

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430196

研究課題名(和文) 表現型性と遺伝子型性が一致しないサクラマス の出現要因および維持機構の解明

研究課題名(英文) Distribution patterns and appearance mechanism of individuals with incongruence between genotypic and phenotypic sex

研究代表者

山本 俊昭 (Yamamoto, Toshiaki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30409255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生殖腺から判別した性は雌であるにも関わらず、遺伝子解析による性別別は雄になる性が不一致になる個体の出現パターンおよび維持機構に関する研究を行った。その結果、不一致個体の分布は中国地方および東北地方の集団を解析したものの出現しなかったことから、北海道の日本海側にのみ現在は分布している個体であることが示された。また、不一致個体を用いた交配実験の結果、多くの遺伝的な雄個体が出現したことから常染色体上に遺伝子マーカーであるGHYが転移した可能性が考えられた。さらに、リアルタイムPCRでGHYの遺伝子量を定量化することを試みているが、現在のところ技術が確立していないのが現状である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to evaluate the distribution patterns and appearance mechanism of individuals with incongruence between genotypic and phenotypic sex. As the results of study of distribution, the incongruent individuals were found only in the populations of Hokkaido, not in those of Tyugoku and Tohoku districts. This result indicates that incongruent individuals are only distributed with Hokkaido area near the Sea of Japan. In secondary study, fertilization test using incongruent individuals showed that sex ratio were male-biased, suggesting Y-to-X chromosomal translocation involving GHY genetic markers. Moreover, we are trying to evaluate the number of GHY genetic markers using the real time PCR, but techniques of estimation have not been established yet at the present.

研究分野：保全生態学

キーワード：遺伝子型性 表現型性 サクラマス 偽成長ホルモン遺伝子 成長抑制

1. 研究開始当初の背景

1) 魚類を含め野生生物を研究する上で、雌雄判別は最も重要な基礎的情報のひとつであるが、多くの生物群では外部形態だけで性別を判別することは極めて難しい。そのため、近年では生化学的手法の開発に伴い、性別に DNA を用いる研究が多数行われている。サケ科魚類ではヘテロ型 XY が雄、ホモ型 XX が雌の性別決定様式であり、Y 染色体に特異的な遺伝子マーカーが近年開発されている。特に、成長ホルモンの偽遺伝子 (growth hormone pseudogene : 以下、GHY と呼ぶ) は性別決定遺伝子に近い場所に存在するとされており、GHY に着目した DNA 分析がサクラマスを始め多くのサケ科魚類の性別判別に用いられている。

2) 申請者はサケ科魚類の一種であるサクラマスを用いて Y 染色体特異的な遺伝子マーカーである GHY によって性別を 1000 個体ほど行ったところ、一部の個体において表現型は雌であるにもかかわらず、遺伝子型による性は雄となる個体、すなわち遺伝子型と表現型の性が一致しない個体 (以下、不一致個体とよぶ) を発見した (Yamamoto and Kitanishi 2012)。また、これら不一致個体は、一致するメスよりも成熟体サイズが小さく、形態的には雄の特徴であることも明らかにした。さらには、北海道内の 23 河川で調べた結果、不一致個体は太平洋側の河川にはほとんど存在せず、日本海側の河川に多く存在することも示している (Yamamoto et al. 2012)。これら出現パターンの偏りは、海洋における回遊場所と関連している可能性があるが、未だその要因は不明であることから本研究の課題を以下の項目とした。

2. 研究の目的

本研究では、不一致個体の出現パターン、出現要因および維持機構を解明することを目

的とし、具体的な研究項目の以下の3つとした。

1) 一つ目は日本全土における不一致個体の分布調査である。これまでの研究では北海道内のみの調査であったが、これら不一致個体が日本国内のどこに分布しているのかを解明する。

2) 二つ目は交配実験による不一致個体の有利性の解明である。表現型性と遺伝子型性が一致しない個体を用いて交配実験を行い、その子の表現型性および遺伝子型性の出現割合を明らかにする。それによって不一致個体の出現要因を明らかにする。

3) 三つ目はリアルタイム PCR を用い、遺伝子マーカーである GHY の遺伝子量をカウントすることにより、常染色体上への転写の可能性を解明する。

3. 研究の方法

1) 2013 年から 2015 年にかけて中国地方で 3 河川、東北地方で 8 河川 (太平洋側 3 河川・日本海側 5 河川)、北海道内で 3 河川において野生魚をサンプリングして、遺伝子解析および生殖腺からの性別判別を行った。

2) 表現型と遺伝子型の性が一致しない個体が最も多く出現した北海道毘沙別川において雌 1 尾および雄 16 尾 (降海型 8 尾・残留型 8 尾) を捕獲して人工授精を行った。その後、一定の環境で畜養した後に浮上してきた 12 月上旬にサンプリングを行い、それら浮上個体の体サイズの計測および遺伝的な性別判別を行った。

3) リアルタイム PCR を用いて遺伝子マーカーである GHY のコピー数をカウントすることをを行った。そのためのプローブ開発に

主な時間を用いた。尚、細胞数を定量的に評価するため、ニジマスで開発された遺伝子マーカーである Rag1 を用いて細胞数の総数を推定することを行った。

4. 研究成果

1) 本研究では 14 河川において計 316 尾の遺伝子による性判別を行った(表 1)。その結果、北海道内の河川においてのみ不一致個体が見られた。このことから、不一致個体の分布は現在のところ北海道の日本海側、特に毘沙別川周辺に留まっていることが示された。

