

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658156

研究課題名(和文) DNAメチル化パターンを利用した新たな魚類育種法の開発

研究課題名(英文) Construction of new breeding methods used the control of matylating pattern

研究代表者

中嶋 正道 (Nakajima, Masamichi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20192221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は遺伝子の発現を制御する重要な機構である一方、餌環境やストレスによりそのパターンが変化する。変化したパターンは遺伝することから塩基配列の変化を伴わない新たな育種手法としての可能性が考えられる。体長の大小に関連する遺伝子として成長ホルモン遺伝子、インシュリン様成長因子をクローニングし、発現制御領域のメチル化パターンの系統間、個体間の比較を行ったが体長の大小との関連は観察されなかった。また、非致死高温処理が高温耐性を増大させることが明らかとなり、その効果が16日間持続することも明らかとなった。また、グッピーにおいて行動の差異を定量化する手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is one of the most important mechanisms for the control of gene expression. This pattern is changed by environment, such as stress and food, and changed pattern is transferred to next generation. Therefore, the control of methylation pattern is expected as new breeding method which is not accompanied by change of DNA sequence. In this project, the correlation between methylation patterns and several traits, such as growth, thermal tolerance and behavior, were examined in the guppy. In the case of Growth hormone gene, the methylation pattern of 5' upstream region were compared, however, clear correlation was not observed between methylation pattern and body size. In the case of thermal tolerance and behavior, correlations were not observed. On the other hand, non-lethal heat treatment leads thermal tolerance at lethal temperature was decided. It is promising as the new method to produce thermal tolerant individual. The method to measure the behavior was constructed.

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：DNAメチル化 遺伝育種 グッピー Hsp70 成長ホルモン 行動 因子分析

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化等のエピジェネティックな遺伝子の発現制御機構はさまざまな生物で調べられ、遺伝子発現の制御機構において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。塩基配列が同じ個体でもエピジェネティックな機構の違いにより遺伝子発現が異なり、異なった表現型として観察されることが報告されている。この転写・翻訳を制御する DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな調節機構は選抜による近交度の上昇に伴う繁殖力や環境適応能力の低下に関与している可能性が指摘されている。これまで選抜に対する選抜反応は遺伝率や育種価など塩基配列の違いに基づく遺伝的多型を統計遺伝学的に解析し、予想してきた。エピジェネティックな影響はこのような理論に対して新たな形質の評価法と改良法を提案する必要性を示している。本課題は魚類の育種改良とエピジェネティクスとの関係を明らかにし、育種改良にかかわる分子メカニズムの新たな可能性を明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

DNA メチル化等のエピジェネティックな遺伝子の発現制御機構は多くの生物で調べられ、遺伝子発現の制御機構において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。家畜では選抜等の集団への人為操作がゲノム中のメチル化パターン等のエピジェネティックな制御に影響を及ぼし、さらにその結果が環境適応能力などの形質に影響を及ぼしている可能性が指摘されている。魚類は卵生(卵胎生)であるが、卵黄は雌親由来であり、雌親への餌料やストレスが影響する可能性が考えられる。魚類におけるゲノム中のメチル化パターンに関する研究は少なく、人為選抜に伴う変化を調べた例は無い。

現在、水産資源において持続的、安定的な利用の観点から、養殖による生産の重要性が

高まりつつある。本課題はゲノム中のメチル化パターンと形質との関係を明らかにし、さらにメチル化パターンの変化を誘導することによる新たな育種手法の開発を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験魚であるグッピーを用いて以下の解析を行った。

- (1) 特定の遺伝子(*Hsp-70*, *GH*)においてプロモーター領域や遺伝子領域におけるメチル化パターンを明らかにし、体長との関連を明らかにする。
- (2) 高温耐性における *Hsp70* 遺伝子の発現量と高温耐性との関係、及びメチル化パターンとの関連を調べる。
- (3) 行動の系統差、個体差を明らかにする手法を開発し、メチル化との関連を調べる。

