

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05816

研究課題名(和文) ゲノム編集とターゲットシーケンスによる特定ゲノム領域内の責任遺伝子単離の高速化

研究課題名(英文) Isolation of causative gene in target genomic regions using genome editing in ayu, *Plecoglossus altivelis*

研究代表者

中本 正俊 (Nakamoto, Masatoshi)

東京海洋大学・学術研究院・博士研究員

研究者番号：80447721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アユの養殖では子持ちアユとしてメスが珍重されており、全雌生産のために遺伝的性判別のニーズが存在する。本研究ではこれまでの天然魚を用いた遺伝解析により同定された雄特異的なゲノム領域に位置する性決定遺伝子候補についてゲノム編集を行いその機能を明らかにすることを目的とした。その結果、性決定遺伝子候補に変異が導入された遺伝的雄個体では卵巣が形成された。次に生殖腺の性分化前の個体についてアユ性決定遺伝子候補のmRNAの発現を解析した。性決定遺伝子候補は遺伝的雄個体でのみ生殖細胞を取り囲む体細胞で発現が検出され、この遺伝子によってアユの性が決まることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産重要種であるアユの養殖においては子持ちアユとしてメスが珍重されており、全雌生産のために遺伝的性判別のニーズが存在する。アユはXX-XY型の性決定様式でありY染色体上の性決定遺伝子によって性が決まると考えられている。本研究によりアユの性決定遺伝子が同定され、確実に遺伝的性を判別できる遺伝マーカーが開発されたことにより、遺伝的性を養殖の初期段階で判別することでより多くの雌を生産することが可能となる。またXX個体に対してホルモン処理等の性転換処理を行いXX雄を作出することで全雌生産ができるようになる。

研究成果の概要(英文)：Ayu (or sweetfish), *Plecoglossus altivelis*, is widely distributed in East Asia. Ayu belongs to the superorder Stomiati and the order Osmeriformes. Stomiati is phylogenetically classified as sister group of Neoteleostei, the largest clade of bony fish including medaka, tuna and cod. Thus, ayu holds an important position in the fish tree of life. In Japan, female ayu are more economically important than males as food. Therefore, there is a need for genetic sex identification of ayu in aquaculture. We identified sex-associated loci by a genome-wide association study using wild populations. Expression analysis for the candidate gene of Y-linked sex determining gene revealed that mRNA of candidate gene was expressed in supporting cells surrounding germ cells in male undifferentiated gonad. Loss-of-function mutation for the candidate gene induced male to female sex reversal. Taken together, these results indicate that the candidate gene on the Y chromosome determines genetic sex.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：水産育種 ゲノム編集 アユ 性決定 性分化

1. 研究開始当初の背景

近年のシークエンス技術の発達とそれを利用した高密度 DNA マーカー開発法の確立により、水産対象種のような非モデル生物においても連鎖解析、ゲノムワイド関連解析といった遺伝学的な手法を用いて目的形質と連鎖した DNA マーカーを同定することが容易になりつつある。しかし一般的に遺伝学的に可能な限りの限局化を行った後であっても DNA マーカーと連鎖するゲノム領域は数百 kbp から数 Mbp におよび、その領域内には数十個以上の多数の遺伝子が含まれている。将来的な育種研究の動向としてはこのような特定ゲノム領域に位置する候補遺伝子の中から、目的形質の責任遺伝子を特定し形質発現の分子メカニズムを明らかにすることが求められる。

これまでのアユ (*Plecoglossus altivelis*) のドラフトゲノム配列の構築、性に関する連鎖解析・相関解析等の研究から Y 染色体上の性決定領域を約 1Mbp まで限局化することに成功した。性決定領域は組み換え抑制がかかった固定化された領域であるため遺伝学的手法によるさらなる限局化は困難であった。性決定領域内には転写調節因子、分泌因子およびそのレセプター、既知の遺伝子とは相同性がみられない新規遺伝子等約 200 個の候補遺伝子が位置していた。またこの領域内にはアユと系統的に近いとされていたサケ科魚類の性決定遺伝子である *sdv* は存在せず、別の遺伝子が性決定遺伝子であることが示唆された。

2. 研究の目的

水産重要種であるアユの養殖においては子持ちアユとしてメスが珍重されており、全雌生産のために遺伝的性判別のニーズが存在する。アユは XX-XY 型の性決定様式であり Y 染色体上の性決定遺伝子によって性が決まると考えられている。性決定遺伝子を同定し遺伝的性を養殖の初期段階で判別することでより多くの雌を生産することができる。また XX 個体に対してホルモン処理等の性転換処理を行い XX 雄を作出することで全雌生産が可能となる。これまでのアユ天然魚を用いた遺伝解析により Y 染色体 (雄) 特異的なゲノム領域が同定された。本研究ではこの領域に位置する性決定遺伝子候補について生殖腺での発現解析と *crispr/cas* 法によるゲノム編集を行いその機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

