

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 家田梨櫻

指導教員名 菊池潔

論文題目 フグ類の性決定遺伝子に関する遺伝学的研究

動物の性はしばしば産業上重要な形質であり、その形質を支配する性決定遺伝子は典型的な有用遺伝子であるといえる。しかし、動物生産分野と比べて水産分野における活用例は未だ少ない。その理由のひとつは、哺乳類のほとんどで性決定遺伝子が保存されているのとは対照的に、水産生物の性決定遺伝子が種間で必ずしも保存されていないからである。特に魚類の場合、その性決定遺伝子が近縁種の間でさえも異なっている可能性が、最近明らかとなってきた。したがって、魚類性決定遺伝子を今後有効に活用していくためには、「近縁種間で急速に進化する遺伝機構」という視点で性決定機構を捉え直していくことが必要となる。本研究では、有力な性決定遺伝子候補が特定されているトラフグ (*Takifugu rubripes*) とその近縁種をモデルグループとして、性決定遺伝子の機能解析および新規性決定遺伝子の探索をおこない、「魚類近縁種間で性決定機構が変化する現象」の理解に資することを目指した。

本研究ではまず、(1) トラフグの性決定遺伝子候補 *Amhr2* 遺伝子が性決定能をもつことを示すため、機能解析をおこなった。次に、(2) その役割が近縁種間で保存されている可能性を検討した。さらに、トラフグ属の中で新規性決定遺伝子を獲得したと考えられる 3 種、(3) クサフグ (*T. niphobles*)、(4) ショウサイフグ (*T. snyderi*)、(5) ナシフグ (*T. varmicularis*) について、各性決定遺伝子の特定を目指した遺伝学的解析をおこなった。

(1) *Amhr2* の性決定能

Amhr2 の性決定能を証明するため、トランスジェニック法を用いた機能亢進実験およびゲノム編集技術を用いた機能欠失実験をおこなった。まず、雄 (XY 型) に特異的なアリルである *Amhr2^Y* をトランスジーンとしてもつ XX 型トラフグ個体を作出したところ、それらは全て精巣を形成した。一方で、トランスジーンをもたない XX 型個体はすべて卵巢を形成した。次に、*Amhr2^Y* を雄特異的なアリルとしてもちながら、トラフグよりも世代時間の短いコモンフグ (*T. poecilonotus*) を材料として、CRISPR/Cas9 法により *Amhr2* の exon2 にフレームシフト変異を導入した個体を作出したところ、*Amhr^Y* に変異をもつ XY 型個体は全て卵巢をもっていた。一方で、*Amhr2^Y* に変異が認められない XY 型個体の 59% は精巣をもっていた。以上より、*Amhr2^Y* は精巣運命を決定する機能をもつと考えられた。

(2) *Amhr2* が性を決定しない近縁種たち

少数個体を用いた予備的研究により、トラフグとその近縁 9 種の雄は *Amhr2^Y* アリルを維持するが、クサフグ、ショウサイフグ、ナシフグの 3 種は、*Amhr2^Y* アリルを失っている可能性が示されている。これを実証するため、はじめに *Amhr2^Y* をもつかどうかを迅速に判定する手法を High Resolution Melting 法をもとに開発した。次に本法を用いて、3 種の野生集団における *Amhr2^Y* の有無を判定したところ、表現型の雌雄に関わらず本アリルの存在は認められなかった。したがって、これら 3 種は *Amhr2^Y* を完全に失っており、その性は *Amhr2* とは異なる遺伝子座により決定されている可能性が高いと考えられた。また、*Amhr2^Y* を失った種で未だ *Amhr2^Y* が性を決定できるかどうかを調べるため、クサフグを用いた種間トランスジェニック実験をおこなった。その結果、トラフグ *Amhr2^Y* をトランスジーンとしてもつクサフグ個体は全て精巣を形成していた。したがって、クサフグは *Amhr2^Y* を失っているにも関わらず、*Amhr2^Y* を起点とした雄決定カスケードを保持していることが判明した。

(3) クサフグの性決定遺伝子

上記の結果から、クサフグはトラフグとは異なる性決定遺伝子をもつ可能性が示された。そこでまず、共同研究者がおこなった連鎖解析のデータを再検討することにより、クサフグの性決定遺伝子が含まれるゲノム領域 (性決定領域) を特定した。その結果、クサフグの性決定遺伝子座は *Amhr2* 座と同じ 19 番染色体上に存在するものの、*Amhr2* 座とは異なった位置にあることが明らかとなった。しかし本解析では、雄特異的な組換え抑制が原因で、クサフグの性決定領域を 9.9 Mb 以下に狭めることはできなかった。そこで次に、XY 型でありながら表現型が雌である個体を選抜して解析家系を作出し、雄特異的な組換え抑制を回避した連鎖解析を試みた。その結果、性決定領域を 300 kb 程度まで狭めることに成功した。さらに性決定領域を狭めるた

