

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380119

研究課題名(和文) レンサ球菌症抵抗性のヒラメの生物特性の解明

研究課題名(英文) Analysis of biological properties of breeding streptococcal infection disease resistance flounder

研究代表者

荒木 和男 (ARAKI, Kazuo)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主幹研究員

研究者番号：00202739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：選抜育種したレンサ球菌抵抗性及び感受性のヒラメの家系の生物特性の解析と関連遺伝子座の詳細化を目的に物理地図への発現遺伝子のマッピングを進めた。抵抗性の個体は感染後に単球や顆粒球の増加が起こり自然免疫系が活性化されるのに対して、感受性の個体では自然免疫系の活性化が見られなかった。物理地図の詳細化により抵抗性に寄与率の高い連鎖群10番の領域にはTLR21及びNKEFが存在することが分かった。そこで、抵抗性と感受性、養殖魚のゲノム塩基配列を比較したところ、抵抗性の個体ではTRL21の発現調節領域に特異的な一塩基多型が見られ、感受性の個体では第9エキソンとイントロンにまたがる領域の欠損が同定された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed disease resistance trait and developed the physical map of flounder. The streptococcal infection disease resistant flounder increased monocyte and granulocyte dramatically after infection. On the other side, the native immunity system of streptococcal infection sensitive flounder did not respond against streptococcal infection. We detected TRL21 and NKEF genes in the region of linkage group 10 contributed to streptococcal infection disease resistance trait by detailing flounder physical map. And, we analyzed the sequences of TRL21 and NKEF genomic genes of the resistance, sensitive and famed flounder. We found single nucleotide polymorphism in regulatory site of TRL21 gene of resistance flounder and deletion between ninth exon and intron of TRL21 in sensitive flounder.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒラメ 連鎖解析 物理地図 レンサ球菌 自然免疫 獲得免疫 TRL2

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本におけるヒラメの養殖は完全陸上養殖のため、毎年感染症の問題が発生すると共に、韓国から格安の養殖ヒラメの加工品が輸入されるようになり、養殖現場では感染症に強い特徴を持つヒラメを育種することが強く求められるようになった。

(2) ヒラメの高密度連鎖地図を作成し、レンサ球菌に対して抵抗性を示すヒラメのQTL解析に着手し、レンサ球菌抵抗性に関与する4つの遺伝子座を同定し、抵抗性の家系と感受性の家系を作出した。

(3) レンサ球菌抵抗性の領域にどのような遺伝子が存在するのかを明らかにするため、ラディエーションハイブリッドを使った物理地図の基本地図の作成を行った。

2. 研究の目的

選抜育種により得られたレンサ球菌抵抗性及び感受性のヒラメ家系の個体に感染実験を行い、生物特性を明らかにする。次に、物理地図の詳細化を行うと共に、感染後に発現の増加が見られる遺伝子を物理地図上の遺伝子座にマッピングする。レンサ球菌抵抗性に連鎖する遺伝子座にマッピングされた遺伝子の発現解析を通じてレンサ球菌抵抗性にどのような分子カスケードが関与するか推測する。

3. 研究の方法

(1) レンサ球菌抵抗性、感受性の家系のヒラメ及び選抜育種されていない養殖ヒラメのふ化後6か月の仔魚25尾を90L水槽に収容し、レンサ球菌 NUF812 株を $1.1 \sim 5.2 \times 10^5$ cfu/fish の濃度で腹腔内に注射した。一定時間毎に採血し、各種の血球の数の経時的変化を測定した。また、一部のヒラメから腎臓を採取して RNA の抽出を行い、cDNA に逆転写した後に Illumina 社の HiSeq2000 で網羅的な塩基配列の解析を行い、公開されているヒラメの cDNA の塩基配列にヒットさせて発現コピー数を推定し、各家系で感染

