

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292118

研究課題名(和文) ヒラメにおけるウイルス耐病性遺伝子の単離

研究課題名(英文) Identification of the candidate genes for Lymphocystis disease resistance in Japanese flounder.

研究代表者

坂本 崇 (Sakamoto, Takashi)

東京海洋大学・その他部局等・教授

研究者番号：40313390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメは、日本、韓国、中国などで重要な養殖魚類である。リンホシスチス病は、ヒラメ養殖に損失を与えており、対策が必要な疾病の一つである。本研究課題では、連鎖解析法、遺伝子発現法、塩基配列解析法を用いて、本疾病に対する耐病性候補遺伝子の単離を行った。連鎖解析法により、リンホシスチス耐病性遺伝子座は、1.1cM(約134kb)まで限局化することが出来た。リンホシスチス耐病性遺伝子座から、11遺伝子のcDNAを単離した。遺伝子発現解析法および塩基配列解析法の結果、2遺伝子が耐病性候補遺伝子として考えられた。耐病性候補遺伝子に関連すると考えられるSNPの天然集団における保有率は約2%と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Japanese flounder is an economically important aquaculture species in Asian countries such as Japan, Korea and China. Lymphocystis disease (LD) is one of important disease and causes serious damage to Japanese flounder aquaculture industry.

In this study, we investigated the candidate genes for Lymphocystis disease resistance in Japanese flounder using linkage analysis, gene expression analysis and sequence analysis. The genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease was localized on 1.1cM (about 134kb) by linkage analysis. Eleven cDNA of candidate genes from the locus controlling the resistance to lymphocystis disease were isolated and used for gene expression analysis and sequence analysis.

Two candidate genes for lymphocystis disease resistance were identified by gene expression analysis and sequence analysis. The genetic frequency of SNP on the candidate genes was about 2% in wild population.

研究分野：水族分子遺伝育種学

キーワード：ウイルス 耐病性 遺伝子 ゲノム 育種 ヒラメ マーカー選抜 SNP

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

養殖魚類の耐病性形質の分子遺伝学的解析は、申請者らの研究グループにより世界初の成果としてニジマス IPN ウイルス耐病性遺伝子座 (Ozaki et al., 2001) が明らかとなり、さらにニジマス IHN ウイルス耐病性遺伝子座 (Khoo et al., 2004)、本研究課題の基盤となるヒラメリンホシスチス耐病性遺伝子座 (Fuji et al., 2006)、ブリの寄生虫抵抗性遺伝子座 (Ozaki et al., 2013: 申請後に発表) が明らかとなっている。国外においては、アメリカのグループによるニジマス IHN ウイルス耐病性研究 (Palti et al, 1999., 2001)、寄生虫症抵抗性研究 (Nichols et al., 2003)、ノルウェーおよびイギリスのグループによる太平洋サケ IPN ウイルス耐病性研究 (Houston et al., 2008, Moen et al., 2009) などがある。論文発表がされているヒラメ以外の耐病性遺伝子座研究の多くはサケ科魚類の研究である。これらの研究は耐病性形質に関連する遺伝子座の報告であり、耐病性遺伝子単離についての報告はない。

### (2) これまでの研究成果

ヒラメにおけるリンホシスチス耐病性研究においては、その耐病性遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーが開発されており (Fuji et al., 2006)、その遺伝マーカーを用いた世界初となるマーカー選抜育種法が実践され、リンホシスチス耐病性ヒラメが実用化された (Fuji et al., 2007)。現在では、日本におけるヒラメ養殖人工種苗の約 20-30 %で利用されている。耐病性遺伝子を単離するためには、耐病性遺伝子座領域の全ゲノム情報を入手する必要があると考え、ヒラメ全ゲノム解析研究の共同研究により、リンホシスチス耐病性遺伝子座を完全に網羅する領域のゲノム情報 (約 930kb) を得た (この領域に約 80 遺伝子が存在することが予想されている)。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、養殖魚類において世界初となる耐病性遺伝子の単離を行い、その耐病性メカニズムを解明することを目的とする。申請者らの研究により、単独遺伝子座で支配されていることが明らかになったウイルス病 (ヒラメリンホシスチス病) の耐病性形質について解析し、その原因候補遺伝子を単離する。従来の水産分野における耐病性メカニズム研究は、ほ乳類等で知られている免疫関連遺伝子を魚類で単離し、その機能解析を行う手法である。本研究では、遺伝学的な結果に基づき耐病性遺伝子の単離を行うため、全く新規の耐病性遺伝子およびそのメカニズムを明らかにすることが期待できる。また、マーカー選抜育種法では、遺伝マーカーと耐病性形質との連鎖関係を利用するため、遺伝マーカーと耐病性形質の原因遺伝子間の遺伝的組み換えに注意を払わなければならない、

