様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｈ０４５４２

研究課題名（和文）魚類における新規性決定遺伝子の同定

研究課題名（英文）Novel sex-determining genes in fish

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（農学部）・准教授

研究者番号：２０２９２７９０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,100,000円

研究成果の概要（和文）：性決定遺伝子は性統御や性判別に役立つことから、生物生産において典型的な有用遺伝子として活用されている。しかし魚類の性決定遺伝子は、しばしば種間で保存されておらず、ほとんどの魚種で性決定遺伝子は不明のままである。本研究では、多くの魚類に適用可能な「性決定遺伝子を迅速に同定するストラテジー」の確立を目指した。その結果、次世代シーケンサーを活用した連鎖および低解像度連鎖不平衡マッピング法を用いれば、新規性決定遺伝子候補をこれまでより容易に短時間で決定できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Sex-determining genes can be used for sex identification, potentially providing important information regarding the ecology and conservation of many wild fish species, as well as management in aquaculture. Since the sex-determining gene(s) are not identified for most fish species and not well conserved among them, it has been difficult to obtain sex-specific markers for a target species of fish. In this study, we show that a combination of linkage and linkage-disequilibrium mapping implemented with high-throughput sequencing technologies is an efficient strategy for identifying novel sex-determining genes/regions in fish.

研究分野：魚類遺伝学

キーワード：性決定　生殖　遺伝　遺伝的多様性

１．研究開始当初の背景

性決定遺伝子は性統御や性判別に役立つことから、生物生産において典型的な有用遺伝子として活用されている。しかし魚類の性決定遺伝子は、しばしば種間で保存されておらず、トラフグやメダカなどを除いたほとんどの魚種で性決定遺伝子は不明のままである。本研究では、多くの魚類に適用可能な「性決定遺伝子を迅速に同定するストラテジー」の確立を目指す。そのため、まずトラフグの近縁種をモデルとして新規性決定遺伝子を同定する。さらに、その手法を主要養殖魚であるブリに適用して、水産応用に直結する新規性決定遺伝子を同定する。同定された新規性決定遺伝子たちは、動物の性決定機構に関する基礎的知見をもたらすと同時に、他の魚類の性決定遺伝子の候補となり、さらなる魚種の性決定遺伝子同定を促すこととなる。

２．研究の目的

（1）フグ類の解析

トラフグは、水産魚の中でゲノム解析リソースが整っていて、かつ、性決定遺伝子が同定されている数少ない種のひとつである。トラフグ属にはこのゲノムリソースが適用可能な多くの近縁種が存在するが、その中には、トラフグとは異なる性決定遺伝子をもつ種もいる。ここでは、そのような近縁種のひとつであるショウサイフグをモデルとして新規性決定遺伝子を同定する。

1-1. 迅速な連鎖マッピング

性決定遺伝子のゲノム上の位置を知るため、連鎖解析用の家系を作出して、次世代シーケンサーを利用した迅速なマッピングをおこなう。

1-2. 低解像度連鎖不平衡マッピング

性決定遺伝子のゲノム上の位置を迅速に絞り込むため、野生個体を材料とした低解像度連鎖不平衡マッピングをおこなう。

1-3. 高解像度連鎖不平衡マッピング

性決定遺伝子のゲノム上の位置を正確にしるため、野生個体を材料とした高解像度連鎖不平衡マッピングをおこなう。

（2）ブリ類の解析

日本おける養殖生産量第１位の魚種はブリ類である。これらについては完全養殖による管理･品種改良が強く求められており、その効率化のため性判別法を開発する必要がある。過去の研究から、ブリの性決定遺伝子は 12 番染色体上にあることが示されている。ここでは、フグ類で用いた方法を適用してブリ類 3 種の性決定遺伝子本体を特定し、養殖現場で使いやすい性判別マーカーを得る。

2-1. 低解像度連鎖不平衡マッピング

性決定遺伝子のゲノム上の位置を知るため、連鎖解析用の家系を作出して、次世代シーケンサーを利用した迅速なマッピングをおこなう。

2-2. 高解像度連鎖不平衡マッピング

性決定遺伝子のゲノム上の位置を正確にしるため、野生個体を材料とした高解像度連鎖不平衡マッピングをおこなう。

３．研究の方法

1-1. 迅速な連鎖マッピング

連鎖マッピングをおこなうため、まず、大規模なフグ類解析家系を作出する。次に解析個体の遺伝子型情報を迅速にえるため、GBS（Genotyping by sequencing）をおこなう。最後に解析個体の表現型を調べて、性決定遺伝子座のゲノム上の位置を決定する。

