

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号： 12601
 研究種目： 基盤研究（S）
 研究期間： 2008 ～ 2012
 課題番号： 20228003
 研究課題名（和文） ゲノム育種によりトラフグの優良品種作出をめざす

研究課題名（英文） Improved breeding of fugu following whole genome Sequencing

研究代表者

鈴木 譲（SUZUKI Yuzuru）
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号： 40107412

研究成果の概要（和文）： 全ゲノムが解読された最初の食用魚であるトラフグを用いて、有用形質を支配する遺伝子の特定めざした。トラフグとクサフグなどの種間交雑を進めて解析することにより、体サイズ、脊椎骨数、鱗の有無、寄生虫耐性、警戒心の強さ、淡水適応能力に関する遺伝子の染色体上の位置が特定され、ゲノム情報に基づく優良個体選抜育種への道筋をつけることができた。また、性決定遺伝子の特定に成功し、雄の価値が高いこの魚における性制御技術の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）： As the first commercially valuable fish species, tora-fugu (*Takifugu rubripes*) genome was sequenced. We tried to utilize this genome information for improved breeding of this species. We found specific loci responsible for each phenotypes, such as body size, scale development, resistance against a specific parasite, and behavioral patterns, using inter-species hybridization among *Takifugu* species. In addition, we found sex determination gene, and developed sex control system of this species, in which male is more valuable.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	46,600,000	13,980,000	60,580,000
2009年度	31,300,000	9,390,000	40,690,000
2010年度	22,600,000	6,780,000	29,380,000
2011年度	23,300,000	6,990,000	30,290,000
2012年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
総計	146,600,000	43,980,000	190,580,000

研究分野：水産学一般→水産学一般

科研費の分科・細目：

キーワード：遺伝育種、トラフグゲノム、耐病性、体サイズ、行動、棘、性決定

1. 研究開始当初の背景

2002年、魚類で初めてトラフグの全ゲノムが解読された。これを受け、我々はいち早く遺伝育種学への応用に着手した。ゲノム情

報は高度に断片化されていたが研究に必須の連鎖地図を作製することができ、種間交雑フグを適用して有用形質を支配する遺伝子の解析に取り組んだ。2005年からは基盤研

究 (A)「ゲノム育種によりトラフグの耐病性品種作出をめざす」を受け、寄生虫耐性に関わる遺伝子に注力していたが、様々な解析家系を作出することができるようになり、他の多くの有用形質にも取り組めるようになった。こうした背景から、最終年度の前年に基盤研究 (S) に応募し、本研究に取り組むこととなった。

2. 研究の目的

有用形質を支配する遺伝子を特定し、優良個体を選抜して行くゲノム育種への道筋をつけようとするのが本研究の目的である。トラフグとクサフグなどの種間交雑第2世代 (F2) や戻し交配世代 (BC) を解析家系として用いることにより、種ごとのさまざまな形質の違い、特に育種の目標となる高成長、耐病性などの有用な形質を支配する遺伝子領域が解析するのが大きな特徴である。

3. 研究の方法

(1) 公開されたトラフグのゲノム情報は Scaffold と呼ばれる短い配列情報の集合であった。そこで、各 Scaffold からマイクロサテライトマーカー候補を抽出し、トラフグの交配家系を用いた連鎖解析を行なうことにより、それらの染色体上の位置を特定し、ゲノム地図作製して行く。

(2) トラフグ属 (*Takifugu* spp.) の魚は種間で交雑第2世代、戻し交配世代などが自由に作出可能である。そのことを利用し、様々な種間交雑世代を作出し、連鎖解析を進めることにより体サイズ、寄生虫耐性/感受性、警戒心の強さなど、様々な形質の種間差を支配する遺伝子座を特定して行く。ゲノム配列情報を参照し、候補となる遺伝子を検索する。遺伝子の機能を解析するなど、有用形質を支配する遺伝子候補の絞り込みをはかり、ゲノム育種への道筋を立てて行く。

(3) 寄生虫耐性とも密接にかかわると考えられる免疫機構の理解を深めるため、トラフグのゲノム情報を利用して、魚類における様々な免疫関連遺伝子を特定し、その機能を明らかにして行く。

