

## 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

Development of DNA microarray for characterization of  
gene network systems of fish and shellfish

青木 宙 (AOKI, Takashi)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・特任教授



### 研究の概要

本研究ではヒラメ、マダイ、ブリおよびクルマエビ類の EST 解析データを基に cDNA マイクロアレイを作製した。次いで、このマイクロアレイを用い、魚介類の免疫応答、発生、化学物質応答に関連する遺伝子発現プロファイリングを行うとともに、特定の疾病に対する魚類の耐病性マーカーの開発を行った。

研究分野：農学(水産学)

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：魚病、遺伝・育種、増養殖、生理

### 1. 研究開始当初の背景・動機

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、マイクロアレイおよびゲノム資源の情報は、21世紀に我々が抱えることになる水産食資源あるいは海洋環境分野の研究を進めていく上できわめて重要になる。

### 2. 研究の目的

本研究では、魚介類よりクローン化した遺伝子を1枚のスライドガラスの基盤上にスポットし、DNA マイクロアレイを作製する。次いで、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の解析、②種々の化学物質等の刺激による遺伝子発現情報の解析、③環境変化などの物理的・化学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した。

### 3. 研究の方法

#### (1)遺伝子配列情報の収集

ヒラメ、ブリ、マダイおよびクルマエビ各種細胞あるいは臓器において発現している遺伝子の Expressed sequence tag(EST)解析を行った。

#### (2)DNA マイクロアレイを用いた大規模遺伝子発現解析

ヒラメ、ブリ、マダイおよびクルマエビの異なる配列をコードする cDNA をスポットした DNA マイクロアレイを作製した。

#### (3)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の解析

種々の病原微生物の人為的感染、DNA ワクチンの接種魚あるいは組換えワクチン接種魚の免疫系遺伝子発現応答を比較解析した。

#### (4)DNA マイクロアレイによる選抜育種への応用

特定の病原性菌に対し耐性の群と感受性の群を用いて遺伝子発現パターンの違いについて比較解析を行った。

#### (5)発育(変態)における各組織あるいは細胞での遺伝子発現解析

受精後から変態、その後の着底までの遺伝子発現変化について調べた。

#### (6)種々の抗菌剤、免疫賦活性剤等の刺激による遺伝子発現情報の解析

種々の免疫賦活剤での刺激や抗菌剤の投与による遺伝子発現変動について比較解析を行った。

### 4. 研究の主な成果

#### (1)魚介類マイクロアレイ

ヒラメ、ブリ、マダイおよびクルマエビ類の cDNA の EST 解析を行い、これら魚介類の遺伝子配列情報を収集し、得られた遺伝子配列情報を解析後、マイクロアレイを作製した。マイクロアレイの最終バージョン

ンは魚類およびエビ類の2種類を作製し、魚類マイクロアレイにはヒラメ(図1)、ブリおよびマダイのcDNAをそれぞれ1,965、1,034および997種類、エビ類マイクロアレイにはクルマエビおよびウシエビのcDNAをそれぞれ754および1,282種類スポットした。

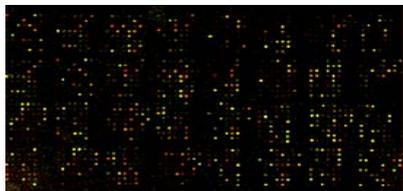


図1 ヒラメのマイクロアレイ

#### (2)マイクロアレイによる魚類遺伝子発現解析

マイクロアレイにより、マイトジェン等の刺激による魚類の遺伝子発現応答、DNAワクチン(ヒラメラブドウイルス、ウイルス性出血性敗血症)およびサイトカインDNAアジュバントの有効性評価を行った。さらに、マイクロアレイによる耐病性家系選別を行うことを可能にするとともにマイクロアレイ法は機能未知遺伝子から新規の有用遺伝子あるいはバイオマーカーを探索する優れた技術であることを明らかにした。

異なる細菌種に対する遺伝子発現応答の比較を行うことにより、異種微生物に対する魚類の免疫応答の違いをマイクロアレイにより検出し、発現動態が異なる遺伝子がバイオマーカーになることが示唆された。

#### (3)マイクロアレイによるクルマエビ類遺伝子発現解析

クルマエビ類に免疫賦活剤を投与した際の遺伝子発現プロファイリングを行い、感染防御に有効な免疫賦活剤を投与すると種々の免疫・生体防御関連遺伝子の発現が上昇することを明らかにし、これらの遺伝子が今後、免疫賦活剤評価のバイオマーカーとなりうる可能性を示唆することが出来た。また、ウシエビに抗菌剤を投与した際の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。これらのことより、エビへの抗菌剤投与は一部の免疫・生体防御機構の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。

#### (4)免疫関連遺伝子の構造および機能解析

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および機能解析を行い、魚類のゲノムの

倍化における免疫関連遺伝子の機能的な進化を示唆する研究成果を得た。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

養殖魚介類の研究にEST解析およびマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング研究を導入したのは我々の研究が最初である。我々は研究成果を種々の国際会議で発表し、高い評価を得るとともに、関連研究分野に多くの影響を与えて来たと自負している。最近では、我々の研究を追跡するように欧米のみならずアジアにおいても魚介類の大規模なEST解析とその情報に基づいたマイクロアレイ解析が魚介類分子生物学研究の主流となりつつあり、我々の研究が先導的な役割を果たして来たと考えている。

マイクロアレイによる魚類の耐病性の評価も可能であることを明らかに出来たことから、今後は養殖産業あるいは関連産業にも本技術が波及して行くと考えている。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Yasuike M, **Kondo H**, Hirono I, **Aoki T**. Difference in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 23:531-541. (2007)

2. Byon JY, Ohira T, Hirono I, **Aoki T**. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine*, 24:921-930. (2006)

3. Kurobe T, Yasuike M, Kimura Y, Hirono I, **Aoki T**. Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarray. *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 515-523. (2005)

4. Emmadi D, Hirono I, **Aoki T**. cDNA microarray analysis of interleukin-1b induced Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells. *Fish Sci.*, 71: 519-530. (2005)

5. Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases (Ed. by Leung Ka Yin), *Molecular Aspect of Fish and Marine Biology-Vol.3*, "Molecular Immunity in Fish-Pathogen Interactions" (**Aoki T**, Hirono I), World Scientific, pp. 256-291. (2004)

ホームページ等

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~h-kondo/research/index.html>