4. 研究成果

(1) 成長関連遺伝子の解析

成長ホルモン(*GH*)遺伝子とインシュリン様成長因子 I(*Igf-I*)のクローニングを行い、系統間比較を行った。

GH の系統間比較では両遺伝子ともに F 系統と S 系統間で配列変異が観察された。*IGH-I* 遺伝子も F 系統と S 系統においてクローニングされ、系統間比較を行ったが、個体差は観察されたものの系統差に由来する差異は観察されなかった。*GH* と *IGF-I* がクローニングされたことから、今後遺伝子領域でのメチル化パターンの比較が可能となった。

さらに成長関連ホルモン関連遺伝子として成長ホルモン(*GH*)とインシュリン様成長因子 (*IGF-I*)を選定し、イントロン領域を含む全転写領域について塩基配列を決定し成長の異なるグッピーに系統間で配列およびメチル化パターンの比較を行った。比較に用いたのは本研究室でクローズドコロニーとして継代飼育されている大型の F 系統と小型の S 系統である。*GH* は 612bp、204 個の A

ミノ酸からなる翻訳領域が得られた。これらは6個のエクソンと5個のイントロンから構成されていた。グッピーにおけるGH遺伝子とIGF-I遺伝子の構造は図の通りである。IGF-I遺伝子の第2イントロンは長いことから全塩基配列の決定はできなかった。翻訳領域内に系統間での差異は検出されなかったが、上流領域とイントロン内に変異が観察された。

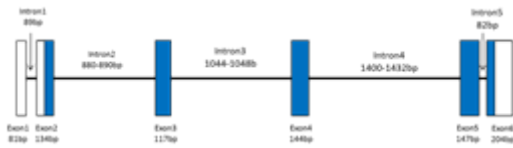


図 グッピーGH遺伝子の構造

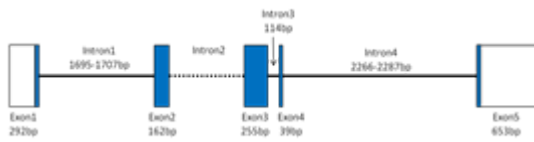


図 グッピーIGF-I遺伝子の構造

上流領域の変異と体長との間には弱い関連が見られ、系統間の体長差に対する寄与率は約30%であった。

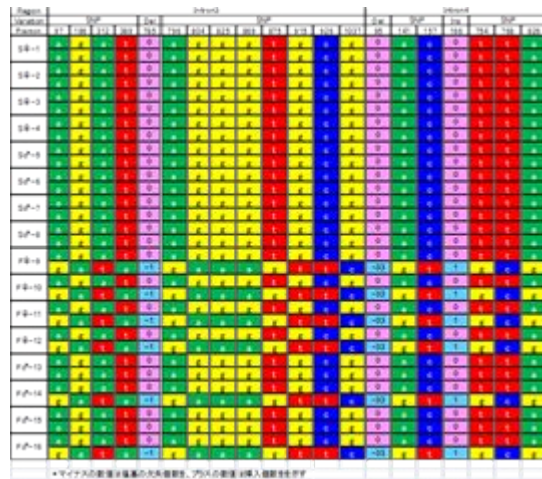


図 グッピーGHホルモン遺伝子上流領域の配列と変異

また、上流領域においてメチル化パターンの比較を行ったが系統差に起因する差異は検出できなかった。IGF-Iでは558bp、186アミノ酸からなる翻訳領域が得られた。これらは5個のエクソンと4個のイントロンから構成されていた。上流領域とイントロンに変異

