

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23658153

研究課題名(和文) 超雄・超雌作製と早期性判別を実現するための性連鎖DNA配列段階的同定法の確立

研究課題名(英文) Development of a method to identify sex-related DNA sequences to enable production of mono-sex population in fish

研究代表者

井尻 成保 (Ijiri, Shigeho)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90425421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：魚類では雄と雌の間で経済価値が大きく異なる魚種は少なくない。対象種の性連鎖DNA配列が解れば、単一の性を増養殖することが可能になる。

本研究では、ニルティラピアをモデルに、次世代シーケンサーを活用した性連鎖DNA配列の同定法を確立した。その結果、ティラピア遺伝的雄の9割を判別できる性連鎖DNA配列を同定した。これによって、今後、経済的価値の高い全雄生産が極めて容易になる。

今後、本研究で確立された方法によってチョウザメ類においても高率で遺伝的性を検定できる性連鎖DNA配列が同定されれば、経済的価値の高い雌優先的な養殖を行うことが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The economical values of some fish species are much different between male and female. Identification of sex-related DNA sequences is an important key step to enable sex-selected breeding of these fish species.

This study developed a method to identify sex-related DNA sequences using next generation sequencer in Nile tilapia as an experimental fish model. In this study, male-related DNA sequences were isolated in the tilapia, which enable to identify 90% of genetic males. Using these sequences as DNA markers makes much easier in production of mono-sex population in the tilapia.

In sturgeons, we failed to identify sex-related sequences using whole RNA sequence method in this study. We expect that future screening utilizing combination of DNA and RNA deep sequencing, which was developed in the tilapia study, would identify sex-related DNA sequences which enable to identify genetic sex in the sturgeons. This would help to develop female-selected aquaculture in sturgeons.

研究分野：農学

キーワード：ティラピア 性統御

1. 研究開始当初の背景

魚類の種苗生産と養殖において雄と雌の間で経済価値が格段に異なる魚種は少なくない。テラピアでは雄がより早く大型に成長するため雄の養殖が好まれる。チョウザメでは卵巣がキャビアとして珍重されるため雌の選抜飼育の実現が望まれる。種苗生産において単一の性を作製するには、テラピアのように XX/XY 様式で性決定される生物では超雄 (YY) を作製することで全雄生産が可能になる。チョウザメのような ZZ/ZW 様式で性決定される生物でも理論的には超雌 (WW) が作製されれば全雌生産が可能となる。超雄または超雌が作製できない場合は、次善の策として稚魚の遺伝的性を速やかに判別して単一性のみを早期に選抜する方法が考えられる。しかし、遺伝的性を知る術がなく、しかも、チョウザメ類のように育成 1 年以上を経て生殖腺の組織切片を作製してようやく雌雄が判別される種では、単一性の早期選抜はできない。ここでもし、性連鎖 DNA 配列が同定されれば、極めて早い時期での性判別が可能となり、さらには、超雌の作製にも取りかかることができる。ただ、性連鎖 DNA 配列の同定は極めて困難であり、これまで様々な魚種で挑戦されてきた例はあるが、メダカやギンザケのように極めて限られた魚種でしか成功していない。

2. 研究の目的

本研究では、北海道沿岸回遊チョウザメ種 (ミカド、ダウリア) の遺伝的性判別法の開発を目指し、ナイルティラピアを用いて性連鎖 DNA 配列を同定する新たな方法を開発することを目的とする。通常、性連鎖 DNA 配列を探索するには、親魚 (P1) と、表現型性が判別された複数の第 1 世代 (F1) および F2 の DNA を準備し、RAPD (ランダムな PCR でゲノムの差異を検出する方法) や AFLP (選択的 PCR で検出) を利用して表現型性に一致して増幅されるプライマーセットを開発するというアプローチがとられる。しかし、チョウザメでは以下の 2 つの理由によってこのアプローチは難しい。1) まず、上記チョウザメ種では染色体数は約 250、DNA 量ではヒトの 1.5 倍程度、メダカの 6 倍近くもあり、雌雄間でゲノム構造の違いを見いだすことは困難である。実際、シベリアチョウザメなど 3 種のチョウザメにおいて、計 700 プライマーによる RAPD および、計 424 ペアのプライマーによる AFLP が行われたが、性連鎖 DNA マーカーは得られなかった (Wuerts et al., 2006)。2) 次に、ミカドやダウリアでは初回成熟まで 15 年~20 年程度かかるため、F2 個体を準備することは不可能である。そこで、チョウザメ類では、P1 個体だけを用いて性連鎖 DNA 配列を同定する方法の開発が必要となる。

