

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18741

研究課題名(和文) 近縁種の連鎖不平衡マッピング ブリ属性決定遺伝子の同定にむけて

研究課題名(英文) Linkage disequilibrium mapping using closely related species -Toward the identification of sex-determining gene in genus *Seriola*-

研究代表者

小山 喬 (Koyama, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：40749701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、カンパチの性がステロイド代謝酵素の一つであるHsd17b1上の1つのSNPで決められていることを遺伝学的に見出した。このSNPはブリにも存在し、その遺伝子型はブリの性とも100%一致していた。オス型HSD17B1は派生型で、性決定SNPにより144番目のグリシンがグルタミン酸へ置換されるために、活性中心の水素結合が阻害され、メス型よりもエストラジオール(E2)合成能が低いことが判明した。よってブリ属では、遺伝的メスはメス型HSD17B1により十分量のE2が作られるためメス化し、遺伝的オスはオス型HSD17B1が十分なE2合成能を持たないためにオス化すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, using genomic, genetic, biochemical, computational, and histological approaches, we found that a single-nucleotide polymorphism (SNP) in one of the steroidogenic enzyme genes, 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (Hsd17b1), is a genetic sex determiner in a ZZ/ZW sex determination system of two *Seriola* fishes. This sex-determining SNP causes a non-synonymous change from glycine on the W chromosome to glutamic acid on the Z near the catalytic center of Hsd17b1, which disrupts the hydrogen-bond network among steroids and the catalytic residues of the enzyme. Consequently, inter-conversion between 17-keto and 17 α -hydroxy steroids is attenuated in the Z. Based on these results, we conclude that homozygosity for the Z allele results in testis formation due to the reduced enzymatic activity of its gene product and the resultant shortage of estradiol, whereas Z/W heterozygosity promotes the development of ovaries due to active W.

研究分野：魚類遺伝学

キーワード：ブリ属 性決定遺伝子 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

ブリは国内生産量第1位で、完全養殖への移行が急ピッチで進んでいる主要養殖魚である。完全養殖への移行に伴い、生産効率を改善するための育種研究も精力的に行なわれている。大型養殖魚であるブリは、育種研究における親魚育成/管理に莫大なコストがかかるが、初期の雌雄判別が可能になれば、大幅なコスト削減が期待できる。以上のことから研究開始当初までに、ZZ/ZW型性決定システムを持つブリで性決定遺伝子の同定を目指して研究を行ってきた。連鎖解析により性決定遺伝子の存在が予想されるゲノム領域(性決定領域)が同定できたことから、そのゲノム配列を解読し、複数のSNPマーカーを用いて関連解析を実施した。しかし、ブリでは性決定領域において最低200kbに渡って組換えが強く抑制された領域(連鎖不平衡ブロック、またはLDブロック)が存在したためにそれ以上領域を絞り込むことができず、性決定遺伝子を同定できなかった。

2. 研究の目的

ブリ性染色体のLDブロックは、組換えが抑制されているゲノム領域をもつ他の生物のものと比較すると、非常に局所的なものであった。加えて近縁種間では、局所的な組換え頻度のパターンが異なる場合があることが報告されている(引用文献①~④)。以上のことから本研究では、性決定遺伝子周辺で組換え抑制のパターンが異なり、かつブリと性決定遺伝子を共有しているブリ近縁種を探し出し、ブリ属の性決定遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ブリ属近縁種のLDパターンの解析

ブリ、ヒラマサ、カンパチのブリ属3種について、非血縁の雌雄各5尾に由来するゲノムDNAを全ゲノムリシーケンシングに供した。得られたリードデータをブリ性決定領域ゲノム配列にマッピングし、SNP情報を取得した。このSNP情報を用いて、ブリ属3種のブリ性決定領域におけるLDの度合いを推定した。