後に発現が増加する遺伝子の同定を行った。

(2) ヒラメの培養細胞(HINAE)に pSV2n を形質転換し、ランダムに pSV2n がヒラメの染色体に組み込まれた200株以上のジェネチン耐性株を樹立した。次に、樹立した細胞株を集めて 50Gy の X 線照射(一部 30Gy および 80Gy)によりヒラメの染色体の断片化を行った。照射した細胞をマウスの細胞株(B78)と細胞融合を行って、0.5mg/ml の濃度でジェネチンを含む培養液で培養し、ジェネチン耐性遺伝子 pSV2neo が組み込まれたヒラメの染色体断片をもつ放射線雑種細胞(Radiation hybrid RH)株を278クローン作製した。各染色体を代表する21から32程度のマイクロサテライトマーカーを用いてヒラメゲノムの保持率(増幅の認められたマーカーの数/調べたマーカーの数)の高いクローン93株を選抜し、そのDNAをRHパネルとして用いた。ヒラメの公開されている免疫応答関連遺伝子を中心に約300座と約900座のマイクロサテライトをマッピングして物理地図の詳細化を行った。

(3) レンサ球菌抵抗性の家系の個体で感染後に発現増強が見られた遺伝子について、再現性の確認のため Digital PCR による発現解析を行った。感染後6時間、24時間、72時間目のヒラメの腎臓から Total RNA を抽出して逆転写を行い、Fluidigm 社のプロトコールにより発現遺伝子のコピー数の測定を PCR 集積流体チップと BioMark (Fluidigm 社)を用いて行った。

(4) 候補に上がった TLR21、TNF、NKEF について、抵抗系家系、感受性家系、養殖ヒラメのゲノム配列の解析を行った。これまでに報告されている塩基配列をもとにプライマーを設計して PCR 反応で増幅し、サンガー法による塩基配列の解析を行った。得られた配列は BioEdit V.7.25 を用いてアセンブルと配列の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 感染実験による表現型の解析

選抜育種された連鎖群 7, 10, 11, 17 番のレンサ球菌抵抗性の領域を持つ抵抗性、持たない感受性家系、選抜前の家系及び養殖ヒラメを各水槽に 25 尾ずつ収容し、レンサ球菌の腹腔内注射による感染を行った。

抵抗性の選抜家系(抗病選抜 1)ではレンサ球菌感染後 2 週間の飼育で 1 水槽当たり 2 尾、マーカー選抜前の抵抗性家系(R×R)と養殖魚(S×A)は 26%の死亡が確認された。一方、選抜感受性の家系(病弱 M 選抜)では、50%(病弱 M 選抜)、マーカー選抜前の感受性家系(S×S)では 36%の個体が死亡し、マーカー選抜の効果が確認された(図.1)。

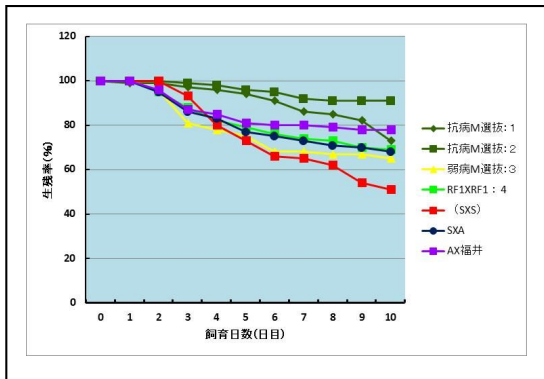


図 1. レンサ球菌感染後の生残率

抗病 M 選抜 1,2(マーカー選抜抵抗性家系) 弱病 M 選抜(マーカー選抜された感受性家系) RF1×RF(マーカー選抜前の抵抗性家系) S×S(マーカー選抜前の感受性家系) S×A(感受性家系×アルピノ) A×福井(アルピノ×福井の養殖ヒラメ)

