

博士論文 (要約)

フグ類の性決定遺伝子に関する遺伝学的研究

家田 梨櫻

目次

序論	1
第1章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
第2章 <i>Amhr2</i> が性を決定しない近縁種たち	32
第1節 トラフグ性判別法の開発	34
第2節 本章本節以降の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
第3章 クサフグの性決定遺伝子	56
第1節 性決定遺伝子座の特定	57
第2節 性転換個体を用いた詳細な連鎖解析	62
第3節 本章本節以降の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
第4章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
第5章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
第6章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。	
要旨	114
謝辞	118
引用文献	121
図・表	
補遺	

序論

多くの動植物で見られる様々な雌雄の違い、すなわち性差は、根源的な生命現象のひとつである。動物の個体発生において、最初期にあらわれる性差は生殖腺の形態である。はじめは形態的に未分化であった生殖腺原基は、卵巢原基および精巣原基へと分化し、その後、これらはそれぞれ機能的な卵巢および精巣へと分化していく。形態的に未分化な生殖腺の中で卵巢運命または精巣運命が決定する過程を性決定という (Hayes 1998)。一方、未分化な生殖腺が、機能的な卵巢あるいは機能的な精巣へ分化していく過程を性分化という。現在、性を決定する要因は、遺伝的要因、あるいは温度や個体密度といった環境要因であると考えられている (小林ら 2013)。これらの中で本論文では遺伝的要因、すなわち性決定遺伝子とそれが座乗する性染色体に焦点を当てる。

性染色体の発見

性決定の遺伝的要因に関する研究の歴史は比較的浅く、最初の大きな進展は性染色体の発見に認められる。ドイツの Hermann Henking は 1891 年にホシカメムシ (*Pyrrhocoris apterus*) の精巣から取り出した染色体の中に見つけた奇妙な染色体を X 染色体として報告し、後に、Clarence Erwin McClung (1902 年) と Edmund Beecher Wilson (1905 年) がこの謎の染色体を性染色体と表現しはじめた (Bainbridge 2003; Henking 1891; McClung 1901; Wilson 1905)。さらに、1905 年に Nettie Maria Stevens がチャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*) から発見した X 染色体よりも小さなサイズの染色体を Y 染色体として報告し、Y 染色体がオス生産に関与する可能性を議論している (Bainbridge 2003; Stevens 1905)。

現在では、性染色体は雌雄異体の生物において雌雄間で形態や数が異なる染色体、あるいは、性決定遺伝子座が座乗する染色体と定義されている。なかでも雌雄間で形が異なる性染色体のペアがある場合、それらはもともと同形の染色体であったものの、組換え抑制や遺伝子喪失などにより、異形化が進んだと考えられている (Bachtrog et al. 2014)。ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) のように Y 染色体が長大化したものから、ヒトのように Y 染色体が矮小化したものまで、異形化の様式は種ごとに異なっている (Kazama et al. 2016; Bachtrog 2013; Bachtrog et al. 2014)。

多様な性決定遺伝子

動物で最初の性決定遺伝子として同定されたのは、マウスの性決定遺伝子 *Sry* (*sex determining region Y protein*) である (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991)。その後の研究で、モグラレミング (*Ellobius lutescens*)、トゲネズミ属の2種アマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*) およびトクノシマトゲネズミ (*Tokudaia tokunoshimensis*) などを除くほとんどの真獣類で、*Sry* が性決定遺伝子として働いていることが明らかとなった (Just et al. 1995; Soullier et al. 1998; Sutou et al. 2001)。また、両生類ではアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の *DM-W* (*W-linked DM-domain gene*) が性決定遺伝子として報告されている (Yoshimoto et al. 2008)。最も多くの性決定遺伝子あるいは有力な候補が同定されているのは魚類で、現在までに7種類が報告されている。すなわち、メダカ (*Oryzias latipes*) の *Dmy* (*DM-domain gene on the Y chromosome*)、ルソンメダカ (*Oryzias luzonensis*) の *GsdfY* (*Gonadal soma derives factor on the Y Chromosome*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の *sdY* (*sexually dimorphic on the Y-chromosome*)、パタゴニアペヘレイ (*Odontesthes hatcheri*) の *amhy* (*Y chromosome-specific anti-Müllerian hormone*)、トラフグの *Amhr2* (*Anti-Müllerian Hormone Receptor TypeII*)、インドメダカ (*Oryzias dancena*) の *Sox3Y* (*Sox3 on the Y chromosome*)、ナイルティラピア (*Opeochromis niloticus*) の *amhy* (*Y-specific duplicate of the anti-Müllerian hormone*) である (Matsuda et al. 2002; Myosho et al. 2012; Yano et al. 2012; Hattori et al. 2012; Kamiya et al. 2012; Takehana et al. 2014; Li et al. 2015)。この他、鳥類の有力な性決定遺伝子候補として *Dmrt1* (*Double sex and mab-3 related transcription factor 1*) が報告されている (Smith et al. 2009)。一方、動物と比べると植物の性決定遺伝子に関する知見は少なく、2014年に報告されたマメガキ (*Diospyros lotus*) の *OGI* (*oppressor of megi*) がはじめての同定例である (Akagi et al. 2014)。さらに、2017年にはアスパラガス (*Asparagus officinalis*) の性決定遺伝子 *MSE1* (*Male Specific Expression 1*) が同定された (Murase et al. 2017)。

上記の知見は、性決定機構の頂点にある性決定遺伝子が、種間で必ずしも保存されておらず、進化の過程で次々と移り変わっていくことを示している。とりわけ魚類は、その傾向が現在までに研究されている分類群の中で最も強いようである。