また原因遺伝子の突然変異などによる形質の喪失は後代の結果で明らかとなる。耐病性遺伝子の単離は、マーカー選抜育種法から遺伝子選抜育種法へと技術革新をもたらすとともに、その結果として天然魚から耐病性形質を保持する系統を開発する技術開発を可能にする究極的な分子育種法になると考えている。

(2) 本研究課題では、いくつかの解析 (遺伝子発現もしくは塩基配列の相違など) により原因遺伝子候補の絞り込み (「実質的な原因遺伝子の特定」) を完了する。原因遺伝子候補の機能解析については、候補遺伝子の絞り込みを進める時点で、その方法論について検討を進める予定であるが、現時点で候補遺伝子が特定されていないため、それについては本研究提案には含めないこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) リンホシスチス耐病性遺伝子座の詳細な連鎖解析

本研究課題では、これまでにヒラメ全ゲノム解析により準備したリンホシスチス耐病性遺伝子が存在すると考えられる約 930kb のゲノム情報を用いて、新規遺伝マーカーを開発し、連鎖解析法によりリンホシスチス耐病性遺伝子座を詳細に解析し、原因遺伝子が存在するゲノム領域を限局化する。

精子や卵の産生時の減数分裂時に、相同染色体間の乗り換えによる遺伝情報の交換が行われる。この相同染色体間の乗り換えを次世代である子孫において遺伝マーカーによる解析により、遺伝的組み換えとして検出する。遺伝マーカーと目的とする遺伝形質であるリンホシスチス耐病性形質との関連性を連鎖解析により遺伝的組み換え個体を明らかにし、遺伝マーカーとリンホシスチス耐病性遺伝子間の遺伝的距離を推定する。この連鎖解析を行う上で、目的のゲノム領域を詳細に調べるためには、その領域から数多くの遺伝マーカーを開発する必要がある。そこで、既に塩基配列情報を得ているリンホシスチス耐病性遺伝子座を完全に網羅する領域 (約 930kb) から、約 50kb 間隔で遺伝マーカー (マイクロサテライトマーカー: MS マーカー) を開発し、連鎖解析に用いた。

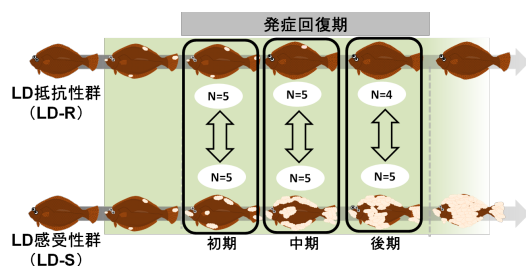
本研究に用いる解析家系は、雄親が耐病性遺伝子座をヘテロ接合体で保持する個体を用い、感受性個体 (耐病性遺伝子座を持たない個体) と実験交配し作出した。この解析家系に、リンホシスチスウイルスを人為的に暴露し、人為感染実験を行った。人為感染実験後に、解析家系の各個体における罹患状況を評価し、罹患した個体は耐病性遺伝子座を持たない感受性個体、罹患しなかった個体は耐病性遺伝子座を保持する耐病性個体とした。

人為感染実験後、罹患した個体 (耐病性遺伝子座を持たない感受性個体)、罹患しなかった個体 (耐病性遺伝子座を保持する耐病性

個体)からゲノム DNA を抽出し、遺伝マーカーを用いた連鎖解析を行った。各個体における耐病性遺伝子座保有の有無と各遺伝マーカーとの関連性を連鎖解析し、関連性が最も高かった遺伝マーカーを明らかにした。(関連性が最も高かった遺伝マーカーの近傍に、耐病性遺伝子が存在すると考えられる。)

