

別紙参考資料

【研究の背景】

近年、太平洋クロマグロ（以下「クロマグロ」）の天然資源減少に伴い、人工種苗を用いた養殖生産への期待も高まっていますが、計画的な親魚の産卵制御、仔稚魚期の生残率の向上や餌料効率の改善、稚魚期のウイルス感染症対策、共食いや衝突死の防止など、安定的な養殖生産のためには、課題が多く残されています。それらの課題を克服するためには、これまで知見が少ないクロマグロの生物学的特性の把握が急務です。

生物活動の基本単位は細胞で、主にタンパク質が中心に働いています。それらタンパク質の成分や活動は、ゲノム（注1）上の遺伝子（注2）に基づいています。したがって、それらの遺伝子が、いつ、体のどの部分で、どのような状況で働いているのかを明らかにすることは、さまざまな生命現象を理解するのに役立ちます。そのためには、すべての遺伝子の発現量（注3）を網羅的に解析できる手法の開発が必要です。

水産総合研究センターを中心とした研究グループは、クロマグロの全ゲノム情報の解読に成功し、合計 26,433 個の遺伝子の存在を予測しています（平成 25 年 7 月 19 日プレスリリース）。そこで今回、そのゲノム情報を活用し、クロマグロ 26,433 個の遺伝子すべての発現量を一度に解析できるクロマグロ DNA チップ（注4）を開発しました。

【研究内容と結果の例の概要】

クロマグロ全 26,433 個の遺伝子の塩基配列（注1、注2参照）から、すべての遺伝子について、それぞれの遺伝子に特異的な 60 塩基の配列をコンピューター上で設計しました。それらの塩基配列をスライドガラス上で合成し、クロマグロ DNA チップを作製しました（図1）。

クロマグロ養殖現場では特に稚魚期のウイルス感染症による被害が大きな問題となっています。感染症対策としてのワクチン等の防除技術の開発にあたっては、身体を守る生体防御機構の解明が重要な課題の1つです。そこで開発した DNA チップの有効性の評価を目的に、免疫を担当する細胞である白血球を用いた実験を行いました。

クロマグロの白血球を、細菌感染時の反応を誘導する物質（LPS、注5）およびウイルス感染時の反応を誘導する物質（poly I:C、注6）で刺激したサンプルについて、開発した DNA チップ本体を使って遺伝子発現を解析した結果、細菌感染時やウイルス感染時に働く遺伝子群を同定できました。LPS 刺激区では、細菌感染で起きる炎症反応に関連するサイトカイン（注7）などの遺伝子の発現量が増加していました。一方、poly I:C 刺激区では、抗ウイルス作用のあるインターフェロン（注8）と、その関連遺伝子の発現量が増加していました（図2）。この結果は、魚類の生体防御反応に関する基礎的な知見と一致しており、今回開発した DNA チップがクロマグロの遺伝子発現動態を的確に評価できること分かりました（図2）。

このチップは、すべてのクロマグロ遺伝子が搭載されているので、生体防御に関する研究のみならず、様々な分野の研究で利用可能です。この内容は、2月1日発行の国際学術雑誌 Gene 特集号（Special issue: Marine Genomics）に掲載されます。

【成果の意義】

開発したクロマグロ DNA チップにより、クロマグロの様々な生命現象に関連する遺伝子の発現量を迅速に解析することが可能になりました。今後、本技術を利用して、クロマグロにおける病気とストレス応答、成熟、初期発生、餌の栄養条件による影響等の生物学的な知見が蓄積されていくことが期待できます。それらの科学的な知見は、クロマグロ養殖技術を向上させ、ひいてはクロマグロの安定的な養殖生産につながるものと期待されます。

【発表論文】

A functional genomics tool for the Pacific bluefin tuna: Development of a 44K oligonucleotide microarray from whole-genome sequencing data for global transcriptome analysis.