性決定遺伝子の利用

動植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。例えば、ウシやブタの雌雄判別マーカーとして *Sry* が利用されている (Gokulakrishnan et al. 2012; Choi et al. 2009)。また、オスがメスよりも高品質の絹糸を作るカイコガ (*Bombyx mori*) の場合、性決定遺伝子はカイコの人為的性操作だけでなく鱗翅目害虫の防除法への応用も期待されている (Kiuchi et al. 2014)。栽培植物であるアスパラガスの場合、雌雄で茎の太さや収穫量が異なるため、性決定遺伝子の同定が農業生産に貢献することが期待されている (Murase et al. 2017)。先述の通り、植物の性決定遺伝子同定は進んでいないが、その原因のひとつには、植物の多く (種子植物の 70%以上) が両性花をもち、雌雄異株性を示す種が少数派であることが考えられる (Yampolsky and Yampolsky 1922)。しかし、産業上重要な雌雄異株性の植物は多数存在し、それらにおいて性差はしばしば生産性に重要な影響を与える要因であることから、植物においても今後性決定遺伝子の同定が進むことが期待される。

水産生物の場合、雌雄で価値が異なるものが数多く存在する (隆島 1990)。その例としては、メスの卵巣が利用されるアユやサケなどが挙げられ、実際、性統御技術が産業上活用されている (桑田 2014)。しかし、動物生産分野と比べて水産分野における性決定遺伝子あるいは性判別マーカーの活用例は未だ少ないのが現状である。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だと考えられる。

移り変わる性決定遺伝子

性染色体は、近縁種間でさえも保存されていない場合があることが報告されている (Tanaka et al. 2007)。こういった移行現象を性染色体のターンオーバー (turnover) という (Mank and Avise 2009)。これまでの研究により、性染色体のターンオーバーは、少なくとも以下の 3 つのプロセスにより起きると考えられている (Kitano and Peichel 2012)。ひとつは (1) 新しい性決定遺伝子座が生まれて、古い性染色体が集団から失われる場合である。次に、(2) 既存の性決定遺伝子座が転座・転位して新たな性染色体が生まれ、既存の性染色体が集団から失われる場合である。最後は、(3) 性染色体と常染色体が融合してネオ性

染色体が生じる場合である（図 序論-1）。同属種間における性染色体のターンオーバーという現象に関して、現在、最も詳細な研究がなされている分類群はメダカ属である（Hamaguchi et al. 2004; Schartl 2004; Takehana et al. 2007a; Takehana et al. 2007b; Nagai et al. 2008; Takehana et al. 2008; Myosho et al. 2015）。なかでも Myosho et al. (2015) は、メダカとその同属 14 種における性染色体の同祖性（オルソロジー）を検討し、それら 15 種の中に 7 つの非同祖的性染色体が存在することを示している。これらメダカ近縁種の性染色体のターンオーバーの少なくとも一部は、全く新しい性決定遺伝子が常染色体に生じることでおきたと考えられている（(1) のケース）。一方、ニジマスを含むサケ類では、13 種が *sdY* を性決定遺伝子としてもつが、そのうち 4 種では *sdY* が存在する染色体が異なる（Woram et al. 2003; Yano et al. 2013）。これらの非同祖的性染色体は *sdY* の転位によりうまれたと考えられている（(2) のケース）。さらに、イトヨ（*Gasterosteus aculeatus*）では（3）のネオ性染色体が報告されている（Yoshida et al. 2014）。

上記のような性染色体のターンオーバーは、性染色体の非同祖性（非相同性）を手がかりとして明らかにされてきたが、理論上は、同じ性染色体に新しい性決定遺伝子が誕生するということもありえる。こういった観点から、既存の性染色体に新しい性決定遺伝子座が誕生して既存の性決定遺伝子座が失われる場合を homologous transition/turnover とよび、常染色体上に新しい性決定遺伝子座がうまれて既存の性染色体が失われる場合、あるいは、ネオ性染色体が既存の性染色体と置き換わることを、nonhomologous transition/turnover とよぶ（Schartl 2015）。

「性染色体のターンオーバー」のアナロジーとして、性決定遺伝子についても「性決定遺伝子のターンオーバー」という表現がしばしば使われる（Ross et al. 2009）。性決定遺伝子のターンオーバーは新規性決定遺伝子の誕生をともなうが、新規性決定遺伝子の誕生はこれまでの研究から、少なくともふたつのプロセスにより生じることが明らかとなっている。ひとつは（1）遺伝子の重複と転座により新しい性決定遺伝子および遺伝子座が誕生する場合であり、もうひとつは（2）ある遺伝子座のアリルが分化することで、その遺伝子座が性決定能を獲得する場合である（Kikuchi and Hamaguchi 2013）（図 序論-2）。

トラフグ属を研究対象とする意義

本研究の供試魚であるトラフグは、日本とその近隣諸国において重要水産種であるだけでなく、脊椎動物におけるゲノムモデル生物として注目されており、ゲノム概要配列と 22 本全ての染色体を網羅する連鎖地図が報告されている (Hedges and Kumar 2002; Aparicio et al. 2002; Kai et al. 2005; Kai et al. 2011)。これまでに、上述の研究基盤を活用した順遺伝学的解析により、トラフグの性は *Amhr2* 遺伝子内に存在する SNP (single nucleotide polymorphism、SNP7271) によって決定されるものと推定されている (Kamiya et al. 2012)。この SNP 座は非同義アミノ酸置換をもたらし、X 染色体上のアリル (*Amhr2^X*) におけるヒスチジンが、Y 染色体上のアリル (*Amhr2^Y*) ではアスパラギン酸に置換されている。このアミノ酸の違いでタンパク質における機能差が生まれ、それによりトラフグの雌雄が決定されると考えられている。一方、トラフグを含むトラフグ属は、約 20 種から構成されており、ミトコンドリア DNA 全塩基配列情報を用いた系統解析により、今から約 200-500 万年前に東シナ海を中心とした狭い海域で爆発的に種分化したことが明らかとなっている (図 序論-3) (Yamanoue et al. 2009)。これらのトラフグ近縁種は遺伝的に非常に近い関係にあるが、興味深いことに *Amhr2* とは異なる性決定遺伝子をもつ種もいることが示唆されている (所属研究室における未発表データと本論文)。

