

平成30年6月19日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04544

研究課題名(和文) キンギョヘルペスウイルスに対する耐病性機構の解明による選抜育種バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of biological marker for breeding goldfish strain resistant to herpesviral hematopoietic necrosis

研究代表者

佐野 元彦 (Sano, Motohiko)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00372053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：キンギョヘルペスウイルス病耐性魚における耐病性機構の解明と選抜育種に利用可能なバイオマーカーの開発を目的とした。

鱭由来初代培養細胞では、耐病性魚の感受性が有意に低いことが判明した。耐病性魚は、感染3日頃までは感受性魚と同様なウイルス増殖を示したが、その後ウイルス量は減少に転じた。宿主応答ではMHC class Iの遺伝子発現量が耐病性魚で感染前から高いことが判明した。この耐病形質はメンデルの優性遺伝を示し、さらに1対1交配群においてGBS解析を行ったところ、耐病形質と有意に相関するSNPが得られた。選抜バイオマーカーとしてMHC Iの定量PCR法とマーカーSNPを判別するHRM法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We investigated mechanisms of resistance against herpesviral hematopoietic necrosis (HVHN) in a resistant strain of goldfish and tried to develop biomarkers utilizing in selection breeding without virus infection.

Virus susceptibility of primary cell culture derived from fin of the resistant fish is significantly lower than that of sensitive strain. In resistant fish, virus load increased for 3 days after virus infection like in the sensitive fish and subsequently it drastically decreased. MHC class I gene expression was significantly higher in the resistant fish than in the sensitive fish before and after virus infection. The resistant trait showed Mendelian dominant inheritance.

Genotyping-by-sequencing (GBS) method was applied to exploration of single nucleotide polymorphisms (SNP) and the linkage analysis of the SNPs showed that two SNPs were significantly related with the resistance to HVHN. Finally, we developed a qPCR for MHC I gene expression and HRM for the SNP detection.

研究分野：水族病理学

キーワード：水産学 病理学 ウイルス 耐病機構 選抜育種マーカー

1. 研究開始当初の背景

1) 致死性が高いキンギョヘルペスウイルス感染によるキンギョ(*Carassius auratus*)のウイルス性造血器壊死症は、1992年愛知県で初めて検出され、その後、日本中のキンギョ生産地へと広がるとともに、ヨーロッパや米国などにも広がっている。さらに、2011年以降、中国の養殖ギベリオブナ(*C. auratus gibelio*)でも甚大な被害を出し、国際的にその防除対策が求められているとともに、非常に注目される病原体・疾病として国際的な研究競争になっている。

2) 日本では、多くの感染魚が流通している現状にあり、魚卵消毒と隔離飼育によって無病のキンギョの生産が可能であるが、流通段階で感染を受けて死亡してしまう。愛知県の推定では、愛知県だけでも4割感染して2億円の被害があり、キンギョ養殖業にとって最大の脅威となっている。

3) そこで、埼玉県水産研究所において、研究協力者(田中)を中心として、病魚を用いた経験的な人為ウイルス感染による選抜と耐過魚の交配を行い、耐病性系統の作出に取り組んできた。その成果として、キンギョの一品種であるアズマニシキでの耐病系統の作出に初めて成功した。(田中, 埼玉農総研研報, 5, 88-90, 2005; 田中, 水産育種, 42, 85-88, 2013)。

4) ただし、この人為感染による選抜育種の大きな問題点は、感染施設でしかできないこと、ウイルスキャリアーとなる耐過魚を隔離し続けなければならないことである。今後、数多くあるキンギョ品種へ応用するため、感染を伴わない新たな選抜育種法の開発が切望されている。

5) 一方、キンギョヘルペスウイルスについては、細胞での分離・培養が難しいことが大きな障害となり、世界でも研究が進展していなかったが、最近、申請者らの研究により、ウイルス継代培養が可能となる手法を構築し、この培養ウイルスを使って再現性のある感染試験が実施可能となった(Ito ら, Dis Aquat Organ. 105, 193-202, 2013)。