(4) 当初の計画にはなかったが、別プロジェクトを引き継ぐ形でトラフグの性決定遺伝子の特定と全雄作出技術の開発にも取り組む。

(5) トラフグは性成熟に3年かかるため、選抜育種には長い年月を要する。育種の効率化を図るために、より短期間での成熟を誘起するためのホルモン処理などを検討する。

4. 研究成果

(1) トラフグのゲノムデータは数千の断片配列のままであったが、ターゲットマップ法によりゲノム断片をつなぎ合わせた22本の染色体を再構築し、詳細なゲノム地図を完成させた。データはすべて水産実験所のホームページ上に公表した。この地図の完成により全配列の86%について染色体上の位置情報を提供することが可能となり、遺伝子座の特定から候補遺伝子を絞り込む本研究の目的に十分資するレベルに達した。このデータは共同研究相手のシンガポール IMBC によるトラフグゲノムアッセムブリーの飛躍的な充実をもたらした。Ensembl を通じて Fugu V5 として2010年に公表した。

(2) さまざまな種間交雑により、体サイズ、脊椎骨数、棘の発達といった形態形質、寄生虫耐性/感受性、警戒心で表される行動様式、淡水への適応能力、に連鎖するゲノム領域の解析を進めた。

① 形態形質として、まず体サイズを支配する遺伝子を1番染色体の114遺伝子を含む領域に絞り込むことができた。この領域には成長ホルモンや IGF ファミリーは含まれていなかったが、成長ホルモンの発現制御に関わる因子が含まれており、今後の遺伝子特定が期待される。

脊椎骨数はトラフグ、クサフグとの間で体サイズとは異なる3領域が認められた。クサフグ、ヒガンフグ間ではそれと共通する1領域と異なる1領域が認められ、脊椎骨数を決める遺伝子座は複数あるが、種によりその貢献度が異なることが明らかとなった。

体表に棘状の鱗が発達したクサフグと退化したヒガンフグ間で連鎖解析を行なったところ、鱗形成に関わる持つ遺伝子座が2番染色体上に認められた。その領域には39個の予想遺伝子が含まれていたが、鱗形成への関与が知られる、EDA や FGF のシグナル伝達系の遺伝子は含まれていなかった。

② トラフグは *Heterobothrium okamotoi* (通称エラムシ) という寄生虫に感染しやすく、養殖現場では大きな被害を受けているが、クサフグでは寄生が見られない。種間交雑世代を用いて調べた結果、9番染色体にこの寄生虫に対する耐性/感受性と強く相関する領域が認められた。一方、また鰓で発現する遺伝子を両種で比較したところ、いくつかの遺伝子候補が見いだされたが、これまでの解析では連鎖解析の結果と結びつけることができなかった。

③ トラフグに比べてクサフグは警戒心が強く、行動には遺伝的な差があるが、給餌者

への接近, 新たな環境への移し替え後の遊泳位置など, 様々な形質ごとに複数の遺伝子座が認められた. その中で1, 9, 22 番染色体の領域は複数の形質に連鎖していることから, 多面的な影響力を持つ主要な遺伝子座であることが示された.

(3) 寄生虫耐性には免疫系の関与が考えられることから, ゲノム情報に基づき様々な免疫関連遺伝子を探査した. 侵入した病原生物を最初に認識し, その抗原情報を提供して免疫応答を誘起することに関わる細胞が抗原提示細胞であるが, そのマーカーとなる B7 ファミリーを魚類で初めて見出した. その他にも多くの遺伝子を明らかにしてきたことで, トラフグは魚類の中でも最も免疫関連遺伝子情報の充実した魚と位置付けられるようになり, 今後の育種を進める際の指標としての利用が期待される.

(4) トラフグの性が抗ミュー管ホルモン受容体の遺伝子 *Amhr2* の 1 塩基の違いにより決定されることがほぼ明らかとなっていたが, その違いが機能の差を生み出していることを *in vitro* の系で実証した. その後, 異なる性決定様式をもつサフグに, トラフグ雄型の *Amhr2* の遺伝子導入を施したところ, 雄化を誘導したことから, 本遺伝子が性決定遺伝子であることの確証が得られた.

別途仔魚期に女性ホルモン処理により雌化した XY 個体から得た卵を, 通常の XY 雄の精子で受精させた結果, YY 超雄個体を得ることができた. この YY 個体から得た精子で通常の XX 雌由来の卵を受精させたところ, 調べた 80 個体すべてが雄になっていることが確認された. トラフグは白子がとれる雄の市場価値が高いことから, 精子の販売という実用段階にまで至った.

(5) トラフグの稚魚期から日長, 水温を制御し, 1 年間に 2 回の夏, 冬の環境を与えたが, 性成熟は通常飼育と変わらなかった. 一方, 6 か月令から雄個体にサケ脳下垂体エキスを繰り返し与えたところ, 5 カ月後には活発な精子形成が観察されるまでに至り, 少なくとも雄ではホルモンによる催熟が可能であることが分かった.