冒頭でも述べた通り、約 1800 万年前から分岐をはじめたメダカ属魚類では (Setiamarga et al. 2009)、同属種の多くが異なる性決定遺伝子をもつことが示唆されている (Myosho et al. 2015)。また、約 6000 万年前から放散が始まったサケ科魚類では、種分化の過程で *sdY* が性染色体間を移動したと考えられている (Woram et al. 2003; Yano et al. 2013)。これら性決定遺伝子の保存性と非保存性が解析されているこれらの淡水魚のグループと比較すると、本研究の供試魚であるトラフグ属は約 200-500 万年前に急速に放散しており、その分岐年代は極めて浅い (Yamanoue et al. 2009)。したがって、トラフグ属魚類を研究対象とすることで、種分化直後の生物群における性決定遺伝子の多様化パターンに関する知見を得ることができると考えられる。前述したようにゲノムレベルの解析リソースがトラフグで整備されているが、これらを近縁種に適用することで (Hosoya et al. 2013a)、効率的にトラフグ属魚類の性決定遺伝子に関する研究が進むと期待される。フグ類はいうまでもなく、ブリ類、サバ類、マグロ類、タイ類など、水産上重要な魚の多くが近縁種群から構成されている。本研究で得られる知見は、今後、水産重要魚種で性決定遺伝子の情報を有効に活用していく

ための基盤となると考えられる。

研究の目的

本研究では、有力な性決定遺伝子候補 *Amhr2* が特定されているトラフグ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。

これ以降の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第1章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第2章 *Amhr2*が性を決定しない近縁種たち

水産分野における性決定研究の大きな目的のひとつは、養殖魚の親魚選抜などで性統御に性決定遺伝子を役立てることにある。しかし、食用魚種の大多数を占める海産魚において性決定遺伝子が同定されているのはトラフグのみである。この状況を打破すべく、性決定遺伝子座の解析が世界各地で進行しており、性判別マーカーが得られている魚種が増えている。例えば、海産魚で性決定遺伝子座が明らかになっている例として、ブリ (*Seriola quinqueradiata*) やカラアカシタビラメ (*Cynoglossus semilaevis*)、イシビラメ (*Scophthalmus maximus*)、オヒョウ (*Hippoglossus stenolepis*)、イシダイ (*Oplegnathus fasciatus*)、タイセイヨウダラ (*Gadus morhua*) などが挙げられる (Koyama et al. 2015; Chen et al. 2007; Chen et al. 2014; Martínez et al. 2009; Viñas et al. 2012; Galindo et al. 2011; Palaiokostas et al. 2013; Star et al. 2016)。こういった水産重要魚種はその近縁種も水産上重要であることが多い。ところが、性判別マーカーは往々にして種特異的である。さらに性決定遺伝子本体が同定されていない魚種では、その性判別マーカーは一部の家系でのみしか有効でない場合が多く、利便性が著しく低い。そこで、性決定遺伝子の有力な候補が同定されているトラフグとその近縁種群を利用して、近縁種群内における性決定遺伝子の保存性に関する知見を得ることにした。

本章の内容の一部は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第1節 トラフグ性判別法の開発

トラフグの SNP7271 座の多型は、ダイレクトシーケンスや制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析法などで判定できるが、多検体をより迅速に判定する方法として High Resolution Melting (HRM) 解析法 (Liew et al. 2004) の確立を試みた。HRM 解析では、PCR 産物に取り込ませた蛍光物質を利用し、温度上昇に伴う二重鎖の乖離状態を蛍光強度で定量することで、SNP の有無を調べることができる (Erali et al. 2008)。すなわち、ミスマッチ塩基対のないホモ二重鎖とミスマッチ塩基対があるヘテロ二重鎖を比較した場合、ヘテロ二重鎖の方が低温で乖離しやすく、温度上昇時に、蛍光強度の上昇が早い。SNP を含む領域を PCR 増幅した場合、ミスマッチ塩基対を含むヘテロ二重鎖が生成されるため、HRM 法で蛍光強度の増大を測定することで SNP の有無を判定できる。本実験では、まず天然魚雌雄 2 個体ずつを用いて HRM 解析による雌雄判別法を試みた。次に、同法を用いて多検体を迅速に解析できるかどうかを調べた。

材料と方法

供試魚

雌雄判別法の確立には天然魚を用いた。また、正確性の検討には人工種苗 (TT05 家系および TT06 伊豆家系) を用いた。

野生個体：2010 年に南伊豆で採捕されたメス 1 個体 (個体認識番号 F12) および、2011 年に南伊豆で採捕されたオス 2 個体 (個体認識番号 103、63C) とメス 1 個体 (個体認識番号 A73) を使用した。

TT05 家系 (TT0505 と TT0510)：トラフグ種苗販売業者により、2005 年 2 月 10 日に人工授精がおこなわれた。水温 17 度で飼育された同胞個体群は、2005 年 4 月 7 日に東京大学水産実験所まで移送して、5 月 11 日 (TT0505) および 10 月 2 日 (TT0510) にサンプリングされた。なお、TT05 家系における TT0510 と名付けられた同胞個体群は Kikuchi et al. (2007) によって報告されている。

TT06 伊豆家系：南伊豆栽培漁業センターにおいて、2006 年 4 月 18 日に人工授精がおこなわれた。4 月 30 日に東京大学水産実験所に移送後、水温 18-20 度で飼育した同胞個体群

は 2006 年 7 月 4 日と 9 月 29 日にサンプリングされた。

本実験における家系サンプルは、松永（2007）、Kamiya et al.（2012）によって報告され、「マイクロサテライト座から推定した性の遺伝子型」と「性の表現型」がわかっている。

ゲノム抽出

約 0.5 cm² の尾鰭を 400 μ l の 8 M 尿素を含む TNESU8 緩衝液（10 mM Tris-HCl、pH7.5、125 mM NaCl、10 mM EDTA、1 % SDS、8 M 尿素）中で、数日から数ヶ月保存した（Asahida et al. 1996）。次に、Gentra Puregene Tissue Kit（QIAGEN）を用いて、取扱説明書に従いゲノム DNA の抽出をおこなった。ゲノム DNA 溶液は、1-50 ng/ μ l になるように超純水で調整した。

