

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850122

研究課題名(和文) 疾病発症を担う分子経路を標的とした魚病防除法の開発-過剰な免疫反応を抑える

研究課題名(英文) Transcriptome analysis to understand disease resistance traits in two Scomber species

研究代表者

矢澤 良輔 (Yazawa, Ryosuke)

東京海洋大学・その他部局等・准教授

研究者番号：70625863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマサバおよびゴマサバを飼育する中で、高水温期の細菌感染症による斃死率が各魚種で異なることを見出した。本研究では、マサバ・ゴマサバ表皮における種間で比較が可能なトランスクリプトーム解析の基盤構築を試みた。3ヶ月齢マサバおよびゴマサバの表皮サンプルをRNA-seqに供し、71,072のマサバコンティグ、52,530のゴマサバコンティグを取得した。さらに、両種のコンティグ配列をreciprocal best matchに供し、両種オースログとして13,875コンティグを得た。このリストを用いて遺伝子発現解析を行い、両種間で発現量に差のあった遺伝子リストには免疫関連のパスウェイ等が確認された。

研究成果の概要(英文)：We found that chub mackerel (*Scomber japonicas*) shows higher mortality in the high water temperature periods comparison with closely related species, blue mackerel (*S. australasicus*). In the present study, we performed that transcriptome analysis to understand such a disease resistance traits showing in blue mackerel with NGS technology. As the results of RNA-seq and subsequent de novo assembly, 71,072 contigs for chub mackerel and 52,530 contigs for blue mackerel. We further conducted reciprocal best match to estimate orthologs between two species and 13,875 contigs were obtained. Using this orthologs list of two Scomber species, we found expression levels of several immune related genes were significantly different. These genes are mostly related to acute immune reaction and inflammation.

研究分野：魚類病態生理

キーワード：耐病性 サバ類養殖 RNA-seq トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、魚介類の養殖は世界中で行われており、生産量も年々増加している。これに伴い種々の感染症が多発し、その経済的損失が甚大であることから水産養殖における最重要課題となっている。魚病対策として抗生物質やワクチンの投与が挙げられるが、ワクチンの開発には膨大な時間や著しい労力が必要であり、対象となる魚種が限定されることも問題となる。我が国の養殖業態は、ノルウェーにおけるアトランティックサーモン養殖の様に、一魚種が養殖生産の大部分を占めるものではなく様々な魚種が養殖対象となるため、ワクチンでの対応にも限界がある。このため、新たな養殖対象種や新しい魚病の発生などにも対応可能で、より広範な魚種に適應できる新しい魚病防除技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

マサバ (*Scomber japonicus*) は水産上重要魚種であるが、高水温期にレンサ球菌症を多発することが、その養殖を困難にしている。本研究室では、マサバおよび、その近縁種であるゴマサバ (*S. australasicus*) の飼育実験を行う過程で、ゴマサバおよびマサバ・ゴマサバ雑種が高水温期においても細菌感染症を発症せず、そ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 (図1)。そこで、サバ科サバ属に属し、雑種の作出が可能ほど近縁であ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ことは、広く海産養殖対象魚種に応用可能な魚病防除技術への知見となると考えた。

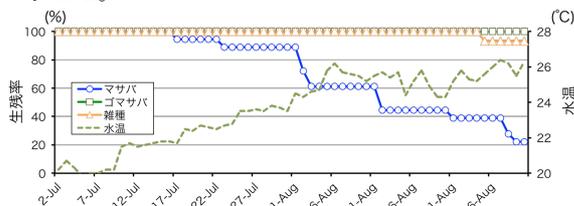


図1. 水温上昇期におけるマサバ、ゴマサバおよび雑種の生残率

近年、ヒトやマウスに加え、様々な動物種におけるゲノム情報や遺伝子発現情報が蓄積されたことにより、モデル動物でその機能が明らかとなっている遺伝子の情報を非モデル動物に対応させることが可能になりつつある。網羅的な遺伝子発現情報によるパスウェイ解析は、個々の遺伝子の機能がほとんど未知であるサバの様な非モデル動物においても、一連の遺伝子群の発現を指標に種々のシグナル伝達経路の動態を調べることが可能な手法である。

そこで、本研究では、次世代シーケンシング技術を用いてマサバおよびゴマサバを対象とした網羅的な遺伝子発現解析を実施する。さらに既知の分子情報をもとに、パスウ

エイ解析等を行うことで、マサバ・ゴマサバ間で抗病性に差が生じる分子基盤の解明を目的とした。

3. 研究の方法

サバ類は通常、水槽内飼育下での自然産卵を行わないが、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与による人為催熟技術が確立されている。我々はこの技術を応用することで、マサバおよびゴマサバ種苗の生産に成功しており、長期間にわたり飼育実験に用いる供試魚の安定供給が可能である。また、比較的小型である 1m³水槽を飼育実験に用いることで、様々な飼育条件下におけるマサバおよびゴマサバの飼育実験を並行して同時に行うことが可能となっている。さらに、当研究室では、自然海水を加温および冷却することが可能な調温設備を複数有しており、様々な水温条件下において飼育実験を実施可能な体制が整備されている。マサバおよびゴマサバでは、図1で示したように高水温期における細菌感染症による斃死率が著しく異なる。これらの条件を人為的に作り出し、それぞれの条件下での感染症に対する防除効果について共通の分子機構が存在するかどうかを確かめる。具体的には東京海洋大学館山ステーションにおいて生産した3ヶ月齢のマサバおよびゴマサバ (平均体長 13.0 cm、平均体重 20.0 g) を供試魚として、飼育水温を 20°C 以下に維持する低水温維持区および、飼育水温 28°C まで段階的に上昇させる水温上昇区を設け飼育実験を行った。試験開始直後および1ヶ月後 (低水温維持区および水温上昇区) における両種の表皮より total RNA を抽出・精製し RNA-seq に供した。各サンプルから Illumina 社 HiSeq2000 により 100 塩基ペアエンドの配列情報を取得し、Trinity による de novo assembly および TransDecoder によるコーディング領域を有する転写産物の抽出を行った。そして、得られた両種のコンティグ配列を blast プログラムによる reciprocal best match に供し、両種間に対応するオーソログ遺伝子の推定を試みた。さらに、このオーソログ遺伝子をヒトとマウスのデータベースに対し Blast プログラムで相同性検索をおこない、ヒト、マウスの遺伝子に対応づけられている kegg パスウェイの情報をアノテーションした。