表1 遺伝子マーカーGHYによる性判別

調査エリア	雌個体数	GHY-	GHY+
中国地方(日本海側)	28	28	0
東北地方(日本海側)	80	80	0
東北地方(太平洋側)	78	78	0
北海道(日本海側)	130	105	25

2) 毘沙別川の人工授精を行った集団のうち、降海型雄 7 尾および残留型 8 尾の半兄弟は 70% 以上のふ化率であった。しかしながら、降海型 1 尾に関しては精子の状態が悪かったこともあり、全個体がふ化しなかった。本研究ではふ化した集団からランダムに 402 尾を抽出し、全て個体から遺伝子抽出を行い、遺伝子による性判別を行った。遺伝子による性判別が行えたのは、全体の 92% (375 個体) であった。その結果、多くの集団で雄に偏っていることが示された(表 2)。このことは、遺伝子マーカーである GHY が Y 染色体以外にも存在することが示唆された。

表2 遺伝子によって性判別を行った結果

交配に用いた雄	n	GHY-	GHY+	交配に用いた雄	n	GHY-	GHY+
残留型雄1	30	10	20	降海型雄1	26	6	20
残留型雄2	30	9	21	降海型雄2	30	10	20
残留型雄3	25	9	16	降海型雄3	30	11	19
残留型雄4	11	3	8	降海型雄4	20	10	10
残留型雄5	10	1	9	降海型雄5	25	10	15
残留型雄6	30	12	18	降海型雄6	30	6	24
残留型雄7	30	11	19	降海型雄7	19	3	16
残留型雄8	29	12	17				
合計	195	67	128	合計	180	56	124

3) 遺伝子マーカーである GHY が常染色体上にも存在する可能性が考えられたので、リアルタイム PCR による遺伝子量(コピー数)を解析した。そのために、細胞数の総数

を把握する必要があるために Rag1 と呼ばれている遺伝子マーカーをプローブとして精子数との相関を最初に試みた。その結果、精子数と rag1 を用いて推定した数がほぼ同数であることから、シングルマーカーであることがサクラマスで示された(表 3)。

表3 リアルタイムPCRを用いて遺伝子量を推定した結果

雄	血球計算盤を用いて rag1を用いた		推定割合
	算出した精子数	推定細胞数	
1	28750	21100	0.734
2	22000	31000	1.409
3	16875	16000	0.948
4	18000	19900	1.106
5	17250	23300	1.351
6	18870	11000	0.583
7	14500	21100	1.455
8	21625	10000	0.462
9	21250	10000	0.471
10	26000	120000	4.615
11	24875	14000	0.563

rag1のプローブ配列はATGAATGGGAAGCTATGCACGGAAG

4) さらに GHY のプローブを開発し、コピー数が精子数(細胞数)の半分程度に収まれば、プローブの増幅率が 100% に近いことが示されるが、本研究では GHY のプローブが正しく当たっているデータは得られなかった。今後は、改めて GHY の塩基配列からプローブ開発を行う必要があると考えられる。

<引用文献>

Yamamoto, T. and Kitanishi, S. (2012) Variable incidences and morphological characteristics of female masu salmon with growth hormone pseudogene. *Journal of Fish Biology* 80(2):378-386.

Yamamoto, T., Kitanishi, S., Tamate, T. and Suzuki, N. (2012) Spatial distribution of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) with incongruent genotypic and phenotypic sex in Hokkaido, Japan. *Environmental Biology of Fishes* 95(3):399-405.

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5件)

— Yamamoto, T. and Kitanishi, S. (2014)
Reduced oceanic growth of
pseudogene-positive female masu
salmon *Oncorhynchus masou*. *Journal of
Fish Biology* 84:256-262.

— Kitanishi, S. and Yamamoto, T. (2015)
Comparison of genetic structure
between juvenile and adult masu salmon
indicates relatively low reproductive
success of dispersers. *Environmental
Biology of Fishes* 98(1):405-411.

— Kitanishi, S. and Yamamoto, T. (2015)
The effects of severe flooding on
native masu salmon and nonnative
rainbow trout in the Atsuta River,
Hokkaido, Japan. *Journal of Freshwater
Ecology* 30(4): 589-596.

— Yamamoto, T., Maruta, H., Suzuki, T.
and Kitanishi, S. (2015) Sperm traits
dependent on body size in masu salmon
Oncorhynchus masou. *Fisheries Science*
81(5), 815-820.

— Yamamoto, T. and Kitanishi, S. (2016)
Comparison of the frequency of the
growth hormone pseudogene between
juvenile and adult female masu salmon
Oncorhynchus masou *Journal of Fish
Biology* 88(2) 746-750

[学会発表](計3件)

1)山本俊昭・北西滋 (2015年3月) サクラマスにおける河川内の卵サイズ変異と河川環境との関連性 第62回日本生態学会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

2)北西滋・山本俊昭・ト部浩一・下田和孝 (2015年3月)北海道におけるサクラマス野生

集団の遺伝的構造解析 第62回日本生態学会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

3)山本俊昭・北西滋(2016年3月)サクラマスの生活史分岐に対する遺伝性:ヤマメの子はヤマメ?第63回日本生態学会 東北大学(宮城県仙台市)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 俊昭 (YAMAMOTO Toshiaki)
日本獣医生命科学大学 ・ 獣医学部 ・ 准教授

研究者番号 30409255

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

4) 研究協力者

北西滋 (KITANISHI Shigeru)