PCR と HRM

ゲノム DNA 溶液（10-30 ng/ μ l）1 μ l を鋳型として、4 μ l の High Sensitivity Master Mix（Idaho Technology）、0.5 μ l の Forward primer（10 μ M）、0.5 μ l の Reverse primer（10 μ M）を加え、超純水で合計 10 μ l とし PCR 増幅をおこなった。プライマー配列は表 2-1-1 に記した。最初に、95°C で 2 分間 DNA を熱変性処理し、次に 94°C で 30 秒間、65°C で 30 秒間の増幅反応を 30 サイクルおこない、94°C で 30 秒間の反応をおこなった後、25°C まで温度を下げて反応を停止させた。続けて、Lightscanner（Idaho Technology）を用いて、50-92°C まで 0.1°C/秒ごとの融解温度曲線を記録した。遺伝子型は、ソフトウェア（Call-IT）で融解曲線をグループ化して判別した。

ダイレクトシーケンス

まず、シーケンスに用いる鋳型サンプルを PCR 法で得た。ゲノム DNA 溶液（10-30 ng/ μ l）1 μ l を PCR の鋳型として、Forward primer を 0.3 μ l、Reverse primer を 0.3 μ l、2.5 mM dNTP mixture（Nippon Gene）を 1.2 μ l、Hot-Start Gene Taq（Nippon Gene）を 0.15 μ l 加え、滅菌蒸留水で合計 15 μ l とし、iCycler（Bio-Rad）を用いておこなった。プライマー配列は表 2-1-2 に記した。最初に 94°C で 3 分間 DNA を変性処理し、次に 94°C で 10 秒間、58°C で 5 秒間、72°C で 1 分間の増幅反応を 35 サイクルおこない、その後 4°C まで温度を下げて反応を停止

させた。これによって得られた増幅産物を鋳型として、サイクルシーケンスキット Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて、サイクルシーケンス反応をおこなった。その後、Clean SEQ (Beckman Coulter) を用いてサイクルシーケンス反応物の精製をおこない、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。得られた配列は MEGA5 (Tamura et al. 2011) を用いて整序した。

結果と考察

まず、野生トラフグ雌雄 2 尾ずつを用いて、ダイレクトシーケンスをおこなったところ、予想通りオスは SNP 座においてヘテロ接合を、メスではホモ接合を示した (図 2-1-1 A)。次に、SNP7271 座を挟み込むようにしてプライマーを設計し、上記サンプルを HRM 解析に供した。その結果、ダイレクトシーケンスで判別した SNP の遺伝子型と HRM 解析の結果は一致した (図 2-1-1)。オスでは、homoduplex の乖離から得られる 81°C 付近ピークに加えて、heteloduplex に由来すると考えられる 77.5°C 付近のピークが認められた (図 2-1-1 B)。これにより、本システムを用いれば、SNP7271 座におけるヘテロ接合型とホモ接合型を区別できることが示された。

つぎに多検体を用いた場合のシステムの迅速性と正確性を検討するため、「性の遺伝子型」および「性の表現型」があらかじめ既知の TT05 家系を用いた。雌雄 48 尾ずつを 96 穴プレート上で一度に HRM 解析に付したところ、野生個体と同様にふたつの遺伝子型を明瞭に区別することができた (図 2-1-1 C)。さらに、その遺伝子型とマイクロサテライトにより判別された既報の遺伝子型 (松永 2007; Kamiya et al. 2012) は完全に一致した。さらに、TT05 家系の別個体 (オス 112 尾、メス 93 尾) および TT06 伊豆家系の個体 (オス 36 尾、メス 59 尾) を HRM 解析に供したところ、その遺伝子型は、マイクロサテライトにより判定された既報の遺伝子型 (松永 2007; Kamiya et al. 2012) と完全に一致した (表 2-1-3)。96 サンプルの解析に要する時間は、PCR 後およそ 15 分であった。

以上の結果から、HRM 解析を用いれば、大量サンプルにおける SNP7271 座の遺伝子型を正確かつ迅速に判定できることが示された。

第 2 節 以降本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第3章 クサフグの性決定遺伝子

魚類の性決定遺伝子は哺乳類や鳥類と比較して急速なターンオーバーが認められ、近縁種においてさえも異なる性決定遺伝子をもつ分類群が報告されている (Myosho et al. 2012; Takehana et al. 2014)。クサフグは、トラフグを含むトラフグ属魚類に属し、*Amhr2* を性決定遺伝子とするゴマフグやシマフグなどと近縁な関係にある (図 序論-3) (Yamanoue et al. 2009)。また、クサフグとトラフグは核型解析から 22 対の染色体をもち、種間で類似した染色体形態を示すことが報告されている (Miyaki et al. 1995)。さらに、遺伝的に近い関係にあるため妊性があり、この種間雑種を利用して表現型の種間差を規定する遺伝子座や種間のゲノム構造の保存性が研究されている (Hosoya et al. 2013a; Hosoya et al. 2013b)。しかし、第2章第2節の結果から、クサフグは *Amhr2* とは異なる性決定遺伝子をもつ可能性が高いと考えられた。

性決定遺伝子のターンオーバーを研究するにあたり、その分子の実体を明らかにすることは重要である。クサフグはトラフグとゲノム構造がよく似通っており、遺伝学的解析するには適した材料である。そこで、クサフグが獲得したと思われる新規性決定遺伝子の同定を目指し、以下の実験をおこなった。

本章の内容の一部は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第1節 性決定遺伝子座の特定

これまで、染色体の位置情報をもとに対象となる遺伝子を調べる手法、すなわちポジショナルクローニング法を用いて、複数の性決定遺伝子が同定されてきた (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990; Matsuda et al. 2002; Kikuchi et al. 2007; Myosho et al. 2012; Takehana et al. 2014)。特に、性染色体ペア (X と Y など) 間における組換え抑制領域がさほど発達していない生物の場合、家系ベースの連鎖解析は、性決定遺伝子座を特定するにあたって強力な解析手法となる (Matsuda et al. 2002)。本研究の対象魚種であるクサフグは、ゲノム連鎖地図が公開されているトラフグとの間でゲノム構造の保存性が高く、トラフグ連鎖地図をもとに遺伝学的解析をおこなうことができる (Hosoya et al. 2013a; Hosoya et al. 2013b)。本節では、クサフグの性決定座を同定して、その性決定遺伝子が含まれるゲノム領域(性決定領域)を限局化するため、まず共同研究者の解析データを再解析した。

材料と方法

供試魚

以下の異なる 2 家系群を作出し、そのうち合計 6 家系を連鎖解析に用いた。

kusa09 家系群 (kusa0901 家系、kusa0902 家系、kusa0903 家系) : 3 尾の野生クサフグオスと 1 尾の野生クサフグメスを用いて、2009 年 6 月 5 日に人工授精をおこなった。この授精卵を、水温 20°C で孵化させた。孵化後、同一水槽内で 3 家系を混合し、22°C になるまで、水温を 1 日あたり 0.5°C 上昇させた。その後、水温 22°C 前後で飼育を続け、2011 年 3 月 28 日、3 月 29 日および 4 月 8 日に平均体長約 80 mm の個体をサンプリングした。この中から kusa0901 家系と kusa0902 家系を解析に用いた (表 3-1-1)。

kusa11 家系群 (kusa1101 家系、kusa1102 家系、kusa1103 家系、kusa1114 家系 kusa1105 家系、kusa1106 家系、kusa1107 家系、kusa1108 家系、kusa1109 家系、kusa1110 家系) : 2011 年 6 月 7 日に、4 尾の野生クサフグオスと 1 尾の野生クサフグオスを用いて人工授精をおこなった。同時に、6 尾の野生クサフグオスと 1 尾の野生クサフグオスを用いて人工授精をおこなった。得られた授精卵を水温 20°C で孵化させた後、10 家系を混合し、22°C になるま

で、水温を 1 日あたり 0.5°C 上昇させた。その後、水温 22°C 前後で飼育を続け、2011 年 10 月 12 日、10 月 17 日および 10 月 18 日に平均体長約 50 mm の個体をサンプリングした。これらの中から、kusa1107 家系、kusa1108 家系、kusa1109 家系、kusa1110 家系を解析に用いた（表 3-1-2）。

「性の表現型」の判別

kusa09 家系群については、サンプリングした各個体から生殖腺を摘出し、肉眼で観察し、卵巣腔の有無により精巣・卵巣の判別をおこなった。一方、kusa11 家系群については、サンプリングした各個体から生殖腺を摘出した後、実体顕微鏡下で観察して精巣・卵巣の判別をおこなった。

ゲノム DNA の抽出

kusa09 家系群のクサフグ尾鰭よりゲノム DNA を抽出した。まず、約 0.5 cm² の尾鰭を 400 µl の TNESU8 緩衝液（10 mM Tris-HCl、pH 7.5、125 mM NaCl、10 mM EDTA、1% SDS、8 M 尿素）中で、数日から数ヶ月間保存した（Asahida et al. 1996）。次に、Quick Gene DNA Tissue Kit S（FUJIFILM）を用いて、取扱説明書に従いゲノム DNA の抽出をおこなった。ゲノム DNA 溶液は、1-50 ng/µl になるように超純水で調整した。

kusa11 家系群の場合、上記と同様に尾鰭を保存した後、Gentra Puregene Tissue Kit（QIAGEN）を用いて、取扱説明書に従いゲノム DNA の抽出をおこなった。ゲノム DNA 溶液は、1-50 ng/µl になるように超純水で調整した。

家系判別と「性の遺伝子型」の判定

第 2 章第 4 節に準じておこなった。

遺伝地図の構築と連鎖解析

各家系について、母親と父親の分離データに基づいて父母それぞれの遺伝地図を構築した。Sewell et al.（1999）の方法に従い、対立遺伝子の由来(相)を推定した。その後、R/qtl ソフトウェア（Broman et al. 2003）を用いて各減数分裂イベントにおいてマーカー間の連鎖

を調べた。マーカー間の遺伝距離は Kosambi のマッピング関数を利用して計算した。また、父母間統合マップも作成した。

QTL (Quantitative trait locus) 解析では、使用したマーカーについて性と連鎖するゲノム領域を R/qtl を用いて interval mapping 法で解析した。解析には Expectation Maximization (EM) アルゴリズムを用い、データは binary model を採用し、インターバルは 0.1cM とした。また、chromosome-wide 解析における有意水準は permutation test を 10,000 回試行して決定した ($p < 0.001$) (Churchill and Doerge 1994)。遺伝子座の 95%信用区間はベイズ法で推定した。

QTL と性との連鎖の強さは LOD (log of odds) 値で表した。LOD とは、尤度比 (odds) を対数で表したもののだが、連鎖解析の場合、その遺伝子座に QTL が存在しないという帰無仮説の尤度に対する QTL が存在すると仮定した対立仮説の尤度の比を対数で表した値である。LOD 値が有意水準を超えた場合、その近傍に QTL があると推定される。

正確確率検定

各マーカー座の遺伝子型と「性の表現型」との関連をフィッシャーの正確確率検定により検定した。

結果と考察

まず 2 家系 (kusa0901 と kusa0902) からそれぞれ 39 個体について、「性の表現型」とマイクロサテライトマーカーを用いて判定した遺伝子型との関連を調べた。その結果、両家系で連鎖群 19 (19 番染色体) の近位末端近傍において、父由来の遺伝マーカーアリルと「性の表現型」との間に強い関連があることが明らかとなった (図 3-1-1 A、図 3-1-2 A)。関連値は連鎖群 19 の遠位末端に向かうごとに減少し、マーカー 1482k と 1469k の間に位置する *Amhr2* 遺伝子座近傍の関連値は中間的な値を示した。母由来の遺伝マーカーアリルと「性の表現型」との間には関連が認められなかった。これらの結果は、連鎖群 19 の近位末端近傍の領域が、XX/XY システムによりクサフグの性を決定していることを示唆している。