(クロマグロのゲノム機能解析ツール:クロマグロゲノム情報を利用した 44K オリゴ DNA マイクロアレイの開発)

著者: Motoshige Yasuike, Atushi Fujiwara, Yoji Nakamura, Yuki Iwasaki, Issei Nishiki, Takuma Sugaya, Akio Shimizu, Motohiko Sano, Takanori Kobayashi, Mitsuru Ototake

安池元重、藤原篤志、中村洋路、岩崎裕貴、西木一生 (水産総合研究センター中央水産研究所)、菅谷琢磨 (水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所)、清水昭男 (水産総合研究センター中央水産研究所)、佐野元彦 (水産総合研究センター中央水産研究所、現職・東京海洋大学)、小林敬典 (水産総合研究センター)、乙竹 充 (水産総合研究センター増養殖研究所)

掲載雑誌: Gene, Volume 576, Issue 2, Part 1, Pages 603-609 (1 February 2016),
Special issue: Marine Genomics.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.023>

用語説明

注1 [ゲノム]

生物が持つ遺伝情報の総体をゲノムといいます。ヒトや魚を含む多くの生物のゲノムを構成する物質はDNA (デオキシリボ核酸、deoxyribonucleic acid) です。DNAは、糖・リン酸に4種類の塩基 (アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)) のいずれか一つが結合したものが順番に鎖のように繋がり、さらに相補的な塩基 (AとT、GとC) が結合して2本鎖を形成し、らせんをまいた構造をとっています (二重らせん構造)。そのA、C、G、Tの塩基の並び順 (塩基配列) に生物の遺伝情報が記録されています。全ゲノムの塩基配列は、ヒトでは約31億塩基対、クロマグロでは約8億塩基対と推定されています。

注2 [遺伝子]

生物は細胞を基本単位として成り立っています。その細胞を作る材料になったり、細胞同士のコミュニケーションに関わったり、様々な生命現象のタイミングや指示を行う際、

主にタンパク質が中心に働いています。それらタンパク質を作るための情報は、上述のゲノムの塩基配列上に書かれていて、その領域を遺伝子と呼んでいます。なお、それら遺伝子領域は、ヒトや魚の場合、ゲノム全体の数パーセントに過ぎないと考えられています。

注3 [遺伝子の発現量]

遺伝子の情報を読み込んで、それを基にタンパク質が作られることを遺伝子の発現といいます。その過程において、遺伝子に書かれたタンパク質の塩基配列情報は、いったん mRNA（メッセンジャーRNA、messenger RNA）と呼ばれる物質に写し取られます（これを転写と呼びます）。この mRNA の量を測定することで、遺伝子の発現量を推定することができます。遺伝子の発現量を調べることで、どの遺伝子から、どれくらいのタンパク質が作られたのか間接的に知ることができます。

注4 [DNA チップ]

DNA チップは DNA マイクロアレイとも呼ばれ、各遺伝子の DNA 断片配列（プローブと呼ばれます）をスライドガラス等の基板の上に高密度に配置した分析ツールです。生物の組織や細胞から抽出した mRNA を蛍光色素でラベルし、DNA チップを反応させると、対応する DNA 断片配列と結合します。反応後、それぞれの DNA 断片配列の位置の蛍光強度（光の強さ）を数値化することで、各遺伝子の発現量を測定します。

注5 [LPS (lipopolysaccharide)]

グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分で、生物に投与すると、グラム陰性細菌が感染した時と同じような生体防御反応を誘導することができます。

注6 [poly I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid)]

人工的に合成した 2 本鎖 RNA で、生物に投与すると、ウイルスが感染した時と同じような生体防御反応を誘導することができます。

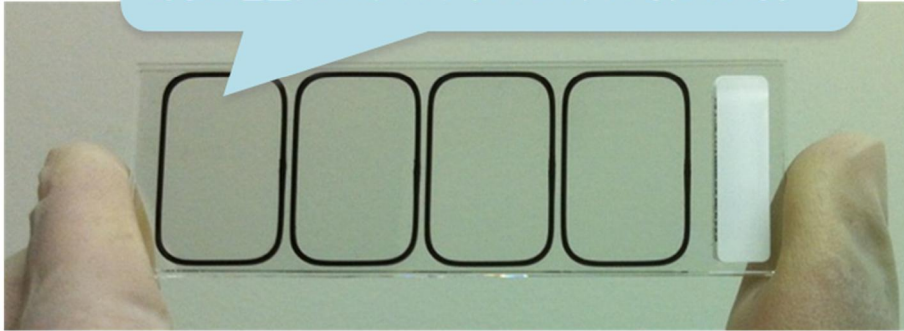
注7 [サイトカイン]

サイトカイン (cytokine) は、細胞間の情報伝達を担う一群のタンパク質です。細胞の増殖、分化や細胞死など、様々な生命現象に関わっていますが、特に免疫や炎症反応において重要な働きをするものが多く存在します。

注8 [インターフェロン]

