

博士論文

トラフグ連鎖地図の作製と比較ゲノム解析

東京大学

大学院農学生命科学研究科

水圏生物科学専攻

平成 18 年度 博士課程進学

甲斐 渉

平成 23 年度

目次

	頁
序論	3
第1章 トラフグ連鎖地図の作製	7
第2章 連鎖地図を利用した硬骨魚類の比較ゲノム解析	21
第3章 トラフグ連鎖地図の高密度化	32
第4章 硬骨魚類における染色体進化過程の推定	58
第1節 染色体間のゲノム再編成	
第2節 共通祖先ゲノムの再構築	
第3節 染色体内のゲノム再編成	
第4節 染色体再編成速度	
総合考察	104
論文内容の要旨	107
謝辞	111
参考文献	112
付録 CD-ROM: Supplemental Table 1 - 25	

序論

「育種」とは有用生物の遺伝的性質を人間が希望するように改良することを指し、人間にとって都合の良い形質を都合の良い方向へ改良していくことから、「品種改良」とも呼ばれている。水産分野における「育種」の対象は養殖魚介類であり、耐病性や高成長といった養殖上有用な性質を持つ魚類系統の確立を目指した努力が行われている。しかし、紀元前から様々な改良が行われてきた家畜、家禽、栽培植物と比較すれば、育種歴の浅い多くの養殖対象魚はあらゆる形質に対して様々な変異を示す個体が混在した状態で飼育されており、「野生種」の域を出ていない。魚類で品種改良が進まない原因の1つとして養殖魚の種苗生産法が考えられる。すなわち、現在の種苗生産では、天然の成魚を親魚として用いることが多く、継代的な選抜育種が盛んに行われているとは言えない。また、多数の個体を親魚として用いることが多い為、有用形質に対する親魚自身の能力を評価する直接検定や子の形質から親魚の能力を評価する間接検定（後代検定）が利用できず、その結果として、親魚の能力が十分に評価されていないことにある。逆に言えば、あらゆる形質に対して様々な変異を示す天然親魚の能力評価を行い、親魚としてふさわしい形質を持つ個体を選抜できれば、極めて優良な品種が作製できる可能性を秘めている。しかし、親魚の能力評価を形質の表現型値だけに基づいて行う場合、検定場の確保、検定の時期、能力評価に有する時間などを考慮する必要があり、その道は険しい。

近年、イネ (*Oryza sativa*) などの農業生物ではゲノム解読の進展に伴い、育種上有用とされる形質に関する遺伝子の同定が急速に進みつつある (International Rice Genome Sequencing Project, 2005; Fadiel *et al.*, 2005)。さらに、これらの遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの蓄積も進み、これらの成果は品種改良の大幅な効率化に寄与すると期待されている。選抜過程において、有用形質に関する遺伝子（または対立遺伝子）を持つ個体を、その遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの遺伝子型を基に、間接的に選抜することをマーカー利用選抜 (marker-assisted selection, MAS) と呼ぶ。MAS は従来の表現型だけに基づく育種法に比べて以下の利点が挙げられる。

- (1) 形質と連鎖するマーカーの遺伝子型に基づいて、個体を実験室で選抜することが可能であり、選抜対象の形質によって選抜方法が左右されることがなく、選抜の場所や時期もさほど限定されない (Edwards and Page 1994)。
- (2) 選抜された個体において有用形質を示す遺伝子座の遺伝子型がマーカーの分離型を通してほぼ確実に決定することができる為、遺伝効果が低く表現型が環境の影響を受け易い形質であっても選抜効果を正しく判定することができる。

これらの利点により、従来の育種法に比べて、MAS は数少ない交配で有用形質を精

密に導入した新品種を作出することが可能である (鵜飼, 2000a; 美濃部ら, 2003)。

魚類においてもゲノム配列情報や DNA マーカーの蓄積が進みつつある。育種を目的としたわけではないが、遺伝学的な研究基盤として、実験用小型魚であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*), メダカ (*Oryzias latipes*) ではゲノム概要配列が公開されており、高解像度な連鎖地図も作製されている (Woods *et al.*, 2005; Kasahara *et al.*, 2007; Ensembl, <http://www.ensembl.org/>)。また、食用魚では、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*), ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*), タイセイヨウサケ (*Salmo salar*), ブラントラウト (*Salmo trutta*), ティラピア (*Oreochromis niloticus*), ヨーロッパスズキ (*Dicentrarchus labrax*), ヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*), ブリ (*Seriola quinqueradiata*), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*), イシビラメ (*Scophthalmus maximus*), タイセイヨウオヒョウ (*Hippoglossus hippoglossus*) などで MAS による品種改良を目指した連鎖地図の作製が報告されている (Waldbieser *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2000; Moen *et al.*, 2008; Gharbi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005; Chistiakov *et al.*, 2005; Franch *et al.*, 2006; Ohara *et al.*, 2005; Coimbra *et al.*, 2003, Bouza *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2007)。さらに、養殖上有用とされる形質 (耐病性, 耐冷性, 早熟性, 体サイズなど) に関与した遺伝子座の同定に向けた研究も行われ始めている (Palti *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 2001; Cnaani *et al.*, 2003; Khoo *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Fuji *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Moghadam *et al.*, 2007; Moen *et al.*, 2007; Houston *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2008; Haidle *et al.*, 2008)。2007 年には、水産養殖における MAS の有効性を実証した研究例がヒラメにおいて報告された (Fuji *et al.*, 2007)。すなわち、ヒラメ養殖ではウイルス病の一種であるリンホシスチス病が問題となっているが、Fuji *et al.* (2007) がこのウイルス病に抵抗性を示す対立遺伝子に連鎖したマーカーを用いた選抜により、短期間で抵抗性系統を確立したのである。これにより、水産分野における MAS の有用性が実証された。