6) 本研究グループで連携を密にし、ウイルス培養系の研究、感染試験系の確立、耐病性魚を用いた実験的な交配などの準備を進め、平成26年度、感受性魚の腎臓抽出液中にウイルス感染・増殖を促進する成分があるという重要な発見が得られ、さらに、キンギョと交配可能な諏訪湖系3倍体クローンギンブナ(*C. auratus langsdorfii*)が高い感受性を有し、キンギョ同士の交配とは異なり、耐病性キンギョの各染色体1本を受け取った影響を見ることができる交配遺伝実験のモデル系として利用可能であることを見いだした(未発表)。

以上のように、これまでの成果・技術を結集・発展させ、細胞、個体、遺伝の3つ面からの研究によりキンギョのヘルペスウイルス耐病性機構の解明を行い、これを基に新た

な耐病性品種の開発につなげるため、今回、本申請課題を立案した。

2. 研究の目的

キンギョヘルペスウイルスに対するキンギョ耐病性機構の解明と選抜育種マーカー開発を目的に、1)細胞レベルでは、ウイルス感染・増殖を促進する標的組織中の成分の特性と作用機序、2)個体レベルでは、感染後の魚体内ウイルス動態から生死を分けるターニングポイントを把握した上で、トランスクリプトーム解析によるウイルスと宿主の発現遺伝子の動態、3)遺伝の観点から、1)、2)で単離される耐病性候補遺伝子について、耐病性魚×感受性魚および3倍体クローンギンブナ(3n)×耐病性魚(精子 n)の交配家系での耐病形質との相関を検討し、ウイルス感染抵抗性の機構を明らかにする。以上の知見を基に、4)ウイルス感染耐過によらない選抜育種に利用可能なバイオマーカーを開発する。これを利用・普及させ、切望される各品種の耐病性系統作出により、キンギョ養殖業における本病被害軽減を目指す。

3. 研究の方法

キンギョヘルペスウイルスに対するキンギョ耐病性機構の解明を目的に、1)ウイルス感染・増殖を促進する標的組織中の物質とその作用機序を特定し、2)感染後の魚体内ウイルス動態から生死を分けるターニングポイントを把握した上で、トランスクリプトーム解析によるウイルスと宿主の発現遺伝子の動態、3)耐病×感受性の交配家系および耐病×3倍体クローンギンブナとの雑種交配での耐病形質と耐病性候補遺伝子との相関、を検討する。以上の知見を基に、4)ウイルス感染耐過によらない他の品種での耐病性選抜育種に利用可能なバイオマーカーを開発する。

4. 研究成果

1)ウイルス感染・増殖を促進する標的組織中の物質とその作用機序の特定
種々の臓器を用いてウイルス増殖促進物質をキンギョ由来細胞で測定すると、筋肉で若干低いもの腎臓、脾臓、肝臓、心臓でも4000倍程度まで希釈しても効果があることが判明した。また、コイ由来細胞を用いた場合でも効果があった。さらに、コイの体腎抽出液にも増殖促進効果があることが判明した。耐病系統と感受性系統で差があるのか調べたため、両系統魚の腎臓抽出液と尾鰭の培養細胞を作出した。感受性系統由来細胞の方が耐病系統由来細胞よりも10倍程度感受性が高かった。また、腎臓抽出液の添加効果をこの鰭細胞で調べたところ、いずれの組み合わせにおいても同程度のウイルス増殖促進効果が認められた。このことから、このウイルス増殖促進物質が直接的に耐病性と関わっている可能性は低いと判断された。