表 グッピー成長ホルモン遺伝子における

塩基配列の個体変異



が観察されたが、系統差に起因する変異は観察されなかった。また、上流領域のメチル化パターンの系統間比較を行ったが、差異は観察されなかった。

表 グッピー成長ホルモン遺伝子における塩基配列の変異ごとの体長比較

SF系 F2	領域	遺伝子型	標準体長	標準偏差	個体数
雄	上流	AA	16.44	1.04	5
		AB	18.74	1.78	6
	イントロン	BB	18.54	0.83	2
		CC	16.76	1.37	4
		CD	17.45	2.01	13
DD	17.90	1.25	4		
SF系 F2	領域	遺伝子型	標準体長	標準偏差	個体数
雌	上流	AA	16.01	1.06	4
		AB	15.66	0.84	11
	イントロン	BB	16.10	0.46	4
		CC	16.49	0.55	3
		CD	15.57	0.83	13
DD	16.26	0.39	3		

(2)高温耐性関連遺伝子の解析

非致死高温処理による高温耐性の変化とでは、まず、S系統とWs系統においてHsp70遺伝子の発現量の比較を行った。S系統は高温に比較的強く、Ws系統は弱い系統である。コントロール、水温37℃到達時、37℃2時間処理を比較すると高温に強いS系統の方がHsp70遺伝子の発現量増加が緩やかであることがわかった。2時間後の発現量に系統差は観察されず、発現量の多寡が大勢に影響しているわけではなかった。

非致死高温処理による前処理が高温耐性へ及ぼす影響について調べた。実験にはWs系統を用いた。非致死高温である35℃で

ッピーを 2 時間処理すると致死水温である 37 °C での生存時間が未処理の平均 2 時間が 6 時間から 10 時間と 3 倍から 5 倍に増加した。

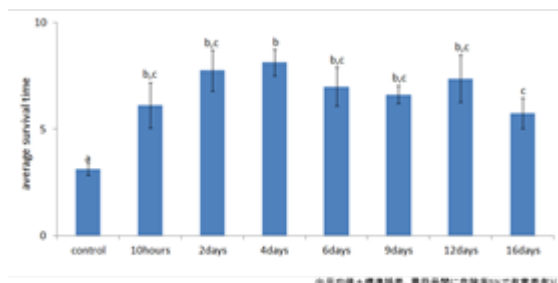


図 実験区毎の平均生存時間

この高温耐性の増加は処理後 16 日間維持されて、16 日経過した後でもコントロールと比べ 2 倍近い生存時間を示していた。HSP70 タンパクの発現量を同時期に測定し、比較したところ、HSP70 タンパク量は非致死高温処理後 6 時間後にはコントロールと同程度に低下していた。このことは HSP70 タンパクが 16 日後まで体内に蓄積されることにより高温耐性が維持されているわけではないことを示している。遺伝子レベルでの発現量変化も同様に処理後に低下することがわかっている。

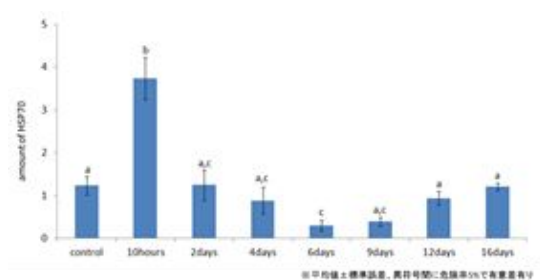


図 実験区毎のHSP70量

この手法で高温耐性が獲得できるのであれば、あらかじめ非致死水温での高水温処理を行うことにより夏季の高水温による斃死を予防できる可能性がある。メチル化パターンとの関連は不明であるが、今後メカニズムの解明が必要である。

(3)行動解析手法の確立

魚類養殖では、親魚に野生個体を持つ「性格」が強く反映されていると考えられ、再生産や継代飼育を行う際には障害となる可能

性がある。このような個体の性格の遺伝的要因の解明は効率的生産を行う上で重要である。魚類のモデル生物であるグッピーを用いて、系統間における行動の差異を、因子分析を用い定量的に解析する方法を確立した。

以下の 9 項目の測定を行った。1)水槽の上半分にいた時間、2)水槽の前半分にいた時間、3)水槽を上下移動した回数、4)水槽を前後移動した回数、5)水槽中での静止時間、6)異物を投入した時異物へ接近するまでの時間、7)異物をつつく回数、8)水槽から取り出したときにはねる回数、9)水槽へ戻したときに自立遊泳を開始するまでの時間、である。

