

研究テーマ	エラムシに強いトラフグ養殖のための分子基盤の解明
研究期間	平成25 ～ 26年度
主たる研究者	【学部・学科】海洋生物資源学部・海洋生物資源学科 【職・氏名】准教授・末武弘章
<p>○研究目的</p> <p>寄生虫であるエラムシの感染により、若狭フグ養殖は大きな被害を受けており、その対策として駆虫薬が利用されているが、高価であり漁業者にとって大きな負担である。また、安心・安全な若狭フグという点においても駆虫薬を使わないフグ養殖が理想である。さらに、これらを使わない淡水浴や網替えも行われているが、非常に高い労働力が必要であり、これらに変わる安心・安全・容易な新しい寄生虫対策が求められている。</p> <p>トラフグ自身の免疫力を高め、安心・安全な若狭フグ養殖を行うためには、エラムシに対するフグ類の感染と排除の仕組みを明らかにすることが不可欠である。我々はこれまでにエラムシの感染・排除に関わるゲノム領域を特定している。本研究では、さらに、エラムシの感染・排除に関わる遺伝子とその役割を決定し、エラムシに強いトラフグ養殖のための分子基盤を確立することを目指す。分子基盤が明らかになれば、エラムシに強いトラフグの育種も可能となることが期待される。</p> <p>○研究成果</p> <p>トラフグとクサフグではエラムシに対する感染性が異なり、クサフグにはエラムシは感染しない。そこで、トラフグとクサフグを掛けあわせたハイブリッドとその子を作り、エラムシの感染性を調べたところ、エラムシへの感染の成立のしやすさは遺伝的であり、クサフグのある特定のゲノム領域を持つものが感染しにくいことがわかった。しかし、その領域には200個を超える遺伝子があり、どの遺伝子がトラフグのエラムシへの感染のしやすさに関わるのかは不明である(Hosoya et al., 2013)。この遺伝子が特定できれば、エラムシ感染と排除の仕組みが明らかになり、今後トラフグ自身の免疫力を活かした寄生虫排除による安心・安全なトラフグ養殖が可能になることが期待される。また、トラフグだけではなく、寄生虫感染はヒラメやブリなど日本国内の養殖魚に加え、サケ科魚類など世界の養殖においても深刻な問題であり、本研究の成果は、福井県のみならず、日本、世界の水産養殖に資するものと考えている。さらに、魚類寄生虫の宿主特異性に関する分子レベルでの研究はほとんどなく、この点においても大きな貢献が期待できる。本研究ではクサフグとトラフグのエラムシに対する感受性に関わる200個以上の遺伝子を含むゲノム領域の中から、この違いを生む遺伝子を特定し、その役割を明らかにすることが目標である。しかし、一般にそのためには多大な研究が必要であり、その端緒となる遺伝子の絞り込みに向けて大きく2つの戦略を採用した。</p> <p>1) 網羅的戦略</p> <p>今年度は主にこちらの戦略を中心に行った。本研究では、共同研究者の東京大学大学院農学部附属水産実験所の菊池准教授、細谷助教の解説したクサフグゲノム配列の供与を受けた。上記のハイブリッドを用いた解析により、9番染色体上の領域が、エラムシ幼生のフグ鰓への着定後の排除に関わることが分かっているが、この領域のゲノム解析を新たに行ったところ、これまでわ</p>	

かっていた 214 個の遺伝子に加え、新たに 25 個の遺伝子が存在することがわかった。これまでの知見では一般に重複した遺伝子や病原体の感染に関わる遺伝子は強い淘汰を受けることが知られている。そこで、これら合計 239 個の遺伝子について、遺伝子が淘汰を受けているかどうかを検討した。塩基置換に伴いアミノ酸配列の置換が生じる非同義置換速度 ( $Ka$ ) とアミノ酸の置換の生じない同義置換 ( $Ks$ ) の比は、正の選択が起こっている場合、すなわち適応的な遺伝子が生じている場合  $Ka/Ks > 1$  となる。寄生虫に対する感受性に差が出ている場合、それに関わる遺伝子は適応的である可能性が考えられる。実際にこれらについて  $Ka/Ks$  を調べてみたところ、24 個の遺伝子が  $Ka/Ks > 1$  を示したが、これらを統計的検定にかけたところ、統計的に有意に  $Ka/Ks > 1$  を示したものは *mon2* 遺伝子のみであった。*mon2* は、ほ乳類でもその機能はよくわかっておらず、ゴルジ体からの分泌に関与する因子であることが知られているのみであり、寄生虫との関連はわかっていない。これらについて鰓での発現パターンやその機能などを詳細に検討する必要がある。また、今回の分子進化学的研究では検出できない遺伝子間の小さな配列差あるいは発現パターンの違いなどが寄与している可能性も十分に考えられる。

そこで、次にトラフグとクサフグの鰓で発現する遺伝子とその発現パターンの解析を行った。クサフグのゲノム情報を持つ東京大学大学院農学部附属水産実験所の菊池准教授、細谷助教、田角特任助教と共同研究を進めている。宿主特異性に関わるゲノム領域の遺伝子のうち、多くのものについてはその遺伝子が特定されている。これらの鰓での発現パターンがトラフグとクサフグの種間で異なっていれば、その違いがエラムシの宿主特異性に関与する可能性が考えられる。また、クサフグにおいては鰓にエラムシ幼生が付着したのち、約 1 日以内で比較的速やかに排除されることがわかっている。このことは、獲得免疫などの異物の排除に時間のかかる因子が関与する可能性が低いことを示唆するものである。つまり、感染によって特異的に誘導されたものというよりは、定常的に発現しているものが関与している可能性が高い。そこで、未感染のトラフグとクサフグをそれぞれ用意し、鰓で発現する遺伝子を網羅的に解析した。手法として網羅的な発現解析に適している次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析（イルミナ社、HiSeq2000）を BGI JAPAN に依頼した。一方で、トラフグゲノムは既に解読済みであるが、クサフグゲノムは解析のための環境整備が不十分であることから、先行して東京大学でクサフグゲノムを解読し、得られた情報を利用したトランスクリプトーム解析のシステムを構築中である。現在は、得られた膨大なデータを解析中である。これにより、トラフグとクサフグの鰓における発現遺伝子の質的な差、量的な差が明らかになることで、候補遺伝子が絞り込まれることが期待できる。

## 2) 候補遺伝子戦略

宿主特異性に関わるゲノム領域の遺伝子のうち、多くのものについてはその遺伝子が特定されている。そこで、このうち、フグや他の動物で粘液に関わるもの、免疫に関わるものを候補とし、前年度と同様に標的領域内にある主要な粘液成分である *Muc2* と *Muc5ac* 遺伝子について引き続き解析した。しかし、両 *Muc* 遺伝子ともに非常に巨大であり、かつ内部に繰り返し構造を持つことから、全長の解析は非常に困難を極め、部分配列の解読にとどまった。一般に繰り返し構造領域は大量の糖鎖によって修飾されているため、この部分は寄生虫の分泌する酵素などによる分解を受けにくい領域であることから、得られた部分配列について分子進化学的解析を行ったところ、*Muc2* 遺伝子ではなく、*Muc5ac* 遺伝子がより強い淘汰を受けている可能性が示されたが、有意な選択的進化が起こった証拠は得られなかった。トランスクリプトーム解析の結果を待ち、N 末端側の配列についても同様の解析を行う。また、同解析により、発現量の差やスプライシング等の発現様式の差が見つかることが期待される。

※ホームページ掲載用として使用するため、A4 2枚程度で簡潔にまとめてください。

参考資料（図、写真等）があれば添付してください。