

平成21年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780145

研究課題名 (和文) アユ冷水病耐性形質関連遺伝子の単離

研究課題名 (英文) Molecular cloning of the gene related to the disease resistance of bacterial coldwater disease in Ayu (*Plecoglossus altivelis*).

研究代表者

坂本 崇 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号：40313390

研究成果の概要：アユ冷水病耐性形質を識別可能な DNA マーカーを用いて、実験魚各個体の耐病性形質保有の有無を推定・識別した。人為的な冷水病菌感染後、1 時間および 3 時間の脾臓において、耐病性形質を保持する個体群に特有の発現パターンを示す遺伝子断片を単離した。耐病性形質を保持する個体群に特有の発現パターンを示す遺伝子断片は、アユにおける冷水病に対する耐病性メカニズムに関与する遺伝子であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：遺伝・育種・マーカー選抜育種・遺伝子地図・耐病性・ゲノム育種・魚類・連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

アユ(*Plecoglossus altivelis*)は、内水面漁業生産額の約 1/2 (約 300 億円) を占める重要な魚種である。1987 年以來、冷水病はアユにおいて最も被害の大きい細菌性疾病であり、養殖業のみならず、全国的に野生集団にも甚大な被害を及ぼし続けているため、本病対策が内水面漁業において課題となっている。養殖業の本病対策としてワクチン等があるが、ワクチン接種の労力と恒常的なコストがかかることが問題となる。それに対して、効率的な育種を行っていくために耐病形質と関連する直接的な遺伝子マーカーを開発することが今後のコスト軽減につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではアユ冷水病耐病形質と関連する遺伝子の単離を目的とした。耐病形質と関連する発現遺伝子を明らかにし、その遺伝子をアユ連鎖地図上に位置づけし、アユ冷水病耐病性遺伝子座との関連を調べることは、耐病形質の原因遺伝子の特定に結びつく非常に重要な研究である。原因遺伝子の単離・解明が究極的な分子育種法(遺伝子選抜)になると考えている。

3. 研究の方法

(1) アユ冷水病耐病形質解析家系の作出

広島県海洋水産センターにおいて、冷水病に耐病性を示すアユ(海産交配系統)が見出された(Nagai et al, 2004, Fish Path.)。広島県海洋水産センターおよび広島県栽培漁業センターとの共同研究により、アユ冷水病耐性系統と感受性系統(累代系統)を交配した F_1 (雑種第一代) 家系を作出する。この F_1 家系に耐病性系統と感受性系統とをそれぞれ戻し交配し、アユ冷水病耐病形質解析家系の作出を作出する。アユ冷水病耐病形質解析家系(戻し交配家系)において、人為感染実験を行い、生残魚と死亡魚とを回収する。そのサンプルを用いて、冷水病耐性形質を識別可能な DNA マーカーを用いて連鎖解析を行い、冷水病耐病形質と DNA マーカーとの関連性を確認する。

(2) アユ冷水病耐病形質と関連性のある候補遺伝子の単離

(1) で冷水病耐性形質と DNA マーカーとの関連性が確認できた解析家系の同群において、人為感染実験を行ない、感染後、0, 1, 3 時間ごとにサンプリングを行う。サンプリング個体から、DNA を抽出するとともに、頭腎もしくは脾臓から RNA を抽出する。冷水病耐性形質を識別可能な DNA マーカーを用いて、抽出した DNA を解析し、各個体の耐病性形質の有無を判定する。耐病性を有すると思われる個体群と感受性を有すると思われる個体群に分けた後、抽出した RNA から cDNA を合成し、耐病性を有する個体群で特異的に発現している、もしくは発現量が著しく増加している cDNA を冷水病耐病形質候補遺伝子として単離する。

4. 研究成果

アユ冷水病耐病形質解析家系において人為感染実験を行ない、感染後経時的に（0時間、1時間、3時間）実験魚をサンプリングした。実験魚の頭腎および脾臓からRNAおよびDNAを抽出し、実験に用いた。まず各個体のDNAから、これまでに開発したアユ冷水病耐病形質を識別可能なDNAマーカーを用いて実験魚各個体の耐病性形質保有の有無を識別した。この識別によって、耐病性群と感受性群に分け、RNAの発現動態を解析した。発現解析法は、HiCEP（High Coverage Expression Profiling）法を用いた。208プライマーペアでの解析により、耐病性群において感受性群と比較して、感染1時間区では94、3時間区では103のRNA発現（増幅）差異のある特異的にバンドを検出した。さらに、感受性群の感染1時間後および3時間後の両方ではRNA発現が見られず、耐病性群では、感染1時間後および3時間後の両方で特異的なRNA発現が見られた特異的断片が13あった。これら特異的なバンドをクローニングし、得られた塩基配列からPCRプライマーを設計し、半定量PCR法により発現量の差について再確認した。その結果、発現量の差が約5.0倍ある遺伝子断片と発現量の差が約4.4倍ある遺伝子断片の単離に成功した。この遺伝子断片から全長cDNAの単離・機能解析を行っている。

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 9件）

M. Hara, T. Sakamoto, M. Sekino, K. Ohara, H. Matsuda, M. Kobayashi, and N. Taniguchi: Characterization of novel microsatellite DNA markers in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Science*, 72 (1), 208-210. (2006). 査読有
T. Nagai and T. Sakamoto: Susceptibility and immune response to *Flavobacterium psychrophilum* between different stocks of Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 41 (3), 99-104. (2006). (In Japanese with English summary) 査読有

〔学会発表〕（計 7件）

森本昌平、他2名、坂本崇：アユ冷水病耐病性形質のマーカー選抜育種、平成19年度日本動物遺伝育種学会大会、平成19年11月24日、（筑波、茨城）

T. Sakamoto, 他4名: Identification of disease resistance locus to bacterial coldwater disease in ayu (*Plecoglossus altivelis*). The Seventh Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 2008.10.19. (Taipei, Taiwan).

T. Sakamoto, 他4名: Marker-assisted breeding of a bacterial coldwater disease resistant ayu (*Plecoglossus altivelis*). 5th World Fisheries Congress, 2008.10.22. (Tokyo, Japan).

T. Sakamoto: Genome Research in Japanese Aquaculture species. Fish Genome Meeting 2009, 2009.03.14. (Hinxton, UK)

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：冷水病耐病性形質を有するアユの判別法、及び、これに用いるポリメラーゼ連鎖反応用プライマー（2件）

発明者：坂本崇、他2名

権利者：東京海洋大学、他1機関

種類：特許権

番号：特願2006-314364、特願2007-31978

出願年月日：2006.11.21、2007.02.13

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 崇 (SAKAMOTO TAKASHI)
東京海洋大学・海洋科学部・准教授
研究者番号：40313390

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし