

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05815

研究課題名（和文）順遺伝学的手法によるトラフグの初回成熟年齢決定機構の解明

研究課題名（英文）Genetic basis underlying differences in age at puberty between *Takifugu* pufferfishes

研究代表者

細谷 将 (Hosoya, Sho)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：60526466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は養殖生産において重要な「種固有の初回成熟年齢を決定するメカニズム」を遺伝学的に解明することを目的とする。重要養殖対象種であるトラフグとその近縁種であるクサフグでは初回成熟年齢にそれぞれ雌雄で1年の差がある。この差に注目し、種間交雑集団を用いたQTL解析により、染色体上の原因領域を特定した。当該領域を限局化するため、両種の野生からゲノム塩基配列を取得して、QTL領域内で特に配列の種間差が大きい領域を探索した。各領域には30個程度の候補遺伝子を含んでおり、ヒトで初回成熟年齢に関与する遺伝子も存在した。今後、これらの遺伝子について機能解析を行い、原因遺伝子の同定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖業において成熟年齢は重要である。例えば、早熟による成長遅滞や晩熟による世代期間の延長はいずれも養殖効率を著しく損なう。水生生物においては性成熟に関する生理学的なメカニズムは詳細が明らかになりつつあるが、初回成熟年齢を決める遺伝基盤は不明な点ばかりである。本研究ではトラフグの初回成熟年齢に影響する染色体領域を特定することに成功しており、いくつかの候補遺伝子を得るにいたった。本知見を応用することで、本種の養殖生産の効率が大きく改善されることが期待される。

研究成果の概要（英文）： This study aims to identify genomic regions associating the differences in the age at puberty onset between the tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*) and its closely related species (*Takifugu niphobles*). We did genetic mapping to detect quantitative trait loci (QTL) and further narrowed down these loci by comparing sequences obtained from wild individuals. We have obtained approximately 30 genes per locus. The responsible genes will be identified by functional analysis such as gene editing.

研究分野：魚類遺伝学

キーワード：初回成熟年齢 QTL解析 ゲノム フグ リシーケンシング 進化 育種

## 1. 研究開始当初の背景

魚類の初回成熟年齢(思春期)は、出荷サイズや生産サイクルに大きな影響を与えることから、その決定機構の解明は水産学上重要で、養殖現場からの要請が強い研究テーマである。これまで、生殖腺の分化と成熟に至る機構の詳細は明らかにされてきたが、成熟の開始を促す機構は謎のままである。その主因の一つは、魚類が独自の初回成熟の開始機構を獲得しており、従来の候補遺伝子アプローチが有効でないことにある。このような場合には、順遺伝学的手法が効果を発揮する。本手法は限られた種にしか適用できないが、国内の主要養殖対象種の中でもトラフグは初回成熟年齢の異なる交雑可能な近縁種が存在し、脊椎動物の中でも高度なゲノム物理地図が利用可能なため、本手法を適用できる。

トラフグとその近縁種であるクサフグのオスの初回成熟はそれぞれ 24 ヶ月齢と 12 ヶ月齢であり、繁殖期はそれぞれ 3-4 月と 5-7 月と季節性が強い。そのため、両種間の  $F_2$  における初回排精時の月齢を量的形質として扱うことで、QTL 解析により両種の初回成熟年齢に差をもたらす遺伝機構を解明できると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、オスの初回成熟年齢に注目し、トラフグとクサフグの交雑集団を用いた順遺伝学的手法により、両種の初回成熟年齢に差をもたらす原因遺伝子の同定を目指す。その後、当該遺伝子を手掛かりに本種および魚類の初回成熟年齢の決定機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

まず、トラフグとその近縁種であるクサフグの交雑第二世代( $F_2$ )を利用した QTL 解析により両種の初回成熟年齢に差をもたらすゲノム上の領域(QTL 領域)を探索する。ただし、QTL 解析によって特定可能な領域は 1M-bp 以上と大きく、数百の遺伝子を内包するため、個々の遺伝子の機能を特定することは現実的ではない。一方で、初回成熟年齢に影響する遺伝子の配列は両種間で大きく異なるため、このような配列の種間差に注目した種間遺伝解析により、候補遺伝子を十数個程度に限局化できると期待される。そこで、当該領域について各種複数個体の配列を得て比較する。最後に、トラフグとクサフグの野生個体について、上述の QTL 解析で特定された原因遺伝子を含む QTL 領域の全長配列を比較して、種間変異に限局化する。最後に、ゲノム編集技術による候補遺伝子の機能破壊やアリル置換を行うことで、それぞれの遺伝子の初回成熟年齢への影響を検証する。これにより、トラフグとクサフグの初回成熟年齢に差をもたらす遺伝子を特定する。