め、集団ゲノミクスの解析をおこなった。まず、雌雄それぞれ 10 尾の野生クサフグを全ゲノムリシーケンスに供し、これをトラフグのゲノム配列に対してマッピングした後、得られたデータから雄でヘテロ接合となり、雌でホモ接合となる SNP 座 (sex patterned SNP) を抽出した。次に、その分布パターンを性決定領域について見たところ、sex patterned SNP のクラスターが認められ、そのうち 2 つの SNP 座は *Appl1* 遺伝子上に存在していた。これらの SNP について、解析個体数を雌雄それぞれ 50 尾ずつとして関連解析をおこなったところ、1 つの SNP 座と性が有意に関連していることが判明した ($-\log_{10}(P) = 14.3$)。したがって、性決定遺伝子 (変異) はこの SNP のごく近傍に存在すると考えられた。また、トランスクリプトーム解析をおこなった結果、*Appl1* はクサフグの未分化生殖腺で発現が認められ、さらに XY 個体では形態的雌雄分化後に発現量が上昇する傾向があった。

(4) ショウサイフグの性決定遺伝子

連鎖解析の結果、ショウサイフグの性決定遺伝子座は 18 番染色体上にあることが判明したが、長腕末端に位置したため、性決定領域の長さを推定することはできなかった。そこで、全ゲノムを対象とした集団ゲノミクス解析をおこなった。まず、雌雄それぞれ 34 および 35 尾からなる野生個体集団を全ゲノムリシーケンスに供し、これをトラフグのゲノム配列に対してマッピングして sex patterned SNP の抽出をおこなった。その結果、18 番染色体ではなく、6 および 14 番染色体上に顕著な sex patterned SNP のクラスターが認められた。ショートリードのマッピング状況をみたところ、6 番染色体上の *Gsdf* 遺伝子の上流には 466 bp の雄特異的配列が、14 番染色体上の *Diaph2* 遺伝子には 73 bp の雄特異的配列が認められた。これらの領域について、解析個体数を雌雄それぞれ 50 尾まで増やした関連解析をおこなったところ、双方とも性と高い関連 ($-\log_{10}(P) = 23.9$) を示した。この結果は一見連鎖解析の結果と矛盾することから、*Gsdf* と *Diaph2* の連鎖解析をおこなった。その結果、2 つの雄特異的配列座は 18 番染色体の性決定領域と完全に連鎖していた。別途、リシーケンシングデータの被覆深度を解析したところ、当該領域に雄特異的な深度増大が認められ、両遺伝子の重複が示唆された。したがって、両遺伝子は重複した後、18 番染色体の性決定領域に転座したと考えられた。他の生物で報告された両遺伝子の機能を考慮すると、これらは有力な性決定遺伝子の候補であると考えられる。

(5) ナシフグの性決定遺伝子

ナシフグの性決定遺伝子座を連鎖解析した結果、10 番染色体長腕末端に位置していることが明らかとなった。そこで、雌雄それぞれ 5 尾の野生ナシフグを全ゲノムリシーケンスに供し、トラフグのゲノム配列にマッピングしたところ、ショウサイフグと同様に、*Gsdf* と *Diaph2* にオス特異的な配列が認められた。そこで、解析個体数を雌雄それぞれ 50 尾まで増やした関連解析

をおこなった結果、両座とも性と高い関連 ($-\log_{10}(P) = 27.0$) を示すことが明らかとなった。連鎖解析をおこなったところ、2 つの雄特異的配列座は 10 番染色体の性決定領域と完全に連鎖した。したがって、ナシフグにおいても、両遺伝子は重複した後、10 番染色体の性決定領域に転座したと考えられた。

以上本研究では、トラフグの性決定遺伝子が *Amhr2* であることを機能解析により示すとともに、3 種の近縁フグにおいて、新規性決定遺伝子の候補を得ることに成功した。これにより、「近縁種間で性決定機構が変化する現象」の一端が明らかとなった。すなわち、トラフグ属内では多くの種が祖先的な性決定遺伝子座を共有しているものの、ごく一部の種が新しい性決定遺伝子を獲得していることが判明した。さらに、クサフグにおいて *Amhr2* を起点とする性決定パスウェイが遺存していたことや、*Appl1* や *Diaph2* が性ホルモンのパスウェイと関わる可能性があることなどから、新規性決定遺伝子は既存のパスウェイを利用する形で誕生した可能性が高いと考えられた。これらの知見や上記の性決定遺伝子同定ストラテジーを他の魚類に適用することで、従来よりも迅速に性決定遺伝子を決定することが可能となることから、本研究の成果は水産分野における性決定遺伝子の有効活用に大きく貢献すると考えられる。