2) 耐病系魚と感受性魚における発現遺伝子の解明

耐病系統と感受性系統を供試し、ウイルス腹腔内接種及び浸漬感染後(図1)の魚体内ウイルス動態を定量PCR法により経時的に調べたところ、感受性魚では鰓や鱗という体表組織での一次増殖がまず起こり、ついで標的器官である腎臓などでの増殖が起こって死に至った。一方、耐病系魚ではこの一次増殖部位での増殖が少なく、標的臓器でもウイルスが増えないことが分かった。このことから、耐病系魚では、一次増殖部位での増殖が少なく、その結果、血流で標的細胞に運ばれるウイルス量も少ないことに加え、腎臓等の標的細胞の感受性が低いことから、相乗的にウイルスが魚体内で増殖することなく、耐病性を示すと考えられた。耐病性アズマニシキ系統と感受性ワキンの感染後の免疫関連遺伝子の発現を調べたところ、耐病性魚では、臓器内ウイルスDNAコピー数が感染5日後に減少に転じ、このときにMHCクラスI遺伝子の発現が有意に高いことが判明した。さらに、感染前の状態でのこの遺伝子発現量は、耐病性アズマニシキ系統魚で感受性ワキンよりも数倍高いことも判明した。

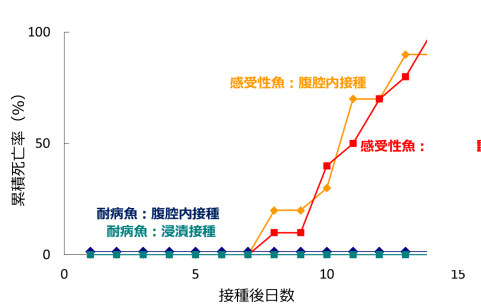


図1. 感染実験における耐病性魚及び感受性魚の死亡率の推移

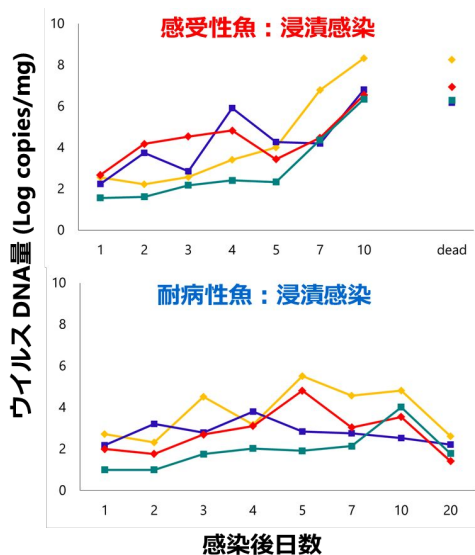


図2. 感染後の耐病性魚及び感受性魚におけるウイルスDNAの推移

— 体腎 — 鰓
— 尾鱗 — 肝脾臓

3) 単離される耐病性候補遺伝子の耐病形質との相関性の解明

耐病成魚×感受性魚の交配稚魚(F1)を用いたF1×F1によるF2稚魚およびF1×感受性魚の戻し交配稚魚を作製しウイルス感染による死亡率を調べたところ、F2稚魚では約20%、戻し交配稚魚では約50%の死亡が認められた。このことから耐病形質は、メンデル遺伝し、優性形質を有することが判明した。

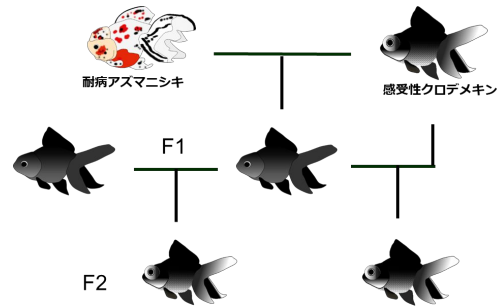


図3. 耐病性魚と感受性魚の交配試験

また、F1(耐病性)×感受性魚の戻し交配稚魚を4群作製し、この交配群をウイルス感染させたところ、予想通り死亡率が50%程度となった。これら交配群の内、1群を用いてその死亡魚と生残魚に分け、Genotyping by sequencing(GBS)によるSNPの分離と連鎖解析を実施した結果、一つの連鎖群で耐病・感受性に関わる有意なSNPが得られた(図4)。SNP 297316は、ある遺伝子上にあることが判明し、PCRプライマーの設計とHRM法での分析法を構築し、分析個体数を増やして検討を行った。その結果、F1を雄親とした交配群では平均して生残魚の95.4%が該当のSNPをヘテロ接合で持ち、死亡魚のうち平均97.9%は持たなかった。一方、F1を雌親とした交配群では平均して生残魚の67.5%が該当のSNPをヘテロ接合で持ち、死亡魚の平均72.9%は持たなかった。雄親の選抜の際にはこのSNPが耐病性の遺伝マーカー候補になりうると考えられた。