江戸川産のアユ天然魚、雄 24 尾、雌 24 尾についてイルミナ HiSeq4000 による genotyping-by-sequencing (GBS) 法によって、多摩川産のアユ天然魚、雄 10 尾、雌 9 尾についてイルミナ HiSeq X による全ゲノムリシーケンス法によって塩基多型情報を取得した。各解析で得られたシークエンスリードをアユ雄 1 個体由来の全ゲノム配列に対してマッピングし、SNP を取得した。得られた 25,118 SNP を用いたゲノムワイド相関解析により性と関連するゲノム領域を探索した。次に同定された性決定ゲノム領域内に位置する遺伝子の予測と配列相同性による機能の推定を行った、その結果、性決定に関わることが予測された性決定遺伝子候補について、RACE 法による cDNA 全長のクローニングを行った。また生殖腺の性分化過程での mRNA の発現解析と *crispr/cas* 法による機能欠損実験を行った。

4. 研究成果

アユ天然魚 67 尾 (雄 34 尾、雌 33 尾) から GBS 法および全ゲノムリシーケンス法により取得された SNP を用いてゲノムワイド相関解析を行った。その結果、ゲノムワイドで有意な SNP 15 個が 3 本のスキファールドにおいて同定された (図 1)。性と関連するスキファールドのサイズは 869.3 kb (scaffold A)、596.3 kb (scaffold B)、568.8 kb (scaffold C) であった。これらのスキファールドに全ゲノムリシーケンス法により取得したリードをマッピングした結果、雄個体ではリードがマップされるが、雌ではマップされない領域、すなわち Y 染色体 (雄) 特異的な領域が存在し、この領域が性決定遺伝子座であることが強く示唆された。遺伝子予測ソフトウェアを用いてこの Y 染色体特異的なゲノム領域に位置する遺伝子を予測した結果、23 個の予測遺伝子が位置することが明らかとなった。このうち、トランスポゾン関連遺伝子を除いた 10 個の予測遺伝子について配列相同性による機能の推定と RT-PCR 法による生殖

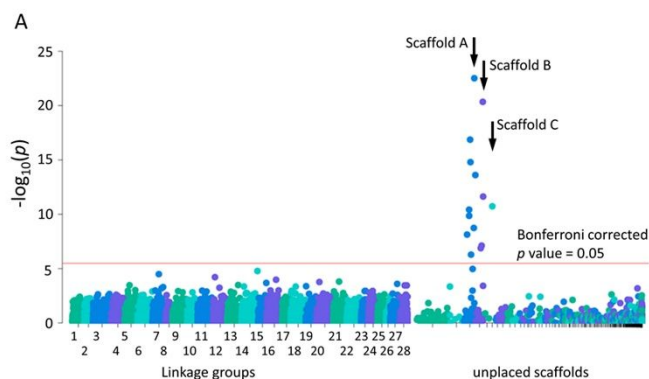


図 1 性に関するゲノムワイド関連解析

腺での発現解析を行った。その結果、雄特異的に生殖腺で発現している予測遺伝子が検出され、アユの性決定遺伝子候補であることが示唆された。RACE 法によりこの性決定遺伝子候補の cDNA のクローニングを行い、11 エクソンからなる、2017 bp の全長配列を明らかにした。

次に性決定遺伝子候補について crispr/cas 法によるゲノム編集を行うためのガイド RNA を合成し、Cas9 タンパク質とともにアユ受精卵へのマイクロインジェクションを行った。ガイド RNA 濃度を 25、50、100、200 ng/μl、Cas9 タンパク質濃度を 100、200、400 ng/μl、の条件でマイクロインジェクションを行い、至適条件を検討した。その結果、アユではガイド RNA 濃度 25 ~ 100 ng/μl、Cas9 タンパク質濃度 100 ng/μl の条件が最も生残率が高いことが明らかとなった。決定した至適条件でアユ受精卵へのマイクロインジェクションを行い、性決定遺伝子候補の機能欠損個体の作出を行った。解析した 149 個体のうち遺伝的雄 (XY) 個体は 77 個体であった。XY 個体について crispr の標的部位の塩基配列を解析した結果、25 個体で 11bp 欠失から 32bp 挿入までの様々な変異の導入が検出された。次に変異が導入された個体の生殖腺の組織学的観察を行った。一般的に魚類の初期性分化過程では最初に雌の生殖腺では始原生殖細胞は体細胞分裂によって増殖し、その後、始原生殖細胞は減数分裂を開始し卵母細胞に分化する。一方、雄の生殖腺では始原生殖細胞は分裂停止に入る。そのため、始原生殖細胞の数は雄よりも雌で多く、生殖腺のサイズも雌の方が大きい (図 2 D, E)。性決定遺伝子の機能欠損個体では、通常の XY 個体と比べて生殖細胞が多く生殖腺の生移線のサイズも大きい雌様の生殖腺が形成された (図 2 A, B)。またより成長した個体では卵母細胞、卵巣が形成され完全な雌に性転換していた (図 2 C)。