そこで、本研究ではまず、超雄 (YY) 作製が喫緊に迫られ、かつ、ゲノムサイズがメダ

カの約 1.5 倍、ミカドチョウザメの 4 分の 1 以下であり、メダカより難易度は高いがチョウザメよりは難易度が低いナイルティラピアをモデルとして、P1 個体から性連鎖 DNA 配列を探索する方法を確立することを目的とした。さらに、ナイルティラピアで確立した方法を利用し、チョウザメ類の性連鎖 DNA 配列の同定を目指した。

3. 研究の方法

研究開始当初、遺伝的雌雄ゲノム間で、ゲノムサブトラクション (差分化) ライブラリーを作製し、それを AFLP または次世代シーケンサー (NGS) で解析することで性連鎖 DNA 候補配列を探索することを予定していた。しかし、差分化ライブラリーを用いた AFLP 解析で特定された 2 つの候補 DNA 配列は、スクリーニングに用いた G0 個体 (XY1 個体、YY2 個体、XX4 個体) では Y 染色体保有個体を完全に識別することができたものの、F1 個体では 6 割程度しか遺伝的雄を判別することができなかった。この結果は、差分化ライブラリーから性連鎖 DNA 配列を同定することの難しさを示していると思われる。一方、研究開始以降、NGS 解析には技術革新が続き、より大量の塩基配列をより安価に決定できるようになった。また、魚類の性連鎖 DNA 配列同定の分野でも 2 つの注目すべき報告がなされた。一つは、トラフグでは 1 塩基の置換が性決定に関わるという報告である (Kamiya et al., 2012)。もし、ティラピアやチョウザメの性決定領域がこのような 1 ないし数塩基の変異しか雌雄間でない場合は、ゲノム差分化ライブラリーを用いた方法は意味をなさないことになる。もう一つは、ニジマスにおいて遺伝的雌雄間の未分化生殖腺における発現 RNA の比較から性特異的配列を同定したという報告である (Yano et al., 2012)。この 2 つの報告から、本研究の方法も大きく方向転換する必要があると考えられた。

上述のように、NGS の技術革新および性連鎖 DNA 配列同定研究における大きな状況変化を勘案し、未分化生殖腺における発現遺伝子と NGS で決定されたゲノム DNA 配列との比較から性特異的 DNA 配列を探索する実験アプローチを試みた。まず、ティラピア未分化生殖腺において遺伝子発現の雌雄差が生じる時期 (分子的性分化) を詳細に調べた。次に、分子的性分化が生じる時期の遺伝的雄 (XY) および雌 (XX) の未分化生殖腺における発現遺伝子を NGS を利用して解析し、XY 特異的発現 RNA 配列を選抜した。それら配列の内、XX ゲノムドラフト配列に一致しない配列を Y 連鎖 DNA 候補配列として選抜した。これら配列の有無を XX (n=3) 個体および超雄 (YY; n=3) 個体においてスクリーニングすることで候補を絞り込んだ。絞り込んだ配列をさらに XX (n=28) および XY (n=30) を用いて性連鎖性を検定した。最後

に、テラピアで試行した方法を踏襲し、ロシアチョウザメの性特異的 DNA 配列の同定を試みた。

4. 研究成果

ナイルテラピアにおいて遺伝的 XY 個体のうち 9 割を同定できる性連鎖 DNA 配列を同定した。100% 判定には至らなかったものの、高い確率で遺伝的性を判定することができることから実用性は高い。これによって、今後ナイルテラピアの超雄さらには超雄偽雌 (YY 雌) の作製が極めて容易になる。本研究期間内ではチョウザメ類の性連鎖 DNA 配列の同定には至らなかった。しかし、今後、本研究で確立された性連鎖 DNA 配列同定法によってチョウザメ類においても高率で遺伝的性を検定できる性連鎖 DNA 配列が同定されれば、効率的に雌優先的な養殖を行うことが可能となると期待される。本研究で用いた手法は単純作業であり、どのような魚種でも用いることができると考えられる。

