

### 3.9 ヒラメ稚仔魚の生体防御関連遺伝子発現に及ぼす

#### 「ほっとけ飼育」の影響

廣田鷹也・近藤秀裕・廣野育生・○青木宙（海洋大院）・森田哲男（水研セ）

##### 【目的】

魚類養殖において病原微生物感染症は経済的な被害が甚大であり、特に、稚仔魚は感染症に対する抵抗性が低く、大きな問題となることがある。しかしながら、稚仔魚期の生体防御機構に関する知見が少ないことなどから、稚仔魚の感染症に対する有効な対策はほとんどないのが現状である。一方、種苗生産における稚仔魚期の飼育作業の省力化および作業時間の短縮を目的として「ほっとけ飼育」と呼ばれる手法が開発された。稚仔魚の「標準的飼育」では、飼育水は交換し一定量の餌料生物を適宜飼育水槽中に添加するのに対し、「ほっとけ飼育」では止水中で餌料生物が一定濃度となるよう餌料生物の餌を適切に調節しながら稚仔魚を飼育する。「ほっとけ飼育」で生産された種苗では、「標準的飼育」のものに比べて病原微生物感染症に対する抵抗性が高いことが示唆されているが、このような違いがどのような機構によるのかは不明なままである。そこで、本研究ではcDNA マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、「ほっとけ飼育」および「標準的な飼育」を行ったヒラメ稚仔魚において mRNA 蓄積量に差異のある遺伝子を調べ、本飼育法がヒラメ稚仔魚の生体防御機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

##### 【方法】

ヒラメ仔稚魚は、小浜栽培漁業センターで「ほっとけ飼育」法および「標準的飼育」法で孵化後 5、10、15、19、22 および 25 日目まで飼育したものをそれぞれ数尾ずつ用いた。各サンプルより全 RNA を抽出し、一本鎖 cDNA を合成した。ほっとけ飼育した稚仔魚より調製した cDNA を赤色蛍光色素 Cy5 で標識し、標準的飼育法のもを緑色蛍光色素 Cy3 にて標識した。マイクロアレイ解析には、213 個の免疫関連遺伝子を含む既知の遺伝子 1,065 個および機能未知の遺伝子 881 個の計 1,946 遺伝子をスポットした DNA チップを用い、先に蛍光標識した cDNA と競合的にハイブリダイズさせた。DNA チップ上の各スポットの蛍光強度はマイクロアレイスキャナーを用いて解析した。

##### 【結果】

マイクロアレイ解析により、孵化後 5、10、15、19、22 および 25 日目のサンプルにおいてそれぞれ 650、1128、783、880、1090 および 682 遺伝子について mRNA を検出した。このうち、それぞれ 169、183、39、41、121 および 220 遺伝子の mRNA 蓄積量がほっとけ飼育した稚仔魚において 2 倍以上増大していた。一方、157、154、49、44、150 および 47 遺伝子の mRNA 蓄積量がほっとけ飼育した稚仔魚において半分以下に減少していた。さらに、生体防御に関係する遺伝子について詳細に解析したところ、ほっとけ飼育した稚仔魚において種々のケモカイン受容体遺伝子の mRNA 蓄積量が増大した。また、それ以外にもいくつかの生体防御関連遺伝子の mRNA 蓄積量がほっとけ飼育した稚仔魚で増大していることが明らかとなった。現在、これらの遺伝子について、RT-PCR により実験群間における mRNA 蓄積量の差異を確認するとともに、各遺伝子の機能的な関連を検討している。