## 4. 研究成果

トラフグ、クサフグ、交雑集団で月齢に伴う生殖腺サイズおよび体サイズの変化を経時的に比較した。クサフグ家系は 11-13 ヶ月齢および 23-25 ヶ月齢で、トラフグ家系は 24-26 ヶ月齢で排精が確認された。一方、交雑第一( $F_1$ )世代家系はクサフグ家系より少し早い 9-11 ヶ月齢および 19-25 ヶ月齢で、第二( $F_2$ )世代家系は両種の間にあたる 16-23 ヶ月齢で排精が確認された。いずれの家系においても、排精に先駆けて生殖腺重量(GW)や生殖腺体指数(GSI)が増加し、春機発動の兆候が認められた。また、両形質は交雑家系、特に  $F_2$  において個体差が大きかったことから、交雑家系を用いた QTL (quantitative trait locus) 解析が可能であることが示された。クサフグ家系と  $F_1$  家系では排精時期が 2 期に分かれたが、1 期目における排精個体と未排精個体とでは前者の方が体サイズが大きい傾向にあった。生物学的最小形に達した一部の個体において環境要因による成熟のスイッチが入り、排精に至ったと考えられ、高成長性が早期成熟をもたらすことが示唆された。また、排精月齢時の体長から、トラフグは 30cm 程度、クサフグは 7cm 程度が性成熟の生物学的最小形であると推定された。 $F_2$  家系で最初に排精が認められたの月齢での SL から、その生物学的最小形は 10-14 cm 程度と推察され、生物学的最小形も両種の間にあたり、両種由来の遺伝的影響が示唆された。トラフグとクサフグは水温が上昇する春季に性成熟を迎えるが、16 ヶ月齢は水温が低下し始める秋季にあたることから、水温の上昇が引き金となったのではなく、至適水温に達したことが引き金になった可能性が考えられる。すなわち、至適水温期に生物学的最小形に達した個体の一部で初回成熟が始まったと考えられた。また、両種の生物学的最小形と成熟至適水温が異なることから、両種由来のゲノム領域が混交する  $F_2$  個体において初回成熟月齢が 8 ヶ月間の長期間に渡って連続的に観察されたと考えられた。

$F_2$  個体を対象に、早期に排精した個体と後期に排精した個体を用いた QTL 解析を行ったところ、有意水準を超える QTL が 2 つ見つかった。そのうち 1 つは性染色体上にあった。いずれの QTL も影響力が弱く、両種の初回成熟年齢の種間差は、効果が小さい多くの遺伝子に支配されていることが示された。また、戻し交雑第 1 世代(BC)家系の 223 個体を用いて、17 ヶ月齢における GW と GSI に関する QTL 解析を行った。解析には 643 個の一塩基多型(SNP)や挿入欠失(Indel)からなる連鎖地図を用いた。両形質において、2 番および 10 番染色体上に有意水準(

=0.05) を超える QTL が共通して検出された。これらの QTL においては、両形質とも成熟が早いクサフグ型のアリルを持つ個体の方がトラフグ型アリルのみを持つ個体よりも大きかった。この結果から、この 2 座は春機発動月齢に影響する QTL であると言えた。また、これらの QTL の寄与率 (percent variance explained, PVE (%)) は 4-11 %程度と小さく、両形質が多因子形質であることが示された。GW については、これらの 2 座に加えて、8 番、9 番および 13 番染色体上にも QTL が検出された (PVE は 6-12 %程度)。これらの座位ではトラフグ型のアリルのみを持つ個体の GW が大きかった。GW は体サイズと正の相関を示すため、この 3 座は成長関連 QTL である可能性が高い。そこで SL と BW に関する QTL 解析を行ったところ、予想通り、これらの 3 座が検出され、両形質ともトラフグ由来のアリルのみを持つ個体の方が大きかった (PVE は 7-14 %程度)。これらの結果から、当該 3 座は成長関連 QTL であると言えた。また、8 番、9 番、10 番染色体上の QTL の間には、それぞれ相互作用が認められ、この 3 座が成熟と成長との間のクロストークにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