また、♂耐病性魚×♀3倍体クローンギンブナとの4倍体雑種交配を作製し、ウイルス攻撃したところ、最終的に21尾の生残魚が得られた。今後、これらを親魚に育成して、雌性発生させることにより4nクローン魚を得る予定であるが、いまだ成熟に至っていない。

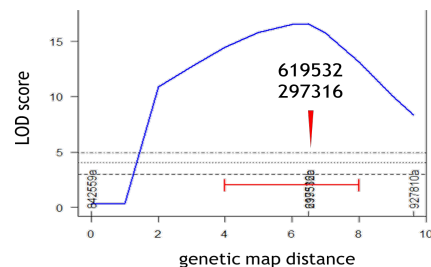


図4. 連鎖グループ29上SNPと耐病性との連鎖解析結果

4) 耐病性選抜育種に利用可能なバイオマーカー開発

耐病性アズマニシキを判別する SNP マーカーを分析する HRM 法等が開発できた。他のキンギョ家系・品種に応用する場合には、この遺伝子上の SNP を見つければ、マーカーとすることが可能と考えられ、今後、より組換えの少ない SNP マーカーの開発、さらには耐病性遺伝子の同定が必要である。また、耐病性アズマニシキでの結果から MHC クラス I 遺伝子の発現量もマーカーとなりうることが示唆された。さらに耐病性魚と感受性魚が混在する 1 対 1 交配群に加え、他の耐病系・感受性系などで検証する必要がある。

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 1 件)

Nanjo A, Shibata T, Yoshii K, Shibasaki Y, Nakanishi T, Tanaka M, Kato G, Sano M. Susceptibility of isogeneic ginbuna *Carassius auratus langsdorfii* Temminck et Schlegel to cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2) as a model species. *Journal of Fish Diseases*, 査読有, 40, 2017, 157-168. doi: 10.1111/jfd.12500

Nanjo A, Shibata T, Yoshii K, Shibasaki Y, Nakanishi T, Tanaka M, Kato G, Sano M. Passive immunization of goldfish with the serum of those surviving a cyprinid herpesvirus 2 infection after high temperature water treatment. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 査読有, 37, 2017, 62-69. https://eafp.org/download/2017-volume37/issue_2/37-2-062-sano-preview.pdf

Tomoya Shibata, Azusa Nanjyo, Masato Saito, Keisuke Yoshii, Takafumi Ito, Teruyuki Nakanishi, Takashi Sakamoto, Motohiko Sano. In vitro characteristics of cyprinid herpesvirus 2: effect of kidney extract supplementation on growth. *Diseases of Aquatic Organisms*, 査読有, 115, 2015, 223-232. doi: 10.3354/dao02885

[学会発表](計 3 件)

Makoto Shirato, Mayuri Nakajima, Mikio Tanaka, Keitaro Dairiki, Tsubasa Uchino, Goshi Kato, Takashi Sakamoto, and Motohiko Sano. Development of the genetic markers associated with resistance to herpesviral hematopoietic necrosis in goldfish. *Asian-Pacific Aquaculture 2018*, 2018. 4.24, Taipei, Taiwan.

中島真結理・田中深貴男・大力圭太郎・内野翼・白土誠・加藤豪司・坂本崇・佐野元彦. キンギョのヘルペスウイルス病に対する耐病性に関わる遺伝マーカーの開発. 平成 30 年度日本魚病学会春季大会, 2018.3.3,

東京・港区.

Chang Wei, QiuYuan Chuah, Azusa Nanjo, Taichi Kakazu, Hayato Iida, Mikio Tanaka, Keitaro Dairiki, Teruyuki Nakanishi, Goshi Kato and Motohiko Sano. Asymptomatic surviving goldfish: potential infection source of cyprinid herpesvirus 2. *JSFS International Symposium on "Fisheries Science for the Future Generations"*, 2017. 9. 22, Minato, Tokyo.

