

2022 年度日本海学研究グループ支援事業

「海産高級魚キジハタの魚病細菌曝露時における遺伝子発現の変化」成果報告書

金沢大学臨海実験施設 木谷洋一郎

【研究の目的】

我々の研究グループはこれまでに海産高級魚キジハタ *Epinephelus akaara* の血液および体表粘液に抗菌タンパク質の一種である L アミノ酸オキシダーゼ (LAO) が含まれることを発見した。キジハタはその食味から市場価値が高く、富山県を含む各地で種苗生産が試みられている。一方、キジハタの魚病耐性や免疫学的特性については知見が少なく、将来的な大規模養殖を行う際に大量斃死のリスクが伴う。そこで当事業ではキジハタの免疫機構を理解する端緒として、キジハタ体表で魚病細菌との接触によりどのような様な遺伝子群が発現量の変動を示すか明らかとした。

【方法】

本研究では、対象魚種として日本海沿岸域に生息し市場価値の高い養殖対象魚種であるキジハタを選定した。キジハタは富山県水産研究所から譲渡され、金沢大学臨海実験施設で飼育しているものを使用した。

キジハタ種苗 8 尾を一群とし、曝露群と陰性対照群を設定した。曝露群には対数増殖期の魚病細菌 *Vibrio harveyi* を培養し 4×10^{10} 細胞を 8L 水槽に加えた。陰性対照群には無菌的な培地のみを同規模の水槽に加えた。曝露 12 時間後に 0.02% トリカインを含む海水で麻酔し鰓を摘出した。組織片は RNA 抽出試薬 ISOGEN (和光純薬) 中で速やかにジルコニアビーズ (3 mm 径) とともに 2 分間高速振盪 (3,000 rpm) することで溶解した。これを付属のプロトコールに従い総 RNA 画分に精製した。精製した総 RNA 画分をアガロースゲル電気泳動による純度検定と蛍光ラベル法による定量後に順次 mRNA 精製、逆転写反応による cDNA 調製を行い、次世代型塩基配列解析装置として NovaSeq 6000 (illumina 社) を用いてトランスクリプトーム解析を行った。

【結果ならびに考察】

得られた遺伝子配列断片 (リード) を計算機上で合一後、Trinity プログラムを使用して配列の重複部分を指標に遺伝子全長の配列に再構成 (アッセンブル) を行った。前述のリードから約 34,600 配列がアッセンブルされた。アッセンブルされた遺伝子配列の相同性検索と意味づけ (アノテーション) を行うために EnTAP パイプライン (計算手法が組み合わされたパッケージ) でこれを解析し 9,682 遺伝子が機能を示す遺伝子であると推定された。

魚病菌曝露群で増加した遺伝子として、インターロイキン等の炎症マーカー遺伝子群、自然免疫に関連するリゾチーム類、レクチン類、トランスフェリンなどがタンパク質分解酵素類が数倍から十数倍増加した。また、免疫グロブリン類の発現量も増加する傾向が見られたことから、曝露 12 時間の短時間でも獲得免疫系が機能していることが明らかとなった。

本研究により、魚類が最初に病原菌と接触する鰓組織において、キジハタは曝露初期から様々な生体防御システムを稼働し魚病に対抗していることが明らかとなった。本成果はキジハタ生体防御を網羅的にとらえたもので、安定的なキジハタ種苗生産や養殖への応用が期待される。