1-2. 低解像度連鎖不平衡マッピング

低解像度連鎖不平衡マッピングをおこなうため、まず、野生フグ個体を採取する。これらの DNA を雌雄別々にプールした後、全ゲノムリシーケンシングをおこなう。全多型座についてアリル頻度を推定し、これと雌雄グループ間の関連を解析し、性決定遺伝子の位置を推定する。

1-3. 高解像度連鎖不平衡マッピング

上記の解析で絞り込んだゲノム領域について、雌雄それぞれ 50 個体程度の野生フグ個体をもちいた、高解像度関連解析をおこない、性決定遺伝子（変異）を特定する。これにより、野生個体にも利用可能な性決定マーカーを得る。

2-1. 低解像度連鎖不平衡マッピング

ブリの連鎖解析は既に終了しているため、ブリ属 3 種（ブリ・ヒラマサ・カンパチ）について野生個体を雌雄それぞれ 5 尾程度採取し、全ゲノムリシーケンシングをおこなう。得られた遺伝子型と表現型の間の関連を解析し、性決定遺伝子の位置を絞り込む。

2-2. 高解像度連鎖不平衡マッピング

上記で絞り込んだゲノム領域について、雌雄それぞれ 50 個体程度の野生個体をもちいた、高解像度関連解析をおこない、性決定遺伝子（変異）を特定する。これにより、野生個体にも利用可能な性決定マーカーを得る。

４．研究成果

1-1. 迅速な連鎖マッピング

ショウサイフグの人工交配により、連鎖解析用家系を作出し、GBS の一種である GRAS-Di 法により、ゲノムワイド多型データの迅速な取得を試みた。連鎖解析の結果、18 番染色体上に性決定遺伝子が存在することが判明した。

1-2. 低解像度連鎖不平衡マッピング

低解像度の連鎖不平衡マッピングをおこなうため、以下の解析をおこなった。i) 雌雄それぞれ 10 個体を全ゲノムリシーケンシングにふした後に関連解析をおこなった。ii) 雌雄それぞれ 24 個体をプールして全ゲノムリシーケンシングにふした後に関連解析をおこなった。iii) 両親と息子からなるトリオを 5 組用意して、ゲノムリシーケンシングにふした後に性特異的なパターンを示す多型を抽出した。以上の結果から、*Diaph2* など、少なくとも 4 つの遺伝子が、性と関連していることが明らかとなった。

この結果は興味深いことに、連鎖解析の結果と一見矛盾していた。すなわち、トラフグゲノム概要によれば、18 番染色体は上記 4 つの遺伝子を含まないはずである。そこで、リシーケンシングのリードデータを詳細に検討したところ、上記 4 つの遺伝子はオス特異的に重複していることが判明した。したがって、ゲノム上の複数の領域に重複・転座がおき、重複領域が 18 番染色体に集積することにより、新規性決定遺伝子座が誕生したと考えられた。この性決定領域拡張には、オス特異的な適応能の高まりが関係したのではないかと考えられた。

1-3. 高解像度連鎖不平衡マッピング

解析個体数を大幅に増やして、高解像度解析をおこなったところ、*Diaph2* などの遺伝子上に性とほぼ完全に一致する多型が見つかった。また、連鎖不平衡ブロックが複数の遺伝子にまたがることもわかった。このことは、本法では原因領域をこれ以上は絞り込めないことを示すと同時に、野生個体にも適用できる信頼性の高い性判別マーカー座が複数得られたことを意味している。以上、本研究では、新規性決定ゲノム領域を迅速に同定するストラテジーを確立することができた。さらに、「性決定領域がゲノム上の複数の領域を引き寄せて拡張していく」という興味深いプロセスを明らかにすることができた。

（2）ブリ類の解析

2-1. 低解像度連鎖不平衡マッピング

ブリ属 3 種について全ゲノムリシーケンシングの後に関連解析をおこなった。その結果、全種で 12 番染色体上に関連領域がみとめられ、全種に共通した性決定領域が存在することが判明した。さらに、連鎖不平衡状態を種間で比較したところ、3 種の中でカンパチが高解像度解析に最も適していることが明らかとなった。

