

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00431

研究課題名（和文）魚類における耐病性責任遺伝子の同定と新規疾病が野生集団に与える遺伝的影響の解析

研究課題名（英文）Identification of genes responsible for disease resistance in fish and analysis of the genetic impact of novel diseases on wild populations of fish.

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） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、魚類における細菌性疾病に対する耐病性形質の責任遺伝子を同定し、耐病性メカニズムを明らかにすると共に、その責任遺伝子を用いて、自然河川で発生した新規疾病による野生集団への遺伝的影響を明らかにすることを目的とした。本研究成果として、耐病性形質との関連性が示唆されたSNPが存在する2つの責任遺伝子を明らかにした。また、責任遺伝子に存在するSNPが、疾病発生前と発生後では、野生集団において遺伝子型頻度が変化していることを捉えた。さらに、その責任遺伝子のSNPを利用した遺伝子選抜技術を開発すると共に、責任遺伝子が発現する血液細胞を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果として、耐病性形質との関連性が示唆されたSNPが存在する2つの責任遺伝子を明らかにした。また、責任遺伝子に存在するSNPが、疾病発生前と発生後では、野生集団において遺伝子型頻度が変化していることを捉えた。魚類における細菌性疾病に対する耐病性責任遺伝子の同定は世界初の成果であり、また、疾病発生後の野生集団において責任遺伝子において、耐病性関連SNPの遺伝子型頻度が大きく変化していることも世界初の成果であることから、学術的意義は大きい。さらに、その耐病性関連SNPを利用した遺伝子選抜技術は、養殖業における新たな育種技術であり、今後の実産業への応用が期待され、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study were to identify the genes responsible for disease resistance traits against bacterial diseases in fish, to elucidate the mechanisms of disease resistance, and to use these responsible genes to determine the genetic impact of novel diseases occurring in natural rivers on wild populations. As a result of this study, two responsible genes were identified with SNPs suggested to be associated with disease resistance traits. We also found that SNP in the responsible gene had altered genotype frequencies in the wild population before and after the disease outbreak. Furthermore, we developed the gene selection technique using the SNPs in the responsible genes and also identified blood cells in which the responsible genes are expressed.

研究分野：水族遺伝育種学

キーワード：耐病性 養殖 細菌性疾病 責任遺伝子

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

養殖業において細菌やウイルスによる疾病被害は大きく、その被害額は年間およそ 100 億円にのぼり大きな問題の一つである。そのため、耐病性品種の開発は、経済的にも大きな効果をもたらすことが期待される。疾病被害は、養殖業だけでなく自然河川において野生集団も発生している。養殖業に人工種苗を用いる場合には、耐病性形質が付加された耐病性系統の利用が疾病被害軽減に有効である。天然魚から耐病性形質を保有する個体を選抜し、耐病性系統を効率的に作出するためには、耐病性メカニズムを解明することが重要である。さらに、自然河川で新規疾病が発生した際に、その疾病が野生集団にどのような遺伝的影響を与えるのかを明らかにすることは極めて重要な課題である。