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 13 件)

1. Hosoya, S., Kido, S., Hirabayashi, Y., Kai, W., Kinami, R., Yoshinaga, T., Ogawa, K., Suetake, H., Kikuchi, K., and Suzuki, Y. (2013): Genomic regions of

- pufferfishes responsible for host specificity of a monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi*. *Intl. J. Parasitol.*, in press
2. Hosoya, S., Kai, W., Fujita, M., Miyaki, K., Suetake, H., Suzuki, Y., and Kikuchi, K. (2013): The genetic architecture of growth rate in juvenile *Takifugu* species. *Evolution*, 67: 590–598. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2012.01781.x
 3. Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., and Kikuchi, K. (2012): A Trans-species Missense SNP in *Amhr2* is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet* 8: e1002798. doi:10.1371/journal.pgen.1002798.
 4. 菊池潔・甲斐渉・細谷将・田角聡志・末武弘章・宮台俊明・鈴木讓 (2012): トラフグのゲノム地図の作製とその応用—性決定遺伝子, 性統御, 比較ゲノム解析を中心に—. *水産育種*, 41, 141-151.
 5. Kai, W., Kikuchi, K., Tohari, S., Chew, S.K., Tay, A., Fujiwara, A., Hosoya, S., Suetake, H., Naruse, K., Brenner, S., Suzuki, Y., and Venkatesh, B. (2011): Integration of the Genetic Map and Genome Assembly of Fugu Facilitates Insights into Distinct Features of Genome Evolution in Teleosts and Mammals. *Genome Biology and Evolution*, 3, 424-442. doi:10.1093/gbe/evr041
 6. Toda, H., Saito, Y., Koike, T., Takizawa, F., Araki, K., Yabu, T., Somamoto, T., Suetake, H., Suzuki, Y., Ototake, M., Moritomo, T., and Nakanishi, T. (2011): Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35, 650-660. doi:10.1016/j.dci.2011.01.013
 7. Odaka, T., Tsutsui, S., Sugamata, R., Suetake, H., Miyadai, T., Suzuki, Y., Watanabe, T., and Nakamura, O. (2011): The plasmablast-like leukocyte in the kidney of fugu (*Takifugu rubripes*). *Fish Shellfish Immunol.*, 30, 682-690. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.018
 8. 菊池潔・甲斐渉・細谷将・末武弘章・鈴木讓 (2010): 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*, 42, 363-371.
 9. Sugamata, R., Suetake, H., Kikuchi, K., and Suzuki, Y. (2009): Teleost B7s expressed on monocytes regulate T cell responses. *J. Immunol.*, 182, 6799-6806. doi/10.4049/jimmunol.0803371