2-2. 高解像度連鎖不平衡マッピング

カンパチの性決定領域約 300kb について、解析個体数を大幅に増やして高解像度関連解析をおこなったところ、性とほぼ完全に一致する多型が、***Hsd17b1*** 遺伝子上に見つかった。さらにこの多型座は、ブリ類 3 種で共有されていることもわかった。以上、新規性決定遺伝子の同定に成功するとともに、野生ブリ類にも適用可能な性判別マーカーを得ることができた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

①Ieda R, Hosoya S, Tajima S, Atsumi K, Kamiya T, Nozawa A, Aoki Y, Tasumi S, Koyama T, Nakamura O, Suzuki Y, Kikuchi K. Identification of the sex-determining locus in grass puffer (Takifugu niphobles) provides evidence for sex-chromosome turnover in a subset of Takifugu species. PLOS ONE 査読有, 13, 2018, e0190635 DOI: 10.1371/journal.pone.0190635.

②Hosoya S, Kikuchi K, Nagashima H, Onodera J, Sugimoto K, Satoh K, Matsuzaki K, Yasugi M, Nagano A, Kumagai A, Ueda K, Kurokawa T. Genomic Selection in Aquaculture. Bull Japan Fish Res Edu Agen 査読無, 45, 2017, 35-39

③Igarashi K, Matsunaga R, Hirakawa S, Hosoya S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y, Nakamura O, Miyadai T, Tasumi S, Tsutsui S. Mucosal IgM antibody with d-Mannose affinity in fugu Takifugu rubripes is utilized by a monogenean parasite Heterobothrium okamotoi for host recognition. J Immunol 査読有, 198, 2017, 4107-4114
10.4049/jimmunol.1601996.

④Hamasaki M, Takeuchi Y, Yazawa R,

Yoshikawa S, Kadomura K, Yamada T, Miyaki K, Kikuchi K, Yoshizaki G. Production of tiger puffer ***Takifugu rubripes*** offspring from triploid grass puffer ***Takifugu niphobles*** parents. Marine Biotechnol 査読有, 19, 2017, 579-591.
DOI: 10.1007/s10126-017-9777-1.

⑤菊池潔, ゲノムワイド解析によるフグ性決定遺伝子の同定. 日本水産学会誌, 査読無, 83, 2017, 325-332.

⑥Ueda K, Saito E, Iwasaki K, Tsutsui S, Nozawa A, Kikuchi K, Nakamura O. Accumulation of cells expressing macrophage colony-stimulating factor receptor gene in the ovary of a pregnant viviparous fish, Neoditrema ransonnetii (Perciformes, Embiotocidae). Fish Shellfish Immunol. 査読有, 50, 2016, 223-230
DOI: 10.1016/j.fsi.2016.01.028

⑦Tasumi S, Yamaguchi A, Matsunaga R, Fukushi K, Suzuki Y, Nakamura O, Kikuchi K, Tsutsui S. Identification and characterization of pufflectin from the grass pufferfish Takifugu niphobles and comparison of its expression with that of Takifugu rubripes. Dev Com Immunol 査読有, 59, 2016, 48-56
DOI: 10.1016/j.dci.2016.01.007

⑧Suzuki M, Wakui H, Itou T, Segawa T, Inoshima Y, Maeda K, Kikuchi K. Two isoforms of aquaporin2 responsive to hypertonic stress in bottlenose dolphin. J Exp Biol 査読有, 219, 2016, 1249-1258
DOI: 10.1242/jeb.132811

⑨Kudo Y, Nikaido M, Kondo A, Suzuki H, Yoshida K, Kikuchi K, Okada N. A microsatellite-based genetic linkage map and putative sex-determining genomic regions in Lake Victoria cichlids. Gene 査読有, 560, 2015, 156-164
DOI: 10.1016/j.gene.2015.01.057

⑩菊池潔, The International Symposium on Genetics in Aquaculture (ISGA) XII に参加して. 日本水産学会誌, 査読無, 81, 2015, 1017

⑪菊池潔, 有用遺伝子の探索・同定・選抜・編集. 日本水産学会誌, 査読無, 81, 2015, 882-883

〔学会発表〕(計 33 件)
①車遥介・小山喬・岡田恵治・家田梨櫻・朝比奈潔・菊池潔, ゼブラフィッシュを用いたブリ属性決定遺伝子の機能解析. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

②家田梨櫻・細谷将・小山喬・城夕香・菊池潔, ショウサイフグ性決定遺伝子の探索 -Pool-seq による表現型原因遺伝子の特定-. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