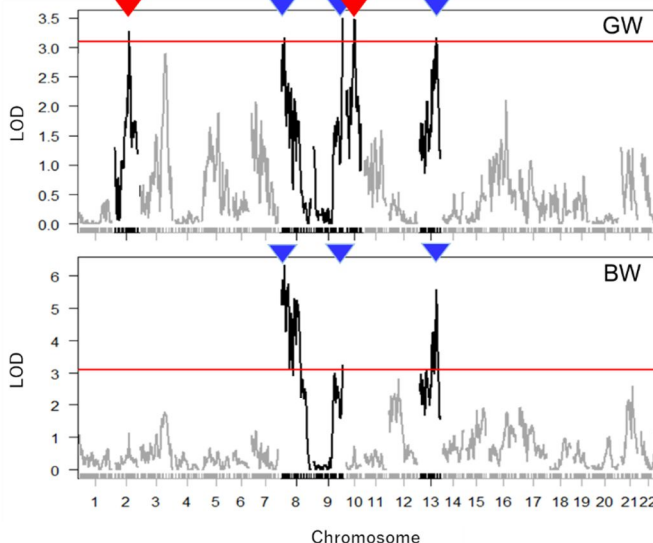


図1. 戻し交配家系を用いた生殖腺重量 (GW, 上) と体重 (BW, 下) のゲノムワイドQTL解析の結果。横軸に各遺伝マーカーの染色体上の位置を示し、縦軸に各遺伝マーカー上にQTLが存在する確立を示すLOD値をプロットした。ゲノムワイド5%有意水準 (赤線) を超えたマーカーが存在した染色体のみをハイライトしてある。GWに関しては5つのQTLが見つかったが、赤の矢じりで示した2番、10番染色体上のQTLがGWでのみ検出された一方で、青の矢じりで示したQTLはBWでも検出された。これらの結果から、前者は成熟関連QTLであり、後者は成長関連QTLであることが示された。

種間遺伝解析については、種間で配列に差が大きい領域を全ゲノムワイドに探索した。まず、トラフグ (30 個体) とクサフグ (20 個体) について、それぞれ次世代シーケンサーによる配列解析に付した。得られた短鎖配列をトラフグの参照配列にマッピングし、多型情報を取得した。その結果を用いて集団遺伝学的解析を行った。集団間の分化の度合いを示す  $F_{ST}$  値を計算したところ、 $F_{ST}$  値が高いサイトは数多く見つかったものの、種間共通多型が遍在したために、種間で明瞭な分化が認められるような領域は得られなかった。一方で、種間の進化距離を示す  $D_{xy}$  値を算出したところ、明瞭なピークが認められる領域をゲノム上に複数見いだした。

両種の種間交雑第 1 世代をトラフグに戻し交雑した家系を用いた QTL 解析により、2 番、10 番染色体上に初回成熟月齢に影響を持つ領域を同定した。当該領域には、それぞれ 456 個と 388 個の予想遺伝子が含まれていた。

種間遺伝解析による限局化により、候補遺伝子は各染色体とも 30 個程度に絞り込まれた。この中には哺乳類において初回成熟関連遺伝子として報告されている遺伝子が存在しており、これらの遺伝子が両種の初回成熟年齢に種間差をもたらす有力な候補と考えられた。現在は、これらの遺伝子のうち、ヒトで初回成熟年齢に対する影響力を持つと報告されている 8 つの遺伝子について、ゼブラフィッシュを用いた CRISPR-Cas9 法による機能破壊実験を進めている。今後、これらの遺伝子を含め、機能解析により候補遺伝子を絞り込み、トラフグあるいはクサフグを用いた機能解析実験を行うことで原因遺伝子の特定を目指す。

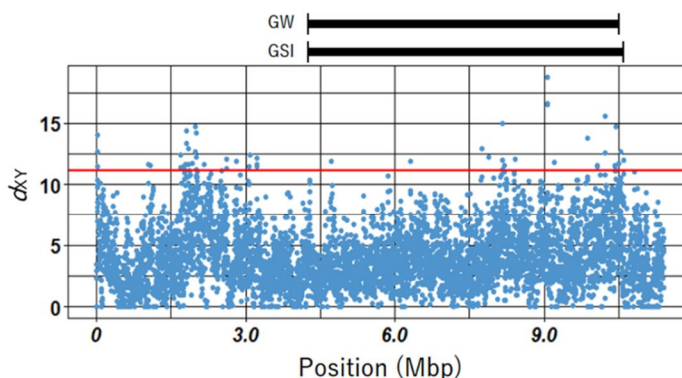


図2. 種間遺伝解析の結果 (例)。2 番染色体においてトラフグとクサフグとの間で配列の種間差が大きい領域を探索した。横軸に染色体上の位置、縦軸に種間の進化距離を示す  $D_{xy}$  値を示した。赤線は  $D_{xy}$  のゲノムワイド上位 1% 水準を示す。また、図上の黒バーは生殖腺重量 (GW) と生殖腺体指数 (GSI) に関する QTL 領域を示す。QTL 領域内に配列の種間差が大きい領域が散在しており、その近傍に原因遺伝子が存在すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉田周平・木元亮太・城夕香・金子智美・佐藤茉菜・吉川壮太・菊池潔・細谷将
2. 発表標題 トラフグ属における初回成熟開始月齢に差をもたらす遺伝機構
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------