

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780183

研究課題名(和文) サバ類における抗病性の種差を規定する分子基盤の解明—ゴマサバはなぜ病気に強いのか

研究課題名(英文) Molecular basis of disease-resistance traits showing differentially between chub and blue mackerel.

研究代表者

矢澤 良輔 (Ryosuke, Yazawa)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：70625863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サバ科サバ属に属するマサバとゴマサバの種間に存在する抗病性の差を規定する分子基盤を明らかにするために、高水温環境下で細菌感染症の発症率が低いゴマサバと、死亡率が高いマサバの網羅的な遺伝子発現パターンの比較解析を実施した。その結果、感染症による斃死率が高い、高水温環境下で飼育したマサバでは、IL-8等の炎症性サイトカインや抗微生物ペプチドなど免疫応答に関連する遺伝子の発現量が著しく高く、さらに、急性の炎症反応に関わる遺伝子発現が高い状態で維持されていた。これらの結果から、マサバでは過剰な免疫反応が疾病の発症や個体の斃死を促進する可能性があることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The comprehensive expression pattern in chub mackerel and blue mackerel were compared by the scombrids-universal microarray to reveal the molecular basis for the differences in disease-resistance traits between this two species belonging to same genus, Scomber. We have previously revealed that blue mackerel showed higher resistance against bacterial disease in the high water temperature periods than chub mackerel in the same temperature condition. As the results of the comparison of the comprehensive gene-expression pattern in the epithelial tissue of the two Scomber species, inflammatory mediators, anti-microbial peptides and the genes related to the acute inflammation showed significantly higher expression in the chub mackerel showed lower resistance against bacterial disease in the high temperature period than blue mackerel. These results suggest that the excessive innate immune response possibly enhance high mortality during high water temperature period.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：耐病性 網羅的遺伝子発現解析 サバ類 感染症

1. 研究開始当初の背景

近年、魚介類の養殖は世界中で広く行われるようになり、その養殖生産量も年々増加している。これに伴い種々の微生物感染症が多発し、その経済的損失は甚大であり水産養殖における最重要課題となっている。このような魚病対策として、水産用医薬品である抗生物質やワクチンの投与が挙げられるが、その対象魚種および疾病は限定的であることや、医薬品の残留が問題になっていることなどから、より広範な養殖対象魚種に適応可能な新しい魚病防除技術の開発が求められている。

マサバ (*Scomber japonicus*) は我が国周辺に広く分布、回遊する水産上重要な多獲性浮魚であるが、乱獲による天然資源の減少に伴い漁獲量が激減している。さらに大型個体の減少により、漁獲されるマサバには小型の若齢魚が多く、単価も低水準である。一方、一本釣りで漁獲される関サバや松輪サバに代表されるブランドサバは肉付きや脂の乗りが良く、沿岸漁業で多獲されるマサバに比べ単価が10倍以上になることもある。これに対して養殖では、餌飼料の制御により肉質の改善が可能で、ブランドサバのように高付加価値を有する養殖サバの計画的な生産が期待できる。このように養殖サバをブランド化や地域特産化することで、天然魚では単価の低い魚を高級魚化することも可能になると期待される。以上の背景から、天然魚を種苗としたサバ類養殖が各地で行われているが、水温が24以上となる高水温期に *Lactococcus garvieae* 感染によるレンサ球菌症の被害が多発し、これがサバ養殖普及の大きな律速になっている。そこで、この高水温期の細菌性感染症を防除する技術が確立できれば、安定したサバ類養殖が可能となる。

我々は、マサバおよび近縁種であるゴマサバ (*Scomber australasicus*) の飼育実験を行う過程で、ゴマサバが高水温期においても細菌感染症を発症せず、この間のゴマサバの斃死率がマサバと比較して著しく低いことを見出した。マサバとゴマサバは同じサバ科サバ属 (*Scomber*)

に属し、雑種の作出が可能なほど遺伝的に近縁であるが、このように抗病性に関して種間差が生じることは興味深い。

2. 研究の目的

海産魚養殖では水温変化や高密度飼育など、環境からの様々なストレスが魚病発生の要因となる。マサバ養殖においても、水温が24以上となる高水温期に細菌感染症が多発し、重大な問題となっている。マサバを安定した養殖環境下で飼育し、飼餌料の制御により肉質を改善すれば、高付加価値を有する養殖サバの生産が可能となり、天然では単価の低い魚の高級魚化が期待される。そこで、本研究ではサバ類養殖における高水温期に発生する細菌感染症の防除技術の開発を最終目的として、サバ類における水温依存的な細菌感染症の発生機構および、申請者が新規に見出した知見である、マサバ-ゴマサバ間の感染症に対する感受性の種間差が生じる機構を分子レベルで解明することを目指す。

3. 研究の方法

サバ類における水温依存的な細菌感染時の生体防御機構、特にゴマサバが種特異的に有する抗病性形質の分子基盤を明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現パターンの比較による解析を行った。

本研究でマサバおよびゴマサバの発現解析に用いたオリゴ DNA マイクロアレイは、現在までに各種データベースに公開・登録されているサバ科魚類塩基配列情報および、水産総合研究センター水産遺伝子解析センターによるクロマグロ全ゲノム解析の結果をもとに、クロマグロの推定遺伝子、26、433 遺伝子を高密度に配置した合成オリゴ DNA マイクロアレイを利用した。