③藤川大学・細谷将・小林純也・田島祥太・家田梨櫻・佐藤茉菜・城夕香・中村修・菊池潔, GRAS-Di 法で明らかとなった「ゲノム再編成による新規性決定遺伝子座の誕生」. 日本水産学会春季大会, 2018年3月27日～2018年 3 月 29 日 東京

④家田梨櫻・小山喬・細谷将・大木駿・水野直樹・藤田真志・菊池潔, クサフグ性決定遺伝子の探索 -少数個体を用いた GWAS の発見的利用-. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑤大木駿・家田梨櫻・細谷将・菊池潔, 新規トラフグゲノム参照配列の作成と近縁魚種への利用. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑥小山喬・森島輝・山下量平・豊田敦・内野翼・坂本崇・鈴木萌・細谷将・菊池潔, ブリ属の性決定遺伝子はステロイド代謝酵素である. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑦小山喬・山下雄史・佐々木皓平・宇野誠一・小山次朗・田角聡志・菊池潔, ブリ属性決定遺伝子の機能解析. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑧中本正俊・小山喬・水野直樹・菊池潔・坂本崇, ブリ属性決定遺伝子の発現解析. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑨木元亮太・細谷将・佐藤茉奈・水野直樹・菊池潔, トラフグ属魚類種間雑種の初回成熟期に関する研究. 日本水産学会春季大会, 2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 29 日 東京

⑩菊池潔, 水産科学におけるゲノム情報の活用を考える. (招待講演) 第 34 回マリントキシン研究会, 2018 年 3 月 26 日 東京

⑪菊池潔, 性決定遺伝子を NGS で簡単に決められないだろうか? 第 12 回 Dmy 研究会, 2017 年 11 月 11 日～2017 年 11 月 12 日 栃木

⑫Kikuchi K, The reuse of the same sex chromosome in pufferfishes.(invited) Asian Sex Differentiation Network (7th Gonad Biology Joint Meeting, 2017), 2017 年 10 月 16 日～2017 年 10 月 17 日 Aichi

⑬Ahammad K, Ieda R, Hirase S, Koyama T, Tasumi S, Hosoya S, Kikuchi K, Footprints of selection around the sex determining gene in fugu. International symposium, Fisheries Science for Future Generations, 2017 年 9 月 21 日～2017 年 9 月 23 日 Tokyo

⑭小山喬・森島輝・鈴木穣・内野翼・坂本崇・

菊池潔， ターゲットエンリッチメント法と長鎖シーケンサーによる領域特異的塩基配列決定の試み. NGS 現場の会, 2017 年 5 月 22 日～2017 年 5 月 24 日　宮城

⑮菊池潔， 水産学会賞受賞者講演　ゲノムワイド解析によるフグ性決定遺伝子の同定.（招待講演）日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 27 日～2017 年 3 月 30 日 東京

⑯佐藤茉菜・細谷将・吉川壮太・菊池潔， アンプリコシーケス法による高速ジェノタイピング技術の確立. 日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 27 日～2017 年 3 月 30 日 東京

⑰小山喬・森島輝・鈴木穣・内野翼・坂本崇・菊池潔，ターゲットキャプチャー法によるブリ W 染色体塩基配列決定の試み. 日本水産学会春季大会，2017 年 3 月 27 日～2017 年 3 月 30 日 東京

⑱菊池潔，世界の水産養殖産業大躍進とその基盤技術.（招待講演） 日本農学会　公開シンポジウム，2017 年 3 月 11 日　東京

⑲菊池潔，ゲノム情報は本当に水産に役立つのか？ - 14 年間の定点観測から-.（招待講演） 第６回太平洋中海域トラフグ研究，2016 年 12 月 15 日～2016 年 12 月 16 日　愛知

⑳家田梨櫻・カビールアハマド・小山喬・藤田真志・平瀬翔太朗・細谷将・田角聡志・菊池潔， 浜名湖を中心とした日本近海のフグにおける性決定遺伝子の進化. 浜名湖をめぐる研究者の会，2016 年 12 月 10 日 静岡

㉑Ieda R, Hosoya S, Tasumi S, Kobayashi H, Suzuki S, Kikuchi K, Incipient transition of a sex determining gene in pufferfish closely-related to fugu.（招待講演）The 22nd International congress of zoology, 2016 年 11 月 14 日～2016 年 11 月 19 日 Okinawa