(2) カンパチ性決定領域のゲノム配列決定

ブリ性決定領域と相同なゲノム領域をカンパチで単離、配列決定するため、長鎖シーケンサーに対応したターゲットエンリッチメント法を開発した。得られた部位特異的ゲノムDNA断片をPacific Biosciences社RS IIを用いてシーケンシングに供し、リードデータをCanuアセンブラでアセンブルした。

(3) カンパチ野生個体を用いた領域特異的高解像度関連解析

(2)で得たカンパチゲノム配列よりプライマーを設計し、雌雄各48尾からなるカンパチ非血縁個体96尾のゲノムDNAからLong PCR法によりターゲット領域の増幅を行った。得

られたPCR産物をシーケンシングに供し、リードデータを(2)で得たカンパチゲノム配列にマッピングしてSNP/InDel情報を取得した。これを用いて領域特異的高解像度関連解析を実施した。

(4) ブリ野生個体を用いたカンパチ性決定遺伝子(*Hsd17b1*)の相関解析

(3)で得られたカンパチ性決定SNPの遺伝子型(Z/Z型かZ/W型か)を判定できる制限酵素BsaWIを用いて、PCR-RFLP遺伝子型判別システムを構築した。このシステムを用いて、雌雄判別済みブリ野生個体93尾の遺伝子型判定を行い、性と遺伝子型の関連解析を実施した。

(5) カンパチ・ブリ性決定遺伝子*Hsd17b1*のcDNAクローニング

カンパチとブリの卵巣よりtotal RNAを抽出し、定法に従ってRACE PCR用cDNAを調整した。これを鋳型として、RACE PCRを行い、カンパチ・ブリ*Hsd17b1*の全長cDNA配列を単離し、塩基配列決定した。

(6) カンパチ*Hsd17b1*の機能解析

(5)で得られたカンパチ*Hsd17b1*全長cDNA配列のうち、開始コドンから終始コドンまでの領域をpColdベクターに組み込んだ。このプラスミドを組換えタンパク質発現用宿主大腸菌に導入し、組換えタンパク質を調整した。得られたタンパク質を各種ステロイド基質と反応させ、代謝されたステロイドの種類と量をLC/MS/MSにより同定・定量した。

また、(5)で決定したW型カンパチ*Hsd17b1*の演繹アミノ酸配列と、ヒトHSD17B1のアミノ酸配列とをアライメントした。得られたアライメント結果とヒトHSD17B1タンパク質立体構造データを用いて、カンパチW型HSD17B1タンパク質立体構造のホモロジーモデリングを行った。カンパチZ型HSD17B1立体構造データはW型立体構造データの一部を改変(変異アミノ酸の置換)して生成した。Z型およびW型HSD17B1タンパク質の水溶液中での振る舞いを、上記立体構造データを用いた分子動力学(MD)シミュレーションにより検証した。

(7) カンパチ*Hsd17b1*の発現解析

PFA固定した受精後46日(形態的性分化前)と88日(形態的性分化後)のカンパチ仔稚魚より作製した切片を用いて、*Hsd17b1*とその他の主要なステロイド代謝酵素である*Cyp19a1a*と*Cyp17a1*、および生殖細胞マーカーである*Vasa*の生殖腺における発現と局在を*in situ* hybridization法により検討した。

4. 研究成果

(1) ブリ属近縁種のLDパターンの解析

ブリ、ヒラマサ、カンパチの全ゲノムリシーケンスデータより抽出した各SNPサイトのペアについて、総当たりでLDの度合いを推定したところ、3種間でLDパターンの明瞭な違いが観察された。ブリでは性決定領域を含む約200kbのゲノム領域で、強いLDが観察さ

れた。ヒラマサではブリよりも狭い領域で強い LD が観察された。一方カンパチでは強い LD は観察されなかった。以上のことから、ブリ属の性決定遺伝子を同定するにはカンパチが理想的な材料であることが強く示唆された。