インターフェロン (interferon、IFN) もサイトカインの一種であり、特にウイルスの侵入に対して細胞が分泌するタンパク質です。インターフェロンが分泌されると、動物体内でウイルスを排除したり、ウイルスの増殖を抑えたりする反応が起こります。

クロマグロ全ゲノム情報から同定された全26,433個の遺伝子の配列情報の一部(それぞれの遺伝子に特異的な60塩基)がスライドガラスにスポットされている。

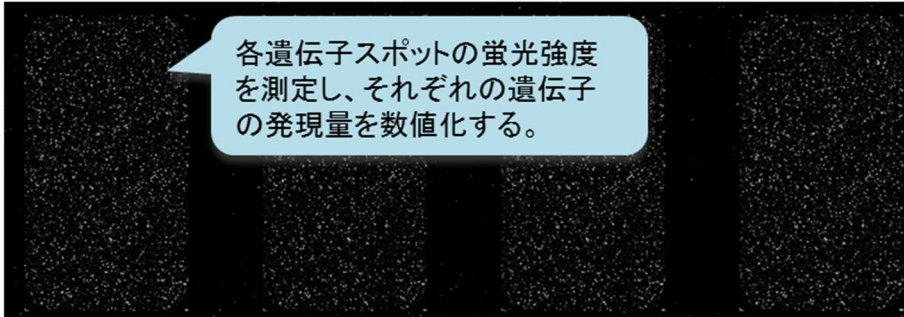


開発されたクロマグロDNAチップ

1枚で4サンプルのクロマグロ全遺伝子の発現量の測定が可能。

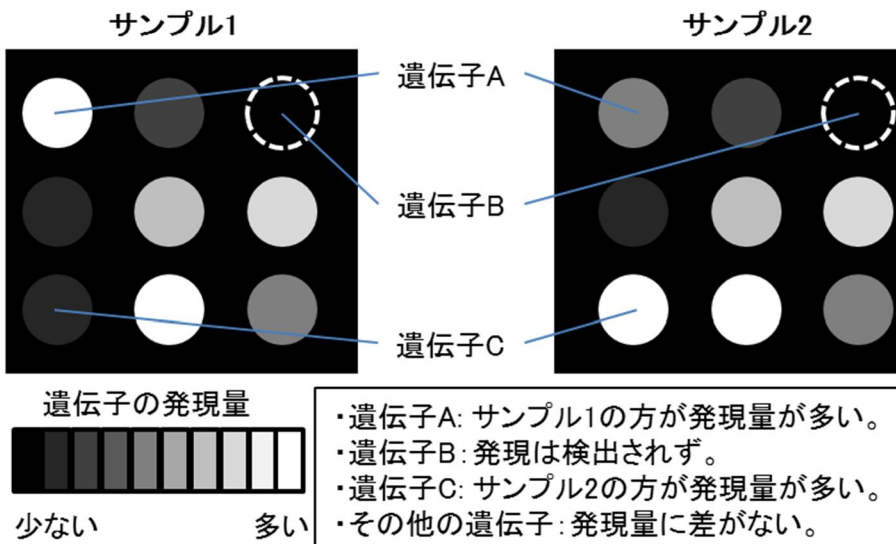
組織や細胞から抽出したmRNAを蛍光標識し、DNAチップに反応させる。

各遺伝子スポットの蛍光強度を測定し、それぞれの遺伝子の発現量を数値化する。



解析例

(模式図)