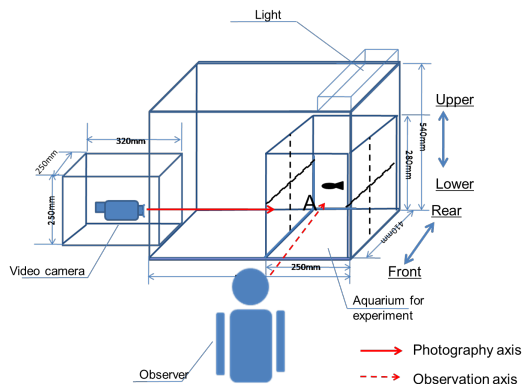


図 グッピーの行動観察装置

因子分析により二つの因子が抽出された。第一因子は活発性の因子と解釈した。また、第二因子は好奇心の因子と解釈した。

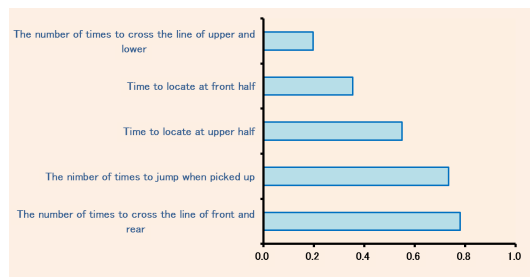


図 第一因子の主要成分

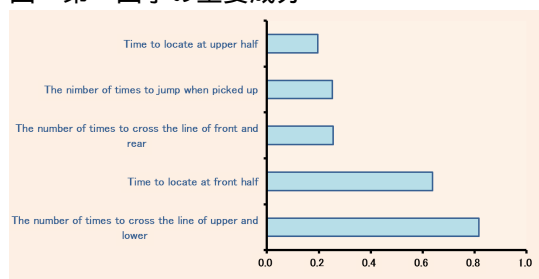


図 第二因子の主要成分

内での上下回数や水槽の前半分にいた時間が高い因子負荷量を示したことから、好奇心の因子と解釈した。

これら二つの因子についてF系統とS系統において各個体の因子負荷量を求め二次元にプロットしたところ、系統間で明確な差異が観察された。F系統は好奇心が強く活発な傾向を示し、S系統は警戒心が強く不活発である傾向を示した。

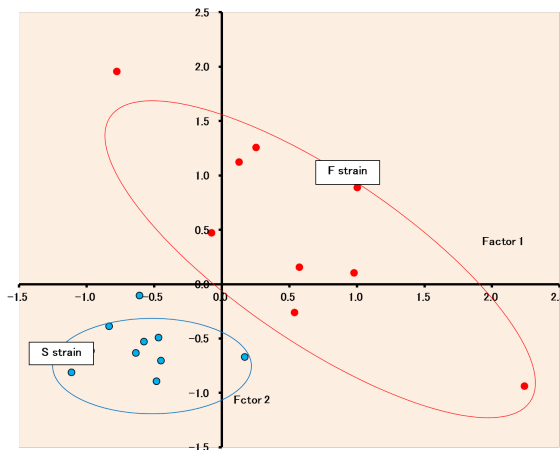


図 グッピーの性格に関連した因子得点の分布

行動の差異を定量化する手法が確立できたことにより、今後行動の際とメチル化パターンの差異との関連を明らかにして行くことが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

中嶋正道、水産育種における観賞魚の利用、水産育種、査読有、42 巻、2013 年、49-54
Takehiko Mochiduki, Noriyoshi Sakai, Toyoko Nakajima, Masamichi Nakajima, The relationship between HSP70 accumulation and acquisition of thermal tolerance in the guppy, *Poecilia reticulata*, Fish Genetics and Breeding Science, 査読有, Vol.42, 2012, 91-98

