

アユにおける耐病性マーカーの探索

中本 崇・岩渕 光伸・濱崎 稔洋・恵崎 撰
(内水面研究所・研究部)

Search of Resistance Marker to Disease in Ayu

Takashi NAKAMOTO, Mitsunobu IWABUCHI,*¹ Toshihiro HAMASAKI*² and Osamu EZAKI
(Freshwater Laboratory・Research Department)

水産生物の養殖において疾病の発生は避けがたいものであり、生産性に大きく影響を及ぼす。疾病には一般的には薬剤療法が用いられているが、薬剤耐性菌の出現や薬剤残留といった食の安全性からも問題がある。そのため、養殖業界では耐病性のある品種あるいは系統の作出が強く望まれている。

アユのビブリオ病は、アユ養殖において短期間に大量へい死を起こす重大な疾病である。その対策として、オキソリン酸による薬剤療法やワクチンによる予防法が用いられている。しかし、これらの治療法や予防法にも限界があり、ビブリオ病やその他の重大疾病に対して耐病性のある品種の作出が望まれている。

ニジマスのIPN(伝染性臓腑壊死症)ではIPN耐病性系統とIPN感受性系統、その交雑F1及び交雑F1と感受性系統との戻し交配家系からDNAを抽出し、耐病性(表現型;生,死)とマイクロサテライトマーカーの遺伝状況をとの関連の有無を解析し、感受性/耐病性に関連する2つの連鎖群に属する4遺伝子座を見いだしている¹⁾。

本研究では、福永²⁻⁵⁾がビブリオ菌を用いて耐病選抜を繰り返し行うことで耐病性のある家系を作出した耐病家系とビブリオ病に感受性のある和歌山系クローンをを用いAFLP解析による耐病性に関するDNAマーカーの検出を試みたので報告する。

方 法

1. 血中抗体価

試験魚には、ビブリオ菌 (*Vibrio anguillarum* PT-479株)を用い、平成9年から3回の耐病選抜を行った矢部

川産耐病系統F4と、耐病選抜を行わなかった矢部川産F4、対照区としてビブリオ病に弱い和歌山系クローンをを用いた。3系統を鰭切除標識により区別し、屋外の25t水槽に収容し、地下水を用いて市販の配合飼料を給餌した。2ヶ月間混合飼育した後、3系統にホルマリン死菌(FKC;1mg/mlPBS)を1尾当たり0.1ml腹腔内に注射し、元の水槽で引き続き飼育した。注射後20日目に3系統のそれぞれ30尾から採血し、血清を分離後-80℃で保存した。その後、これら保存血清についてマイクロタイター法⁶⁾により血中抗体価を測定した。

2. ビブリオ人為感染試験

(1) 各系統における耐病性の差異

試験魚には耐病系統として平成9年から5回の耐病選抜を行った筑後川産耐病系統F6及び矢部川産耐病系統F6、対照区として和歌山系クローン、更に矢部川天然遡上アユと合所ダム陸封アユを加えた。各30尾をそれぞれNaCl1%のビブリオ菌液(105CFU/ml)に5分間浸漬し、60ℓ水槽に収容した。以後の飼育は地下水を毎分0.5ℓ注水し、無給餌で行った。へい死が見られなくなった時点での生残率を耐病性の指標とした。

(2) 交雑F1の表現型

試験魚には矢部川産耐病系統F4(父親)と和歌山系クローン(母親)との交雑F1から2家系(No.1, No.2)、対照区として平成9年から4回ビブリオ耐病選抜を行った矢部川産耐病系統F5及び和歌山系クローンを使用した。鰭切除標識により試験魚を区別し、5t水槽で56日間飼育した。各30尾をNaCl1%のビブリオ菌液(3.5×105CFU/ml)に1時間浸漬し、1tパンライト水槽に収容した。以後の飼育は地下水を毎分0.5ℓ注水し無給餌で行った。へい死が見られなくなった時点

*1 現有明海研究所 *2 現福岡県水産林務部漁政課

での生残率を耐病性の指標とした。

3. 耐病性DNAマーカーの同定

(1) AFLP解析法の有効性

AFLP解析法によってアユ耐病性と連鎖するDNAマーカーの検出が可能かどうかを確認するため、矢部川産耐病性系統F4と和歌山系クローンそれぞれ5個体からDNAを抽出してAFLP解析を行った。DNAは胸鱗等から常法によりプロテアーゼKとフェノールクロロフォルム処理によって抽出し、RNase処理でRNAを除いた後、濃度 $0.05 \mu\text{g}/5.5 \mu\text{l}$ に調整した。AFLP解析はアプライドバイオシステムズ社のAFLP™ Plant Mapping Kit Regular Plant Genomes用を用い、添付プロトコールに従って処理を行った。解析にはEco-R I側-Mse I側の組合せにagg-ctt, aag-cagの2組のプライマーペアを用い、アプライドバイオシステムズ社のGenetic Analyzer 310を用いて増幅断片を検出した。