(2) カンパチ性決定領域のゲノム配列決定
エンリッチメント産物のシーケンシングの結果、約 1Mb のカンパチ性決定領域ゲノム配列を決定することに成功した。このゲノム配列とブリ性決定領域ゲノム配列を比較したところ、カンパチではブリ性決定領域の一部の配列(約 20kb)が存在していなかったが、その他の領域については大きな構造変化もみられず、遺伝子の並び等もよく保存されていた。

(3) カンパチ野生個体を用いた領域特異的高解像度関連解析

関連解析の結果、連続した 4 つの SNP サイトにおいて性と有意な関連を検出した。そのうちもっとも関連値が高かった SNP は、*Hsd17b1* 遺伝子のエキソン上に存在していた。

(4) ブリ野生個体を用いたカンパチ性決定遺伝子 (*Hsd17b1*) の関連解析

カンパチ *Hsd17b1* 上に存在し、性と強い関連を示す SNP はブリにも存在していた。ブリで関連解析を実施したところ、この SNP の遺伝子型はブリの性別と 100%一致していた。つまり、*Hsd17b1* 遺伝子はカンパチだけでなくブリでも性決定遺伝子として働いていることが強く示唆された。カンパチとブリはブリ属の中で最初に種分化したことが報告されている(引用文献、)。よって、*Hsd17b1* が性決定機能を獲得した時期はブリ属の種分化開始以前であった可能性が高い。以上のことから *Hsd17b1* 遺伝子はブリ属性決定遺伝子であると結論付けた。

(5) カンパチ・ブリ性決定遺伝子 *Hsd17b1* の cDNA クローニング

カンパチとブリで *Hsd17b1* 遺伝子の全長 cDNA 配列を取得した。演繹アミノ酸配列を用いて、Z 型 HSD17B1 と W 型 HSD17B1 を比較したところ、ブリ属性決定 SNP は 144 番目のアミノ酸サイトにおいて非同義置換をもたらすことが分かった。他生物種 HSD17B1 アミノ酸配列と比較したところ、144 番目のアミノ酸サイトでグリシン (Gly144) をコードする W 型 HSD17B1 が祖先型で、グルタミン酸 (Glu144) をコードする Z 型 HSD17B1 が派生型であることが明らかとなった。

(6) カンパチ *Hsd17b1* の機能解析

Z および W 型 HSD17B1 組換えタンパク質を用いて各種ステロイドの代謝活性を調べたところ、Z 型 HSD17B1 は各種ステロイド代謝活性が W 型に比べて総じて低かった。

ヒト HSD17B1 タンパク質 - エストロン (E1) - NADP⁺ の結晶構造解析の報告によると、HSD17B1 アミノ酸配列の、142 番目のセリン (Ser142) と 155 番目のチロシン (Tyr155) および E1 の C17 カルボニル基が水素結合ネ

ットワークを形成することにより、E1 からエストラジオール (E2) が代謝される(引用文献)。MD シミュレーションで Ser142 側鎖水素原子 (Ser142_H) と Tyr155 側鎖酸素原子 (Tyr155_O) との間の距離の分布を調べたところ、カンパチ W 型 HSD17B1 の分布では見られた 0.25nm 以下のピークが Z 型 HSD17B1 では消失していた。これは、Z 型 HSD17B1 では Ser142_H がと Tyr155_O との間で水素結合が形成されにくいことを意味している。この原因を調べたところ、Z 型 HSD17B1 において Ser142_H は、Glu144 側鎖の酸素原子 (Glu144_O) と頻繁に水素結合を形成しており、そのために Ser142_H-Tyr155_O 間で水素結合が形成されにくくなっていることが判明した。以上のことから、ブリ属では Z 型 *Hsd17b1* をホモ接合で持つ遺伝的オスでは、Z 型 HSD17B1 の Glu144_O によって Ser142_H-Tyr155_O 間の水素結合が十分に形成されないために E1 代謝が起こりにくい状況が未分化生殖腺内で発生して精巣分化が開始され、W 型 *Hsd17b1* をもつ遺伝的メスでは Ser142_H-Tyr155_O 間の水素結合が良く形成されるために十分量の E2 が生殖腺で作られ、卵巣分化が起こるものと考えられた。