Qiu Yuan Chuah, Azusa Nanjo, Tomoya Shibata, Chang Wei, Teruyuki Nakanishi, Goshi Kato and Motohiko Sano. A possible DNA vaccine candidate encoding a membrane protein by ORF 136 of cyprinid herpesvirus 2 against goldfish herpesviral hematopoietic necrosis. *JSFS International Symposium on "Fisheries Science for the Future Generations"*, 2017. 9. 22, Minato, Tokyo.

Chang Wei, QiuYuan Chuah, Azusa Nanjo, Taichi Kakazu, Hayato Iida, Mikio Tanaka, Keitaro Dairiki, Teruyuki Nakanishi, Goshi Kato and Motohiko Sano. Reactivation of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in asymptomatic surviving goldfish. *10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 2017. 8. 28, Bali, Indonesia.

Qiu Yuan Chuah, Azusa Nanjo, Tomoya Shibata, Chang Wei, Teruyuki Nakanishi, Goshi Kato and Motohiko Sano. ORF 136 encoding membrane protein of cyprinid herpesvirus 2 as a promising candidate for DNA vaccine against goldfish HVHN. *10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 2017. 8. 28, Bali, Indonesia.

Nanjo A, T Shibata, K Yoshii, Y Shibasaki, T Nakanishi, M Tanaka, G Kato, M Sano. Passive immunization of goldfish with the serum of fish surviving cyprinid herpesvirus-2 infection in high water temperature treatment. *12th Japan-Korea Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture*, 2016. 11.3, Tu, Mie.

Yoshii K, M Tanaka, T Shibata, A Nanjo, M Saito, H Fukuda, T Sakamoto, G Kato, M Sano. Cyprinid herpesvirus 2 infection dynamics in a goldfish resistant strain after experimental infection. *12th Japan-Korea Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture*, 2016. 11.3, Tu, Mie.

南條 梓・柴田智也・吉井啓亮・田中深貴男・中西照幸・加藤豪司・佐野元彦. Cyprinid herpesvirus 2 感染耐過魚血清を用いた受動免疫の効果. 平成 28 年度日本魚病学会春季大会, 2016.3.12, 東京・武蔵野市.

吉井啓亮・田中深貴男・大力圭太郎・柴田智也・南條 梓・齊藤真慧・福田穎穂・坂本 崇・加藤豪司・佐野元彦. ヘルペスウイルス性造血器壊死症耐性系統および感受性系統のキンギョにおける感染後のウイルス体内動態, 平成 27 年度日本魚病学会秋季大会, 2015.9.25, 東京・文京区.

Nanjo A., T. Shibata, M. Saito, K. Yoshii, M. Tanaka, T. Nakanishi, T. Sakamoto, G. Kato, M. Sano. Susceptibility of isogeneic ginbuna *Carassius langsdorfii* to goldfish hematopoietic necrosis virus (CyHV-2) as a model species. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2015.9.7, Gran Canaria, Spain.

Shibata T., A. Nanjo, M. Saito, K. Yoshii, T. Sakamoto, G. Kato, M. Sano. Goldfish organ extracts can enhance propagation of goldfish hematopoietic necrosis virus in cell culture. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 2015.9.7, Gran Canaria, Spain.

〔図書〕(計 0 件)

M. Sano. Diseases Caused by Viral Pathogens: Freshwater fish. Fish Diseases (part of the Component Encyclopedia of Food and Agricultural Sciences, Engineering and Technology Resources, in the global Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)). Eolss Publishers Co. Ltd. UK, 2017, pp 278-287.

〔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

(1)研究代表者

佐野 元彦 (SANO, Motohiko)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：00372053

(2)研究分担者

坂本 崇 (SAKAMOTO, Takashi)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：40313390

(3)研究協力者

田中深貴男 (TANAKA, Mikio)