

令和 6 年 3 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19225

研究課題名（和文）魚類早熟化遺伝子のゲノムワイドな探索

研究課題名（英文）Genetic analysis of genes involved in precocious puberty 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）・教授

研究者番号：20292790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：近年、養殖魚の育種事業が世界各地で展開されているが、養殖魚の多くは初回成熟を迎えるまでの期間が長く、これが育種の律速となっている。そこで本研究では、ニジマスの早熟系統と通常成熟系統を比較することで、その早熟性に関わる変異を探索した。両系統の多数個体を縮約ゲノム解析に供したところ、系統間で顕著に分化したゲノム領域が複数見つかった。そのうちの一つは、配偶子形成関連遺伝子の近傍に存在していた。並行して系統間交雑集団を作出・育成し、上記分化領域の早熟化への関連を量的遺伝子座解析で確認することを試みた。しかし、新型コロナウイルス感染症対策のため飼育施設への立ち入りが困難となり、飼育試験は中止した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノム情報を利用した養殖魚の育種プロジェクトが世界各地で展開されているが、養殖魚の多くは初回成熟を迎えるまでの期間が長く、これが育種プロジェクトの大きな律速となっている。この問題を解決する方法のひとつとして、本研究では、早熟化をもたらす遺伝子の探索をおこなった。新型コロナウイルス感染症の影響で研究の伸展が大きく阻まれた面もあったが、早熟化に関連する可能性がある変異を同定することができた。今後の検証が必要ではあるが、本研究の成果は、養殖魚の育種加速化に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, farmed fish breeding projects have been developed in many countries, but most farmed fish take a long time to reach initial maturity, which is the rate-limiting factor in breeding. In order to find genes that are related to precocious puberty, we conducted population genomic analyses for two strains of rainbow trout, a strain exhibiting precocious puberty and a strain with a regular breeding schedule. We found that several genomic regions are significantly diverged between the two strains. In particular, our analysis revealed an Fst outlier locus near a gene functioning in gonad development. In parallel, we produced between-strain progenies for quantitative trait loci analysis to confirm the genotype-phenotype (precocious puberty) linkage. However, due to restrictions related to COVID-19, we were unable to obtain the phenotype of the progenies.

研究分野：水産遺伝学

キーワード：早熟 初回成熟

1. 研究開始当初の背景

近年、魚介類のゲノム情報の取得が比較的容易になってきたことから、ゲノム情報を利用した水産育種プロジェクトが世界各地で実施されはじめている。この育種プロジェクトにおける律速要因は複数存在するが、その代表が世代間隔である。多くの養殖魚の世代間隔は豚や鶏よりはるかに長く、初回成熟を迎えるのに数年を必要とする。そのため、初回成熟を年単位で早める技術（早熟化技術）が求められているが、ごく一部の魚種を除いてそのような技術は確立されていない。そもそも、魚介類の初回成熟年齢を決定する生物学的メカニズムの詳細は未だ不明の状態といつてよい。

2. 研究の目的

上記の背景のもと本研究では、魚類の初回成熟機構の解明を、これまでの内分泌学的研究とは異なった手法、すなわち、ゲノムレベルの遺伝学的アプローチにより解明することを目指す。

具体的には、研究協力者が所属する東京海洋大学で継代維持されている「早熟系統」ニジマス进行研究対象とする。一般的なニジマスの場合、多くのオスは満 2 歳、多くのメスは満 3 歳で初回成熟を迎えるが、この「早熟系統」の雌雄の多くはそれぞれ 1 年早く初回成熟を迎える。その対照群としては、「早熟系統」の選抜元となった「大泉系統」（以後、通常系統とよぶ）を用いる。この系統は一般的なニジマスと同様の初回成熟スケジュールをもっている。両系統の比較解析により早熟化関連変異・遺伝子を探索するため、以下の方法欄に述べるような項目を設定した。

3. 研究の方法

(1) 表現型の計測

これまで両系統において、初回成熟と、それに強く関係することが予想される体サイズの表現型については、厳密な記載はおこなわれていない。そこで、両系統の飼育実験を東京海洋大学大泉ステーションでおこない、これらの表現型を取得・記載する。

(2) 系統間のゲノム比較解析

早熟性に関連する遺伝子を探索するため、両系統の複数個体をゲノムワイドな比較解析に供する。具体的には、まず、ゲノムワイドな多型情報を得るため、満 1 歳で排精した早熟系統 34 個体と満 2 歳で排精した通常系統 66 個体を、縮約ゲノム解析の一種である GRAS-Di 法に供する。次に、得られたリードを BWA を用いてニジマス参照ゲノム配列（Omyk_1.0）にマッピングし、GATK4 により多型情報を抽出する。次に、両系統の基本的な遺伝的性質を把握するため、上記で得られた多型情報を用いて系統内の遺伝的多様性および系統間の遺伝的分化の度合いを解析する。次に、早熟性に関連する遺伝子の候補をえるため、3 種類の Fst outlier 解析（Arlequin hierarchical island model, Arlequin not hierarchical island model, BasyeScan）をおこなう。また、Genome Wide Association Study（GWAS）も実施する。