(1) テラピア超雄 (YY) と通常雌 (XX) ゲノムの間でサブトラクションしたライブラリーを AFLP 法で解析した結果得られた 2 つの性連鎖 DNA 配列候補は P1 (YY; n=2, XY; n=1, XX; n=4) では完全に性に一致した。これら配列の F1 (XX; n=34, XY; n=46) での検定を行ったところ、6 割程度しか表現型性との一致は見られなかった。この結果から、今回選抜された候補配列は遺伝的性の判定には利用できないと結論された。

(2) 性決定期の生殖腺で性特異的に発現する性連鎖 DNA 配列の探索を行う上で、テラピアの性決定期を厳密に検証する必要がある。これまで調べてきた性分化関連遺伝子群の性特異的発現のタイミングをより厳密に調べ、また、人為的に性転換を誘導した場合の性分化関連遺伝子の発現変動を調べた。加えて、新たに発見した性特異的発現変化を示す遺伝子として fshr (濾胞刺激ホルモン受容体) 発現のタイミングも厳密に調べた。さらに、生殖腺の性特異的遺伝子発現が脳下垂体ホルモン性の性特異的発現によって誘導されている可能性も考慮し、脳下垂体ホルモン発現のタイミングの性差を厳密に調べた。その結果、脳下垂体ホルモン発現の性差は生殖腺の分子的性分化開始よりも遅れること、生殖腺における遺伝子発現の性差は孵化後 4 ~ 5 日目から生じることが解った。よって、この時期の未分化生殖腺を解析サンプルとして用いることが適当であると判断された。

(3) 孵化後 4 および 5 日目の XX または XY の未分化生殖腺から RNA を抽出し、Illumina 社の HiSeq2000 によってシーケンスした。その結果、XX からは平均 97b で 45,758,757 リード数、XY からは平均 97b で 44,172,448 リード数、合わせて 8,695Mb の塩基配列が得られた。これらをアセンブルし、N50 長 400b の 446,533 コンティグが構築され、151Mb の総塩基配列が得られた。コンテ

ィグに対しそれぞれのサンプル由来のリード数カウントを行い (戻しマッピング) 約 10 万の XY 特異的発現配列が選抜された。さらに、孵化後 4 日目の XX および XY 未分化生殖腺の RNA シーケンスを IonPGM にて行った。その結果、それぞれ、240 万および 310 万のリードが得られた。HiSeq2000 で得られたリードと共に混合アセンブリーを行い、それぞれのコンティグにリードマッピングを行った。先ず、これまでに得られている全ての XX 未分化生殖腺由来のリードにマッピングされたコンティグを排除した。残ったコンティグに対して孵化後 4 日目および 5 日目の XX または XY 未分化生殖腺由来のリードをマッピングし、XY 由来のリードに特異的にマッピングされるコンティグとして 2,328 の cDNA 配列を選抜した。これらコンティグのうち、遺伝的雌ゲノムのドラフト配列と相関性が高いコンティグ、ミトコンドリア、リボソーム由来のコンティグを除外することで、さらに 103 個のコンティグに絞り込んだ。

これらのコンティグに対し、G0 の XX (n=3)、YY (n=3) 個体から調整したゲノムを用いて PCR スクリーニングを行った。その結果、6 つのコンティグが YY ゲノムのみで増幅が認められた。さらに、検定数を増やし、F1 の XX (n=28) および XY (n=30) 個体から調整したゲノムを用いた PCR スクリーニングを行った。その結果、4 個のコンティグで 30 個体の XY ゲノム中それぞれ、12、16、13、13 個体で増幅が認められた。4 個のコンティグ増幅のうちいずれも増幅が認められなかったのは 3 個体のみであった。また、これら 4 個のコンティグは XX ゲノムでは全く増幅が認められなかった。

