

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		AOKI TAKASHI					
①研究代表者氏名		青木 宙		②所属研究機関・部局・職		東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・教授	
③研究課題名	和文	魚介類における DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現情報解析手法の開発					
	英文	Development of DNA microarray for characterization of gene network systems of fish and shellfish					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		17,200	15,900	15,900	15,900	15,900	80,800
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
青木 宙		東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・教授		魚病学		研究の総括ならびにマイクロアレイの発現解析 発現遺伝子配列情報の収集・解析 各種臓器・細胞の cDNA ライブラリーの構築	
廣野 育生		東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・助教授		魚病学			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>マイクロアレイ法は生物の持つ全ての遺伝子の動的挙動を効率的、また、定量的に計測する手法であり、マイクロアレイで得られた情報を解析することにより、様々な生命現象（発生、分化、成長、免疫など）における遺伝子機能あるいは遺伝子発現の制御回路を解明することが可能である。また、マイクロアレイの情報とゲノム資源を有効に使うことが、21世紀に我々がかかえる水産食資源あるいは海洋環境分野の研究を推し進めていく上での重要な鍵になるものと思われる。</p> <p>本研究では、魚介類よりクローン化した約1万個の遺伝子を1枚のスライドガラスの基盤上にスポットし、DNA マイクロアレイを用いて、①稚魚から成魚に至る発育・成熟における各組織あるいは細胞での遺伝子発現の類似性あるいは違いの解析、②種々の化学物質等（生理活性物質、抗菌剤、免疫賦活性剤、ワクチン）の刺激による遺伝子発現情報の解析、③環境変化(溶存酸素、水温)などの物理的刺激による遺伝子発現情報の解析、④健康魚およびワクチン投与魚への微生物感染による遺伝子発現情報について、マイクロアレイ法を用いて体系的に解析する手法を開発することを目的とする。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1. ヒラメの肝臓、脾臓、表皮細胞、ポリ I:C で刺激した脳および腎臓、細菌リポ多糖 (LPS) あるいはマイトジェンであるコンカナバリン A(ConA)およびホルボールエステル(PMA)で刺激した腎臓の cDNA ライブラリーを構築した (研究成果論文 8,18,20,29、研究成果学会発表 2,3,8,12)。
2. ヒラメ cDNA クローンの EST 解析(約 4,000 クローン)により得られた配列情報を解析し、異なる遺伝情報をコードしていると考えられた 1,218 クローン (698 の既知遺伝子および 520 の機能未知遺伝子) を選び、cDNA マイクロアレイを作製した。
3. ヒラメの腎臓ならびに白血球を LPS、ConA、PMA あるいはヒラメラブドウイルス感染による刺激を与え、発現する遺伝子のプロファイリングを cDNA マイクロアレイで行い、本マイクロアレイにより、ヒラメの免疫関連遺伝子発現プロファイリングが行えることを解明した (研究成果論文 7、学会発表 18)。
4. ヒラメのウイルス性出血性敗血症 (VHS) に対して有効な DNA ワクチン (VHS-g ワクチン) を接種した場合に、どのような免疫系が活性化されるのかを調べた。VHS-gDNA ワクチンを接種した場合、インターフェロンネットワークシステム関連遺伝子の発現が上昇することが明らかになった (研究成果論文 1、学会発表 6,7)。
5. ヒラメのウイルス性出血性敗血症 (VHS) に対して有効な DNA ワクチンと効果の見られない組換えタンパク質ワクチンをヒラメに接種した場合に発現する遺伝子の違いを解析し、VHS ウイルスを感染防除する DNA ワクチンは細胞性免疫も液性免疫もともに活性化するが、組換えタンパク質ワクチンは液性免疫のみを活性化することが明らかになった (研究成果学会発表 6,17)。
6. ヒラメのラブドウイルス(HIRV)感染症に対する 2 種類の DNA ワクチン (HIRV-g および HIRV-n) の効果とワクチン接種後の遺伝子発現プロファイリングを行ったところ、VHS の DNA ワクチンの試験と同様にインターフェロンネットワークシステム関連遺伝子の発現がワクチン効果の指標になることが示唆された (研究成果学会発表 4,7,14,17,19,20)。
7. 魚類病原細菌 *Edwardsiella tarda* に対して感受性の異なる 2 グループのヒラメにおいて、発現している遺伝子の違いの有無を cDNA マイクロアレイで解析したところ、複数の遺伝子の発現パターンが異なっていた。特に、種々ケモカインの発現量ならびに発現時期が 2 グループ間で顕著に異なっており、ケモカインが本菌感染症に対する耐病性に関与していることが示された (研究成果学会発表 10,11,13,16)。
8. サイトカイン DNA アジュバントとして、ヒラメのインターロイキン 1、CC ケモカインおよび CXC ケモカインが有効であり、これらサイトカイン DNA アジュバントが種々の免疫関連遺伝子の発現を誘導することを解明した (研究成果論文 9、学会発表 8)。
9. 種々の機能未知遺伝子の発現プロファイリングをマイクロアレイにより解析することにより、免疫系に関与していると考えられる遺伝子候補を得ることが出来た (研究成果学会発表 1,4,6-8,10,11,13,14,19,20)。
