiella tarda* 遺伝子が検出、または細菌培養によって、菌が分離され、感染が確認された感染魚から血液を採取した。採取した血液は、血漿と血球に分離後、それぞれ-80℃で保存した。また、分離しない全血も凍結保存した。その後、血漿または全血からスモールRNAのうち、miRNA(21~25塩基)の抽出を試みた。

各サンプルから、miRNA 抽出キット (Nucleo spin miRNA kit および Nucleospin miRNA Plasma; Machery-Nagel 社) にて抽出し、Bioanalyzer で解析した結果、血漿および全血で 200 塩基以下のスモール RNA が得られ、また、miRNA と推定される 20-40 塩基以下の RNA のピークが検出された。これらの結果から、魚類の血液中に miRNA が存在することが示唆された。なお、血漿および全血から得られたスモール RNA の品質をバイオアナライザーで解析した結果、全血から得られた miRNA の方の品質が高かったため、今後の解析では全血から得た miRNA を用いて実施した。

エドワジエラ症感染マダイおよび健常マダイの全血から抽出した miRNA の配列について、次世代シーケンサー (NGS: Miseq, illumina 社) を用いて網羅的解析を実施した。その結果、それぞれのマダイの全血に存在する miRNA の配列が明らかとなった。さらに、それらの RNA の配列および発現量を、次世代シーケンサーで比較した結果、エドワジエラ感染魚で単球炎症反応やアポトーシス、細胞死、自然免疫、微生物防御等に機能を持つと考えられる 13 種のスモール RNA で、感染魚で発現量が増加または低下していた (図 1)。

これまでの我々の研究により、マダイに *E. tarda* を人為感染すると、肝臓中の Hecpudin 遺伝子発現が増加することが明らかになっており、発症前の感染指標になる可能性を示している (Mahapatra et al., 2015, Comp Biochem Physiol A. 189, 1-10)。このことから、肝臓中の Hecpudin 遺伝子発現が相対的に高いが、*E. tarda* 遺伝子および菌が検出されなかった養殖マダイと、導入時の未感染魚で発現している miRNA の配列も比較した。その結果、感染魚で発現量が変化していた miRNA について、同様の発現の変化が見られた。

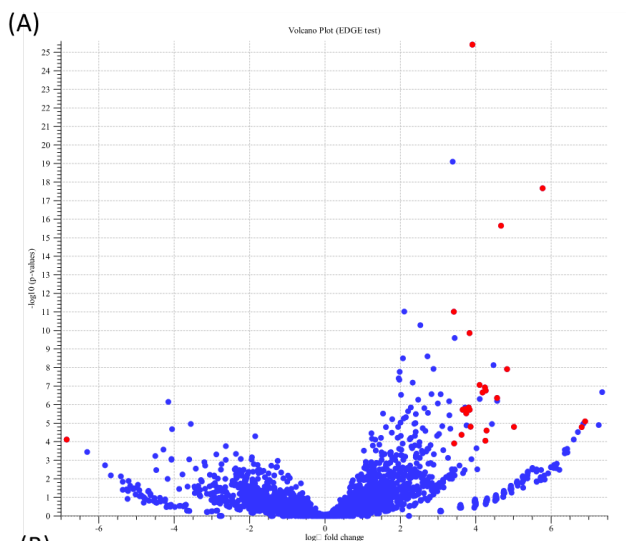
さらに、Hecpudin が高かった養殖マダイと、*E. tarda* が検出されたマダイについて、NGS で得られたシーケンスを比較した結果、感染が検出されたマダイで発現が増加していた遺伝子が 1 種類確認された。

(2) 定量的 PCR による発現量解析

スモール RNA のうち、次世代シーケンサーの解析で特に発現が顕著であった 7 種について、定量 PCR による測定系を構築し、養殖生簀で飼育しているマダイの 0 歳魚および 1 歳魚の感染に伴う発現量の詳細な変動を解析した。なお、内部標準遺伝子には、(1) の網羅的解析で、感染魚と非感染魚の間で発現量に差が見られなかった miRNA を内部標準に用いた。

その結果、NGS で得られた結果と同様に、エドワジエラ症の感染が認められた 9 月に、発現が著しく減少した miRNA が 1 種、有意差は見られなかったものの、発現が増加する傾向が見られた miRNA が 2 種見られた。このことから、これらの miRNA が本症感染の早期検出マーカーに有用となる可能性が示唆された。

一方で、NGS では発現が増加していたが、定量 PCR では減少傾向が見られた miRNA があった。*E. tarda* の感染状況や、病気の進行状態と関係している可能性が考えられ、今後詳細な解析が必要である。



(B)