本研究が対象とした疾病は、アユ細菌性冷水病である。アユ *Plecoglossus alivelis* はキュウリウオ目キュウリウオ科アユ科アユ属に分類される淡水魚である。生息域は、日本列島のほぼ全域と、韓国や中国の一部地域である。アユは古くから食用として利用されるほかに、遊漁対象魚種として、全国の河川で種苗放流が実施されており、日本の内水面養殖漁業における重要魚種となっている。細菌性冷水病とは、グラム陰性菌である *Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とした細菌性の疾病で、日本においては、1985 年頃からギンザケやニジマスに見られるようになり、アユでは 1987 年に養殖場で発生が確認されている。養殖および天然水域のアユで発生し、主な症状としては、体表の糜爛・潰瘍、下顎部の出血や欠損、鰓や内臓諸器官の貧血などが見られる。水温 16~20°C での発生が多く、降雨後の急激な水温変化、水の濁り、ストレスが影響して感染すると言われており、全国のアユ養殖場で毎年被害が発生している。現在、養殖場などで行なわれている冷水病対策には、加温処理、スルフィソゾールナトリウムの投与、各種ワクチンの開発などが挙げられる加温処理は、加温した水を徐々に注水し、飼育水温を 23°C まで上げて 3 日間維持し、通常水温 (18°C 程度) に数日間戻した後に再度 28°C で 3 日間維持することで、冷水病の治療を行う方法である。スルフィソゾールナトリウムは、唯一アユ冷水病の治療薬として認可されている化学療法剤である。ワクチンについては、これまでにオイルアジュバントや水溶性アジュバントをホルマリン死菌に混合した注射ワクチンや、ホルマリン死菌を用いた経口ワクチンなどの研究が進められている。しかし、加温処理は温度上昇によって生じるストレスや酸欠、水質悪化、他の疾病の発生等が起こるおそれがあり、それによってアユが死亡する可能性がある。スルフィソゾールナトリウムについても、薬剤耐性菌の出現が懸念される。ワクチンはその有効性が報告されているものの、実用化には未だ至っていない。以上のように、養殖場でのアユ冷水病被害は根本的には解決しておらず、冷水病への対策として耐病性形質を遺伝的に有する系統を作出し、種苗生産に利用することが期待されている。

魚類において細菌性疾病に対する耐病性責任遺伝子は、これまでに単離・同定されておらず、そのメカニズムは未知のままである。魚類の感染性疾病における責任遺伝子単離の報告例でも、ウイルス病が 1 例、寄生虫症については申請者らの研究グループによる 1 例のみである。細菌性耐病性形質に関する分子遺伝学的解析例は様々な魚種で多数あるものの、本研究が対象とする細菌性疾病 (アユ冷水病) の耐病性遺伝子座のように、単一の主働遺伝子座によって耐病性形質が支配されていることを裏付けられた例はない。複数遺伝子座が関与する耐病性形質では、責任遺伝子の同定は非常に困難であり、ほとんど実施されていない。さらに、新規疾病が野生集団に及ぼす遺伝的影響を解析する研究展開や、野生個体から直接耐病性個体を選別する研究報告例は皆無である。

2. 研究の目的

本研究課題では、4 つの学術的「問い」を明らかにすることを研究目的とした。

1) 細菌性耐病性形質の機能を担う責任遺伝子は何なのか？

魚類において細菌性疾病に対する耐病性形質の機能を担う責任遺伝子 (以下、責任遺伝子) は、これまでに単離同定されておらず、そのメカニズムは未知のままである。本研究では、魚類において世界初となる細菌性疾病に対する責任遺伝子を同定し、その本体を明らかにする。

2) 細菌性耐病性メカニズムはどのようなものなのか？

これまでも魚類の疾病に関する生体防御能解析においては、種々の関連遺伝子が報告されているが、耐病性形質の遺伝的背景を解析し、その遺伝子座から耐病性形質の本質となる責任遺伝子を単離した報告例は上記 2 例のみである。本研究では、細菌性疾病 (アユ冷水病) の耐病性

遺伝子座から責任遺伝子を単離・同定し、耐病性メカニズムを明らかにする。

3) 自然河川で新規に発生した疾病は、野生集団にどのような遺伝的な影響を与えるのか？

本研究の対象とするアユ冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* を原因細菌とする疾病で、日本のアユでは 1987 年に養殖場で発生が報告され、1993 年ごろから自然河川においても発生するようになった。現在でも全国の河川で冷水病が発生している。新規疾病の魚病被害においては、発生当初の数年は大きな被害があり、その後はある程度の被害状況に落ち着く傾向が知られており、アユ冷水病についても同様な傾向が見られた。このような動向は、自然界で発生した疾病被害では、野生集団内で自然選択が起こり、その後に耐病性形質を保有した個体が世代を繋いでいる可能性があると考えられる。しかしながら、自然河川で発生した新規疾病による野生集団への遺伝的な影響を解析した例は過去にない。自然河川で毎年採集されてきたアユ（同一河川の冷水病初発発生前後年次サンプル）を用いて、疾病による野生集団の遺伝的変異（自然選択の痕跡）を解析し、新規に発生した疾病が野生集団に及ぼす遺伝的な影響を明らかにする。