10. クルマエビおよびウシエビの EST 配列より、1,026 クローンを選択し、cDNA マイクロアレイを作製した (研究成果学会発表 5)。
11. クルマエビ類の細菌感染症の治療に用いられている抗菌剤を投与した場合のウシエビ血球における遺伝子発現変化をマイクロアレイにより解析したところ、抗菌剤投与によりウシエビの種々生体防御関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった (研究成果学会発表 5)。
12. マイクロアレイにより得られた遺伝子発現プロファイリングを詳細に検討するために、種々の免疫、生体防御関連遺伝子の構造及び機能解析を行った (研究成果論文 2-6,10-17,19,21-28,30-32、学会発表 15)。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. DNA ワクチン接種による遺伝子発現プロファイリングとワクチン効果の評価に関する研究は魚類では初めてであり、魚介類免疫の研究分野に学術的に大きなインパクトを与えた。このことは、我々が *Fish and Shellfish Immunology* 誌に発表した論文 (研究成果論文 1) が *Fish and Shellfish Immunology* 誌の web 上で最もダウンロードされたベスト 25 論文 (2004 年 10~12 月) の第一位に選出されたことから明らかである。
2. 抗生物質等の抗菌剤を投与すると免疫システムが抑制されるという研究報告はこれまでに魚を用いた研究では見られたが、これらは免疫システムのある一面を細胞レベルで研究したものであった。本研究ではクルマエビ類においても抗菌剤を投与すると免疫・生体防御システムが抑制されるであろうことがマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングで明らかにすることが出来た。本研究成果に基づいて、今後は魚類においても同様の研究を行うことにより、抗菌剤の投与が魚介類にどのように影響し、免疫システムを抑制するのかを明らかにすることができると考えられる。本研究を継続し、データを蓄積し、比較か解析することにより、将来的には、抗菌剤の免疫抑制作用を改善することも可能になると思われる。
3. 魚類病原細菌である *Edwardsiella tarda* 感染に対する耐病性グループと耐病性ではないグループにおける遺伝子発現プロファイリングにより種々の免疫関連遺伝子の発現動態が異なることを明らかに出来た (研究成果学会発表 10,11,13,16)。発現動態が異なる遺伝子の内、ケモカインはアメリカナマズにおいても耐病性との関連が報告されており、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングにより、耐病性関連遺伝子を特定することが可能になることを本研究結果は示唆した。今後、さらに異なる家系やグループの魚やエビについて病原微生物に対する感受性と遺伝子発現パターンを解析することにより、耐病性に直接関与する遺伝子を特定することができるものと考えている。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術論文

1. Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T. (2005) Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18:135-147.
2. Yazawa, R., Hirono, I., Ohira, T. and Aoki, T. (2005) Functional analysis of tumor necrosis factor gene promoter from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, using fish cell lines. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 73-81.
3. Park, C.-I., Hirono I, Aoki T. (2005) Molecular characterization of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, CD3 ϵ and evolution of the CD3 cluster. *Dev. Comp. Immunol.*, 29:123-133.
4. Ooi EL, Ohira T, Hirono I, Taki T, Aoki T. (2005) Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Dev. Comp. Immunol.*, 29:443-455.
5. Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, Aoki T. (2005) Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shell Immunol.*, 18:39-48.
6. Caipang CM, Hirono I, Aoki T. (2005) Induction of antiviral state in fish cells by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, interferon regulatory factor-1. *Fish Shellfish Immunol.*, 19:79-91.
7. Kurobe T, Yasuike M, Kimura Y, Hirono I, Aoki T. (2005) Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarray. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 515-523.