また、抵抗性の選抜家系では感染後 24 時間目から顆粒球と単球の増加が確認され、72 時間目で大幅に増加し、選抜する前の R 家系の個体より著しい増加が見られた(図 2,3)。一方、マーカー選抜した感受性家系の個体では単球及び顆粒球の感染後の増加が見られなかった。このことから、マーカー選抜したレンサ球菌抵抗性の家系では自然免疫系が強く活性化される可能性が示唆された。

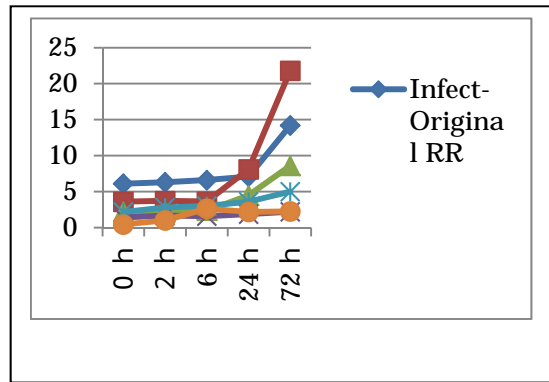


図 2. レンサ球菌感染後の抵抗性家系における単球数の変化

レンサ球菌感染後の抵抗性家系の単球の増加を調べた。縦軸は 1×10^5 Cells/ml

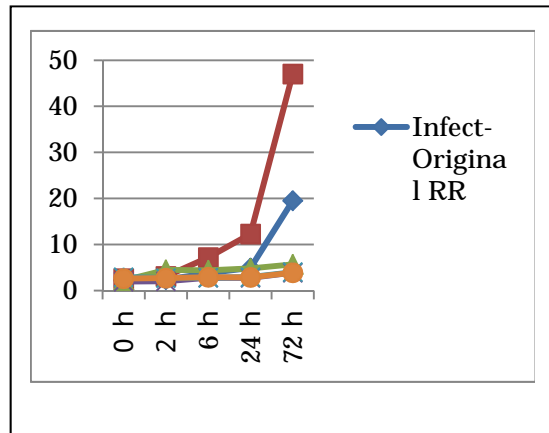


図 3. レンサ球菌感染後の抵抗性家系における血中顆粒球数の変化

レンサ球菌感染後の抵抗性家系の顆粒球の増加を調べた。縦軸は 1×10^5 Cells/ml

(2) 腎臓における網羅的な遺伝子の発現解析

レンサ球菌感染に対する選抜効果が確認されたため、レンサ球菌感染前及び感染後 72 時間目の選抜抵抗性家系及び感受性家系の腎臓の RNA をもとに cDNA に逆転写し、Illumina 社の次世代高速シーケンサーによる網羅的な発現解析を行った。得られた配列を、公開されているヒラメの EST 情報にマッピングし、各遺伝子の配列に何コピーヒットするかをカウントして発現量の比較を行った(表 1.RNA-seq)。個体間の RNA 量に依存した発現量の違いはアクチン遺伝子のヒ

ット数を参考に均一化を行った。

表 1. マーカー選抜抵抗性家系でレンサ球菌感染後発現が増加する遺伝子

#valueuniq	S-before	S-after	R-before	R-after	Gene Name
AY997530	6860	4821	6225	17616	MHC class II A antigen
AF216646	5075	4181	4429	9816	interleukin-8 (IL-8)
AJ843878	4334	4189	4207	8817	complement component 1 q subcomponent gamma polypeptide
AB081752	2287	2411	2406	3483	interleukin-1b (IL-1b)
AB070835	1323	1308	1323	2606	CD40
DQ009987	1191	1193	854	1826	natural killer enhancing factor (NKEF)
AB247498	726	746	685	1338	caspase 10
DQ884914	180	188	158	379	interleukin-6 (IL-6)
AB080612	157	150	109	235	MIP1alpha
GU191336	61	63	141	258	toll-like receptor2 (Toll-2)
AB080947	41	29	28	118	tumor necrosis factor(TNF)
EU024928	10	2	14	137	creatine kinase I
AB375266	105	87	89	185	Par o1
AJ298327	23	17	9	56	cathepsin F
AY277950	10	3	6	48	carboxypeptidase A2
AB081557	0	0	2	19	T cell receptor delta chain

