

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏名 篠原幹拓
指導教員 浅川修一

論文題目 アコヤガイ (*Pinctada fucata*) の真珠・貝殻の色調関連遺伝子に関する研究

アコヤガイ *Pinctada fucata* は質の高いアコヤ真珠を生産する真珠貝として知られる。養殖真珠の生産技術は、アコヤガイを対象として世界に先駆けて日本で確立され、以来本種は真珠生産の中心的役割を担ってきた。しかし、日本では外来種との交雑などによる真珠の質の低下が問題となるなど、真珠の質を維持・向上するための新しい技術の開発が必要とされている。

真珠の質として重要な要素の一つが色である。アコヤ真珠は黄色色素の蓄積の多寡（黄色度）により白色～黄色の色調を帯び、それにより品質も大きく影響される。交配実験から、黄色度は遺伝的影響が大きいとされているが、関連する遺伝子は同定されておらず、色素蓄積の分子機構は全く不明である。本研究では真珠色調の決定に関与する遺伝子を特定することを目的に、真珠形成組織である真珠袋について、黄色度の異なる真珠を形成した真珠袋間の比較トランスクリプトーム解析を行った。また、貝殻に色素を蓄積しないアコヤガイの突然変異体系統につき、野生型と掛け合わせた解析家系を作出し、一塩基多型（SNP）解析から原因遺伝子の探索を行った。さらに、色調関連遺伝子の機能解析やその応用的展開を考慮し、アコヤガイに対する遺伝子導入技術についても検討した。

1. 白色系および黄色系アコヤガイの真珠袋の比較トランスクリプトーム解析

貝類の貝殻を形成する組織は外套膜であり、外套膜上皮から分泌されるタンパク質の働きにより、複雑な微細構造を持つ炭酸カルシウム結晶が体外に貝殻を形成する。真珠は貝類の体内で形成される貝殻組織であり、真珠養殖ではこれを利用して、ピース貝と呼ばれるドナー個体から外套膜の断片（ピース）を採取し、これを核と共に別の個体（母貝）に移植する。母貝の体内でピースの外套膜上皮細胞は増殖し、核を覆う真珠袋と呼ばれる組織を形成する。真珠袋は核の周りに真珠層を堆積させ、真珠が形成される。ここでは貝殻真珠層の黄色度が異なる二つのアコヤガイ系統からピースを採取し、それらを同じ母貝に移植することで、同一環境下でも遺伝的違いによって黄色度の異なる真珠が形成されるかどうかを検証した。さらに、同一母貝内で形成された遺伝的背景の異なる2つの真珠袋について、発現する遺伝子を網羅的に比較することで、色調の決定に関わる遺伝子をスクリーニングすることとした。

ミキモト真珠研究所で維持されている貝殻真珠層白色系（以下白色系）および貝殻真珠層黄色系（以下黄色系）アコヤガイをピース貝として用いた。白色系統および黄色系統から採取したピースそれぞれを核と共に同一の母貝に移植し、これを 100 個体の母貝に対して行い、3 カ月後に真珠袋と真珠を回収した。脱核等により真珠が得られなかったものを除く 46 個体の母貝から得られた白色系および黄色系由来真珠袋のペアについて、作られた真珠の黄色度を測定したところ、同一母貝内でも 2 つの真珠の色調は明確に異なり、それぞれピース貝の貝殻真珠層の黄色度をよく反映したことから、真珠への黄色色素の蓄積はピース貝の性質に依存することが確認された。

次に、同一母貝から得られた 6 ペアの黄色系および白色系由来真珠袋を対象に、mRNA を精製後 cDNA ライブラリを構築し、IonProton シーケンサーによるマルチプレックスシーケンスを行った。得られた 11Gb の配列に対して、CLC Genomics Workbench を用いた *de novo* アセンブルとマッピングを行い、平均塩基長 379bp の 99,607 個の contig およびそれらの発現量情報を得た。全 contig の発現量を基に、主成分分析および階層的クラスタリング解析を行ったところ、各真珠袋は形成した真珠の黄色度の違い（白色か黄色か）でクラスターを形成しなかったことから、黄色色素の蓄積に関連した遺伝子発現変動はわずかであると考えられた。一方、同一の母貝から得られた 2 つの真珠袋の遺伝子発現パターンはよく類似しており、真珠袋の全体的な遺伝子発現は母貝の影響を受けることが考えられた。

白色系および黄色系由来真珠袋間の発現変動遺伝子を抽出したところ、false discovery rate (FDR) 補正で有意な発現変動遺伝子 (FDR=0.0025) が 1 つ得られたが、定量的 PCR では発現量の違いを確認できなかった。その他、FDR 値が 0.16~0.60 の発現変動遺伝子候補が 6 つ得られ、このうち一つは、クロチョウガイのアルビノ個体での発現変動が報告されていることから、真珠や貝殻色調との関連が示唆された。