8. Arma NR, Hirono I, Aoki T. (2005) Identification of genes expressed in the liver of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by expressed sequence tags. *Fisheries Science*, 71: 印刷中
9. Emmadi D, Hirono I, Aoki T. (2005) cDNA microarray analysis of interleukin-1 β induced Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells. *Fisheries Science*, 71: 印刷中
10. Yazawa R, Hirono I, Ohira T, Aoki T. (2005) Induction of Japanese flounder TNF promoter activity by lipopolysaccharide in zebrafish embryo. *Mar. Biotechnol.*, 印刷中
11. Hwang JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T. (2004) A pore-forming protein, perforin, from a non-mammalian organism, Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 56:360-367.
12. Srisapoom P, Ohira T, Hirono I, Aoki T. (2004) Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 56:292-300.
13. Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, and Aoki T. (2004) Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. *Fisheries Science*, 70: 765-771.
14. Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T. (2004) Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 367-374.
15. Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, and Aoki T. (2004) Molecular cloning and expression analysis of alpha 2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 16:599-611.
16. Hirono I, Takami M, Miyata M, Miyazaki T, Han HJ, Takano T, Endo M, Aoki T. (2004) Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 56:38-46.
17. Khattiya R, Ohira T, Hirono I, and Aoki T. (2004) Identification of a novel Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) CC chemokine gene and an analysis of its function. *Immunogenetics*, 55:763-769.
18. Hirono I, Yazawa R, Aoki T. (2004) Expressed sequence tag of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) skin cells. *Fisheries Science*, 70:195-197.
19. Srisapoom P, Ohira T, Hirono I, Aoki T. (2004) Cloning, characterization and expression of cDNAs containing major histocompatibility complex class I, II α and II β genes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 70:264-276.
20. Arma NR, Hirono I, Aoki T. (2005) Characterization of expressed genes in kidney cells of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* following treatment with ConA/PMA and LPS. *Fish Pathology*, 39: 189-196.
21. Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. (2004) Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis Aquat Organ.* 61:123-135.
22. Aoki T, Rattanachai A, Tomura N, Watanabe K, Itami T, Takahashi Y, Ohira T, Hirono I. (2004) Molecular mechanisms of biodefense in kuruma shrimp. *Mar. Biotechnol.*, 6: 153-157.
23. Caipang CM, Hirono I, Ohira T, Aoki T. (2004) Possible role of Mx, an interferon-inducible gene, in antiviral response in teleosts. *Mar. Biotechnol.*, 6: 475-479.

24. Amparyup P, Klinbunga S, Preechapol R, Tassanakajon A, Hirono I, Aoki T, Jarayabhand P. (2004) Expressed sequence tag analysis of ovaries and testes from tropical abalone (*Haliotis asinina*). Mar. Biotechnol., 6: 365-372.
25. Leelatanawit R, Klinbunga S, Puanglarp P, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Hirono I, Aoki T, Menasveta P. (2004) Isolation and characterization of differentially expressed genes in ovaries and testes of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Mar. Biotechnol., 6: 506-510.
26. Caipang CM, Hirono I, Aoki T. (2003) *In vitro* inhibition of fish rhabdovirus by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. Virology, 317:373-382.
27. Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, Hirono I, Aoki T. (2003) Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme that possesses the widely potential lytic activity against *Vibrio* species. Gene, 316:187-195.
28. Khatiya R, Hirono I, Aoki T. (2003) Molecular cloning, gene structure and expression of two CC chemokines from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 69: 1063-1072.
29. Nam BH, Hirono I, Aoki T. (2003) Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequenced tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes stimulated with Con A/PMA. Fish Shellfish Immunol., 14: 467-476.
30. Hirono I, Nam BH, Enomoto J, Uchino K, Aoki T. (2003) Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. Fish Shellfish Immunol., 15: 63-70.
31. Nam BH, Hirono I, Aoki T. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder TCR α , β , γ , and δ chains. 2003. J. Immunology, 170: 3081-3090
32. Park CI, Kurobe T, Hirono I, Aoki T. (2003) Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Dev. Comp. Immunol., 27: 365-375.