RNA-seq では実際のコピー数をカウントするためDNAチップやリアルタイムPCRよりも正確性が高い。そこで、1.5 倍以上発現が高いものを選択して表にまとめた(表 1)。S 家系では感染後も自然免疫に関連する遺伝子の発現増加は見られないが、抵抗性家系では多くの免疫応答関連遺伝子の発現が増加していた。MHC ClassII や CD40 等の遺伝子の発現が高いのは、抵抗性家系では感染後のリンパ球の増加と関連していると思われる。インターロイキン関連の遺伝子の発現が高いのもそのことを反映しているものと思われる。また、TLR21 や TNF はマクロファージの表面抗原や分泌タンパク質であることから、これらの遺伝子の発現の増加は、レンサ球菌感染後の抵抗性家系の単球(マクロファージ)の増加を反映するものと考えられる。以上から、マーカー選抜抵抗性家系では自然免疫系が活性化されたと考えられる。NKEF によって活性化される Natural Killer 細胞もまた自然免疫の主要細胞として働く細胞障害性リンパ球の一種であることが知られている。

(3) 物理地図の詳細化

連鎖地図は連鎖解析する家系内で多型を持つ遺伝子だけマッピングできるのに対して、物理地図ではヒラメの染色体断片を持つマウスとの放射線雑種細胞 (RH) を用いてマッピングするため、多型をもたない遺伝子でもマッピングできる。そこで、免疫応答関連遺伝子を中心に、報告されているヒラメの

発現遺伝子及びマイクロサテライト DNA 配列を中心に物理地図にマッピングした。

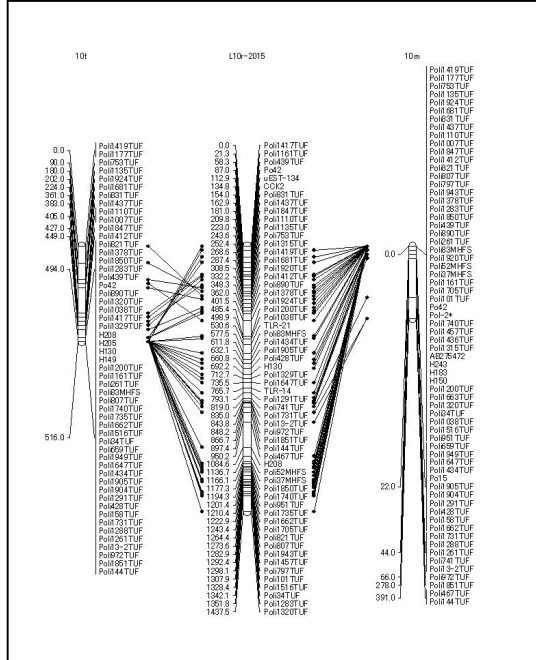


図 4-1.連鎖群 10 番に相当する物理地図

中央が物理地図で左側が雌の連鎖地図、右側が雄の連鎖地図

物理地図の作成及び詳細化はヒラメの染色体を一部持つマウスとヒラメの放射線雑種細胞 (RH) を用いて行い、886 座の STA マーカーと 305 個の発現遺伝子をマッピングすることが出来た。その結果、レンサ球菌抵抗性と連鎖する連鎖群 7 番には C3、連鎖群 10 番には TLR14、TLR21、TNF 遺伝子がマッピングされた。TLR21 は細菌のリポペプチドの受容体として働く。また、MHC class クラスターの遺伝子は連鎖群 13 番、MHC class II クラスター及び主要な免疫応答関連遺伝子は連鎖群 15 番にマッピングされた(図 5)。連鎖地図と物理地図を比較することによって、遺伝的な距離と物理的な距離の違いがわかる。