Name	function
A	Glioblastoma, Gastric cancer, Tumor suppression in hepatoma cell, dicer independenced miRNA biogenesis, Erythrocyte development
B	Monocyte Inflammatory response, cancer cell clearing, regulates autophagy
C	Senescence and apoptosis, COX regulation, Innate immunity
D	P53 phosphorylation, T cell regulation, inflammatory response
E	Gut brain disorder, P53 phosphorylation, autophagy regulation
F	Oxidative stress response, cell death, metastatic cancer
G	Inflammatory response
H	Regulates NF-kb pathway, Calcium ion homeostasis
J	Cell death
K	Innate and adaptive immunity, kidney disease, coronary artery disease
L	Tumor suppression, fatty liver disease, innate immunity, T cell immunity,
M	Tumor suppression, T lymphocyte immunity
N	Microbial protection, mucosal immunity,

図1. *E. tarda* 感染魚および未感染魚の全血中で発現している miRNA. (A)両者を用いた Volcano plot, FDR<0.05 を赤色で示す。(B) (A)にて赤で示した miRNA の配列から推察される機能。

(3) 総括

本研究により、マダイの血液中に miRNA が存在することが明らかになった。これまで、魚類を用いた miRNA の解析は、ゼブラフィッシュやメダカなど、淡水に生息するモデル魚を用いた研究が主であり、海産魚に関する知見は少ない。本研究では、エド和字ら小感染における miRNA の発現に着目して解析したが、その他の miRNA のデータについても、海産魚の miRNA の機能を解析する上で重要な知見になる。

今回、血液からエドワジエラ症感染時にマーカー候補となる miRNA が得られたことは、今後、魚体を解剖することなく、低侵襲性の魚病診断方法の開発につながることを期待出来る。複数種の miRNA が、感染に伴い変化していることから、今後は、養殖環境を反映した感染実験を実施し、これら miRNA 発現の詳細な時間変化を明らかにし、これら miRNA の有効性の向上などを検討したい。また、これらの miRNA が感染に伴いどのような機能を有しているのか、機能解析を明らかにする必要があると考えられる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Mohammad Ali Noman Reza, Sipra Mohapatra, Sonoko Shimizu, Shin-Ichi Kitamura, Shogo Harakawa, Hidemasa Kawakami, Kei Nakayama, Eitaro Sawayama, Takahiro Matsubara, Kohei Ohta, Tapas Chakraborty (2018). Molecular cloning, characterization and expression analysis of complement components in red sea bream (*Pagrus major*) after *Edwardsiella tarda* and red sea bream Iridovirus (RSIV) challenge. *Fish and Shellfish Immunology* 82, 286-295.

2. Sipra Mohapatra, T. Chakraborty, M.A.N. Reza, S. Shimizu, T. Matsubara, K. Ohta (2017). Short-term starvation and realimentation helps stave off *Edwardsiella tarda* infection in red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*. 206: 42-53.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 松本真依・Sipra Mohapatra・Tapas Chakraborty・川上秀昌・原川翔悟・Reza Mohammad Ali Noman・太田耕平・松原孝博・清水園子・マダイのエドワジエラ症感染早期検出技術の開発、平成 29 年 11 月 18 日 日本水産増殖学会第 16 回大会 宇和島市

2. 服部純也・岡本渉・齋藤類・太田耕平・松原孝博・武岡英隆・清水園子・魚病早期検出のための海水中病原体の挙動解析 平成 29 年 11 月 18 日 日本水産増殖学会第 16 回大会 宇和島市

3. Mohammad Ali Noman Reza, Tapas Chakraborty, Sipra Mohapatra, Shogo Harakawa, Hidemasa Kawakami, Takahiro Matsubara, Kohei Ohta, Sonoko Shimizu. Characterization of complement system association in stress responsive immunity modulation in red sea bream, *Pagrus major* 平成 29 年 11 月 18 日 日本水産増殖学会第 16 回大会 宇和島市

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：チャクラボーティー タパス

ローマ字氏名：CHAKRABORTY Tapas

研究協力者氏名：竹内 久登

ローマ字氏名：TAKEUCHI Hisato

研究協力者氏名：川上 秀昌

ローマ字氏名：KAWAKAMI Hidemasa

研究協力者氏名：マハパトラ シブラ

ローマ字氏名：MOHAPATRA Sipra

研究協力者氏名：原川 翔吾

ローマ字氏名：HARAKAWA Shogo

研究協力者氏名：松原 孝博

ローマ字氏名：MATSUBARA Takahiro

研究協力者氏名：太田 耕平

ローマ字氏名：OHTA Kohei

研究協力者氏名：吉原 勇作

ローマ字氏名：YOSHIHARA Yusaku

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。