

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 篠原 幹拓

---

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母貝として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ことが示されているが、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、以下の研究を行った。

第一章では、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を行った。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。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、3 カ月後に真珠袋と真珠を回収した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っており、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黄色系および白色系由来真珠袋6ペアを対象に、cDNA ライブラリを構築しシーケンスを行った。得られた11Gbの配列に対して *de novo* アセンブルとマッピングを行い、99,607 個のコンティグおよびそれらの発現量情報を得た。白色系および黄色系由来真珠袋間の発現変動遺伝子をスクリーニングしたところ、発現変動遺伝子候補が7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に興味を持たれた。

第二章では貝殻に色素を蓄積しない突然変異系統の原因遺伝子探索を行った。白色貝は、貝殻に色素を蓄積しないアコヤガイの自然発生突然変異体である。当該変異については、その

遺伝様式から、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一塩基多型（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、 $F_1$ を得た。 $F_1$ 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、それぞれ RBBL 群および RBY 系統とした。各系統につき、 $F_1$  同士を掛け合わせて  $F_2$  を作出し、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 DNA を抽出した。HiSeq4000 シーケンサを用いた RAD-seq を行い、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ある 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遺伝子で、当該遺伝子の変異は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。さらには関連遺伝子における 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。

第三章ではアコヤガイへの遺伝子導入方法の検討を行った。アコヤガイは商業的な価値とバイオミネラリゼーションのモデルとしての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が、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。CMV プロモータの下流に GFP 遺伝子を導入した発現ベクターを用いて、ピースへのパーティクルガンによる遺伝子導入を行ったところ、蛍光顕微鏡による観察でピースにおける GFP の発現を確認することができた。ただし、導入効率は低く、手法の改善が必要と考えられた。

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遺伝子解析から、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、黄色色調に関連する遺伝子発現変化はわずかであることを示し、幾つかの黄色色素蓄積に関連する遺伝子候補を得た。また、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から、細胞外への物質輸送に関わる有力な候補遺伝子を得た。こうした成果は、今後、本研究で検討した遺伝子導入技術等と組み合わせることで、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られる。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。