(4) 発現解析とゲノム遺伝子の配列の解析

RAD-seq 解析によりレンサ球菌抵抗性の選抜抵抗性家系及び選抜前の家系で感染後

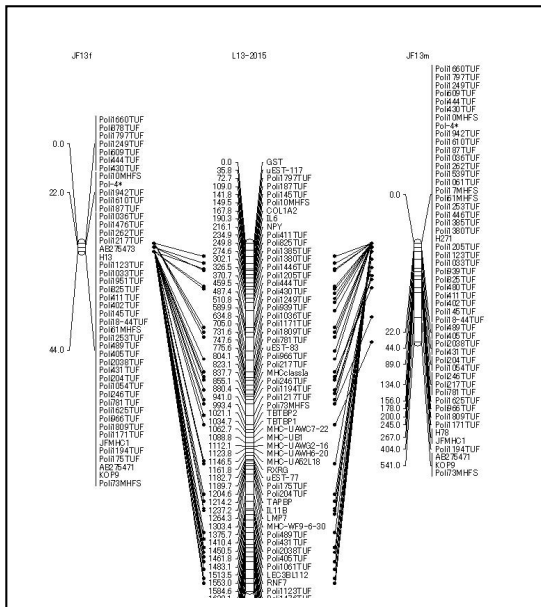


図 4-2.連鎖群 13 番に相当する物理地図
中央が物理地図で左側が雌の連鎖地図、右側が雄の連鎖地図

に発現の増加が見られた遺伝子の内、抵抗性と連鎖した連鎖群 10 番と 23 番の領域にマッピングされた TLR21⁷⁾、TNF 及び NKEF の遺伝子の発現を Digital PCR を用いて再確認した。Digital PCR では溶液中の目的の遺伝子のコピー数を直接数えられるため、従来のリアルタイム PCR や DNA チップ解析より正確な発現量の比較を行える。得られた発現コピー数は、アクチンの発現量を細胞あたり 100 コピーになるように平均化した後に細胞あたりのコピー数を算出して比較した(図表 3)。その結果、これら 3 つの遺伝子の発現コピー数は低いが、RNA-seq の結果と同様にレンサ球菌抵抗性の家系で感染後に発現が増加することが確認された。そこで、これらの遺伝子の各家系間のゲノム塩基配列を解析し、比較することにした。

(5) ゲノム遺伝子の配列の比較

公開されているメダカのゲノム配列情報とヒラメの cDNA 配列の相同検索により、プライマーを設計し、選抜耐病性家系、選抜感受性家系、養殖魚各 10 尾のゲノム DNA から PCR 反応により増幅された DNA をサンガ

一法で塩基配列の解析を行い、BioEdit により各個体の塩基配列の比較を行った。その結果、選抜抵抗性個体特異的な一塩基多型が TLR21 の発現調節領域に見つかった。また、選抜感受性個体では第 8 エキソンと第 9 エキシソンの間に特異的な欠損がみられた(図 6)。TLR21 は哺乳類の TLR2 及び 9 と同様に細菌のリポプロテインの受容体として働く。そのため、TLR21 に見つかった多型や欠損が表現型に關与する可能性が示唆される。

ニワトリや哺乳類の TLR21 や TLR2 の研究から、これら細菌受容体の下流には NF- κ B や INF- γ がシグナル伝達に關与していることが知られており、今後、これらの発現を調べることによって、TLR21 を受容体とする分子カスケードがレンサ球菌抵抗性に關与する可能性を調べたいと考えている。

表 3. レンサ球菌感染前、感染後の各家系の腎臓における NKEF、TNF、TLR2 の発現量の比較

NKEF			
	感染前	24 時間後	72 時間後
養殖魚	0.75	2.8	4.2
R 家系	7.3	8.7	12.6
マーカー選抜抵抗性家系	6.7	14.2	21.3
マーカー選抜感受性家系	1.37	2.1	2.8