しかし、最も強い関連を示したマーカー遺伝子座でさえ、「性の表現型」と「性の遺伝子型」との間に不一致があった (表 3-1-1)。例えば、kusa0901 家系ではオス 25 個体中 2 個体は XX 型であった。この不一致は、性決定遺伝子の不完全浸透 (incomplete penetrance) に

よるものである可能性がある。すなわち、一部の個体は「性決定遺伝子の遺伝子型」とは異なる「性の表現型」をもつ（性転換）可能性が考えられた。この仮定にもとづき、性転換の疑いのある個体をデータセットから除外して、父方の減数分裂を利用した連鎖解析をおこなったところ、クサフグの性決定遺伝子座は連鎖群 19 の近位末端にマッピングされた（図 3-1-1、図 3-1-2）。不一致が見られた他の原因として、「性の表現型」と完全連鎖するマーカーは実は存在するが、単に本実験で同定できていないという可能性も考えられる。この仮定によると性転換した個体はいないということになるので、全ての個体を含めて連鎖解析をおこなった。その結果、性決定遺伝子座は、遺伝マーカーにより構成される連鎖地図上ではなく、連鎖群 19 のさらなる近位側に位置することがわかった（図 3-1-3、図 3-1-4）。いずれのシナリオにおいても、解析結果はクサフグの性決定遺伝子座は連鎖群 19 の *Amhr2* 遺伝子座とは異なる領域に存在することを示唆している。

上記のような仮定を設けず、より包括的な解析をおこなうため、クサフグの性を量的形質遺伝子座 QTL によって制御されるバイナリー形質としてあつかう QTL 解析をおこなった。その結果、主要な性決定 QTL が連鎖群 19 上にあることが示された（図 3-1-1 B、図 3-1-2 B）。kusa0901 家系と kusa0902 家系の最大 LOD 値はそれぞれ 10.7 と 9.32 であり、両家系の QTL の位置は関連解析において「性の表現型」と最も高い関連を示すマーカー領域（図 3-1-1A、図 3-1-2A）と一致した。QTL によって説明される表現型の寄与率は、kusa0901 家系および kusa0902 家系において、それぞれ 73.5 % および 75.0 % であった。QTL の 95 % 信頼区間はそれぞれトラフグ 19 番染色体の約 9.9 Mb の領域に対応し、kusa0901 家系では 56.5 cM、kusa0902 家系では 53.6 cM の領域に及んだ。両家系の最大 LOD 値は 0.1 % 有意水準 4.69 を超えていたが、*Amhr2* 遺伝子座の LOD 値は有意水準を下回った。性決定 QTL の 95 % 信頼区間と *Amhr2* 遺伝子座の間の距離は、kusa0901 家系で 13.9 cM、kusa0902 家系で 15.6 cM であった。以上の結果は、クサフグの性決定遺伝子座が *Amhr2* 遺伝子座とは異なることを示している。

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）を絞り込むため、kusa11 家系群の 4 家系 502 個体を用いて、上記で明らかとなった性決定領域（約 9.9 Mb）内外のマーカーについて組換え体を探した。まずトラフグ物理地図上で約 4.1 Mb の距離にある 2 つのマーカー座（f383 および f714）で解析をおこなった結果、6 個体の組換え体を得られ

た。これらの個体について生殖腺の組織学的観察をおこなったところ、4 個体が精巢をもち、2 個体が卵巣をもっていた（表 3-1-2）。これら 6 個体についてさらに詳細な解析をおこなうため、f383 と f714 の間に 7 個のマーカー座（f1637、f1497、f1478、f1437、f2002、f2003、f2004）を設定して、組換え体を探索した。しかし、3.7Mb の距離にある f1637 と f714 の間に組換え体は見出せなかった（図 3-1-5）。これらの結果は、性決定遺伝子周辺の組換えがクサブグのオスの減数分裂中にほとんど起こらないことを示している。

第 2 節 性転換個体を用いた詳細な連鎖解析

前節の結果は、クサフグの性決定領域は 19 番染色体上に存在するものの *Amhr2* 座とは異なる可能性を示していた。また、性決定領域は約 7.3 Mb におよび、843 個体 (kusa0901、kusa0902、kusa1107、kusa1108、kusa1109、kusa1110) を用いた連鎖解析でも、性決定遺伝子が存在する領域を狭めることができなかった。その原因は、クサフグ性決定遺伝子がオス特異的な組換え抑制を示す領域内に存在しているからだと考えられる。高解像度な連鎖マッピングをおこなうには組換え率を上げる必要があるが、それには精子形成と卵形成における組換え頻度の違いを利用する手法が有効である。

これまでに、精子形成過程における組換え頻度が、卵形成過程におけるそれより小さい生物種が複数報告されているが、トラフグにおいてもその傾向が顕著に認められている (Kai et al. 2005; Kai et al. 2011; Singer et al. 2002; Dib et al. 1996)。こういった生物種では、父方の減数分裂を利用した連鎖マッピングの解像度は、母方の減数分裂を利用したマッピングより低くなる。通常、オス決定遺伝子は父方からしか伝わらないので、父方の減数分裂を利用した連鎖マッピングに頼らざるをえないが、オス決定遺伝子をもちながら卵形成をおこなう個体 (XY 型メス、性転換メス) が利用できる場合、高解像度な解析が可能となる。実際にメダカでは、XY 型メスを用いた高解像度解析により性決定領域が絞りこまれている (Matsuda et al. 2002)。本実験では、XY 型であるにも関わらず卵巢をもつ個体を用いて解析家系を作出し、これまでより解像度の高い連鎖解析をおこなった。

