

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380107

研究課題名（和文） ゲノム情報を利用した魚類汎用連鎖解析システムの開発

研究課題名（英文） A genotyping system capable of analyzing many teleost species

研究代表者

菊池 潔 (Kikuchi Kiyoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20292790

研究成果の概要（和文）：魚類に分子育種法を適用するためには、全ゲノムを覆うマーカー座が必須あるが、マーカー座の種特異性は著しく高い。多くの魚種に利用可能なマーカー座を得るため、まず、トラフグのゲノム地図を作製した。次に、これを既報のメダカのゲノム地図と比較して、魚類において保存されたゲノム構造の特徴を明らかとした。この情報をもとに、モデル魚類間で保存されたマーカー座を同定した。これらの座を用いることで、非モデル魚であるマサバの連鎖地図を作製できた。従って、得られたマーカー座は多くの魚で利用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：A large set of polymorphic markers are essential for applying molecular genetics to fish improvement. However, these markers are highly species-specific. To develop genetic markers that can be used in breeding program of many fish species, I first constructed a fugu genome map that covers 86% of genome assembly. I then compared it with the map of medaka, and revealed highly conserved features of fish genomes. By using the results of comparisons, I found a large number of marker loci that have been conserved among fish genomes. These markers successfully enabled me to construct a linkage map of chub mackerel without any information of its genome sequences, suggesting the versatility of the markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：遺伝・育種

## 1. 研究開始当初の背景

魚類に分子育種法を適用するためには、マーカー座による連鎖地図の作製が必須であるが、魚種ごとに膨大な労力を注いでマーカーを収集しなければならないのが現状である。多くの魚類で利用でき、かつ、ゲノム上の位

置があらかじめ推定されている多型マーカーが存在すれば、多くの魚類で連鎖地図を作製することや、集団遺伝学的解析をおこなうことが劇的に容易となるだろう。

## 2. 研究の目的

### (1) トラフグのゲノム地図の作製

非モデル魚類の遺伝子のゲノム上の位置を推定するためには、遺伝子のゲノム上の位置がすでに同定されている2種類以上のモデル魚類ゲノムが必要である。メダカのゲノム地図は全ゲノムの約90%の位置情報を明らかにしているが、他のモデル魚類のデータはこれに遠く及ばない。本研究では、トラフグのゲノム地図を作製して、ゲノム概要の75%以上の位置情報を得る。

### (2) トラフグとメダカの比較ゲノム解析

上記で得たトラフグゲノム地図をメダカ地図と比較し、両種における染色体構造の保存の度合いを明らかにする。その成果をweb上に公開することで、魚類育種家は自分の扱う魚類のゲノム構造を推定することが可能となり、マーカー選択が容易となる。

### (3) 汎用マーカーの開発

トラフグとメダカのゲノム地図を配列レベルで詳細に比較して、多くの魚種で使用可能と予想される多型マーカー座を得る。このマーカー座の汎用性を、非モデル魚類を用いて実証する。

### (4) フグ研究におけるゲノム地図の活用

ゲノム解析が進む種において、ゲノム地図は、遺伝子のオーソロジー判定や順遺伝学的研究などに活用されている。本研究で作製した地図も同様に活用する。

## 3. 研究の方法

### (1) トラフグのゲノム地図の作製

トラフグゲノム概要中50kb以上のscaffold上に多型サイト座を同定する。次に、これら多型サイトの連鎖関係を解析し、scaffoldを高密度連鎖地図上に貼りつけてゲノム地図を作製する。これまでトラフグ同胞個体の64尾のゲノムを用いて連鎖地図を作製してきたが、連鎖地図の解像度に限界があった。そこで、トラフグの同胞個体300尾を作出して、新たに大規模連鎖解析をおこなう。

### (2) トラフグとメダカの比較ゲノム解析

まず、上記で得た約2万個のトラフグ遺伝子のゲノム上の位置情報を、メダカ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュのデータと共に双方向ブラストおよびシンテニー解析に付して、遺伝子のオーソロジー関係を明らかにする。次に、遺伝子の配置（シンテニーとジーンオーダー）をモデル魚類間で比較して、各魚種間に認められる配置パターンの差を最節約的に説明する染色体再編成過程を推定する。