㉒家田梨櫻・細谷将・小山喬・田角聡志・鈴木重則・小林久人・菊池潔，NGS を用いたフグ類の性決定遺伝子の探索. 生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム，2016 年 9 月 6 東京

㉓Kikuchi K, I Turnover of sex chromosomes in pufferfishes.（招待講演） The workshop on sex chromosomes in frogs and fish, 2016 年 8 月 23 日 Hiroshima

㉔Kim D, Hosoya S, Kai W, Nozawa A, Jo Y, Suzuki Y, Tasumi S, Kikuchi K, Genetic basis of the parallel evolution of scale loss among closely-related species of fugu. The 7th World Fisheries Congress, 2016 年 5 月 23～2016 年 5 月 26 日 Korea

㉕小山喬・菊池潔・内野翼・坂本崇，ブリ性決定遺伝子座の高精度塩基配列決定，日本水産学会春季大会，2016 年 3 月 26 日～2016 年 3 月 30 日 東京

㉖家田梨櫻・青木勇磨・中村修・城夕香・小山喬・細谷将・田角聡志・菊池潔， ショウサイフグが獲得した新しい性決定遺伝子座の解析. 日本水産学会春季大会，2016 年 3 月 26 日～2016 年 3 月 30 日 東京

㉗細谷将・田角聡志・菊池潔， 全ゲノムリシーケンスによるトラフグ集団の解析-日本海群と太平洋群の比較-. 動物遺伝育種学会第 16 回神戸大会，2015 年 11 月 7 日～2015 年 11 月 8 日 神戸

㉘Ieda R, Hosoya S, Tasumi S, Suzuki S, Kikuchi K, Incipient transition of a sex-determining gene among closely related species of fugu. 43rd Scientific Symposium of the United State-Japan Natural Resource Aquaculture Panel, 2015 年 11 月 10 日～2015 年 11 月 11 日 長崎

㉙Hosoya S, Tasumi S, Kikuchi K, Whole genome re-sequencing of fugu populations. 43rd Scientific Symposium of the United State-Japan Natural Resource Aquaculture Panel, 2015 年 11 月 10 日～2015 年 11 月 11 日 長崎

㉚細谷将・田角聡志・菊池潔，全ゲノムリシーケンスによるトラフグの集団間比較　-日本海 vs. 太平洋-. 日本水産学会秋季大会，2015 年 9 月 24 日～2015 年 9 月 24 日 仙台

㉛小山喬・吉田一範・尾崎照遵・青木純哉・荒木和男・細谷将・菊池潔・坂本崇， 性染色体進化初期段階の実験モデルとしてのブリ類の有用性. 日本進化学会第 17 回大会，2015 年 8 月 20 日～2015 年 8 月 23 日 東京

㉜Ieda R, Hosoya S, Tasumi S, Suzuki S, Kikuchi K, Incipient transition of a sex determining gene in Takifugu pufferfish. The International Symposium on Aquaculture Genetics XII, 2015 年 7 月 22 日～2015 年 7 月 26 日 Spain

㉝小山喬・吉田一範・尾崎照遵・青木純哉・細谷将・荒木和男・坂本崇・菊池潔， ブリ性染色体では局所的な連鎖不平衡が観察される＋魚類コア遺伝子の網羅的同定の試み. NGS 現場の会， 2015 年 7 月 1 日～2015 年 7 月 3 日 茨城

〔図書〕（計１件）
①菊池潔， 水産遺伝育種学（担当　第 11 章水産育種におけるゲノム情報の利用），東北大学出版会，2017，101-132

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）

名称：ブリ類の性識別法
発明者：坂本崇・中本正俊・菊池潔・小山喬
権利者：同上

種類：特願 2018-027260
番号：22079701
出願年月：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/japanese.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・准教授
研究者番号：20292790

(2)研究分担者（H27 年度のみ）
小山　喬（KOYAMA, Takashi）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・研究員
研究者番号：40749701

(3)連携研究者
田角　聡志（TASUMI, Satoshi）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号：90359646

細谷　将（HOSOYA, Sho）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：60526466

（H27 年度のみ）
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：40313390

(4)研究協力者
水野　直樹（MIZUNO, Naoki）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・技術専門職員

城　夕香（JYO, Yuka）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・技術専門職員

藤田　真志（FUJITA, Masashi）
東京大学・大学院農学生命科学研究科・技術職員