2. 貝殻に色素を蓄積しない突然変異系統（白色貝系統）の原因遺伝子探索

白色貝は、貝殻に色素を蓄積しない自然発生突然変異体である。当該変異については、野生型と掛け合わせた F1 個体は全て野生型表現型となり、F1 同士を掛け合わせた F2 では、およそ 1/4 の個体に白色貝型表現型が現れることから、単一遺伝子を原因とする劣性突然変異と考えられる。また、白色貝は貝殻に色素を蓄積しないが、外套膜には色素を蓄積していることから、外套膜上皮細胞から貝殻に色素を分泌できないことが異常の原因と考えられる。本研究では、白色貝と野生型を掛け合わせた解析家系を作出し、ゲノムシーケンシングによる SNP 解析から原因遺伝子のスクリーニングを行った。

ミキモト真珠研究所で保持されている白色貝系統の一個体と野生型個体一個体を掛け合わせ、F1 を得た。F1 には貝殻稜柱層が黒色と黄色のものがあつたため、それらを分け、貝殻稜柱層黒色の F1 についてオス 4 個体とメス 3 個体、同様に貝殻稜柱層黄色の F1 についてオス 4 個体とメス 3 個体を掛け合わせて F2 群を得、それぞれ RBBL 群および RBY 群とした。これら F2 群それぞれから白色貝型表現型を示す 100 個体と野生型表現型を示す 20

個体をサンプリングし外套膜から DNA を抽出した。また、F2 作成に用いた F1 個体の閉殻筋からも DNA を抽出し、Hiseq シーケンサを用いた restriction site associated DNA sequence を行った。得られたシーケンスデータをアコヤガイゲノムにマッピングし SNP を抽出した。ここからデプスが 5 未満の低クオリティな SNP を除去し、白色貝型表現型の個体でホモ接合となる領域を抽出した結果、RBBL 群および RBY 群に共通する領域として一つの scaffold が抽出された。当該 scaffold は約 100kb で、scaffold 内に 4 つの遺伝子が予測されていた。このうち一つは細胞外への物質分泌に関与することが示されている遺伝子で、当該遺伝子の変異により機能が消失すると仮定すれば、外套膜から色素を分泌できないという白色貝の表現型をよく説明する。さらに、当該遺伝子産物は他のファミリータンパク質と複合体を形成し機能するが、そのファミリータンパク質遺伝子における SNP がヒトの肌色や髪の毛の色の違いに寄与するとの報告があることから、当該遺伝子は有力な原因遺伝子候補と考えられた。

3. アコヤガイへの遺伝子導入方法の検討

アコヤガイは商業的な有用性から軟体動物の中では比較的研究基盤の整備が進んでいる。分子生物学の分野についても、RNAi による遺伝子の機能阻害技術が確立され、また全ゲノムのドラフト配列も既に公開されている。しかし、アコヤガイに対して任意の遺伝子を導入するための効率的な方法はまだ確立していない。全ゲノム配列を利用した研究が盛んになる中で、当該手法の確立は、新規遺伝子の機能解析やその応用のためにも重要な技術となる。真珠の色調に関与する遺伝子についても、当該遺伝子を導入することで色調への影響を確認することができ、新しい色調の制御技術の確立につながることも期待される。そこで、アコヤガイに対する効率的な遺伝子導入方法を確立するべく、幾つかの手法を検討した。

サイトメガロウィルスプロモータの下流に緑色蛍光タンパク質遺伝子 hrGFP を連結した発現ベクターを用いて、(1) ピースへのリポフェクション、(2) ピースへのパーティクルガン、の二つの手法による導入効率を比較検討した。リポフェクション法においては、蛍光顕微鏡による発現確認では導入を確認できなかった。一方、金粒子を核酸でコーティングし、高圧で細胞内に打ち込むパーティクルガンについては、蛍光顕微鏡による観察でピースにおける hrGFP の発現を確認することができた。ただし、発現が認められたのは遺伝子導入を行った 25 ピース中 3 ピースで、またピースのごく一部の細胞が発現しているだけであり、導入効率は低かった。

以上本研究では、白色系と黄色系由来真珠袋の性状解析と比較トランスクリプトーム解析から、真珠への黄色色素の蓄積はピース貝の性質に依存すること、関連する遺伝子発現変化はわずかであることを示した。また、母貝が真珠袋の遺伝子発現に大きく影響することを示し、真珠形成における母貝の重要性も提示した。貝殻に色素を蓄積しない突然変異系統を用いたゲノム解析では、細胞外への物質輸送に関わる有力な候補遺伝子を得ることができた。

今後当該遺伝子を原因遺伝子として同定できれば、貝殻や真珠の色調決定メカニズムの解明への新たな展開につながる大きな成果となることが期待される。また、アコヤガイに対する遺伝子導入方法を検討し、効率は低いものの、パーティクルガンによって外套膜片への外来遺伝子を導入できることを確認した。本研究の成果は、今後アコヤガイの真珠の色調決定の分子機構の解明とその応用に向けた研究の進展に大きく寄与するものと考えている。