鍋島裕、山口光太郎、中嶋登代子、中嶋正道、グッピーにおける行動の系統差解析法の検討、水産育種、査読有、41 巻、2012 年、63-68

中嶋正道、大日方駿介、水産生物における遺伝的能力評価に基づいた選抜育種、水産育種、査読有、41 巻、2012 年、97-103

〔学会発表〕(計 14 件)

大日方俊介、中嶋登代子、中嶋正道、育種価と表現型を用いた選抜育種における選抜効果の比較、日本水産学会、2014 年 3 月 29 日、函館

Fadhil Syukri Ismail, Toyoko Nakajima, Masamichi Nakajima, The effect of parental relatedness towards heat treatment in the process of inbreeding, 日本水産学会、2014 年 3 月 29 日、函館
Masamichi Nakajima, Syunsuke Obinata, Toyoko Nakajima, Evaluation of selective breeding used phenotype and breeding value in the model experiment of the guppy, *Poecilia reticulata*, as a model of sustainable use of coastal genetic resources, 1st International Conference on the West Philippine Sea, Feb. 21, 2014, Puerto Princesa, Philippin

Fadhil Syukri Ismail, Toyoko Nakajima, Masamichi Nakajima, The correlations between genetic variation and thermal tolerance during the process of inbreeding in the guppy *Poecilia reticulata*, 日本水産学会、2013 年 3 月 29 日、東京

望月健彦、酒井則良、中嶋登代子、中嶋正道、グッピーにおける非致死高温処理による高温耐性の獲得と Hsp70 発現量変化、日本動物遺伝育種学会、2012 年 10 月 6 日、仙台

Fadhil Syukri Ismail, Toyoko Nakajima, Masamichi Nakajima, Effect of inbreeding guppy *Poecilia reticulata* toward heat resistance and genetic variation, JSPS-NRCTCAsia Core Program Symposium, 2012年12月7日、東京

Y. Hata, Y. Chiba, T. Nakajima, N. Sakai, M. Nakajima, Molecular cloning and detection of strain differences of growth hormone (GH) gene in the guppy, Genetic Improvement of Livestock and Aquatic Animals in the Tropics, Sep. 25, 2012, Bangkok, Thailand

T. Mochiduki, N. Sakai, T. Nakajima, M. Nakajima, The relationship between HSP70 accumulation and acquisition of thermal tolerance in the guppy, *Poecilia reticulata*, Genetic Improvement of Livestock and Aquatic Animals in the Tropics, Sep. 25, 2012, Bangkok, Thailand

M. Nakajima, Y. Sogawa, T. Ikeda, N. Taniguchi, The estimation of genetic breeding value from parentage estimated by microsatellite DNA markers in the red seabream *Pagrus major*, The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Jul. 17, 2012, Kochi City, Japan

Yoshiaki Watanabe, Yu Nabeshima, Toyoko Nakajima, Masamichi Nakajima, Evaluation and quantification of behavioral differences among guppy strains, The 11th International Symposium on Genetics in Aquaculture, Jun. 27, 2012, Auburn, USA

畠葉子、中嶋登代子、酒井則良、中嶋正道、グッピーにおけるIGF-I遺伝子のクローニングと変異の検出、日本水産学会、2012

年3月27日、東京

田千代悠太郎、中嶋登代子、中嶋正道、グッピーにおけるコブラ斑模様の定量化と遺伝様式、日本動物遺伝育種学会、2011年11月19日、東広島

大日方俊介、中嶋登代子、鈴木啓一、中嶋正道、BLUP法を用いた魚類育種の可能性の検討、日本水産増殖学会、2011年10月29日、津

望月健彦、中嶋登代子、酒井則良、中嶋正道、グッピーにおける非致死温度高温処理による高温耐性の獲得、日本水産学会、2011年9月28日、長崎市

〔図書〕(計 0件)

無

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中嶋正道(NAKAJIMA, MASAMICHI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：20192221

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：