10. Hosoya, S., Kaneko, T., Suzuki, Y. and Hino, A. (2008): Individual variations in behavior and free cortisol responses to acute stress in tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Fisheries Sci.* 74, 755–763.
doi:10.1111/j.1444-2906.2008.01586.x
11. Araki, K., Akatsu, K., Suetake, H., Kikuchi, K., and Suzuki, Y. (2008): Characterization of CD8-positive leukocytes in fugu (*Takifugu rubripes*) with antiserum against fugu CD8 α . *Dev. Comp. Immunol.* 32, 850–858.
doi:10.1016/j.dci.2007.12.005
12. 菊池潔, 甲斐渉, 末武弘章, 鈴木讓 (2008): 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*, 38, 25–30.
13. 渡部終五・木下滋晴・池田大介・古川聡史・鈴木讓・菊池潔・甲斐渉 (2008): ゲノムデータベースを利用したトラフグ優良形質遺伝子の探索, *水研センター研報* 26, 83–89.
- [学会発表] (計 99 件)
1. 菊池潔・野澤碧・城夕香・藤田真志・水野直樹・濱崎将臣・鈴木重則・田角聡志・鈴木讓: 超雄トラフグ (YY 型魚) の作出とその生存率. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.3.26-30., 東京
2. 家田梨櫻・穴井康崇・藤田真志・渥美九郁・田島祥太・中村修・田角聡志・鈴木讓・菊池潔: トラフグの雄型性決定遺伝子はクサフグを雄化する. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.3.26-30., 東京
3. 細谷将・丹羽悠二・水野直樹・鈴木讓・菊池潔: 連続戻し交雑家系を用いたトラフグ“噛み合い”遺伝子座の探索. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.3.26-30., 東京
4. 田角聡志・山口晶・筒井繁行・中村修・菊池潔・鈴木讓: トラフグとクサフグの鰓において存在量の異なる膜タンパク質の単離. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.3.26-30., 東京
5. 菊池潔・濱崎将臣・宮木廉夫・土井啓行・合田知樹・藤田真志・鈴木讓: 遡河回遊のゲノムワイド遺伝解析にむけて—河にさかのぼるフグと海産フグの遺伝学—. 平成 24 年度日本水産学会秋季大会. 2012.9.15., 下関
6. Tauchi, H., Suetake, H., Odaka, T., Kaneda, M., Maeda, T., Kikuchi, K., Suzuki, Y., and Miyadai, T.: A fish chemokine expressed in the secondary lymphoid organs in fugu *Takifugu rubripes*. 12th Congress of ISDCI 2012.7.9-13. Fukuoka
7. Tasumi, S., Yamaguchi, A., Hirabayashi, Y., Kido, S., Kobayashi, K., Kai, W., Hosoya, S., Tsutsui, S., Nakamura, O., Suetake, H., Kikuchi, K., and Suzuki, Y.: Candidate key molecule(s) determining host specificity of parasite on the pufferfish, *Takifugu rubripes*. 12th Congress of ISDCI 2012.7.9-13. Fukuoka
8. 鈴木讓・菊池潔: トラフグのゲノム育種. 日本水産学会シンポジウム「フグ研究とトラフグ生産技術開発の最前線」, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会. 2011.10.2., 長崎
9. 合田知樹・細谷将・城夕香・菊池潔・鈴木讓: 近縁種間で脊椎骨数の差をもたらす遺伝子座. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会. 2011.9.30., 長崎
10. 平林陽・木戸慎一・木南竜平・細谷将・甲斐渉・菊池潔・城夕香・末武弘章・良永知義・小川和夫・鈴木讓: 寄生虫の宿主特異性に関わるフグ遺伝子の探索. 日本比較免疫学会第 23 回学術集会. 2011.8.22., 横浜
11. Yamanoue, Y., Kai, W., Kuroyanagi, W., Hosoya, S., Suetake, H., Suzuki, Y., and Kikuchi, K.: Genetic Basis of Parallel Evolution of Scale Loss in *Takifugu* Pufferfishes. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2011.7.26-30 Kyoto
12. 菊池潔・甲斐渉: フグのゲノム地図作成と性統御および育種への応用. 日本水産学会シンポジウム「水産育種におけるゲノム情報利用の現状と将来展望」, 平成 23 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 333. 2011.3.
13. Kikuchi, K., Kai, W., Kuroyanagi, M., Nozawa, A., Hosoya, S., Suetake, H., and 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., Kobe
14. Hosoya, S., Kikuchi, K., Kai, W., Mizuno, N., Suetake, H., and Suzuki, Y.: Genetic architecture of interspecific differences in growth of pufferfishes. 9th International Congress for the Biology of Fish, 2010.7.5., Barcelona, Spain.
15. 甲斐渉・菊池潔・末武弘章・鈴木讓: Fugu version 5—トラフグのゲノム地図—. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 2010.3.29., 神奈川
16. 菊池潔・甲斐渉・細谷将・木戸慎一・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 QTL 解析, 2009 年度日本魚類

- 学会シンポジウム. 2009.10.12., 東京
17. Kido,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*. 11th Congress of ISDCI, 2009.7.3., Prague, Czech Republic
 18. Sugamata R., Suetake H., Jo Y., Kikuchi K., and Suzuki Y.: Teleost B7 molecules on monocytes regulate T cell responses. 11th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2009.6.29., Prague, Czech Republic
 19. Kikuchi,K., Kai,W., Kido,S., Kamiya,T., Hosoya,S., Suetake,H., and Suzuki,Y.: Fugu genome map and its application in aquaculture 5th World Fisheries Congress 2008.10.20-24.,Yokohama
 20. 鈴木讓：トラフグのゲノム解読が魚類養殖を変える。第5回東京大学の生命科学シンポジウム。2008.4.19.東京

[図書] (計1件)

1. 鈴木讓・菊池潔 (2012) : トラフグのゲノム育種. 長島裕二・村田修・渡部終五編「フグ研究とトラフグ生産技術の最前線」, 恒星社厚生閣, pp69-83.

[その他]

データベースの構築

Fifth Genome Assembly (IMCB のサイト) :

<http://www.fugu-sg.org/>

トラフグ連鎖地図 :

<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/Fugu-Map/map.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 讓 (SUZUKI YUZURU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 40107412

(3) 連携研究者

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

末武弘章 (SUETAKE HIROAKI)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号 : 00334326