(7) カンパチ *Hsd17b1* の発現解析

Hsd17b1 は未分化生殖腺の段階から生殖細胞を取り囲む細胞を含む体細胞で広く発現していた。一方、*Cyp17a1* と *Cyp19a1a* は形態的性分化が始まる時期の生殖腺でしか発現が認められなかった。また *Cyp19a1a* の発現は遺伝的メスでのみ観察された。

< 引用文献 >

Smukowski CS, Noor MA. Recombination rate variation in closely related species. *Heredity* (Edinb)., 107, 2011, 496-508

Stapley J, Feulner PGD, Johnston SE, Santure AW, Smadja CM. Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 372, 2017, 20160455

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, Kikuchi K. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet.*, 8, 2012, e1002798

Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol Appl.*, 6, 2013, 486-496

Santini F, Carnevale G. First multilocus and densely sampled timetree of trevallies, pompanos and allies

(Carangoidei, Percomorpha) suggests a Cretaceous origin and Eocene radiation of a major clade of piscivores. Mol Phylogenet Evol., 83, 2015, 33-39

Swart BL, von der Heyden S, Bester-van der Merwe A, Roodt-Wilding R. Molecular systematics and biogeography of the circumglobally distributed genus *Seriola* (Pisces: Carangidae). Mol Phylogenet Evol., 93, 2015, 274-280

Breton R, Housset D, Mazza C, Fontecilla-Camps JC. The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. Structure., 4, 1996, 905-915

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Ieda 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
- (2) Nakamoto M, Takeuchi Y, Akita K, Kumagai R, Suzuki J, Koyama T, Noda T, Yoshida K, Ozaki A, Araki K, Sakamoto T. A novel C-type lectin gene is a strong candidate gene for Benedenia disease resistance in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Dev Comp Immunol., 査読有, 76, 2017, 361-369. DOI: 10.1016/j.dci.2017.07.010

〔学会発表〕(計12件)

- (1) 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、プリ属の性決定遺伝子はステロイド代謝酵素である、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
- (2) 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、プリ属性決定遺伝子の機能解析、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
- (3) 中本正俊、小山喬、水野直樹、菊池潔、坂本崇、プリ属性決定遺伝子の発現解析、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
- (4) 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プリ属性決定遺伝子の機能解析、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
- (5) 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、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年

- (6) 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、平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
- (7) 菊池潔、小山喬、車遥介、プリ属性決定遺伝子の同定と性染色体進化、DMY研究会、2017年
- (8) 小山喬、森島輝、鈴木穰、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現場の会第五回研究会、2017年
- (9) 小山喬、森島輝、鈴木穰、内野翼、坂本崇、菊池潔、ターゲットキャプチャー法によるプリW染色体塩基配列決定の試み、平成29年度日本水産学会春季大会、2017年
- (10) 家田梨櫻、カビールアハマド、小山喬、藤田真志、平瀬翔太郎、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
- (11) 佐藤耕平、伊藤洸太郎、小山喬、城夕香、細谷将、菊池潔、遡河回遊の進化に伴う淡水適応能獲得の遺伝基盤、浜名湖をめぐる研究者の会、2016年
- (12) 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、2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 喬 (KOYAMA, Takashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員
研究者番号: 40749701

(2) 研究協力者

中本 正俊 (NAKAMOTO, Masatoshi)
東京海洋大学・学術研究院・博士研究員
山下 雄史 (YAMASHITA, Takefumi)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授
水野 直樹 (MIZUNO, Naoki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・技術専門職員
田角 聡志 (TASUMI, Satoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教
細谷 将 (HOSOYA, Sho)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教
宇野 誠一 (UNO, Seiichi)
鹿児島大学・水産学部・准教授

豊田 敦 (TOYODA, Atsushi)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・特任教授
坂本 崇 (SAKAMOTO, Takashi)
東京海洋大学・学術研究院・教授
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