(3) 交雑個体におけるゲノム比較解析

両系統間における遺伝的分化がゲノム全般にわたって進行している場合、単純な系統間ゲノム比較では、早熟性に関連する領域を絞り込めない可能性がある。そこで、系統間交配をおこない、両系統のゲノムがモザイク状に混じり合った交雑後代集団を作出して、その表現型とゲノム領域との関連をみることにより、早熟関連遺伝子の絞り込みをおこなう。具体的には、系統間交配より得た F1 個体雌雄それぞれ 10 尾を交配し、F2 集団を得る。また、F1 個体を通常系統と交配した戻し交配集団も作出する。比較対照として、通常系統同士の交配もおこなう。これらの交配より得られた集団の育成を行い、表現型データを取得すると同時にゲノム DNA を採取し、量的遺伝子座解析に供する。

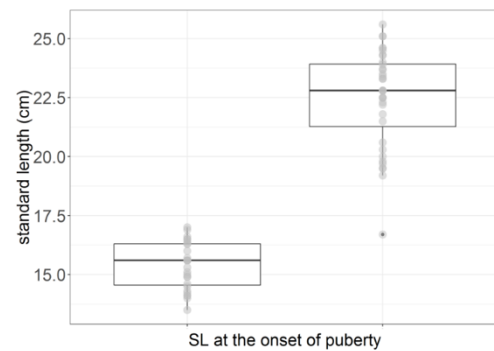
4. 研究成果

(1) 表現型の計測

本実験ではオス個体に焦点を絞り、満 2 歳の産卵期まで飼育・観察を継続した。まず、初回成熟年齢について着目したところ、早熟系統オスの場合、満 1 歳で排精した個体は 46 尾（全体の約 96%）で、満 2 歳で排精した個体は 2 尾であった。一方、通常系統オスでは、満 1 歳で排精

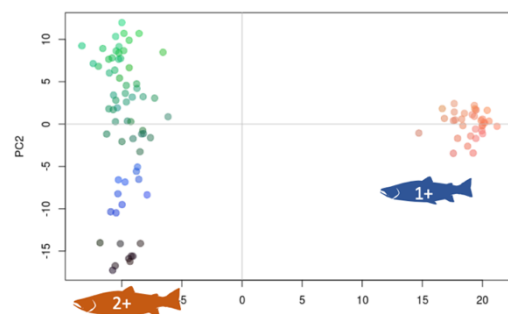
した個体は 52 尾 (約 38%)、満 2 歳で排精した個体は 33 尾、満 3 歳で排精すると予想される個体が約 50 尾であった。以上の結果から、早熟系統が早熟表現型をもつことが確認できた。なお、今回の飼育試験では、通常系統において満 2 歳で初回成熟を迎える個体が少なく、成熟にさらに 1 年を要すると予想される個体が多かった。その原因は不明である。

次に、初回成熟に強く関係することが予想される体の大きさについても検討した (右図)。満 1 歳で排精した早熟系統個体と満 2 歳で排精した通常系統個体の体サイズを測定したところ、それぞれの平均標準体長は 15cm および 22.5cm であり、体長に大きな差があることが明らかとなった。この結果は、生物学的最小形 (初回成熟の発動に必要とされる体サイズ) の分化が、両系統間で進行している可能性を示している。



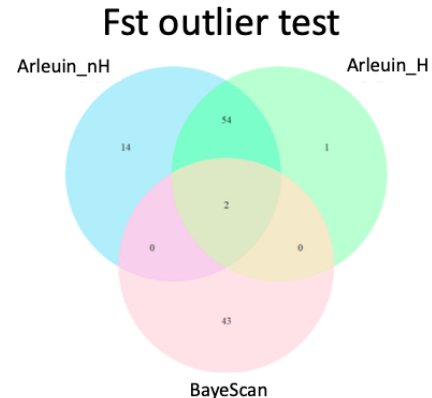
(2) 系統間のゲノム比較解析

早熟系統 34 個体および通常系統 66 個体を縮約ゲノム解析に供してフィルタリングをした結果、18,847 個の SNP 座をえることができた。これらの SNP 座を用いて、両系統の遺伝的多様性をみたところ、早熟系統の平均ヘテロ接合度が 0.249 であるのに対して、通常系統のそれは 0.295 と、早熟系統におけるヘテロ接合度の低下が認められた。さらに早熟系統は、通常系統が持つ全 18,612 個の SNP 座のうち 4,141 座の多型性を失っていた。早熟系統は、通常系統内の早熟個体を選抜して作出された集団であることから、創始者効果により、ゲノム全体の遺伝的多様性が低下したと考えられた。

