

## 二国間交流事業 共同研究報告書

平成 23 年 4 月 14 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 東京海洋大学・海洋科学技術研究科

職・氏名 <sup>(ふりがな)</sup> 特任教授・青木 宙 <sup>あおき たかし</sup>

1. 事業名 相手国 (ポーランド) との共同研究 振興会対応機関 (ポーランドPAN)

2. 研究課題名 バイオマーカーを利用したコイヘルペスウイルス病に対する防疫技術の確立

3. 全採用期間

平成 21 年 4 月 1 日 ~ 平成 23 年 3 月 31 日 (2 年        ヶ月)

4. 経費総額

(1) 本事業により執行した研究経費総額 5,000千円

初年度経費 2,500千円、 2年度経費 2,500千円、 3年度経費       円

(2) 本事業経費以外の国内における研究経費総額       円

## 5. 研究組織

### (1) 日本側参加者（代表者は除く）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
ひろの いくお 廣野 育生	東京海洋大学・教授	KHV 新規抗原の探索
こんどう ひでひろ 近藤 秀裕	東京海洋大学・准教授	コイ網羅的遺伝子発現解析法の確立
さかもと たかし 坂本 崇	東京海洋大学・准教授	KHV 耐性系統の評価
かとう ごうし 加藤 豪司	東京海洋大学大学院博士課程	KHV 感染魚における網羅的な遺伝子発現解析

### (2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名

ポーランド科学アカデミー・チームリーダー・Irnazarow Ilgiz

### (3) 相手国参加者（代表者は除く）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
Krzysztof Rakus	ポーランド科学アカデミー, Institute of Ichthyobiology and Aquaculture・assistant (ポー ランド)	KHV 耐性コイにおける網羅的な遺伝子発現 解析
Patrycja Jurecka	ポーランド科学アカデミー, Institute of Ichthyobiology and Aquaculture・assistant (ポー ランド)	KHV 耐性コイの感染試験

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

コイヘルペスウイルス (KHV) 病は、食用ゴイやニシキゴイ特有に発生するウイルス病で 1998 年に報告されて以来、現在に至るまで世界中のコイ養殖に多大な被害をもたらしている。そのため、KHV 病を防ぐために有効な技術の開発が望まれている。これまでに、日本側の申請者らは KHV の全ゲノム解析、PCR 診断法の実用化を行ってきた。一方、相手国(ポーランド)側の研究者グループは、KHV 耐性コイ系統選抜の研究を行っている。本研究は KHV 病をより能率的に防除するための手法を開発するため、KHV 病防除に有効なワクチン開発や診断手法開発のための KHV 抗原分子の同定を行うとともに、コイ生体内で発現する生体防御関連遺伝子を網羅的に検出するためのリアルタイム PCR 法を確立し、KHV 感染に伴い発現変動する遺伝子を解析するとともに、KHV 耐性コイ系統の作出を能率的に行うためのバイオマーカーを同定するため、本系統で特異的に発現する遺伝子の解析を目的としたマイクロアレイ解析を試みた。

KHV に特異的な抗原分子を同定するため、KHV 遺伝子発現ファージライブラリーを作成し、抗 KHV ウサギ抗血清を用いた免疫スクリーニングを行った。スクリーニングにより得られたクローンについて塩基配列を決定し、2 種類のエピトープコード領域を含むクローンを同定した。各クローンの配列をもとに大腸菌組換えタンパク質を調製し、得られた組換えタンパク質でマウスを免疫した。免疫したマウス脾臓細胞を用いてモノクローナル抗体を作成した後、各抗体の抗原に対する特異性を確認し、2 つの抗原うち特に 1 つのものに対して特異性の高いモノクローナル抗体を作成することに成功した。コイに感染するヘルペスウイルスには KHV の他に 2 種類が知られるが、本モノクローナル抗体は KHV 以外のヘルペスウイルスには反応しなかったことから、今後 KHV の迅速かつ簡便な診断手法への応用が期待された。

KHV 感染に伴い発現変動する遺伝子を解析するため、公共データベースに登録された遺伝子配列を用いてコイの免疫関連遺伝子発現量を解析するためのリアルタイム PCR 法を確立し、さらに様々な遺伝子発現を網羅的に解析するためのオリゴマイクロアレイを開発した。本リアルタイム PCR 法を用いて KHV 感染に伴う免疫関連遺伝子の発現動態を解析したところ、いくつかの炎症性サイトカイン遺伝子の発現量が低下する傾向が見られた。また、ポーランド側でこれまでに選抜した KHV 耐性コイについて感染試験を行うとともに、発症過程における遺伝子発現動態を網羅的に解析するため、上述の通り開発したオリゴマイクロアレイを用いた解析を行った。これらの系統間で KHV に対する抵抗性に差がみられることを確認した上で、マイクロアレイ法を用いた解析を行ったところ、いくつかの遺伝子について系統間で発現差異がみられた。今後これらの遺伝子をバイオマーカーとして用いることにより KHV 耐性コイ系統の作出を能率的に行うことが可能となることが期待された。また、上述のリアルタイム PCR 法を用いて、耐性系統の KHV に対する抵抗機構を解析し、いくつかの遺伝子について系統間で発現動態に差がみられたが、このような違いが KHV に対する抵抗性にどのように関わるかについては現在解析中である。