(2) 耐病性に関するDNAマーカーの探索

矢部川産耐病系統F4（父親）と和歌山系クローン（母親）の交雑F1のうち、No.1家系30個体について64通りのプライマーペアの組合せを用いてAFLP解析を行った。F1個体間では耐病性に差が認められなかったことから、父親に認められるが母親の和歌山系クローンには認められない増幅断片のうち、交雑F1のNo.1家系の30個体すべてに検出される断片を探索した。さらにその断片がNo.2家系のF1個体すべてに認められるかどうかを同様に調べ、耐病性に関するDNAマーカーの絞り込みを行った。

結 果

1. 血中抗体価

矢部川産耐病系統F4、矢部川産F4及び和歌山系クローンの血中抗体価を図1に示した。FKC接種後の抗体価が32以上を示した個体の割合は矢部川産耐病系統F4で90.0%、矢部川産F4で67.9%及び和歌山系クローンで10.0%となり耐病系統が高い値を示した。また、和歌山系クローンの値は全体の76.7%が抗体価16に集中し、ビブリオ病に対する抵抗力がほぼ均一なことが確認された。

2. ビブリオ人為感染試験

(1) 各系統における耐病性の差異

各系統毎の生残率の推移を図2に示した。試験開始後14日目の生残率は筑後川及び矢部川耐病系統でそれぞれ97%、87%、和歌山系クローンで40%、矢部川天然遡上

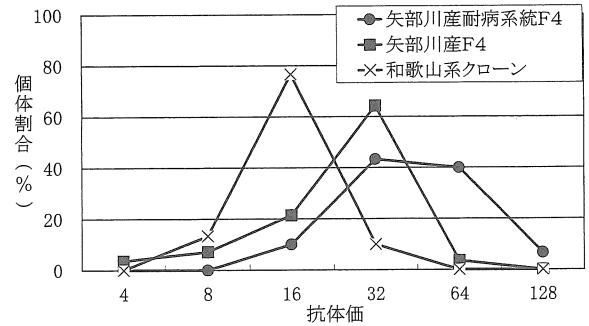


図1 各系統のビブリオ菌に対する血中抗体価

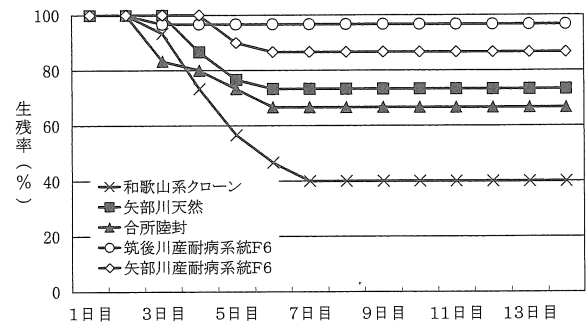


図2 各系統毎の生残率の推移

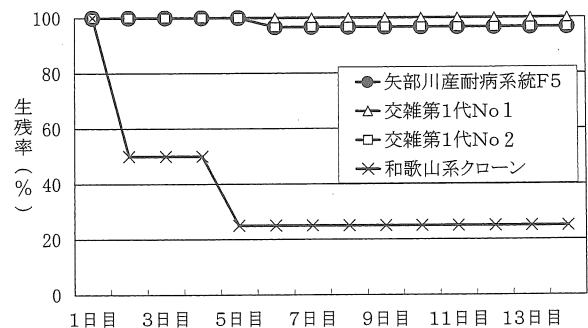


図3 各系統毎の生残率の推移

アユで73%、合所ダム陸封アユで67%となり、耐病系統の生残率は他系統のそれより高かった。

(2) 交雑F1の表現型

各系統毎の生残率の推移を図3に示した。試験開始後14日目の生残率は矢部川産耐病系統F5で97%、交雑F1ではそれぞれ100%、97%、和歌山系クローンで25%、となり和歌山系クローン以外では耐病性を持ち、生残率に有意な差は見られなかった。

3. 耐病性DNAマーカーの同定

(1) AFLP解析法の有効性

和歌山系クローンのAFLPパターンは図4に示したように5個体全てが完全に一致し、AFLP法でもクローン性の確認が可能であった。これは、DNA解析法として信頼性の高いRFLP法と同様、AFLP法の再現性、信頼性に問題が無いことを示している。