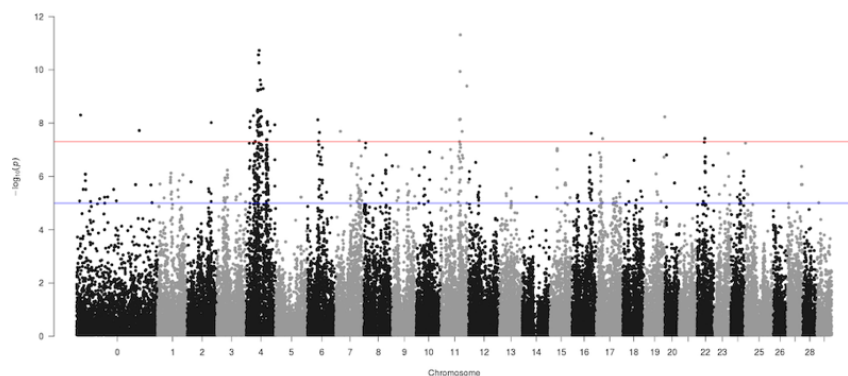


次に、系統間の遺伝的分化の度合いを PCA や ADMIXTURE といった複数の手法で解析した。その結果、両系統は遺伝的に明瞭に分化していることが明らかとなった (右上に PCA 図を示した)。

次に、早熟性に関連する遺伝子の候補をえるため、方法欄で述べた 3 種類の Fst outlier 解析をおこなった。これら 3 種の解析で共通した outlier 座を抽出したところ、2 つの SNP 座が該当した (右図)。そのうちのひとつは、配偶子形成を促進する遺伝子の近傍に存在していた。当該遺伝子座で早熟系統に偏った分布を示すアレルは、早熟化原因変異の有望な候補であると考えられた。



次に、両系統を GWAS により比較した。その結果、4 番染色体と 11 番染色体の広い領域に関連が認められた (右図)。これらの領域内には先に同定した outlier 座が存在していないことから、早熟表現型は複数の遺伝子によって支配されている可能性が考えられた。一方、outlier



解析や GWAS で検出された SNP 座は早熟化ではなく、系統間分化にともなう他の形質または遺伝的浮動に関連する座である可能性も残された。この問題を解決するひとつの方法は、両系統のゲノムを混交させた交雑後代個体を解析に利用することである。

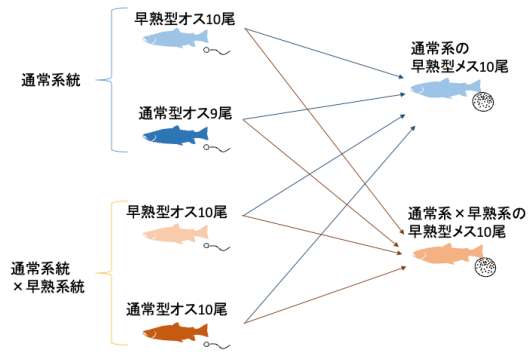
(3) 交雑個体におけるゲノム比較解析

両系統のゲノムがモザイク状に混じり合った個体を作成するため、右図のような交配実験により、8つの家系を作成した。すなわち、系統間交雑 F1 世代同士を交配した F2 集団を作成し、同時に、F1 と通常系統（系統内の早熟型魚または通常型）を交配した戻し交配集団も作成した。さらに、通常系統同士を交配した集団も作成した。

これらの飼育を継続して、その表現型とゲノム領域との関連を量的遺伝子座解析でみるこ

により、早熟関連遺伝子の絞り込みをおこなう予定であった。しかし、水カビ病の発症で個体数が減ったことに加え、新型コロナウイルス感染症対策のため、飼育施設（東京海洋大学大泉ステーション）への自由な立ち入りが困難となった。この立ち入り制限は 2 回の産卵シーズンにまたがって継続されたため、排精・排卵といった表現型を取得することができなかった。この制限期間内に多くの個体が寿命で死亡してしまったため、本解析を中止することにした。

後継プロジェクトにより本研究を継続できるという仮定のもとでの話ではあるが、現在、本研究提案当時よりはるかにゲノム編集技術の簡便化が進み、遺伝子破壊のみならず、遺伝子置換も可能となってきている。したがって、本研究で得られた多数の候補遺伝子・変異にゲノム編集を施して機能検証をおこなうほうが、上記の交雑家系を再構築するより、早熟化機構解明という目標を早く達成できるかもしれない。この観点からすると特に、outlier 解析で得られた配偶子形成促進遺伝子の機能解析、例えばトランスジェニック法を利用した過剰発現系統の作出や、ゲノム編集法を利用した機能欠損系統の作出が有望と思われる。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院農学生命科学研究科 附属水産実験所
<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/japanese.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------