4) 野生個体から耐病性個体の遺伝子選抜は可能か？

これまでに魚類において、耐病性責任遺伝子を用いた野生個体の遺伝子選抜の報告はない。本研究で対象とするアユ冷水病の耐病性遺伝子座のように、形質が単一遺伝子座で支配されていることは、すなわち形質に対するその責任遺伝子の遺伝的な寄与率が大きいことを意味する。遺伝的な寄与率が小さな遺伝子を用いて野生個体を選抜したとしても、他の遺伝的要因や環境要因によって目的形質の表現型を得られない可能性がある。そこで、遺伝的な寄与率な大きな責任遺伝子を用いることで、目的とする形質（本研究では耐病性形質）を保持する個体を野生集団の中から選抜することが可能かどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 魚類における細菌性疾病に対する責任遺伝子の同定

アユ冷水病耐病性形質の連鎖解析により、耐病性遺伝子座を明らかにし、耐病性形質識別マーカーを開発した。さらに、耐病性形質識別マーカーを用いたマーカー選抜育種技術により、冷水病に対する耐病性系統と感受性系統の作出に成功した。これまでに、冷水病耐病性遺伝子座のゲノム領域：約 1,000kb の詳細な物理的地図を作成し、上記 2 系統間の全ゲノムリシーケンス解析により、このゲノム領域において推定された遺伝子内にアミノ酸変異をもたらす非同義置換を伴う一塩基多型 (SNP) を明らかにしていた。これまでに実施した上記 2 系統間の網羅的遺伝子発現解析では、このゲノム領域内で有意な発現量差のある遺伝子は検出されず、遺伝子配列多型による質的な変異が耐病性形質を司っていると考えていた。

本研究では、東京都・多摩川および岐阜県・長良川から野生個体を採捕した後、冷水病人為感染実験を実施し、その生残個体および死亡個体において上記の SNP との関連性を解析する。候補領域内の全ての SNP を同時に次世代シーケンサーで解析を行うターゲットリシーケンス解析法を開発し、実施する。人為感染実験により各個体の冷水病への耐病性形質の有無を評価し、候補遺伝子との相関性から遺伝子同定を行う。また、解析個体の一部に関しては、全ゲノム領域を対象にしたリシーケンス解析により、本研究で対象としている耐病性遺伝子座以外のゲノム領域の関与についても解析する。

2) 細菌性疾病に対する耐病性メカニズムの解明

1) で述べたゲノム領域において推定された候補遺伝子内にアミノ酸変異をもたらす非同義置換を伴う SNP には、免疫関連遺伝子が推定され、その内のいくつかの遺伝子においては、機能を担うドメイン領域に変異が推定されている。そこで本研究では、1) における関連解析と連動しつつ、免疫関連遺伝子の発現を確認した後に抗体を作成し、抗体が認識する血球をフローサイトメトリーにより分取し、その種類や陽性細胞割合を解析する。

3) 自然河川で新規に発生した疾病が野生集団に及ぼす遺伝的な影響の解明

冷水病発生以前の集団と発生以後の集団について解析し、新規に発生した疾病が野生集団に及ぼす遺伝的な影響を明らかにする。本研究では、富山県庄川（富山県水産研究所・提供）で 1992 年から 2000 年まで採集された流下仔魚を解析する。庄川を含む富山県の河川では、1996 年頃には顕著な冷水病の発生が確認されている。1) で述べたターゲットリシーケンス解析法もしくは、同定された責任遺伝子上の SNP を用いて、冷水病発生前グループ、冷水病発生直後グループ、冷水病発生後グループにおいて、各年代間、グループ内、グループ間について、遺伝的差異を解析する。

