

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660151

研究課題名(和文)ゲノム情報を利用して性格の個体差を生み出す魚類の性質制御遺伝子を同定する試み

研究課題名(英文) Trial to identify genes related with fish characters using bioinformatics and genome database

研究代表者

鈴木 徹 (Suzuki, Tohru)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70344330

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)：魚類種苗に望まれる形質に、“神経質でない”等の「飼育に適した性質」がある。哺乳類では、脳で働く蛋白質に発生したアミノ酸リピート数の多型、プロモーターに発生したマイクロサテライトの多型が、「性質」に差をもたらすことが知られている。

本研究では、メダカの「人に慣れやすい」d-rR系統と、「神経質な」HNI系統の2系統を使って、ゲノム情報を使ったバイオインフォマティクスにより、魚類の性質関連遺伝子を探索した。その結果、脳機能に関係するセロトニン合成酵素、アンドロゲンレセプター、ドーパミンレセプターが候補遺伝子として抽出され、いずれも系統間で多型性を示すことから性質との相関が示唆された。

研究成果の概要(英文)：One of representative genetic traits required for aquaculture is fish character adequate for breeding, such as non-nervousness. In mammals, polymorphism of single amino acid repeat and microsatellites in promoter region that evolved in the genes related with brain function cause variation of character among strains.

Medaka strains of d-rR and HNI-II have opposing character; the former being tame, while the latter being nervous. Using these two strains, this study aimed at searching the genes correlated with characters of fish strains by using bioinformatics and genome databases. Serotonin receptor, androgen receptor and dopamine receptor were selected as candidate genes. Since polymorphism in repetitive sequences were detected among two strains and wild medaka, it is highly possible that selected three genes are actually correlated with character of strains.

研究分野：水産学

キーワード：逃避行動 多型性 ゲノム情報 メダカ 魚類 繰り返し配列 脳機能

### 1. 研究開始当初の背景

養殖用種苗に望まれる形質の中に、“暴れない”あるいは“神経質でない”などの「飼育に適した性質」がある。

動物の性質に関する研究は、脳機能との関連から哺乳類で精力的に進められており、著名な例としては、アンドロゲンレセプターのグルタミンのリピート(QQ...Q)の長短が攻撃性と関わり、グリシンのリピート(GG...G)の長短が神経質と関わっていることが類人猿で分かっている。また齧歯動物では、バソプレシン受容体のプロモーター内のマクロサテライトの長短が、転写効率の差異をもたらすことにより、バソプレシン(脳神経ペプチド)の合成量を変化させ、それによって子供を保護する、保護しないといった社会行動にバリエーションが発生していることが知られている。このように、哺乳類では脳機能に関連する遺伝子内のリピート配列が動物の性質と深く関わっている。

養殖魚でも、高成長や耐病性系統に加えて、最近では「飼育に適した性質」を持った系統の開発が望まれている。しかし、本研究の開始当初には、魚類で性質を制御している遺伝子は見つかっていなかった。

### 2. 研究の目的

「飼育に適した性質」を選抜した例にギンギツネの家畜化実験があり、野生集団から50年の比較的短期間で人間に良く慣れる系統が選抜されている。野生集団が家畜化される間には、脳機能に関連した遺伝子に存在するリピート配列の多型に選択圧がかかっていることが示唆されている。そこで私達は、魚類ゲノムに存在するリピート配列を有する候補遺伝子をゲノムデータベースから in silico で全て選別し、その中から多型解析で性質制御遺伝子を選択することを着想した(図1)。

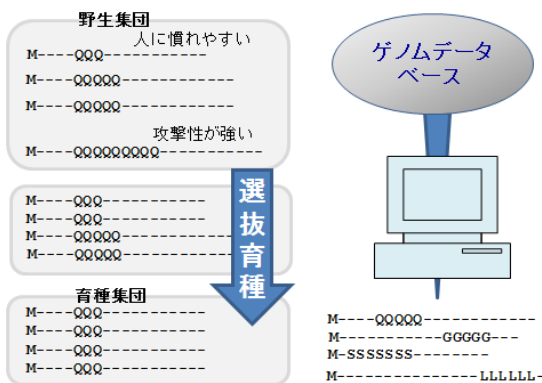


図1 本研究のアイデア。

脳機能に関連する遺伝子のなかには繰り返し配列が生じたものがあり、リピートの数により性質に変化が生じる(左上)。選抜育種の課程では人に慣れやすい系統がセレクトされる傾向にある(左中-下)。

ゲノムデータベースから繰り返し配列を持つ脳機能関連遺伝子を選ぶ(右)

ウシやブタなどの家畜における選抜の歴史に比べると、ギンギツネの例は短期間のうちに育種化に成功しているものの、選抜育種

に50年要している。本研究では、ゲノムデータを利用することにより、選抜育種の手順無しに、3年間の研究期間で魚類の性質関連遺伝子を同定することを目指した。

本研究では、(1)リピート配列の検出プログラムを開発し、(2)ゲノムデータベースからリピート配列を持つ候補遺伝子を抽出する。(3)候補遺伝子の多型性を、性質に差があるメダカ近交系間で比較し、性質制御遺伝子と同定することを目的とした(図2)。

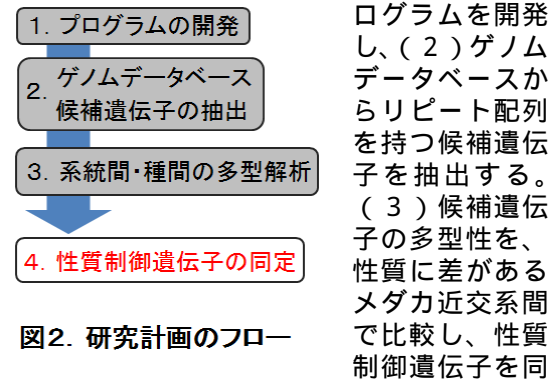


図2. 研究計画のフロー

定することを目的とした(図2)。

モデル生物であるメダカには、20世代以上にわたって兄妹交配を繰り返して確立された系統があり、その中に人に非常に慣れやすい d-rR 系統、それとは対照的に音や人の動く影などに非常に敏感で、驚きやすい性質を持つ HNI-II 系統がある。本研究では、これらメダカ2系統を使って、性質の差をつかさどっている遺伝子を見つけ出すことを試みた。

得られた成果は、飼育に適した性質を持つ養殖魚の効率的選抜に応用でき、また魚類の脳機能に関する研究の進展に貢献できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 「リピート配列検出プログラムの開発」

アミノ酸のリピートを持つ遺伝子、プロモーターとイントロンにマイクロサテライトを持つ遺伝子をデータベースから抽出することを目的として、アミノ酸配列およびDNA塩基配列から、一文字あるいは数文字のリピートを検索するプログラムを開発した。

#### 「アミノ酸のリピートを持つ遺伝子の検索」

開発したプログラムを使って、Ensembl ゲノムデータベースに保存されているメダカのゲノム情報から、アミノ酸の繰り返しを持つ遺伝子を全て抽出した。

魚種間で繰り返しの数が保存されている遺伝子は、機能的なバイアスにより配列の保存性が強く、メダカ系統間でも保存されていると考えられる。そこで、NCBI に保存されている18種類の魚類配列とリピート数の比較を行い、抽出した遺伝子から魚種間でリピート数が異なる遺伝子のみを絞り込んだ。

絞り込まれた遺伝子について、メダカ d-rR と HNI- 系統間でリピート数を比較し、脳機能に係る候補遺伝子を選び出した。

#### 「マイクロサテライトを持つ遺伝子の検索」

哺乳類の研究により、攻撃性や社会性に関与する神経伝達物質・ホルモンとして、セロ



*ar* と *drd3* はトラフグでもマイクロサテライトが存在することが分かった。そこでマイクロサテライトを挟むようにプライマーを設計し、トラフグ 10 個体で配列を解読してリピート数を調べた。*ar* はメダカ系統と似た TAGA の 4 塩基型のマイクロサテライトが存在し、個体間で 3~5 回のリピートの差が検出された。*drd3* には TG や GA の 2 塩基型マイクロサテライトが存在し、2~3 回程度のリピートの差が存在した。

リピート数の多型性に富む *tph1*, *ar* と *drd3* は性格関連遺伝子の候補と考えられる。さらに RT-PCR や in situ ハイブリダイゼーションなどの発現解析により、これらマイクロサテライトの長さが、遺伝子発現量と関係するかどうか検証する必要がある。

### 「次世代シーケンズ解析」

次世代シーケンサーを使った RNA-Seq 解析により、DrR と HNI 系統で脳内発現量が有意に異なる遺伝子が 47 個見つかった。そのうち脳機能に関わる遺伝子は、*pomc*, *vamp2*, *caly* の 3 種であった。

*pomc* は副腎皮質刺激ホルモンの前駆ペプチドであり、その発現量は、d-rR よりも HNI-II 系統で 400 倍以上高かった。家畜化され、人に慣れやすくなったギンギツネでは、*pomc* の合成量が低くなっていることが報告されている。d-rR 系統に比べて *pomc* の発現量が HNI-II 系統で著しく高いことは、d-rR が人に慣れやすく、HNI-II が慣れにくいという性質と良く一致している。