## (2) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域内に存在する遺伝子の発現解析

連鎖解析家系の一部について、人為感染実験中にサンプリングを行い遺伝子発現解析に用いた。連鎖解析により限局化した耐病性遺伝子座に存在すると推定された遺伝子について、耐病性形質との関連性を検討するため、各遺伝子内に PCR プライマーを設計し RNA サンプル(頭腎、脾臓、肝臓、表皮)を用いて、人為感染実験中の遺伝子発現動態を解析した。人為感染実験中にサンプリングした個体については、ゲノム DNA を用いて遺伝マーカーによる解析を行い、耐病性遺伝子座を保持する個体(耐病性個体)と耐病性遺伝子座を保持しない個体(感受性個体)を識別し解析に用いた。これにより、人為感染実験中の遺伝子発現動態だけでなく、耐病性個体と感受性個体との間の比較遺伝子発現解析も可能になる。(遺伝マーカーによる解析で、リンホシスチス耐病性遺伝子座で遺伝的組み換えを起こしていない個体において、耐病性遺伝子座保持の有無により耐病性形質保持の有無が推定可能となる。)これらの解析により、リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域内に存在する遺伝子とリンホシスチス耐病性形質との関連性を検討した。



## (3) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域内に存在する遺伝子の塩基配列解析

連鎖解析により限局化した耐病性遺伝子座に存在すると推定された遺伝子について、各遺伝子内に設計した PCR プライマーを用いて、神奈川県水産技術センターで保有するリンホシスチス耐病性系統と感受性系統間の塩基配列比較を行い、遺伝子翻訳領域内の変異と耐病性形質との関連性を検討した。

## (4) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域のゲノム DNA 塩基配列解析

連鎖解析により限局化した耐病性遺伝子座ゲノム領域において、リンホシスチス耐病性系統と感受性系統間の差異を解析した。耐

病性系統および感受性系統の各 1 尾について、次世代シーケンサー(イルミナ社)を用いて解析し、取得されたリードデータを限局化したリンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域にマッピングした。その後、リンホシスチス耐病性系統と感受性系統間での差異を検討した。

## (5) 天然魚を用いたリンホシスチス耐病性候補遺伝子の保持率の推定

リンホシスチス耐病性遺伝子候補をさらに絞り込むためには、天然魚を用いてリンホシスチス病への罹患の有無とリンホシスチス耐病性遺伝子候補の塩基配列との関連性を解析する必要がある。そこで、これまでに絞り込みを行った原因遺伝子候補の遺伝子翻訳領域内変異(SNP)について、天然集団(2 地点)における保持率を解析した。

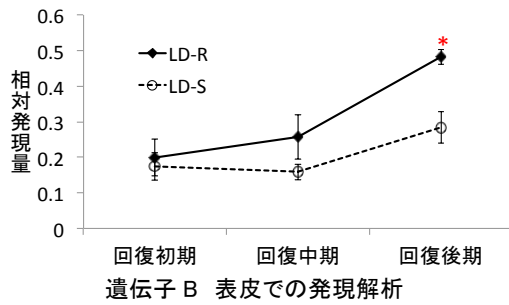
## 4. 研究成果

### (1) リンホシスチス耐病性遺伝子座の詳細な連鎖解析

リンホシスチス耐病性遺伝子座領域の塩基配列情報から、約 50kbp 間隔に遺伝マーカーを開発した。リンホシスチス病人為感染試験を行ったヒラメ戻し交配家系(n=88)を用いて、リンホシスチス耐病性遺伝子座を連鎖地図上にマッピングをした。その結果、8 個の遺伝マーカーがリンホシスチス耐病性遺伝子座領域上にマッピングされ、そのうち 2 つのマーカー座において組換え個体が確認された。この連鎖解析により、リンホシスチス耐病性遺伝子座領域は遺伝距離で 1.1cM、物理距離で 130kbp に限局化された。

### (2) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域内に存在する遺伝子の発現解析

限局化されたリンホシスチス耐病性遺伝子座領域に含まれる遺伝子をソフトウェアにより推定したところ、リンホシスチス耐病性遺伝子座領域内に 11 個の遺伝子が存在することが予測された。リンホシスチス病耐病性個体(n=14)と感受性個体(n=15)についてリンホシスチス病人為感染試験を実施し、リンホシスチス病での症状の回復初期・中期・後期(およそ 1 ヶ月間隔)にサンプリングを行った。次に、頭腎・脾臓・肝臓・表皮における 11 個の候補遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により時期別に両群で比較した。その結果、回復初期では頭腎、脾臓において細胞膜の構成タンパクをコードする遺伝子 G、中期では頭腎において免疫関連遺伝子 C 及び細胞膜輸送系の遺伝子 D、後期では表皮において免疫関連遺伝子 B、肝臓においてテロメア構造の維持に関わる遺伝子 J の発現量がリンホシスチス病耐病性個体において有意に高く、回復初期の頭腎において遺伝子 G の発現量がリンホシスチス病感受性個体で有意に高いことが明らかになった。