### (3) 汎用マーカーの開発

トラフグ、ミドリフグ、トゲウオ、メダカの

ゲノム間で高度に保存されているアンカー配列を同定し、アンカーペア間に二塩基リピートを含む座を抽出する。これらの座を増幅するプライマーを作製して、野生のマサバ、マダイ、ヒラメ、それぞれ24個体における多型を解析する。さらに、マサバ家系を用いて連鎖解析を行う。

### (4) フグ研究におけるゲノム地図の活用

他の脊椎動物と相同性が低いトラフグの遺伝子については、そのオーソロジーを判定するため、ゲノム上の位置を種間で比較する。また、順遺伝学的研究においては、ブラスト法によりマーカー座のゲノム上の位置を解析前に同定し、適切なマーカー座選択の指標とする。

## 4. 研究成果

### (1) トラフグのゲノム地図の作製

作製した高密度連鎖地図は、1,220個のマーカー座から構成されており、新たに連結した697個のscaffoldを貼り付けて、22本の染色体配列を再構築することができた（図1A, B）。これにより、トラフグ全ゲノム概要の72%のジーンオーダーを決定し、さらに、他の14%の配列の染色体上の位置を決定した（方向は未同定）。このジーンオーダーの決定比率はゲノム概要が公開されている魚類の中で2番目の高さである。本研究から得られたトラフグ遺伝子の位置情報をもとにして、Ensemblにおけるトラフグゲノムデータはversion5へと更新された（[http://ensembl.fugu-sg.org/Fugu\\_rubripes\\_v5/index.html](http://ensembl.fugu-sg.org/Fugu_rubripes_v5/index.html)）。さらに、連鎖地図情報もweb上で公開した（<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/Fugu-Map/map.html>）。

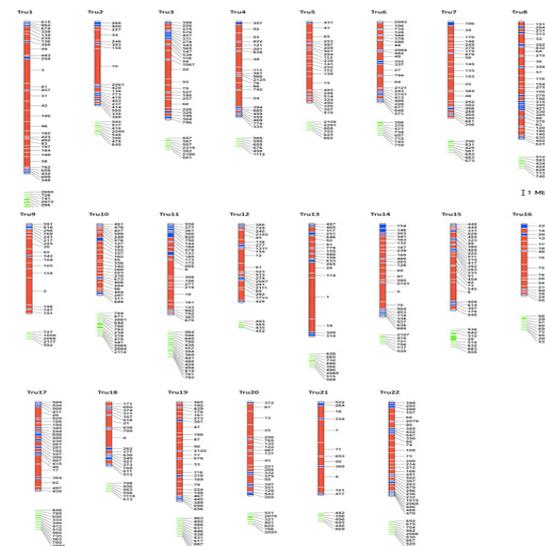


図1A. 再構築した22本のトラフグ染色体のゲノム地図。赤で示した scaffold のジーンオーダーを決定した。青

と緑の scaffold については、ジーンオーダーは未決定。

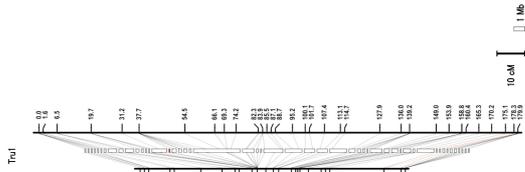


図 1B. 連鎖地図と配列地図の統合によるゲノム地図の作製。トラフグ 1 番染色体 (長さは 26Mb) の例を示した。

(2) トラフグとメダカの比較ゲノム解析

トラフグと他のモデル魚類のゲノム地図を比較した。①シンテニー構造が保存されている領域を同定して視覚化した。また、両者のパターンの差を最節約的に説明する染色体再構成過程を推定した (図 2A)。フグとメダカを含む棘鱗上目魚類においてシンテニーが著しく保存されていることがわかった。

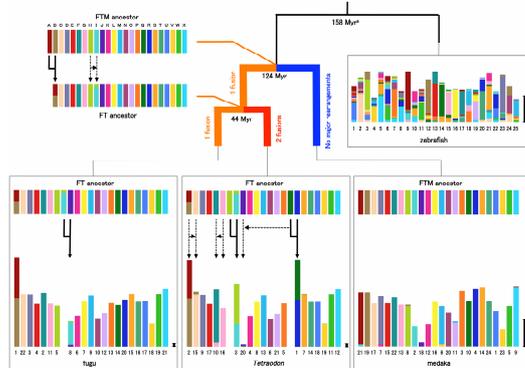


図 2A. モデル魚類における染色体再構成。トラフグ (Fugu)・ミドリフグ (Tetraodon)・メダカ (Medaka) の共通祖先における 24 本の染色体を AncA-X と名づけて色分けした。各系列における染色体の再構成を矢印で示した。

②次に、トラフグと他のモデル魚類のジーンオーダーの保存性を全ゲノムに渡り解析した (図 2B)。棘鱗上目魚類においては、ジーンオーダーの保存性も高いことが示され、モデル魚類から非モデル魚類のジーンオーダーが精度高く推定可能なことがわかった。

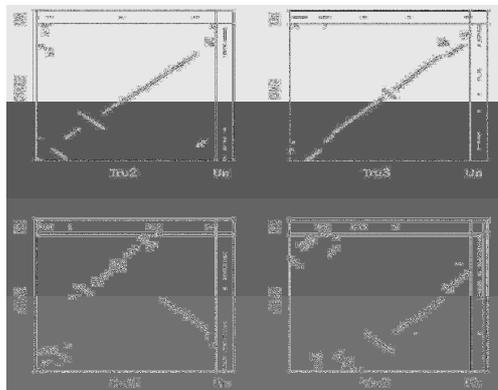


図 2B. トラフグとメダカのジーンオーダーの比較. 4 ペア

の染色体比較例を示した。Tru はトラフグ染色体を、01a はメダカ染色体を示す。ジーンオーダーが保存されている領域は対角線上に並ぶ。inversion は直行方向に並ぶ線として検出される。

③さらに、魚類のデータに哺乳類 (ヒト、マウス、オポッサム) のゲノムデータを加えて染色体再編成速度を算出したところ、棘鱗上目魚類のゲノム構造の保存性の高さは、魚類と哺乳類の染色体間再編成速度の差に起因することがわかった (図 2C)。

これらすべてのデータは、オープンアクセス 学術誌である Genome Biology and Evolution において無料で公開されており、誰もが自由に利用可能である。

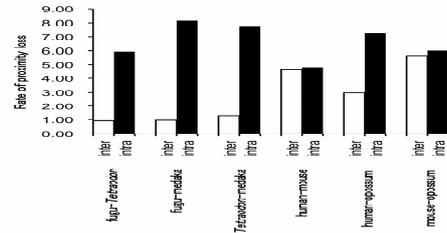


図 2C. 魚類と哺乳類間における染色体間 (Inter) および染色体内 (Intra) 再編成頻度の比較。

(3) 汎用マーカーの開発

①モデル魚 4 種間で保存されたマイクロサテライト座を探索したところ、数千個の単位で存在することがわかった。アンカーペア間の距離を 150-300bp に設定したところ、1396 個の座が抽出された。染色体上の位置を考慮して 54 個のマーカーを選び、野生のマサバ、マダイ、ヒラメ (それぞれ 24 個体) を解析した結果、83% のマーカー座で 3 魚種共通の PCR 増幅が認められ、それぞれ魚種内で 39-44% のマーカー座が多型を示した (図 3A)。

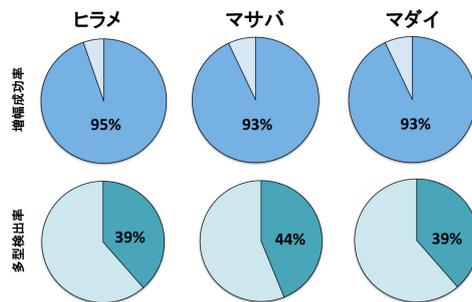


図 3A. 汎用マーカーの野生魚における多型検出率。

②次に、トラフグの 2 番染色体上にある 48 個の座を、マサバのマッピング家系 (最多で 4 アリル/1 座) において解析したところ、11 個の座が多型を示し、トラフグの染色体に対応するマサバ連鎖地図を得ることができた (図 3B)。マサバのゲノム配列の情報は必要なかった。従って、棘鱗上目魚類間には高

度に保存されたマイクロサテライト座が多数存在し、これらが多くの魚類の遺伝解析に利用可能であることが示された。加えて、(2)における予想どおり、マサバの染色体構造はトラフグとよく似ていることも示された。以上の研究により、トラフグのゲノム情報を他の魚類の遺伝解析に有効活用する道筋が示された。

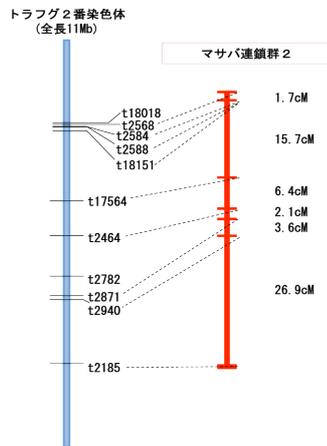


図 3B. 汎用マーカーにより作製したマサバ連鎖地図。

(4)フグ研究におけるゲノム地図の活用  
魚類の免疫に関わる遺伝子の多くは進化速度が速く、相同性のみを指標にしてオーソロジーを判定することは困難である。本研究で作製したゲノム地図を利用することで、トラフグ B7 やケモカインなど、多くのトラフグ免疫関連遺伝子のオーソロジーが判定できた。また、トラフグの性決定遺伝子の同定など順遺伝学的研究においても、マーカー座の選択にゲノム地図を参照することで、効率的なマッピングが可能となった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kai, W., Kikuchi, K., K., Tohari, S., Chew, A., Tay, A., Fujiwara, A., Hosoya, S., Suetake, H., Naruse, K., Brenner, S., Suzuki Y. and Venkatesh, B.: Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals. *Genome Biol. Evol.*, 査読有, (2011, in Press)

② 菊池潔\*, 甲斐渉, 細谷将, 末武弘章, 鈴木讓, フグ類の多様化をもたらした遺伝子の探索-種間交雑を利用したゲノムワイドマッピング-, *月刊海洋*, 査読無, 42 巻, 2010,

363-371

③ Sugamata, R., Suetake, H\*, Kikuchi, K., and Suzuki Y., Teleost B7 Expressed on Monocytes Regulates T Cell Responses., *J. Immunol.*, 査読有, 182, 2009, 6799-6806

④ 菊池潔\*, 甲斐渉, 末武弘章, 鈴木讓, トラフグのゲノムマップ計画と魚類養殖におけるゲノム情報の利用法, *水産育種*, 査読無, 38 巻, 2008, 25-30.

⑤ Araki, K., Akatsu, K., Suetake, H\*, Kikuchi, K., and Suzuki, Y., Characterization of CD8-positive leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 $\alpha$ ., *Dev. Comp. Immunol.*, 査読有, 32, 2008, 850-858.

\*Corresponding Author

[学会発表] (計 38 件)

① Kikuchi, K., Kai, W., Kuroyanagi, M., Nozawa, A., Hosoya, S., Suetake, H., Suzuki, Y. Genetic Basis of Parallel Evolution for the Spiny Scale in the Rapid Radiation of Pufferfishes., The 20th CDB Meeting Molecular Bases for Evolution of Complex Traits, 2011. 2. 23, Hyogo

② 松藤由佳, 李在萬, 日下部宜宏, 菊池潔, 鈴木讓, 北野載, 米田道夫, 松山倫也, 山口明彦, トラフグ初期生殖腺器官培養系を用いた FSH の機能解析, 日本動物学会第 81 回東京大会, 2010. 9. 25, 東京

③ 甲斐渉, 細谷将, 菊池潔, 黒柳美和, 合田知樹, 野澤碧, 末武弘章, 鈴木讓, フグにおける形態多様化の遺伝的背景: 種間交配を利用したゲノムワイド連鎖解析, 日本進化学会第 12 回東京大会, 2010. 8. 5, 東京

④ 末武弘章, 菊池潔, 鈴木讓, 宮台俊明, トラフグの TNF 受容体スーパーファミリー遺伝子の cDNA クローニング, 比較免疫学会 2010 年学術集会, 2010, 8. 2~4, 福岡

⑤ 田内博久, 末武弘章, 菊池潔, 鈴木讓, 宮台俊明, 皮膚に発現する二つのトラフグケモカイン 比較免疫学会 2010 年学術集会, 2010. 8. 2~4, 福岡

⑥ Suetake, H., Araki, K., Sugamata, R., Hamuro, K., Akatsu, K., Kikuchi, K., Suzuki, Y., Miyadai, T., Fugu genome unveils fish adaptive immune system, 2nd International Symposium on Aquatic Animal Defense Mechanisms against Invading Pathogens, 2010. 6. 23, Korea, Jeju

⑦ Fugu version 5 - トラフグのゲノム地図 - 甲斐 渉, 菊池潔, 末武弘章, 鈴木 讓, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 29, 神奈川

⑧ 田内博久, 末武弘章, 菊池潔, 鈴木讓, ト

ラフグ皮膚に発現するケモカイン II, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 28, 神奈川

⑨魚類ゲノムワイド関連解析の可能性と問題点-トラフグの連鎖不平衡解析からの考察-, 菊池潔, 神谷隆史, 甲斐涉, 末武弘章, 鈴木重則, 鈴木譲, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 27, 神奈川

⑩細谷将, 菊池潔, 水野直樹, 末武弘章, 鈴木譲, フグの行動 QTL, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 27, 神奈川

⑪合田知樹, 細谷将, 甲斐涉, 菊池潔, 水野直樹, 末武弘章, 石川智士, 鯉江洋, 鈴木譲, フグの脊椎骨数と成長を支配する遺伝子の関係, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 27, 神奈川

⑫甲斐涉, 黒柳美和, 菊池潔, 藤田真志, 鈴木重則, 末武弘章, 鈴木譲, 鱗の退化をもたらした遺伝子のゲノムワイド探索と詳細マッピング, 平成 22 年日本水産学会春季大会, 2010. 3. 27, 神奈川

⑬菊池潔, フグ類の多様化をもたらした遺伝子の探索: 種間交雑を利用したゲノムワイド QTL マッピング, 菅平分子生態集会, 2009. 12. 8, 長野

⑭菊池潔, 甲斐涉, 細谷将, 木戸慎一, 末武弘章, 鈴木譲, フグ類の多様化をもたらした遺伝子の探索: 種間交雑を利用したゲノムワイド QTL 解析, 2009 年度日本魚類学会シンポジウム, 招待講演, 2009. 10. 12, 東京

⑮菊池潔, 神谷隆史, 甲斐涉, 末武弘章, 鈴木譲, Search for the sex-determining gene in fugu, *Takifugu rubripes* 日本動物学会第 80 回大会, 招待講演, 2009. 9. 17, Shizuoka

⑯Kido S., Kai W., Suetake H., Kikuchi., K., and Suzuki Y., Genetic approach for identifying the genes responsible for resistance and susceptibility against a parasite, *Heterobothrium okamotoi*, in fugu, *Takifugu rubripes*., 11<sup>th</sup> Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, July 3, 2009, Czech Republic, Prague

⑰Suetake H., Tauchi H., Kikuchi., K. Murayama T., and Suzuki Y., Fugu skin chemokine., 11<sup>th</sup> Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, June 30, 2009, Czech Republic, Prague

⑱Sugamata R., Suetake H., Jo Y., Kikuchi., K., and Suzuki Y., Teleost B7 molecules on monocytes regulate T cell responses., 11<sup>th</sup> Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, June 29, 2009, Czech Republic, Prague

⑲田内博久, 末武弘章, 菊池潔, 村山司, 鈴木譲, トラフグ表皮に発現するケモカイン, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 30, 東京

⑳菅又龍一, 末武弘章, 城夕香, 菊池潔, 鈴木譲, トラフグ B7 抗原提示細胞の多様性, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 30, 東京

㉑菅又龍一, 末武弘章, 城夕香, 菊池潔, 鈴木譲, トラフグの CD8 $\alpha$  樹状細胞, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 30, 東京

㉒末武弘章, 田内博久, 山崎敏朋, 菊池潔, 恩田紀代子, 村山司, 筒井繁行, 中村修, 宮台俊明, 鈴木譲, 細胞魚類免疫応答に関わるメラノマクロファージセンター, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 30, 東京

㉓細谷将, 菊池潔, 甲斐涉, 水野直樹, 末武弘章, 鈴木譲, フグの体サイズ進化をもたらしたゲノム領域, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 30, 東京

㉔神谷隆史, 菊池潔, 甲斐涉, 藤田真志, 城夕香, 末武弘章, 鈴木譲, クサフグの性決定機構, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 28, 東京

㉕木戸慎一, 木南竜平, 甲斐涉, 菊池潔, 末武弘章, 水野直樹, 中村修, 良永知義, 小川和夫, 鈴木譲, 寄生虫の宿主特異性に関わるフグのゲノム領域の探索 II - 寄生虫の着定と脱落 -, 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 2009. 3. 28, 東京

㉖菊池潔, フグのゲノムマップ計画と性決定遺伝子の解析, 平成 20 年度日本水産学会北海道支部大会若手の会講演会, 招待講演, 2009. 1. 10, 北海道

㉗木戸慎一, 木南竜平, 甲斐涉, 菊池潔, 末武弘章, 水野直樹, 脇田翔, 杉岡晋也, 鈴木秀和, 中村修, 渡邊翼, 大橋雄, 良永知義, 小川和夫, 鈴木譲, 寄生虫の宿主特異性に関わるフグのゲノム領域, 日本動物遺伝育種学会第 9 回大会, 2008. 11. 29, 岡山

㉘Kikuchi., K., Kai W., Kido S., Kamiya T., Hosoya S., Suetake H., Suzuki Y., Fugu genome map and its application in aquaculture, 5th World Fisheries Congress, 2008. 10. 20-24, Kanagawa

㉙Suetake H., Araki, K., Akatsu, K., Kikuchi., K., Suzuki Y., Characterization of tiger pufferfish *Takifugu rubripes* (fugu) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> leukocytes, 5th World Fisheries Congress, 2008. 10. 20-24, Kanagawa

㉚Suzuki Y., Suetake H., Kikuchi., K., Recent advances in fish immunology by means of the genome project of fugu, *Takifugu rubripes*. 5th World Fisheries

Congress, 2008.10.20-24, Kanagawa

③① Hosoya S., Kikuchi., K., Suetake H., Hino, A., Suzuki Y., Behavioral differences among related species of pufferfishes and their intercross progeny, 5th World Fisheries Congress, 2008.10.20-24, Kanagawa

③② Sugamata, R., Suetake H., Kikuchi., K., Suzuki Y., Fish B7+ monocytes as antigen-presenting cells, 5th World Fisheries Congress, 2008.10.20-24, Kanagawa

③③ Kikuchi., K., Matsunaga, T., Kai, W., Hosokawa, A., Suetake, H., Asahina, K., Suzuki, Y., The Genomic Region That Determines the Sexual Identity of Fugu (The Tiger Pufferfish), International Symposium for Sex Differentiation, Invited, 2008.9.14-16, Fukuoka

③④ 菊池潔, フグとメダカの比較から見える魚類ゲノムの進化, 日本進化学会第10回東京大会, 招待講演, 2008.8.23, 東京

③⑤ 末武弘章, 恩田紀代子, 菊池潔, 村山司, 鈴木讓, 組織特異的に発現するトラフグケモカイン, 第20回日本比較免疫学会学術集会, 2008.8.25-27, 東京

③⑥ Kikuchi., K., Kai, W., Hosokawa, A., Suetake, H., Asahina, K., Suzuki, Y., The sex determining locus in the tiger pufferfish (fugu) *Takifugu rubripes*, XX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 2008.7.12-17, GERMANY, Berlin

③⑦ Kai, W., Kikuchi., K., Suetake, H., Suzuki, Y., The second-generation genetic map of fugu (the tiger pufferfish): a resource for comparative genomics and evolutionary genetics, XX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 2008.7.12-17, GERMANY, Berlin

③⑧ Kikuchi., K., Matsunaga, T., Kai, W., Hosokawa, A., Suetake, H., Asahina, K., Suzuki, Y., The Sex-Determining Locus in Fugu (the Tiger Pufferfish), NIBB International Symposium, Invited, 2008.2.27-28, Aichi

#### [産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: フグの雌雄を判別する方法

発明者: 宮台俊明、菊池潔、鈴木康仁、鈴木讓

権利者: 宮台俊明、菊池潔、鈴木讓

種類: 得願

番号: 2010-290463

出願年月日: 2010年12月27日

国内外の別: 国内

#### [その他]

以下のサイトに、トラフグのゲノム概要データを、国際標準形式であるEnsembl形式で公開した。

Fugu genome assembly version 5 ([http://ensembl.fugu-sg.org/Fugu\\_rubripes\\_v5/index.html](http://ensembl.fugu-sg.org/Fugu_rubripes_v5/index.html))

別途、トラフグの統合ゲノム地図作製に用いたマーカー配列を以下のサイトに公開した。  
The second-generation genetic map of fugu (<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/Fugu-Map/map.html>)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菊池 潔 (Kikuchi Kiyoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 20292790

##### 研究協力者

城由香 (東京大学技術職員)

甲斐渉 (大学院生)

神谷隆史 (大学院生)