4. 研究成果

マサバおよびゴマサバ表皮の転写産物における RNA-seq を実施し、50M リード/個体、両種3個体ずつの計 150M リードを得た。Trinity による de novo assembly および TransDecoder によるコーディング領域を有しかつ各種データベースに登録済みの既知の分子と相同性のあるをトランスクリプトを抽出したところ、71,072 のマサバコンティグ、52,530 のゴマサバコンティグを取得した。

さらに、異種間で比較可能なコンティグリストを構築するために、遺伝子の重複を除いたうえ、マサバおよびゴマサバの各コンティグを1対1でオーソログとして対応させる必要がある。そこで、得られたコンティグリストからマサバ、ゴマサバおよびクロマグロ（クロマグログenom情報から推定された遺伝子リストを用いた。）間のオーソログ遺伝子を reciprocal best match 法により抽出した。その結果、マサバおよびゴマサバ間で推定されたオーソログとして 13,875 コンティグ、マサバとマグロ間のオーソログとして 748 コンティグ、ゴマサバとマグロ間のオーソログとして 1,652 コンティグが得られた（図2）。

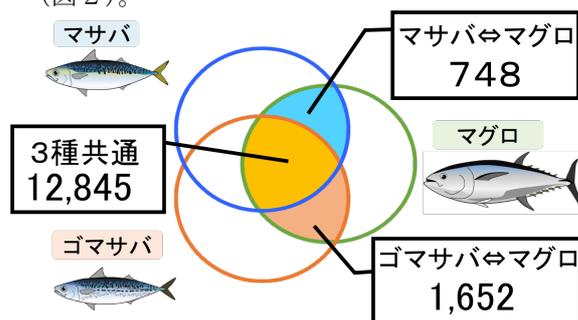


図2. マサバ、ゴマサバおよびマグロ間の推定オーソログ数

さらに、この両種コンティグをヒト、マウスのデータベースに対し相同性検索をおこなった結果、約9割の遺伝子に相同性があった。また、これらオーソログ遺伝子 kegg パスウェイと対応させたところ、両種とも約1万の kegg パスウェイの情報を付与することが可能であった。

次に、このアノテーションが完了したコンティグリストを用いて遺伝子発現解析を実施したところ、図3に示したような遺伝子において、その発現量に有意な差があった。特に高水温期に高い斃死率を示すマサバにおいて、ケモカインレセプターやヘプサイジンといった、早期の免疫応答に関する分子が

マサバコンティグ		ゴマサバコンティグ	
FC	gene name	FC	gene name
4.7	beta-microseminoprotein	3.9	Histidine_ammonia-lyase
4.0	Histidine_ammonia-lyase	3.3	Carbonic_anhydrase
3.7	Carbonic_anhydrase	3.1	Milk_fat_globule-EGF_factor8
3.1	Novel immune-type receptor 11	2.5	Glycogenin_2
2.9	Secretagogin	2.5	CDC42_effector_protein
2.9	Milk_fat_globule-EGF_factor8	2.3	Coiled-coil_domain-containing_protein3
2.7	Glycogenin_2	2.1	Immunoresponsive_gene_1_like
2.7	C-C_chemokine_receptor_3	2.0	Coiled-coil_domain-containing_protein6
2.5	Hepcidin-1	2.0	Cathepsin L precursor

こう発現していることが明らかとなった。

図3. マサバあるいはゴマサバにおいて高発現している遺伝子のリスト

さらに本研究では、マサバおよびゴマサバにおいて、それぞれの種におけるコンティグリスト作成している。この発現解析においては、両種のコンティグリストをそれぞれリファレンスとしてマッピングに用いているた

め、図3に示したように、遺伝子発現解析の結果、マサバコンティグのみ、あるいはゴマサバコンティグのみにリストされている遺伝子とその発現量に有意な差があるものとしてリストアップされた。このことから、両種のリファレンスをそれぞれ使用することにより、片方種のコンティグリストのみをリファレンスとして使用する際には得られない情報を得られることが明らかとなった。

さらに、マサバ、ゴマサバ間で発現量に差のあった遺伝子を kegg パスウェイに対応させたところ、免疫関連の kegg パスウェイがいくつか確認された。今後は、マサバおよびゴマサバを用いた水温別の飼育試験を行い、本研究で作成した種間統一リファレンス配列を利用して、トランスクリプトーム解析を行い、高水温期の斃死率の種間差を規定する分子機構を解明することを目指している。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 大崎彰悟, 矢澤良輔, 佐藤昌直. サバ類近縁種間のトランスクリプトーム解析. 平成28年度水産学会春季大会 2016年3月
2. 矢澤良輔, 大崎彰悟, 佐藤昌直. RNA-seq でなぜゴマサバがマサバより強いのかを探る. 生命情報科学若手の会 第7回研究会 2015年10月
3. 佐藤昌直, 矢澤良輔, 富田勝. ゴマサバ・マサバ表皮のトランスクリプトームの de novo assembly. NGS 現場の会 第四回研究会 2015年7月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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・学術研究院・准教授

研究者番号：70625863

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：