4) 責任遺伝子を用いた野生個体から耐病性魚を遺伝子選抜する新規育種技術の開発

長良川河口堰で採捕した野生個体にピットタグを装着し、耐病性責任遺伝子の DNA 配列情報から耐病性形質を保持する親魚候補（耐病性区）および耐病性形質を保持しない親魚候補（感受性区）を選抜する。各区内で選抜した親魚同士を交配し、人工種苗を各区複数家系で作出する。これらの人工種苗について人為感染実験を実施し、各区の死亡率を比較し、耐病性形質付与の成否を判定する。1) における責任遺伝子同定の結果をもとに、責任遺伝子上の SNP を用いて耐病性および感受性個体を遺伝子選抜し、交配区を作出後、人為感染実験を実施する。

4. 研究成果

1) 魚類における細菌性疾病に対する責任遺伝子の同定

耐病性責任遺伝子が存在すると考えられるゲノム領域にある SNP を複数同時に次世代シーケンサーで解析を行うことができるターゲットリシーケンス解析法を開発した。また、東京都・多摩川で採捕された天然個体において、冷水病人為感染実験を実施し、その生残個体および死亡個体を用いて解析を行った。その結果、候補遺伝子（遺伝子 C）内に存在する SNP と耐病性形質との関連性が示唆された。さらに岐阜県・長良川の天然個体を用いた耐病性形質との関連解析を実施した結果、耐病性形質との関連性が示唆された。耐病性形質との関連性が示唆された SNP（遺伝子 C）近傍の SNP マーカーで解析結果、近傍の SNP マーカーでは有意差が検出されず、これまでに耐病性形質との関連性が示唆された SNP が重要であることが確認された。

2) 細菌性疾病に対する耐病性メカニズムの解明

耐病性責任遺伝子が存在すると考えられるゲノム領域で、DNA 配列情報から責任遺伝子候補として強く考えられる 2 つの遺伝子について各組織における転写量を qRT-PCR で解析した。その結果、1 つは心臓のみで非常に高い発現レベルを示した。一方で、もう一方の候補遺伝子（遺伝子 C）は末梢血白血球および脾臓で発現レベルが顕著に高く、免疫関連細胞で発現することが示唆された。そこで、パーコール密度勾配遠心法でアユの末梢血白血球を分画し、各白血球分画における発現レベルを解析した。その結果、この遺伝子 C は免疫関連細胞における遺伝子発現レベルが高く、細菌性冷水病の耐病性形質に関与する可能性があると考えられた。そこで、この遺伝子について、哺乳類用発現ベクターに組み込み、BALB 3T3 細胞に導入した。発現ベクターの Myc エピトプタグを利用して、導入遺伝子の発現を確認し、当該遺伝子産物を発現する細胞株（mpC-BALB/3T3 細胞）を樹立した。これを BALB/c 系マウスに接種して免疫し、定法にてモノクローナル抗体を作製した。樹立細胞株を用いた一次スクリーニングを免疫染色法で実施し、35 の陽性クローンを得た。少なくとも陰性クローンよりも高い蛍光強度を有する 2 クローンを得ることができた。アユ末梢血白血球、腎臓白血球および脾臓白血球に対して最も反応性の良いクローン 1 つを選定した。mpC-BALB/3T3 細胞に対して、このモノクローナル抗体は特異的に結合していることが確認された。耐病性形質との関連性が示唆された SNP が存在する遺伝子 C に対して作成したモノクローナル抗体を用いて、アユ末梢血白血球、腎臓白血球および脾臓白血球における発現細胞を解析した。脾臓白血球、末梢血白血球および腎臓白血球に対して陽性を示す細胞集団の割合が明らかになった。各白血球亜集団に対する mAb（K1 : B 細胞、H13 : 好中球・マクロファージおよび G30 : 栓球）も利用し、フローサイトメトリー解析した結果、それぞれの陽性細胞割合が明らかになった。

3) 自然河川で新規に発生した疾病が野生集団に及ぼす遺伝的な影響の解明

富山県庄川で 1992 年から 2000 年まで採集された流下仔魚サンプルの中で、各年の採取月日を出来るだけ合わせてサンプルを選抜した。流下仔魚から抽出できる DNA 量は少なく、ターゲットリシーケンス解析法では難しいと判断された。そのため、1) で耐病性形質との関連性が示唆された遺伝子 C の SNP について解析を実施した。冷水病発症前（1992 年）と冷水病初発症後（1996 年、2000 年）のサンプルについて、遺伝子型頻度の変化について解析を行なった。その結果、冷水病発症前と冷水病初発症後では、冷水病初発症後において遺伝子型有意に変化していることが明らかになった。