一方、父親に使用した耐病系統5個体間では多型断片

が確認され、多型断片数はプライマーペアagg-cttが13、aag-cagが17であった。またクローンには認められないが、耐病系統5個体すべてに認められた断片数は、agg-cttが2、aag-cagが3であった。

(2) 耐病性に関するDNAマーカーの検索

感染試験の結果、すべてのF1個体に耐病性が認められたことから、父親に認められて母親には認められず、

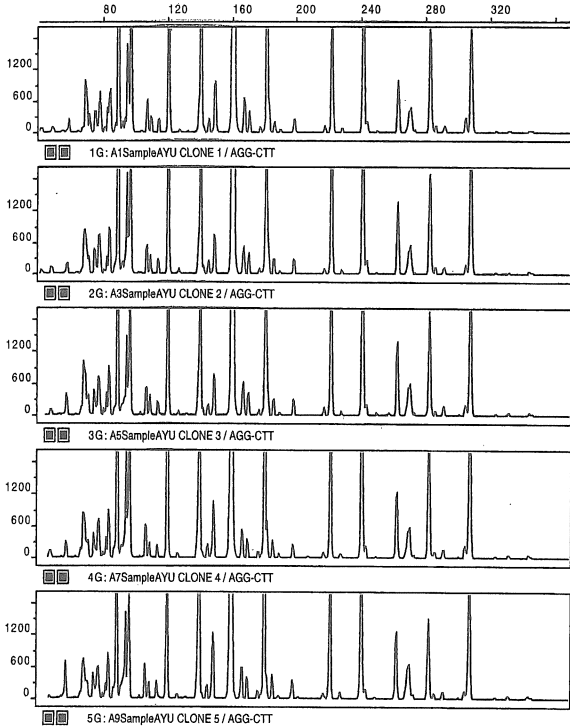


図4 和歌山系クローンのAFLPパターン

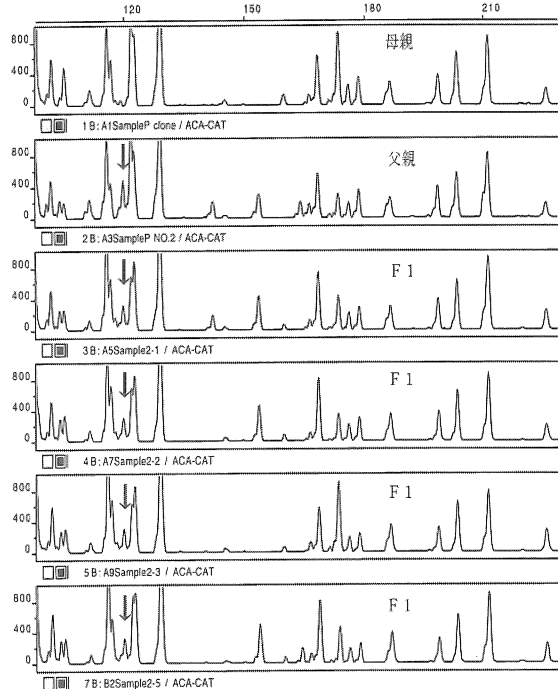


図5 両親とF1個体のAFLPパターン

かつF1個体すべてに認められる増幅断片が耐病性関連遺伝子と連鎖するDNAマーカーの候補と推定された。耐病性No. 1家系の父親に認められるが、和歌山系クローンの母親に認められない増幅断片は63プライマーペアで217断片認められた。そのうち図5の左端の矢印に見られるように、すべてのF1個体に認められた断片は61断片であった。さらにこれらの断片のうち、交雑F1 No. 2家系のF1個体すべてに検出されたのは表1に示した23断片であった(図6)。

考 察

アユのビブリオ病における耐病形質の確認には抗体価の変異を見ることが有効であると言われていた⁷⁾。本試験においての血中抗体価は耐病系統の方が和歌山系クローンや無選抜群よりも高い結果となり、耐病系統の耐病性は引き継がれていた。また、血中抗体価の変異はビブリオ人為感染後の生残率の結果にも符合した。

耐病系統のF5、F6及び福永²⁻⁵⁾の行った耐病系統F2、3との選抜回数による耐病性の差は感染試験時の条件が一様でないため、人為感染試験の生残率の差からは選抜の効果を見ることが出来なかった。しかし、いず