(3) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域内に存在する遺伝子の塩基配列解析

限局化されたリンホシスチス耐病性遺伝子座領域に含まれる遺伝子(翻訳領域内)について、リンホシスチス病耐病性個体と感受性個体間での塩基配列の差異を解析した。その結果、遺伝子 A で 2 カ所、遺伝子 B で 1 カ所、遺伝子 C で 2 カ所、遺伝子 J で 6 カ所の一塩基多型 (SNP) を検出した。特に、遺伝子 B と遺伝子 C において検出された SNP は、重要な機能ドメイン内に位置しており、遺伝子機能に及ぼす影響が大きい可能性があると考えられた。

(4) リンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域のゲノム DNA 塩基配列解析

耐病性系統および感受性系統の各 1 尾について、次世代シーケンサーで取得されたリードデータをリンホシスチス耐病性遺伝子座ゲノム領域(約 134kb)にマッピングし、リンホシスチス耐病性個体と感受性個体間での差異を検討した結果、およそ 760 個の SNP (差異) を検出した。

(5) 天然魚を用いたリンホシスチス耐病性候補遺伝子の保持率の推定

耐病性候補遺伝子内で検出された SNP について、天然集団(2 地点でサンプル収集)における保持率を解析し結果、1 地点目が 360 尾中 7 尾(1.94%)、2 地点目が 78 尾中 2 尾(2.56%)となり、天然集団における保持率は約 2%程度であることが明らかになった。

## 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)

①C. Shao, Y. Niu, P. Rastas, Y. Liu, Z. Xie, H. Li, L. Wang, Y. Jiang, S. Tai, Y. Tian, T. Sakamoto and S. Chen.

Genome-Wide SNP Identification for the Construction of a High-Resolution Genetic Map of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL Mapping of *Vibrio anguillarum* Disease Resistance and Comparative Genomic Analysis.

DNA Research 22 (2), 161-170. 2015.

(査読有)

DOI: 10.1093/dnares/dsv001.

[学会発表] (計 6 件)

①法橋亜矢子、杉森信哉、長谷川理、Changwei Shao、Songlin Chen、佐野元彦、坂本崇  
ヒラメリンホシスチス病抵抗性遺伝子座領域に存在する候補遺伝子の発現解析

日本動物遺伝育種学会第 15 回大会、2014.10.31. 埼玉県和光市

②坂本崇(招待講演)

ゲノム情報を用いた耐病性育種

日本水産学会水産増殖懇話会、2015.03.27.

東京都港区

③中嶋彩奈、法橋亜矢子、佐野元彦、坂本崇  
ヒラメのリンホシスチス病抵抗性候補領域内に存在する遺伝子の単離と配列解析

平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015.09.23. 宮城県仙台市

④H. Okamoto, J. Aoki, T. Nozaki, A. Ozaki, S. Uji, K. Fuji, T. Sakamoto, N. Okamoto, J. Kawai, K. Araki and M. Ekker.

Convenient physical genome map of flounder. A Practical whole-genome radiation hybrid map of Japanese flounder.

The international symposium on genetics in aquaculture XII. 2015.06.24.

Santiago de Compostela

⑤坂本崇(招待講演)

養殖魚類における遺伝情報を活用したゲノム育種研究の現状と展望

魚類防疫士連絡協議会 講演会 2016.03.02. 東京都中央区

⑥坂本崇(招待講演)

養殖魚類における遺伝情報を活用した分子育種研究の現状と展望

京都産業大学シンポジウム「最新遺伝学からせまる生物資源の利用と保全」2016.03.11.

京都府京都市

[図書] (計 1 件)

①T. Sakamoto, A. Ozaki and N. Okamoto

EOLSS (Encyclopedia of life support systems) "Fish Pathogens" volume 5.5.35.

Development of Disease-Resistant Fish using Marker-Assisted Selection.

Eolss Publishers Co Ltd. *In press*.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 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