4) 責任遺伝子を用いた野生個体から耐病性魚を遺伝子選抜する新規育種技術の開発

岐阜県・長良川天然個体にピットタグを装着し、責任遺伝子候補の DNA 情報で親魚候補を選抜・交配し、次世代を作出・維持管理した。作出した次世代で実施した冷水病人為感染実験家系サンプルを用いて、耐病性形質（生残/死亡）と遺伝子 C 内に存在する SNP を関連解析した結果、耐病性形質と SNP との関連性が検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamoto Masatoshi, Uchino Tsubasa, Koshimizu Eriko, Kuchiishi Yudai, Sekiguchi Ryota, Wang Liu, Sudo Ryusuke, Endo Masato, Guiguen Yann, Scharf Manfred, Postlethwait John H., Sakamoto Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 A Y-linked anti-Müllerian hormone type-II receptor is the sex-determining gene in ayu, <i>Plecoglossus altivelis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009705	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

1. 著者名 Feron Romain, 他25名, Sakamoto Takashi, Nakamoto Masatoshi, Wargelius Anna, Karlsen ?rjan, Wang Zhongwei, St?ck Matthias, Waterhouse Robert M., Braasch Ingo, Postlethwait John H., Scharf Manfred, Guiguen Yann	4. 巻 21
2. 論文標題 RADSex: A computational workflow to study sex determination using restriction site associated DNA sequencing data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Ecology Resources	6. 最初と最後の頁 1715 ~ 1731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1755-0998.13360	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

1. 著者名 Masatoshi Nakamoto and Takashi Sakamoto	4. 巻 16
2. 論文標題 Improvement of the ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>) draft genome using Hi-C sequencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-023-06362-7	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 -

1. 著者名 Ricardo Shohei Hattori, Keiichiro Kumazawa, Masatoshi Nakamoto, Yuki Nakano, Toshiya Yamaguchi, Takeshi Kitano, Eiichi Yamamoto, Kanako Fuji, Takashi Sakamoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Y-specific amh allele, amhy, is the master sex-determining gene in Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1007548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.1007548	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中本正俊・坂本 崇
2. 発表標題 アユにおける性決定遺伝子候補の発現解析
3. 学会等名 2021年度 日本水産学会 春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 口石雄大・近崎友亮・氏家 森・横山大河・市村琴恵・中本正俊・坂本 崇
2. 発表標題 アユ細菌性冷水病に対する耐病性責任遺伝子の探索（1）
3. 学会等名 2023年度 日本魚病学会 春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 アユ細菌性冷水病に対する耐病性責任遺伝子の探索（2）
2. 発表標題 近崎友亮・口石雄大・岡田 亮・中本正俊・永井崇裕・大原健一・藤井亮吏・坂本 崇
3. 学会等名 2023年度 日本魚病学会 春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二川堯允・真下勝多・國江翔太・Lau Lik-Ming・松本 萌・中易千早・佐野元彦・坂本 崇・加藤豪司
2. 発表標題 細菌性冷水病耐性に関する責任遺伝子候補の発現細胞の同定
3. 学会等名 2023年度 日本魚病学会 春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本 崇
2. 発表標題 養殖魚における耐病性育種研究
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会 水産増殖懇話会シンポジウム（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小川和夫、飯田貴次 編 第2章 - 2. 耐病性育種（坂本崇）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 204
3. 書名 新版 魚病学概論	

1. 著者名 坂本 崇（分担執筆）	4. 発行年 2024年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 168
3. 書名 養殖ビジネス増刊（2024年3月号）- イチから学ぶ種苗生産と遺伝的改良	

〔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
研究分担者	加藤 豪司 (Goshi KATO) (50624219)	東京海洋大学・学術研究院・准教授 (12614)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中本 正俊 (Masatoshi NAKAMOTO) (80447721)	東京海洋大学・学術研究院・博士研究員 (12614)	削除：2021年5月11日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関