*vamp2* はドーパミンの小胞輸送に機能し、ヒトではうつ病の指標遺伝子として用いられている。HNI-II 系統の *vamp2* の発現量は d-rR に比べて 3 分の 1 程度であり、d-rR よりも神経伝達速度が低下している可能性が考えられる。

*caly* は、ドーパミンの小胞エンドサイトシスに関わる。*caly* 発現は、d-rR よりも HNI-II の方が低いことから、やはり両系統で神経伝達速度に差がある可能性が考えられる。

*pomc*, *vamp2*, *caly* の 3 遺伝子も性格関連遺伝子の候補である。メダカ 2 系統間で発現量を比較し、脳機能との関係を調べる必要がある。

今回の研究により、魚類の性格に関連する候補遺伝子として、*clock*, *tph1*, *ar*, *drd3*, *pomc*, *vamp2*, *caly* の 7 種類が選別された。今後さらに詳細な検討を行い、性格との関係をさらに詳しく解析する計画である。

### 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)

横田 慎平、松野 林太、加藤 寛之、橋本 寿史、木下 政人、横井 勇人、鈴木 徹、

Establishment of *oct4:egfp* transgenic and *oct4:egfp/b-actin:DsRed* double transgenic medaka lines, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 査読有、2016、印刷中、

DOI 10.1007/s11626-016-0020-6

金子 隆正、Khalid Freeha、Wu Xiaoming、茂木 淳、宇治 督、横井 勇人、鈴木 徹、Role of notochord cells and sclerotome-derived cells in vertebral column development in fugu, *Takifugu rubripes*: histological and gene expression analyses, *Cell & Tissue Research*, 査読有、2016、印刷中、

茨木春美、Wu Xiaoming、宇治 督、酒井 義文、横井 勇人、鈴木 徹、Transcriptome analysis of vertebral bone in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Teleostei, Pleuronectiformes), using Illumina sequencing, *Marine Genomics*, 査読有、24 巻、2015、269-276、

doi.org/10.1016/j.margen.2015.09.009

加藤 寛之、阿部 光太、横田 慎平、松野 林太、三毛門 毅、横井 勇人、鈴木 徹、Establishment of *oct4:gfp* transgenic zebrafish line for monitoring cellular multipotency by GFP fluorescence, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 査読有、51 巻、2015、42-49、

DOI 10.1007/s11626-014-9805-7

辰見 吉成、武田 萌、松田 勝、鈴木 徹、横井 勇人、TALEN mediated knockout zebrafish reveals the critical function of r-spondin in the fin and vertebral skeletogenesis, *FEBS Letter*, 査読有、588 巻、2014、4543-4550、

doi.org/10.1016/j.febslet.2014.10.015

[学会発表](計5件)

岩泉 雅樹、横井 勇人、鈴木 徹、エレクトロポレーションによる成体器官への遺伝子導入効果の検討、平成 28 年度日本水産学会大会、2016 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京都港区)平成 28 年度日本水産学会大会、2016 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京都港区)

Shen Jialing、横井 勇人、鈴木 徹、Induction of germline-specific and pluripotency factor mRNAs, including *vasa* and *oct4*, in medaka somatic cells by dimethylnitrosamine, 2016 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京都港区)平成 28 年度日本水産学会大会、2016 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京都港区)

鈴木 徹、TALENCRISPR/Cas9 によるゲノム改変技術の利用、平成 27 年度水産増殖談話会「最新の技術を使った水産育種」、2015 年、3 月 27 日、東京海洋大学(東京都港区)

辰見 吉成、横井 勇人、松田 勝、鈴木 徹、TALEN mediated knockout zebrafish reveals the critical function of r-spondin in the

fin and vertebral skeletogenesis、47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN)、2014年5月29日、Winc Aichi (愛知県名古屋市)

明珍 大志、橋本 寿史、横井 勇人、鈴木 徹、メダカ系統を使った臆病な性質の定量化の試み、平成 26 年度日本水産学会大会、2014年3月28日、北海道大学水産学部(北海道函館市)

〔図書〕(計1件)

鈴木 徹、動物の事典、第13章-1 水産とバイオテクノロジー、2016、印刷中、朝倉書店

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioinform/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70344330

### (2)研究分担者

酒井 義文 (SAKAI, Yoshifumi)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10277361

### (3)連携研究者

横井 勇人 (YOKOI, Hayato)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40569729