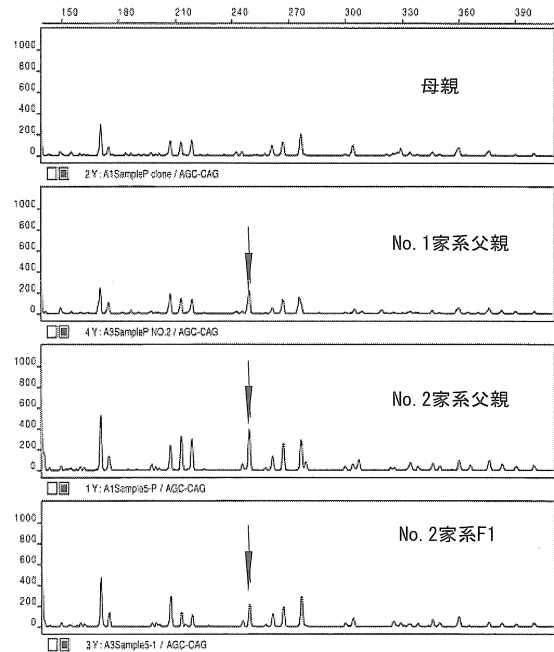


図6 耐病系のみ認められた増幅断片 ↓

表1 耐病性DNAマーカー候補と推定された23AFLP増幅断片

aag-caa 116	aac-cac 67	agc-cag 249	act-cta 122
aag-cta 157	aac-cag 210	agc-ctg 79	act-cta 313
aag-ctc 213	aac-cag 226	aca-cac 427	act-ctc 219
aag-ctt 317	agg-cag 290	acc-caa 324	
aca-cta 182	agg-cta 52	acc-cac 479	
aca-cac 139	agg-ctg 363	act-cag 119	
aca-ctc 441		act-cag 192	

れの場合も耐病系統は和歌山系クローンや無選抜群等よりも高い生残率を示した。

また、耐病系統と和歌山クローンの交雑F1は2家系とも生残率が高く、耐病性を有していた。このことから4世代にわたり選抜を行った矢部川耐病性系統の耐病性に関する遺伝子は優性であり、ホモ化していると推察された。

AFLP解析では最大64通りの組み合わせが可能なプライマーペアのうち、2通りの組み合わせでも系統間の違いを示す断片が認められたことから、交雑家系のAFLP解析により耐病性DNAマーカーの検出は可能であると考えられた。

耐病性マーカーの検出では耐病性に関するDNAマーカーを23断片までに絞り込むことが出来たが、特定するまでには至らなかった。DNAマーカーを特定するためには交雑F1と和歌山系クローンとの戻し交配家系を作出し、耐病性と連鎖する断片を同定する必要がある、今後の課題である。また、耐病性AFLPマーカーが特定されても本耐病系統以外での利用はできないため、汎用性の高いマイクロサテライトDNAマーカー等の同定も必要であると考えられる。また、検出されたDNAマーカーがピブリオ病だけでなく冷水病等他のアユの重大疾病に関与しているかも調べる必要がある。

要 約

- 1) 耐病家系とピブリオ病に感受性のある和歌山系クローン及びその交雑F1を用いAFLP解析による耐病性に関するDNAマーカーの検出を試みた
- 2) 抗体価は耐病系統の方が和歌山系クローンよりも高い結果となり、これはピブリオ人為感染後の生残率の結果にも符合した。
- 3) 和歌山系クローン個体は、全体の76.7%が抗体価16に集中し、ピブリオ病に対する抵抗力がほぼ均一で弱いことが確認された。
- 4) 人為感染試験の結果、耐病系統は和歌山系クローンや無選抜群等よりも高い生残率を示した。
- 5) 耐病性に関するDNAマーカーを23断片までに絞り込むことが出来たが、特定するまでには至らなかった。DNAマーカーを特定するには交雑F1と和歌山系クローンとの戻し交配家系の個体を調べる必要がある。

文 献

- 1) 岡本信明, 坂本崇, 尾崎照遵: 魚類ウイルス病に対する抵抗性遺伝子座の検出. 水産育種, Vol.32, No 2, 75-86 (2002)
- 2) 福永剛: アユ耐病性系統作出技術の開発. 水産生物育種の効率化基礎技術の開発, 前期成果, 175-178 (2001)
- 3) 福永剛, 濱崎稔洋: アユ耐病性系統作出技術の開発. 福岡県水産海洋センター事業報告, 平成9年度, 409-411 (1997)
- 4) 福永剛, 濱崎稔洋, 岩渕光伸: アユ耐病性系統作出技術の開発. 福岡県水産海洋センター事業報告, 平成10年度, 342-344 (1998)
- 5) 福永剛, 濱崎稔洋: アユ耐病性系統作出技術の開発. 福岡県水産海洋センター事業報告, 平成11年度, 339-340 (1999)
- 6) 東京大学医学科学研究所学友会: 微生物学実習提要, 丸善株式会社, 東京, 1988. pp. 305
- 7) 稲田善和: アユにおける耐病系統群作出の実際. 水産育種, Vol.32, No 2, 59-66 (2002)