材料と方法

供試魚

kusaXY×XY 家系 : 2013 年 5 月 15 日、kusa09 家系の中に含まれていた XY 型で排卵したメス (個体認識番号 5485) と野生クサフグ (ワシヅクサ 1) 凍結精子を用いて人工授精をおこなった。授精は 20°C でおこない、この水温で孵化 (授精後 7 日目) まで維持した。孵化後、22°C まで徐々に水温を上昇させ 100 L パンライトで飼育した。孵化後開口を確認したのちワムシを与え、孵化後 20 日前後でアルテミアおよび配合飼料を与えた。その後、密度に応じて 1 t 水槽へ移し、2013 年 11 月 7 日にサンプリングをおこなった (表 3-1-1)。

「性の表現型」の判別

サンプリングした各個体から生殖腺を摘出し、実体顕微鏡下で観察して精巣・卵巣の判別をおこなった。

新規プライマーの作製

性決定領域を絞り込むため、既存のマイクロサテライトマーカー (Kai et al. 2011) に加え、新たにプライマーを設計した。

遺伝子型の判定

第 2 章第 4 節に準じておこなった。用いたマーカーは表 3-2-1 に記した。

連鎖解析

第 3 章第 1 節に準じておこなった。

候補遺伝子の検索

性決定遺伝子の候補を得るため、検出された QTL の 95%信頼区間に含まれる予想タンパク質コード遺伝子をトラフグのリファレンスゲノム情報から得た。データベースには、Ensembl (Fugu Genome Assembly v4、Institute of Molecular and Cell Biology) を用いた。

結果

まず、XY 型でありながら卵形成をおこなう個体 (XY 型メス) を探索した。共同研究者が遺伝マーカー f2004、f2003、f2006 を利用して、kusa09 家系群 91 尾の中から 42 尾の XY 型魚を同定した。著者はこれらの個体の飼育を継続し、2013 年 5 月に排卵したメス

(TagNo.5485) を用いて家系を作出した。得られた 140 尾の同胞を材料として、まず関連解析をおこない、つぎに連鎖地図を作成し QTL 解析をおこなった。

関連解析とは、多型座のアリル頻度 (あるいは遺伝子型など) と表現型の関連を統計的手法で検定する方法であり、「特定のアリル型が表現型と関連がない」という帰無仮説を立て、その仮説を棄却する確率である P 値を算出する方法である (鎌谷 2009)。関連解析の

結果、f1413 から fi-9 の母親由来のマーカで $-\log_{10}P$ が 2.5 を超える高い値を示し、母親からも、父からも、オス決定遺伝子が伝達されていることが明らかとなった (図 3-2-1 A)。また、関連値が近位末端付近で明瞭なピークを示した。この領域では、母親で組換えが頻繁に起きていることが示された。

連鎖解析の結果、予想どおり父親では組換えが抑制されていたが、母親(XY 型メス)では組換えが頻繁に起きていた (図 3-2-2)。約 6.7 Mb の領域内にある 27 マーカを用いて得られた連鎖地図は、母方の減数分裂を利用した場合 64.9 cM の遺伝距離を示した。この解析では、約 0.5 Mb の領域内にある 5 つのマーカ (f1437、fi-4、fi-6、f1497、fi-9) を除く、大部分のマーカ座間で組換えが見られた (図 3-2-2)。高解像度連鎖地図を使用してオス決定遺伝子座の QTL 解析をおこなった結果、95%信用区間は f1595 から fi-1 の間 (16.4 cM) にあることが明らかになった (図 3-2-1 B)。

クサフグ性決定遺伝子の候補遺伝子を列挙するため、トラフグゲノム概要配列に付されたアノテーションを利用した。まず、マイクロサテライトマーカの位置情報をもとにクサフグ性決定 QTL に対応するトラフグゲノム領域を特定した。その結果、対応領域は少なくとも 5 つの scaffold (scaffold_586、scaffold_617、scaffold_688、scaffold_926、scaffold_538) を含む 321 kb の領域であることが明らかとなった。この領域には 12 個の予想タンパク質コード遺伝子が含まれていた (表 3-2-2)。

考察

クサフグの性決定 QTL の 95%信用区間をトラフグゲノム概要に対応させたところ、その領域には、少なくとも 5 つの scaffold が含まれており、合計 12 個の予想タンパク質コード遺伝子が存在していた。しかし、これらの中には過去に性決定や性分化において重要な役割を果たすことが示されている *Sox*、*Dmrt* または *TGF- β* 遺伝子のような遺伝子は含まれなかった。2012 年頃まで、脊椎動物において性決定の役割を担える遺伝子は複数あるだろうが、そのレパートリーは限られており、動物の性分化過程で共通して重要な働きをする一部の遺伝子群 (*Sox* や *Dmrt* のような) だけが性決定遺伝子となる資格をもつと考えられていた (Volff et al. 2007; Graves and Peichel 2010)。しかし、ニジマスの性決定遺伝子 *sdY* が免疫関連遺伝子であったことや (Yano et al. 2012)、アポトーシスを促進する *p53* が、ゼブ

ラフィッシュにおいて生殖細胞数の制御と性転換に関与していたことなどから (Rodríguez-Marí et al. 2010)、一見すると性分化に関与しそうな因子であっても、性決定遺伝子になりうる可能性が示されている。したがって、上記の予想遺伝子内に性決定遺伝子が含まれる可能性は、現時点では棄却できない。

今回の解析から浮かび上がった問題点のひとつは、トラフグゲノム概要配列の不完全さである。クサフグの性決定 QTL に対応するトラフグゲノム概要配列は断片化が著しく、現時点で5つの scaffold が含まれることは明らかだが、scaffold 間の DNA 配列は全く不明であり、さらに scaffold 内にも、DNA 配列未解読の領域が広く存在していた (scaffold 全長の約 32%が未解読)。したがって、本領域には上記 12 個の遺伝子以外の遺伝子が多数存在する可能性がある。また、クサフグにはトラフグゲノム概要には含まれていない種特異的な DNA 配列が存在する可能性も否定できない。今後、性決定遺伝子の分子の実体を明らかにするためには、contiguity の高いクサフグの参照ゲノム配列があることが望ましい。

第 3 節 以降本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第4章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第6章 本章の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5年以内に出版予定。