学会発表

1. Emmadi Dhanwanthari・廣野育生・青木宙：ヒラメの IL1 および 2 種類のケモカインのアジュバント効果について。平成 17 年度日本水産学会大会、東京、平成 17 年 4 月
2. Prapruddee Piyaviriyakul・廣野育生・青木宙：Expression profile of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney cells using poly I:C as a stimulator. 平成 17 年度日本水産学会大会、東京、平成 17 年 4 月
3. 原口郁実・廣野育生・青木宙：ポリ IC で刺激したヒラメ脳細胞における遺伝子発現プロファイル。平成 17 年度日本水産学会大会、東京、平成 17 年 4 月
4. Tomokazu Takano, Motoshige Yasuike, Ju Yong Byon, Ikuo Hirono, Takashi Aoki : Development of DNA vaccines for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and analysis of the immune response after vaccination. 第 7 回アジア水産学会、マレーシア、平成 16 年 11-12 月
5. Takashi Aoki and Ikuo Hirono : Molecular Biodefense Mechanism in Kuruma Shrimp and Black Tiger Shrimp.第 7 回アジア水産学会、マレーシア、平成 16 年 11-12 月
6. Ju Yong Byon, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : Potential use of a cDNA microarray in the study of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) infection in fish. DNA ワクチン 2004、モナコ、平成 16 年 11 月
7. Motoshige Yasuike, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : Application of DNA microarray for characterization of the immune system during DNA vaccination in fish. DNA ワクチン 2004、モナコ、平成 16 年 11 月
8. Emmadi Dhanwanthari, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : The adjuvant effects of IL-1, CXC chemokine and MIP1 α in DNA vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus in Japanese flounder. 平成 16 年度日本水産学会関東支部大会、東京、平成 16 年 11 月
9. Nur Rahmawaty Arma, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : EST-based identification of genes expressed in the liver of adult Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 平成 16 年度日本水産学会関東支部大会、東京、平成 16 年 11 月
10. Motoshige Yasuike, Tomokazu Takano, Tsuyoshi Ohira, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : Gene expression profiles in different groups of Japanese flounder with distinct susceptibility to infectious disease. 第 77 回日本生化学会大会、横浜、平成 16 年 10 月
11. Motoshige Yasuike, Tomokazu Takano, Tsuyoshi Ohira, Ikuo Hirono and Takashi Aoki : Gene expression profiling of different group of Japanese flounder by using DNA microarray analysis. 第 29 回国際動物遺伝育種会議、東京、平成 16 年 9 月

12. 廣野育生・Praprudee Piyankul・原口郁美・青木 宙：ポリ I:C で刺激したヒラメの腎臓および脳において発現する遺伝子の EST 解析. 平成 16 年度日本魚病学会大会、北海道、平成 16 年 9 月
13. 安池元重・大平剛・廣野育生・青木宙：マイクロアレイを用いたヒラメの病原微生物感染応答遺伝子解析. 平成 16 年度日本水産学会春季大会、鹿児島大学、平成 16 年 4 月
14. Motoshige Yasuike, Tsuyoshi Ohira, Ikuo Hirono, and Takashi Aoki : Application of DNA microarray technology for the evaluation of DNA vaccines in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Plant and Animal Genome XII、アメリカ、平成 16 年 1 月
15. Ikuo Hirono, Tomofumi Kurobe, Chan-Il Park, Tsuyoshi Ohira, and Takashi Aoki : Cytokine genes of Japanese flounder. Plant and Animal Genome XII、アメリカ、平成 16 年 1 月
16. Takashi Aoki, Motoshige Yasuike, and Ikuo Hirono : Gene expression profiling of Japanese flounder by microarrays: a powerful tool for directed identification of important genes for selective breeding in aquaculture. Genetics in Aquaculture VIII、チリ、平成 15 年 11 月
17. 卞 珠瑩・高野倫一・大平 剛・廣野育生・青木 宙：ヒラメ VHS ウイルスに対する DNA ワクチンチンの開発. 平成 15 年度日本魚病学会大会、下関、平成 15 年 10 月
18. Ikuo Hirono and Takashi Aoki : Functional cDNA microarray analysis of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* for characterization of the immune system. Marine Biotechnology Conference 2003、千葉、平成 15 年 9 月
19. Motoshige Yasuike, Ikuo Hirono, and Takashi Aoki : Differential gene expression profile of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to DNA vaccine utilizing microarray analysis. Marine Biotechnology Conference 2003、千葉、平成 15 年 9 月
20. Motoshige Yasuike, Ikuo Hirono, and Takashi Aoki : Microarray analysis of gene expression during DNA vaccination in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The 2nd International Symposium on Aquatic Genomics、東京、平成 15 年 9 月