TNF			
	感染前	24 時間後	72 時間後
養殖魚	0.42	0.51	0.68
R 家系	0.37	0.51	1.15
マーカー選抜抵抗性家系	0.85	1.12	2.27
マーカー選抜感受性家系	0.56	0.61	0.76

TLR21			
	感染前	24 時間後	72 時間後
養殖魚	0.35	0.86	1.14
R 家系	0.36	0.91	2.2
マーカー選抜抵抗性家系	0.73	1.12	7.1
マーカー選抜感受性家系	0.28	0.31	0.37

アクチンの発現量をもとに個体間の RNA 量のノーマライゼーションをしたのちに 1 細胞あたりの発現量を計算した結果。

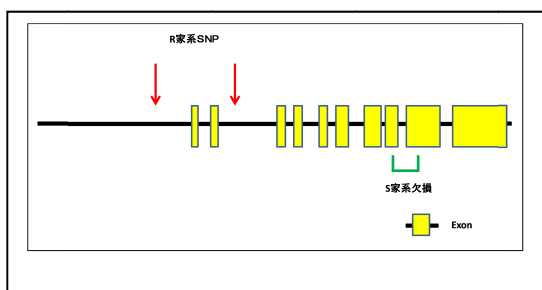


図 5. TLR21 の選抜抵抗性家系特異的な一塩基多型のある場所と選抜 S 家系で欠損があった部分

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

山田 敏行、土内 勇人、岡内 正典、田川 正智、荒木 和男
Induction of ambicoloration by exogenous cortisol during metamorphosis of Spotted halibut *Verasper variegatus* Comparative Biochemistry and Physiology, Type B 査読有 160巻 2011、174-180

岡本 裕之、青木 純哉、野崎 智代、尾崎 照遵、岡本 信幸、Mark Ekker、荒木 和男

Practical whole-genome radiation hybrid map of flounder Aquaculture 査読有 submit
〔学会発表〕(計 4 件)

荒木 和男、青木 純哉、尾崎 照遵、岡本 裕之、甲斐 歩、坂本 崇
平成23年度水産学会秋季大会シンポジウム「水産育種の現状とゲノム情報利用の将来展望」2011、p.21

荒木 和男、尾崎 照遵、岡内 正典、岡本 裕之、正岡 哲治、坂本 崇
Transgenesis of Amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) for the analysis of biological

characteristics and genomic analysis of Japanese flounder for DNA-marker-assisted breeding. International Symposium on Aquatic Biothechnology Beijing, Chain 2011, Abstract p.89

岡本 裕之、野崎 智代、尾崎 照遵、荒木 和男、坂本 崇、岡本 信明、Mark Ekker

First generation whole-genome radiation hybrid map of the Heterosomata: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), including BAC clones of MHC class Ia, Ib, IIa and IIb. The 11th International Symposium on Genetics in Aquaculture. 2012, p.90

荒木 和男、岡本 裕之、尾崎 照遵、吉田 一範、岡内 正典
レンサ球菌抵抗性のヒラメの生物特性の解明 日本動物遺伝育種学会第 14 回大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者
荒木 和男 (ARAKI Kazuo)
独) 水産総合研究センター増養殖研究所・育種研究センター・基盤研究グループ・主幹研究員 研究者番号: 00202739

(2) 研究分担者
岡本 裕之 (OKAMOTO Hiroyuki)
独) 水産総合研究センター増養殖研究所・育種研究センター・基盤研究グループ・主任研究員 研究者番号: 50372040

岡内 正典 (OKAUCHI Masanori)
独) 水産総合研究センター増養殖研究所・育種研究センター・基盤研究グループ・主幹研究員 研究者番号: 40372023

尾崎 照遵 (OZAKI Terumichi)
独) 水産総合研究センター増養殖研究所・育種研究センター・基盤研究グループ・主幹研究員 研究者番号: 40416045