謝辞

本研究をおこなうに際し、その機会を与えて戴くとともに、研究計画の策定、実験の遂行、研究上の問題解決、論文執筆において多くのご助言とご鞭撻を賜った東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所准教授の菊池潔博士に深く感謝いたします。

東京大学大学院農学生命科学研究科教授の井上広滋博士には、修士論文と学位論文審査に際して本質的なご指摘とご助言を賜りました。同研究科准教授の大久保範聡博士には、修士論文と学位論文審査に際して貴重なご指摘とご助言を賜りました。宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター教授の松田勝博士には、ゲノム編集技術に関する実験に際してご指導とご鞭撻を賜るとともに、学位論文審査に際しても重要なご指摘とご助言を賜りました。長浜バイオ大学バイオサイエンス学部准教授の竹花佑介博士には、学位論文審査に際して有意義なご指摘とご助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

東京大学名誉教授の鈴木譲博士には、震災直後の混乱した中でもいち早く受け入れをご快諾いただき、安心して研究できる環境を提供していただきました。修士1年次の指導教員を引き受けていただくとともに、組織学について多大なご助言とご指導をいただきました。深く感謝いたします。研究遂行に際して、東京大学大学院農学生命科学研究科教授の良永知義博士には、修士2年次前期の指導教員を引き受けていただくとともに水産実験所での生活を見守っていただきました。心よりお礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所特任助教の田角聡志博士には、実験の基礎から *in vitro* 実験に至るまで適確なご指導とご助言をいただきました。また、研究生活で行き詰まったときにも、親身になってご意見を下さりました。心より感謝申し上げます。同助教の細谷将博士には、本研究全般にわたって数多くのご助言をいただくとともに、多くの時間を割いて温かいご指導をいただきました。心よりお礼申し上げます。同助教の平瀬祥太郎博士には、系統解析や NGS 解析において丁寧にご指導いただきました。感謝申し上げます。同特別研究員の小山喬博士には、性決定研究に関して有益なご助言をいただくとともに、NGS 解析において多くのご協力をいただきました。お礼申し上げます。

水産研究・教育機構増養殖研究所主任研究員の鈴木重則氏には、長年にわたりトラフグ卵および精子を御供与戴き解析家系作出のための人工授精にご協力いただきました。名古

屋大学理学部教授の田中実博士には、免疫組織化学的手法をご教授いただき、抗メダカ vasa 抗体をご供与いただきました。東京大学大学院理学系研究科附属三崎臨海実験所助教の黒川大輔博士には、クサフグのサンプリングにご協力いただきました。福井県立大学生物資源学部准教授の末武章弘博士には、CRISPR/Cas9 のインサートチェックにおいてシーケンス配列を読んでいただきました。静岡県水産技術研究所の木南竜平博士には、CRISPR/Cas9 の gRNA および Cas9 のグリセロールストックをご供与いただきました。長崎県総合水産試験場の吉川壮太氏には、野生フグのサンプルをご提供いただくとともに解析家系の作出にご協力いただきました。東京農業大学生物資源ゲノム解析センター准教授の小林久人博士には、一部のフグのゲノム配列取得にご協力いただきました。ご協力いただいた皆様に、深くお礼申しあげます。

東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の水野直樹技術専門職員、城夕香技術専門職員、藤田真志技術職員には実験魚の飼育およびサンプリングに多大なるご協力をいただきました。また、実験所生活を送るにあたり、高見隆江氏、佐野智典氏、倉田厚子氏、村橋智美氏には温かいご協力をいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の黒柳美和博士、山野上雄介博士、野沢碧氏、高梨志保里氏、佐藤茉菜博士、大木駿博士には、研究生活をおくる上で数々の有益なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。河辺元子博士、合田知樹氏、平林陽氏には、研究生活をおくる上で温かいご支援をいただきました。深くお礼申し上げます。また、外川理絵氏、山口晶氏、内田琢也氏、菅原康平氏、伊藤洸太郎氏、高屋敷早紀氏、松永亮平氏、小林純也氏には研究の様々な局面において数多くのご協力をいただきました。感謝申し上げます。佐藤耕平氏、木元亮太氏、佐藤楽生氏には、本論文執筆中に特段のご配慮をいただきました。感謝申し上げます。金東仁氏、林子杰氏、岡田恵治氏、鈴木萌氏、手良村知功氏にもお礼申し上げます。

本研究を開始するにあたり、北里大学海洋生命科学部海洋生命科学科准教授の中村修博士には温かく送り出していただくとともに、研究生活を送る上で貴重なご助言を数多く賜りました。また、北里大学海洋生命科学部海洋生命科学科講師の筒井繁行博士には、どんな時でも研究者である姿勢を貫き、真摯に研究することをご教示いただきました。心より感謝申し上げます。

名古屋大学理学部助教の西村俊哉博士には、免疫組織染色のご指導を戴き、研究に対して貴重なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

水産研究・教育機構増養殖研究所研究員の須藤竜介博士には、論文執筆にあたり多くのご助言をいただきました。また、水産研究・教育機構瀬戸内地区水産研究所研究員の中村政裕博士には、学位申請の書類手続きを含め数多くのご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの増山治男博士、今井拓人博士、齊野兼太郎氏には TALEN 作製実験で宇都宮大学に滞在中、多大なるご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

北里大学大学院海洋生命科学研究科海洋生命科学専攻の田口瑞姫氏、渋谷航氏、加藤秀一氏、小野啓介氏、五十嵐健人氏、土屋広平氏には、サンプリングやレーザーマイクロダイセクションを利用した実験などにご協力いただきました。感謝申し上げます。

最後に、フグ類の性決定遺伝子研究を先行しておこない、本研究を進めるきっかけを与えてくださった東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の松永貴芳氏、神谷隆史氏、岡あゆみ氏に深くお礼申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、共にフグ類の性決定遺伝子の研究を進め、多大なるご助言とご協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の渥美九郁氏、田島祥太氏、青木勇磨氏、カビールアハマド氏、車遥介氏、藤川大学氏に深く感謝します。

これ以降の内容は、学術雑誌論文として出版する予定があるため公表できない。5 年以内に出版予定。