以上の結果から、選抜された 4 個のコンティグの PCR スクリーニングを行うことによって、遺伝的 XY 個体のうち 9 割を特定できることが示された。

(4) ロシアチョウザメ孵化後 9 ヶ月目の個体の未分化生殖腺のうち、将来精巢 (n=2) および将来卵巢 (n=3) の間で発現遺伝子解析を HiSeq2000 を用いて行った。その結果、雌特異的発現配列を約 300 選抜し、RNA シーケンスに用いた個体の DNA で PCR スクリーニングを行い、7 つの雌特異的発現配列に絞り込んだ。それらを F1 個体 (ZZ; n=6, ZW; n=7) の DNA においてスクリーニングを行ったものの、性特異性は認められなかった。同定に至らなかった理由として、孵化後 9 ヶ月目のサンプルが性特異的 DNA 配列由来の RNA を特定するにはタイミングが遅かった可能性が考えられる。また、ゲノム DNA のシーケンスはまだ完了しておらず、1 回目の選抜スクリーニングに確実性が不足していたことも理由として考えられる。今後、より早期の未分化生殖腺における発現遺伝子解析を行い、ゲノム DNA のシーケンスにマッピングして性連鎖 DNA 配列を選抜する必要があると考えられた。

参考資料

Wuertz S, et al., Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258, 685-688. (2006)

Kamiya T, et al., A Trans-species missense SNP in amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLOS Genetics* 8, e1002798 (2012)

Yano A, et al., An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* 22, 1423-1428 (2012)

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 1 件)

Yan H, Ijiri S, Wu Q, Kobayashi T, Li S, Nakaseko T, Adachi S, Nagahama Y. Expression patterns of gonadotropin hormones and their receptors during early sexual differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 87(5):116, 1-11. (2012)

(査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

李爽・井尻成保・ヤンホンウェイ・西澤朋実・足立伸次(北大院水)・長濱嘉孝(愛媛大南水研)

ナイルティラピア遺伝的雄仔魚の雌化誘導に伴う性分化関連遺伝子群の発現変動

平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学品川キャンパス. 東京都 平成 25 年 3 月 27 日

Hongwei Yan・Shigeho Ijiri・Shuang Li・Shinji Adachi (Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido Univ.)・Tohru Kobayashi (Univ. of Shizuoka)・Yoshitaka Nagahama (Ehime Univ.)

Roles of GTHs in gonadal sex differentiation of Nile tilapia

平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学品川キャンパス. 東京都 平成 25 年 3 月 27 日

Hongwei Yan, Shigeho Ijiri, Quan Wu, Tohru Kobayashi, Shuang Li, Taro Nakaseko, Shinji Adachi, Yoshitaka Nagahama

Expression patterns of gonadotropin hormones and their receptors during early sexual differentiation

7th International Symposium on Fish Endocrinology, September 1-6, 2012

(口頭発表)平成 24 年 9 月 5 日 プエノスアイレス、アルゼンチン

李爽・閔紅偉・中世古太郎・井尻成保・足立伸次(北大院水)

ナイルティラピア黄体形成ホルモンの発現解析

平成 23 年度日本水産学会北海道支部大会. 北海道大学水産学部. 北海道函館市 平成 23 年 11 月 26 日

閔紅偉 (ヤンホンウェイ)・中世古太郎・呉泉・井尻成保・足立伸次(北大院水)

ティラピア性決定・性分化期における濾胞刺激ホルモンの発現

平成 23 年度日本水産学会秋期大会. 長崎大学文教キャンパス. 長崎県長崎市 平成 23 年 9 月 29 日

李爽・吉田沙織・倉持有希・井尻成保・足立伸次(北大院水)

ナイルティラピア遺伝的雌仔魚の雄化に伴う性分化関連遺伝子群の発現変動

平成 23 年度日本水産学会秋期大会. 長崎大学文教キャンパス. 長崎県長崎市 平成 23 年 9 月 29 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井尻 成保 (IJIRI Shigeho)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：90425421

(3)連携研究者

なし