クロマグロの様々な生命現象を遺伝子の発現量により迅速に解析することが可能に！

図 1

クロマグロの全遺伝子情報を網羅した DNA チップ[注 4]の開発

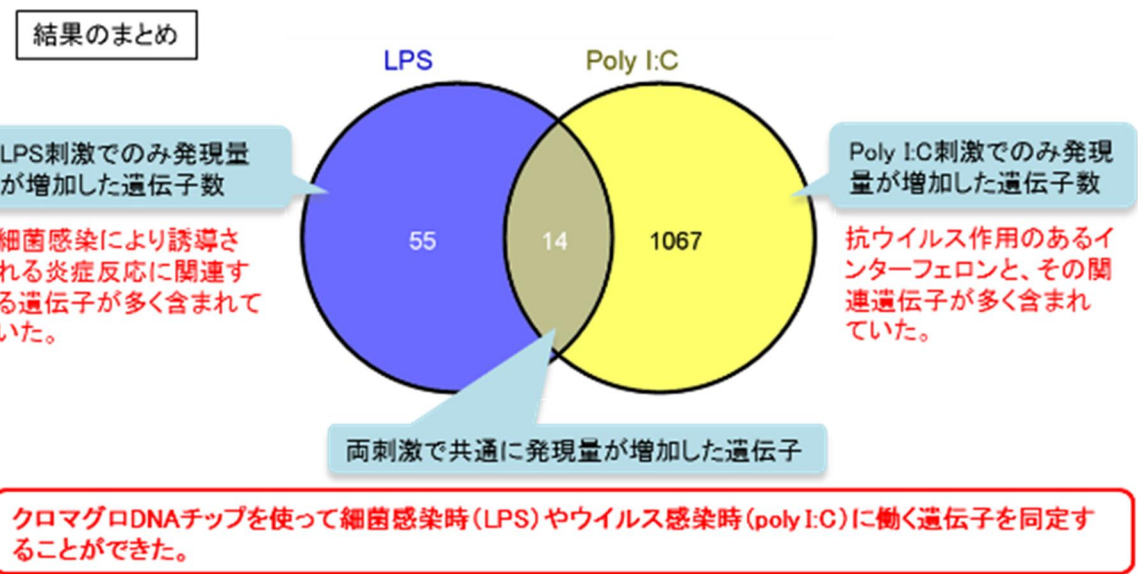
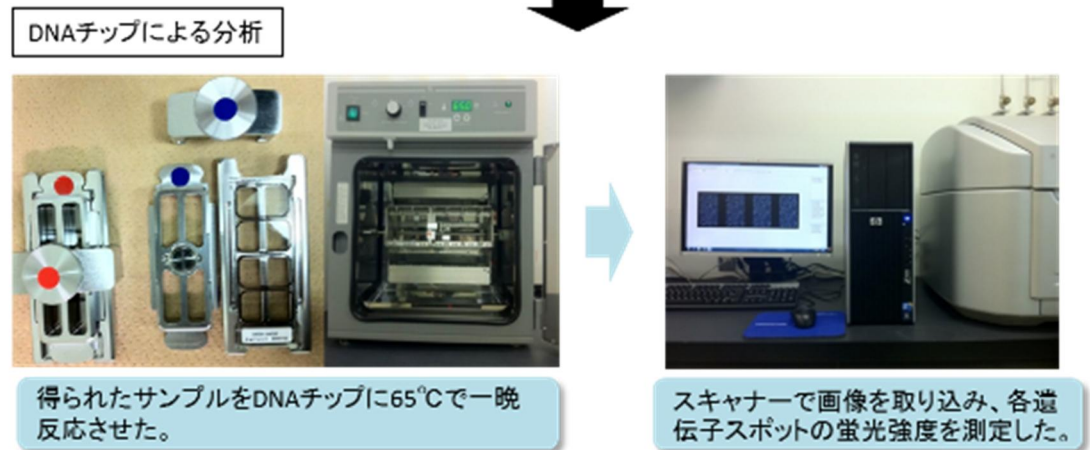
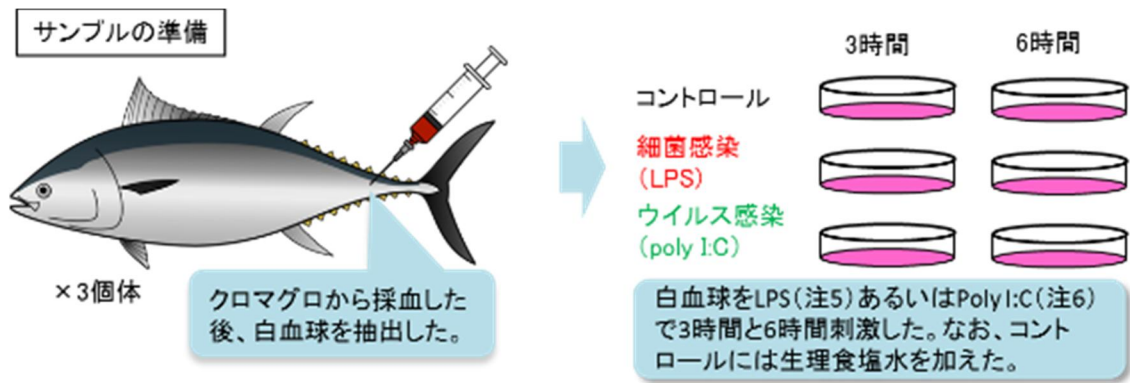


図2 クロマグロ DNA チップのパイロット試験 (クロマグロの生体防御機構に関わる遺伝子の探索)