次に、本研究室で生産した3ヶ月齢のマサバおよびゴマサバ幼魚を供試魚として、下記の飼育実験を行った。

マサバの低水温飼育(冷却装置の使用により、飼育水温を20以下に維持する)および高水温飼育(加温装置を使用し、飼育水温28まで段階的に上昇させる)

マサバおよびゴマサバの高水温飼育（加温装置を使用し、飼育水温 28 まで段階的に上昇させる）

さらに、各試験区に用いたマサバおよびゴマサバ供試魚の体表から mRNA サンプルを抽出・調整し、上記のサバ科魚類ユニバーサルマイクロアレイ解析を利用し、大規模な遺伝子発現パターンの比較解析を行った。

4. 研究成果

サバ科魚類の遺伝子情報をもとに設計したマイクロアレイがマサバおよびゴマサバの両種に使用可能かどうかを確認した。具体的には、サバ科魚類であるクロマグロ、スマ、マサバおよびゴマサバの稚魚期の表皮から抽出した RNA をプローブとして、サバ科ユニバーサル合成オリゴ DNA マイクロアレイに対し、それぞれハイブリダイゼーションを行った。その結果、全スポットに対し、クロマグロでは 80.9%、スマでは 68.4%、マサバでは、60.4%、ゴマサバでは 59.5%のスポットにおいてシグナルが検出された。それぞれの魚種における発現パターンは同様の傾向を示したことから、本研究で用いる合成オリゴ DNA マイクロアレイは、マサバおよびゴマサバの網羅的な遺伝子発現解析に有用であることが示唆された。

次に、高水温環境下で細菌感染症の発症率が低いゴマサバと、死亡率が高いマサバの網羅的な遺伝子発現パターンの比較解析を上記のサバ科魚類ユニバーサルマイクロアレイ解析を利用し実施した。

まず、マサバ低水温飼育区、ゴマサバ高水温飼育区、マサバ高水温飼育区の各個体 (n=3) における、それぞれの遺伝子発現プロファイルの結果をクラスター解析に供した。この解析の結果から、斃死率の低いマサバ低水温飼育区およびゴマサバ高水温飼育区の各個体は種が異なるにも関わらず、同じクラスターに属していることが明らかとなった(図1)。一方、サンプリング時点では斃死が始まっていないものの、飼育の経過に伴い斃死率が高くなるマサバ高水温飼育区の発現プロファイルは異なるクラスターを形成した(図1)。

以上の結果から、それぞれの試験区における発現パターンの差は、分子レベルでの感染症の発症、あるいは斃死にいたるマサバおよびゴマサバ間に存在する抗病的の種間差を示している可能性があることと推察された。

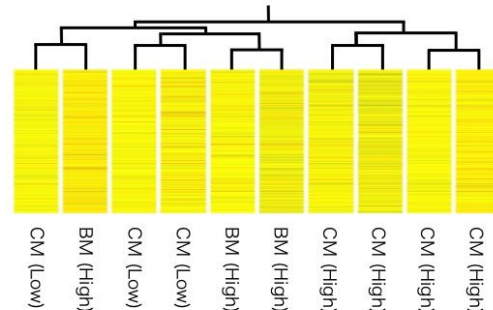


図1. マサバ(CM)およびゴマサバ (BM)の低水温(Low)および高水温(High)飼育環境下での遺伝子発現パターンのクラスター解析

さらに、低水温飼育マサバおよび高水温飼育ゴマサバの発現パターンと比較し、高水温飼育ゴマサバでは感染時に発現が上昇する免疫グロブリン、炎症性サイトカイン、抗微生物ペプチド等の発現が著しく高く、ミオシン、トロポニンコラーゲン等の表皮および筋肉の構成に関わる遺伝子の発現が著しく低かった(表1)。加えて、急性の炎症反応に関わる遺伝子発現が高い状態で維持されていた。これらの結果から、マサバでは過剰な免疫反応が疾病の発症や個体の斃死を促進する可能性があることが推察された。以上の結果から、ゴマサバでは、高水温下において感染症に対する感受性が低いことが、分子レベルであらためて証明された。

近年、ヒトやマウスに加え、様々な

表1. マサバ高水温飼育区でのみ高い発現を示した遺伝子のリスト

Genes	BM-High	CM-Low	CM-High
Cathepsin L	0.6	0.3	4.1
IgM heavy chain	0.7	0.4	3.7
Interleukin-8	0.7	0.6	3.6
C/EBP beta 2	0.7	1.9	3.2
Lysozyme	1.1	0.4	2.2

動物種におけるゲノム情報や遺伝子発現情報の蓄積が進んでおり、このような情報を基にサバ類における疾病の発生や斃死に至る際の細胞内情報伝達経路を同定することに取り組んでいる。さらに、同定された情報伝達経路を制御する化合物の投与により、ゴマサバが有する抗病的性を担う分子機構を魚体内で人為的に再現することを目指したい。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

矢澤 良輔、耐病性系統作出を目指した魚類分子免疫学に関する研究、平成26年度水産学会春季大会、2014年3月27日～30日、北海道大学、函館

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢澤 良輔 (YAZAWA, Ryosuke)

東京海洋大学 海洋科学技術研究科 助教

研究者番号: 70625863

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号:

(3)連携研究者

無し

()

研究者番号: