

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248030

研究課題名(和文) 4倍体起源種における未知遺伝子の単離法の確立とその応用

研究課題名(英文) The establishment and application of positional cloning method for unknown gene in fish species of tetraploid origin.

研究代表者

岡本 信明 (Okamoto, Nobuaki)

東京海洋大学・その他部局等・その他

研究者番号：40114912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円、(間接経費) 9,630,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝マーカーSSLP147を用いて解析家系(1004個体)で連鎖解析を行い、優性アルビノ遺伝子座とSSLP147の遺伝的距離が0.2cMであることを明らかにした。SSLP147を起点にBACライブラリーを用いた染色体歩行を行ない、完全連鎖するBACクローンを単離・同定することに成功した。完全連鎖するBACクローンについて全塩基配列を解析したが、変異の原因と考えられる候補遺伝子は特定されなかった。シンテニー情報を利用した候補遺伝子解析法によりニジマスc-kit様遺伝子を単離し、正常個体とアルビノ個体を比較した結果、翻訳領域には変異は見つからなかったが、転写調節領域に塩基置換が検出された。

研究成果の概要(英文)：As a first step towards the positional cloning of the gene responsible for autosomal dominant oculocutaneous albinism (OCA) in rainbow trout, we performed linkage analysis of SSLP147 markers associated with the dominant albino locus by using 1004 samples from analyzed family. And then, we found that the genetic distance between SSLP147 marker and the dominant albino locus was only 0.2 cM. As a second step, we started chromosome walking method using rainbow trout BAC libraries. As a results, we detected some BAC clones that have no recombinant between phenotypes and genotypes within 1004 samples. We determined whole sequences of the BAC clones and searched the candidate gene in the sequence. Unfortunately, we could not find the candidate gene of OCA. By candidate gene approach method, we isolated rainbow trout c-kit like gene that related with the pigment pattern mutant in zebrafish. We found some base pair substitutions in transcriptional regulatory region, but not in coding region.

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：ニジマス 優性アルビノ 候補遺伝子 4倍性 染色体歩行 ポジショナルクローニング シンテニー解析 BACクローン

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究背景

サケ・マス類やコイ科魚類などは、全ゲノムの倍数化が進化的に極めて最近に起きた4倍体起源の魚類である。このような魚では、染色体の倍数化によって起源を同じくする遺伝子が二つ存在するが、そのうちの一方は機能を失うか、新たな機能を獲得する方向で進化している(Ohno, 1993)。近年、ゼブラフィッシュやメダカ、フグなどの2倍体性魚類で全ゲノムの塩基配列が明らかになり、ヒトやマウスなどにおいて特定された機能遺伝子との比較から、ヒトやマウスなどと共通の機能遺伝子が推定され、多くの魚類でその情報を利用する候補遺伝子アプローチの方法で遺伝子が単離されている。しかし、ヒトやマウスなどにはない魚類に特有な形質発現に関与する未知の遺伝子はこの方法では単離することはできない。未知の遺伝子は染色体歩行を行って原因遺伝子に順次近づく方法で単離する必要がある(ポジショナルクローニング法)。しかし、4倍体起源種では染色体が単純に同じ染色体が2本になっているわけではなく、オリジナルの染色体が複雑に入り組んだ染色体構造をとっており(Danzmann *et al.*, 2008)、塩基配列を頼りにBACクローン(ゲノムを断片化したもの)を単純につなぎ合わせると(染色体歩行)、原因遺伝子が存在する染色体を選択しているか、それとも祖先を同じくする異なる染色体(同祖染色体)を選択しているかが区別できないために、一度、選択を間違えると原因遺伝子にはたどり着くことが出来ない。4倍体起源種における目的形質を支配する原因遺伝子の単離法の確立は、広く4倍体起源種の未知遺伝子の単離に応用できる点で学術的に意義があるほか、サケ・マス類やコイ科魚類などでの耐病性や酸欠耐性などの経済形質の原因遺伝子の単離にも道を開くものであり、その成果は育種に応用できるので、水産的観点からも価値がある。

### 国内・国外の研究動向

優性アルビノニジマスは1956年に長野県水産指導所に出現した突然変異体である(立川, 1974)。体色は薄いオレンジ色、眼は暗赤色を示し、ホモ接合体の方がより眼が赤い。交配試験により一遺伝子による常染色体優性遺伝様式を示すことが確認されている。常染色体優性遺伝様式を示すアルビニズムについては、ヒトにおいて3例が報告されているのみであり(Bergsma *et al.*, 1974, Fitzpatrick *et al.*, 1974, Frenk *et al.*, 1977)、他の種では報告されていない。解析されているアルビノは劣勢であり、一般的にメラニン合成チロシナーゼ遺伝子の変異が疑われ、アルビノメダカではトランスポゾン遺伝子 Tol-2 の挿入がその原因であることが明らかになっている(Koga *et al.*, 1996, Murisier and Beermann, 2006)。優性アルビノニジマスについての知

見として、優性アルビノニジマスは野生型ニジマスと比較すると、チロシナーゼ活性は低いが、チロシナーゼ遺伝子には違いがないと報告されているが(Boonanuntanasarn *et al.*, 2004)、ニジマスの優性アルビノを支配する原因遺伝子は未だに明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ニジマスの優性アルビノ形質をモデルとして、2倍体性生物で遺伝子単離に使われる染色体歩行に工夫を加え、BAC選択を行うごとに連鎖解析を行って、進むべき方向(正しい染色体)を確認する手法を確立し、それを用いて染色体歩行を行い、4倍体起源種における未知の遺伝子の単離法を確立し、原因遺伝子を単離する。4倍体起源種における未知の遺伝子の単離法の確立は、広く4倍体起源種の遺伝子単離に応用できる点で学術的に意義があるほか、サケ・マス類やコイ科魚類などにおける耐病性や酸欠耐性などの水産有用形質の原因遺伝子の単離にも道を開くものである。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA マーカー(SSLP147)を用いた1000個体解析によるマーカーと優性アルビノ遺伝子座との遺伝的距離の確定

SSLP147を用いて交配家系魚の個体数を1000個体に増やして連鎖解析を行い、優性アルビノ遺伝子座とSSLP147の遺伝的距離の確定を行なう。96個体を用いた連鎖解析では完全連鎖(優性アルビノ遺伝子座とマーカーが近傍にあり、減数分裂時に両者間で組換えが起きない遺伝的距離)しているため、1000個体を解析したときには、数個体の組換え個体が出るにすぎないであろうと推測している(最大推定組換え個体数である2個体で組換えが起きた場合には、両者間の遺伝的距離は0.2センチモルガン(cM)となり、ニジマスの遺伝的距離が913kb/cM(Young *et al.*, 1998)とされているので、その場合でも、優性アルビノ遺伝子座とマーカー間は182.6kbと推定され、染色体歩行によって原因遺伝子の単離・同定が十分可能な遺伝的距離である。

### (2) SSLP147を起点とする染色体歩行によるBACクローンの整列化

SSLP147を起点に準備済みのBACライブラリーを用いて染色体歩行を行ない、BACクローンの整列化を行う。まず初めに、SSLP147を用いて同マーカーが位置しているBACクローンを特定し、そのクローンの両末端部分の塩基配列を決定し、プローブ化してBACライブラリーのスクリーニングを行なう。陽性クローンについて引き続き同じことを行い、陽性クローンの遺伝学的マッピングを行なって、BACクローンの整列化を図る。この場合、原因遺伝子座と異なる染色体由来のBACクローンの選択を回避するために、BAC

クローン選択ごとに解析家系を使って連鎖解析を行ない、その方向性を確認しながら染色体を歩行する。

(3) 整列化した BAC クローンの末端部分から作成した DNA マーカーによる組換え率 0% の BAC クローンの特定

整列化したクローンの末端部分から作成した DNA マーカーによる連鎖解析から、組換え個体が 0 個体となるまで、解析を進める。この状態は、優性アルビノ遺伝子座との遺伝的距離は 0cM となり、解析家系において限界まで優性アルビノ遺伝子座に近づいたことになる。

(4) 得られた BAC クローンの全塩基配列の決定とシテニー解析による候補遺伝子の絞込み

組み換え個体が 0 個体、すなわち、優性アルビノ遺伝子座との遺伝的距離は 0cM となった（完全連鎖）BAC クローン（その近傍 BAC クローンを含む）を、次世代型シーケンサーを用いて全塩基配列を決定し、BLASTn, BLASTx を用いて相同検索を行ない、さらに、既知遺伝子配列の配列比較ではなく、ゲノム配列とコンピューターアルゴリズムのみを用いた *in silico* 遺伝子予測法である GENSCAN などにより解析する。本塩基配列の決定は外注する。

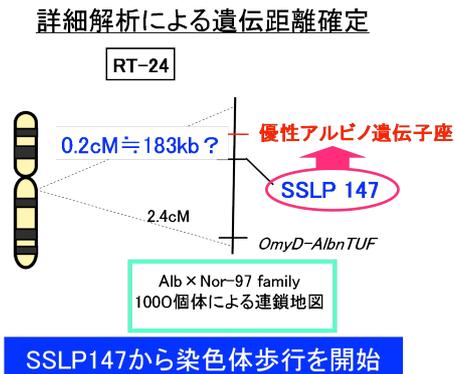
(5) 優性アルビノ遺伝子座のシテニー情報を利用した候補遺伝子の探索

染色体歩行および BAC クローンの整列化による方法と並行して、優性アルビノ遺伝子座が存在するニジマス染色体とゼブラフィッシュなどとのシテニー情報を利用した候補遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

(1) DNA マーカー (SSLP147) を用いた 1000 個体解析によるマーカーと優性アルビノ遺伝子座との遺伝的距離の確定

ニジマス優性アルビノ遺伝子座に強く連鎖する AFLP マーカーを STS 化した SSLP147 を用いて、交配家系魚の個体数を 1004 個体に増やして連鎖解析を行い、優性アルビノ遺伝子座と SSLP147 の遺伝的距離の確定を行った。その結果、2 個体の遺伝的組み換え個体を検出した。



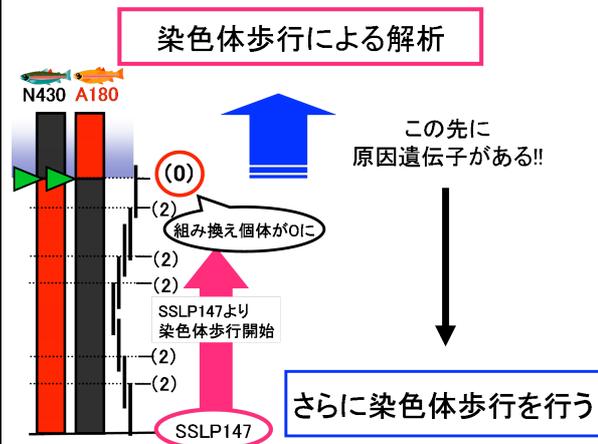
優性アルビノ遺伝子座と SSLP147 の遺伝的距離は、0.2cM であることが明らかになった。ニジマスの遺伝的距離は、913kb/cM (Young *et al.*, 1998) と推定されているため、優性アルビノ遺伝子座とマーカー間 (0.2cM) は 182.6kb と推定され、染色体歩行によって原因遺伝子の単離・同定が十分可能な遺伝的距離であると考えられた。

(2) SSLP147 を起点とする染色体歩行による BAC クローンの整列化

SSLP147 を起点に準備済みの BAC ライブラリーを用いて染色体歩行を行ない、BAC クローンの整列化を行った。まず初めに、SSLP147 を用いて同マーカーが位置している BAC クローンを特定した。その BAC クローンの両末端部分の塩基配列を決定した後、BAC ライブラリーのスクリーニングを行なった。陽性クローンについて引き続き同じことを行い、陽性クローンの遺伝学的マッピングを行なって、BAC クローンの整列化を行った。この場合、原因遺伝子座と異なる染色体由来 (4 倍体起源種であるために単離されてくる同祖染色体等) の BAC クローンの選択を回避するために、BAC クローン選択ごとに 1004 個体の解析家系を使って連鎖解析を行ない、その方向性を確認しながら染色体歩行を行った。

(3) 整列化した BAC クローンの末端部分から作成した DNA マーカーによる組換え率 0% の BAC クローンの特定

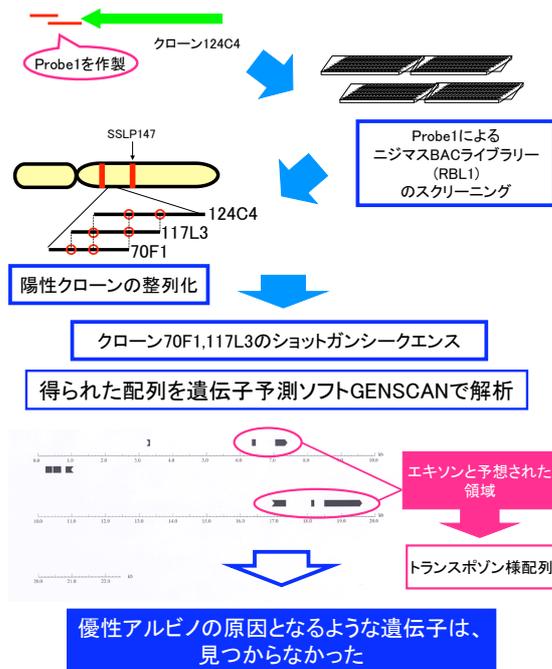
染色体歩行により整列化した BAC クローンの末端部分から作成した DNA マーカーによる連鎖解析から、組み換え個体が 0 個体となる BAC クローンを探索した。その結果、遺伝的組換え率 0% の BAC クローンを単離・同定した。この BAC クローンと優性アルビノ遺伝子座との遺伝的距離は 0 cM となり、解析家系において限界まで優性アルビノ遺伝子座に近づけることが出来た。



(4) 得られた BAC クローンの全塩基配列の決定とシテニー解析による候補遺伝子の絞込み

組み換え個体が 0 個体、すなわち、優性ア

ルビノ遺伝子座との遺伝的距離は 0 cM となった (完全連鎖) BAC クローン (2 クローン) を解析し、全塩基配列を決定した。BLASTn, BLASTx を用いて相同検索を行なったが、これまでに単離されている完全連鎖 BAC クローン内には有用な候補遺伝子は見つからなかった。さらに、既知遺伝子配列の配列比較ではなく、ゲノム配列とコンピューターアルゴリズムのみを用いた *in silico* 遺伝子予測法である GENSCAN により解析したが、変異の原因と考えられる候補遺伝子は特定されなかった。

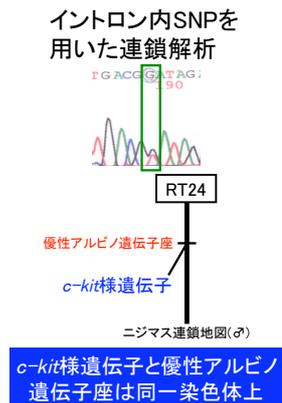


#### (5) 優性アルビノ遺伝子座のシンテニー情報を利用した候補遺伝子の探索

原因遺伝子が存在する可能性がある領域を完全に単離するために、染色体歩行により完全連鎖する BAC クローンからさらに複数の BAC クローンを単離し、新たに組換え個体を検出する遺伝マーカーが単離するまで継続していた。しかしながら、新たに組換え個体を検出する遺伝マーカーを単離する前に、BAC クローン内に繰り返し配列が多く存在するようになり、染色体歩行に必要なユニークな塩基配列を取得することが出来なくなった。そのため、これ以上の染色体歩行が困難になった。そこで、優性アルビノ遺伝子座が存在するニジマス染色体とゼブラフィッシュなどのシンテニー情報を利用した候補遺伝子の探索を行うこととした。

ゼブラフィッシュとのシンテニー情報を利用した候補遺伝子の探索を行った結果、優性アルビノ遺伝子座と対応すると予想される領域に、ゼブラフィッシュの色素変異体 *sparse* の原因遺伝子 *c-kit* が位置していることが明らかになった。そこで、Degenerate PCR によりニジマス *c-kit* 様遺伝子と予想される塩基配列の一部を得た。その塩基配列から連鎖解析を行った結果、ニジマス連鎖地図 (雄

地図) で優性アルビノ遺伝子座と連鎖していることが確認された。



さらに、ニジマス *c-kit* 様遺伝子を含む BAC クローンを単離し、全塩基配列を決定した。ニジマス *c-kit* 様遺伝子の塩基配列について、正常個体とアルビノ個体とを比較した結果、翻訳領域には変異は見つからなかったが、転写調節に塩基置換が検出された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 二見邦彦・興水江里子・本島佳苗・山根允文・坂本崇・岡本信明：ニジマス優性アルビノ原因遺伝子同定の試み 日本動物遺伝育種学会第 14 回大会 2013 年 10 月 12 日～2013 年 10 月 13 日 東京海洋大学 (東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 信明 (OKAMOTO NOBUAKI)

東京海洋大学・その他部局・学長

研究者番号：4 0 1 1 4 9 1 2

(2) 研究分担者

坂本 崇 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：4 0 3 1 3 3 9 0

(3) 研究分担者

二見 邦彦 (FUTAMI KUNIHICO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：0 0 5 1 3 4 5 9