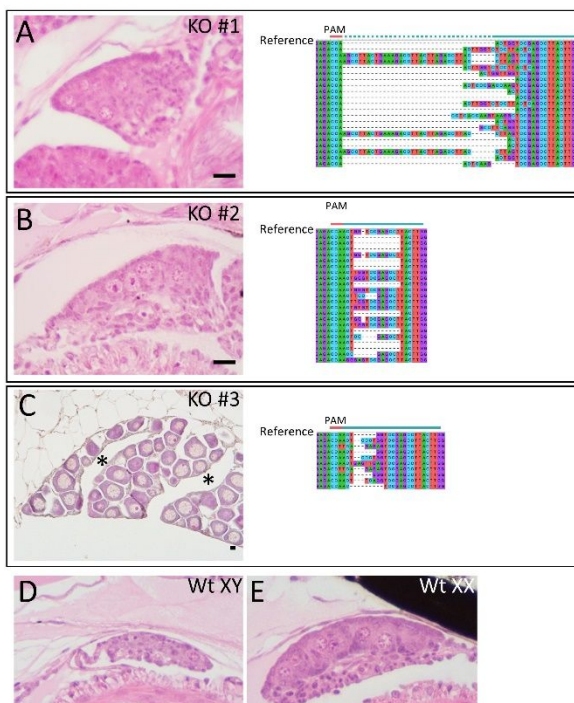


図 2 性決定遺伝子候補の機能欠失実験

また、生殖腺の形態的な性分化前の時期 (受精後 2 カ月) の個体について生殖腺の組織切片を作製し、*in situ* hybridization 法によりアユ性決定遺伝子候補の mRNA の発現を解析した。さらに性決定遺伝子候補の発現パターンと、生殖細胞のマーカー遺伝子である *ddx4* および生殖腺の支持細胞のマーカー遺伝子である *sox9b* の発現パターンとの比較を行った。アユ性決定遺伝子候補 (SD:赤色) は形態的な性分化前の時期の生殖腺では、XY 個体でのみ生殖細胞 (*ddx4*:緑色) を取り囲む体細胞で発現が検出された (図 3 A, B)。XX 個体では発現は検出されなかった。また性決定遺伝子候補 (SD:赤色) 性的に未分化な支持細胞のマーカーである *sox9b* (緑色) と同じ細胞で発現していることが示された (図 3 C, D)。

以上の結果から、本研究で着目した遺伝子がアユの性決定遺伝子であることが示された。また、同定した性決定遺伝子を用いて、雄アユ 387 尾、雌アユ 324 尾の遺伝的性を判別した結果、99.5% の個体で遺伝的性と表現型性が一致した。このことからアユ性決定遺伝子を用いた遺伝的性判別法が養殖アユの生産に応用可能であることが示された。

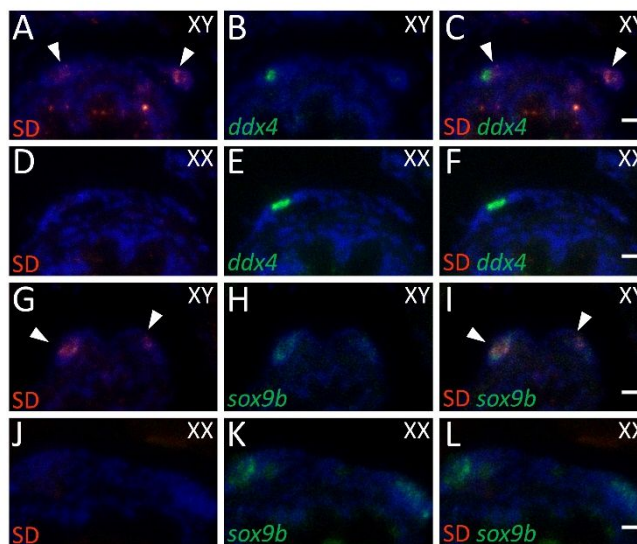


図 3 性決定遺伝子候補の発現パターン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 R Feron, Q Pan, M Wen, B Imarazene, E Jouanno, J Anderson, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 RADSex: A computational workflow to study sex determination using restriction site-associated DNA sequencing data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Ecology Resources	6. 最初と最後の頁 1715-1731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1755-0998.13360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamoto Masatoshi, Uchino Tsubasa, Guiguen Yann, Sakamoto Takashi
2. 発表標題 GENOME SEQUENCING AND MAPPING OF SEX-DETERMINING LOCUS IN AYU PLECOGLOSSUS ALTIVELIS
3. 学会等名 International Symposium of Genetics in Aquaculture XIII（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中本正俊, 内野翼, Guiguen Yann, 坂本崇
2. 発表標題 ゲノムワイド相関解析によるアユ性決定遺伝子座の探索
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中本正俊, 坂本崇
2. 発表標題 アユの性決定遺伝子候補の発現解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アユ類の性識別方法	発明者 坂本崇 中本正俊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-203939	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	坂本 崇 (Sakamoto Takashi) (40313390)	東京海洋大学・学術研究院・教授 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------