本研究の供試魚であるトラフグ (*Takifugu rubripes*) は水産養殖上重要魚種であり、高級魚として位置付けられている。トラフグ養殖は我が国を中心とした東アジアにおいて盛んに営まれているが、養殖上有用とされる形質を持つ系統の確立は未だ報告されていない。一方、トラフグには脊椎動物におけるモデルゲノムとして注目されてきた側面がある (Hedges and Kumar, 2002)。Hinegardner (1968) は 300 種に渡る硬骨魚類の細胞内の DNA 量を測定し、その中で最も DNA 量の少ない魚種がミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) であることを示した。その全ゲノムサイズは塩基配列数に換算すると約 380 Mb となり、既報の脊椎動物の中で最も小さなゲノムであった。Brenner *et al.* (1993) は、ランダムシーケンシングアプローチにより、同じフグ目に属するトラフグのゲノムサイズは約 400 Mb であることを示した。このゲノムサイズは

ヒト (*Homo sapiens*) のゲノムサイズの約 1/8 であった。また、ヒトゲノムに比べトラフグゲノムは非翻訳領域が少なく、遺伝子が高密度で存在していることも明らかになった (Edwards *et al.*, 1998; Elgar *et al.*, 1999)。従って、トラフグの全ゲノムを解読することはヒト全ゲノムを解読することより容易であり、さらに、両種のゲノム配列を比較することで、ヒトの遺伝子や転写調節領域を同定することに役立つと考えられた (Grützner *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2001)。このような背景のもと、トラフグゲノムの概要配列が公開されていた (Aparicio *et al.*, 2002)。トラフグはゲノム概要配列が公開された唯一の養殖対象魚種であり、ゲノム情報を活用した育種法を適用する上で良いモデル魚となり得ると考えられる。しかし、2002 年の時点では連鎖地図が存在していなかった為、ゲノム配列情報と遺伝形質と結び付けることができなかった。この連鎖地図を完成させれば、トラフグのゲノム情報を育種へと有効に活用する道が開かれることとなるものと考えられる。

トラフグ以外の養殖魚種においても上記のように MAS を適用した効率的な育種の展開が期待されており、それにはゲノム配列情報の蓄積が望ましい。しかし、養殖対象となる魚種は多岐に渡る為、全ての魚種でゲノム配列を解読することは現時点で現実的ではない。そこで、比較ゲノム学的手法を使い、ゲノム配列が解読されていない魚種でも MAS の適用を容易にする方法の開発が求められる。例えば、トラフグやゼブラフィッシュなどのモデル魚類のゲノム構造の比較から魚種間で保存されたゲノム領域が把握できれば、ある魚種で同定された有用遺伝子と同様の遺伝子座を、他の魚種においても予測されたゲノム構造を手掛かりとして見つけることができるかもしれない (Erickson *et al.*, 2004; Sarropoulou *et al.*, 2008)。また、未だ連鎖地図が存在しない魚種においても比較的容易に連鎖地図を作製することが可能になるものと考えられる (Kikuchi *et al.*, 2008)。Bourque *et al.* (2005) はニワトリ (*Gallus gallus*) を外群として、ヒト、マウス (*Mus musculus*)、ラット (*Rattus norvegicus*) のゲノム構造を比較し、哺乳類に共通して認められるゲノム領域を同定し、3 種の共通祖先生物のゲノム構造を再構築した。この祖先生物のゲノム構造はゲノム情報に乏しい哺乳動物のゲノム構造を推定する為の良いモデルとなった。一方、硬骨魚類を材料とした研究では、ゼブラフィッシュ、メダカ、ミドリフグのそれぞれのゲノムをヒトのゲノムと比較することで、脊椎動物の共通祖先ゲノム構造の推定と硬骨魚類系統における太古の染色体再編成を理解しようという試みが先駆的に成されている (Postlethwait *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2000; Naruse *et al.*, 2004; Jaillon *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005)。しかし、これらの解析はいずれも、硬骨魚類の染色体進化の過程において、太古の事象に焦点が当てられたもので、比較的最近に起きた事象には触れられていなかった。この事象を理解するには硬骨魚類系統の内部でゲノム構造を比較する必要がある。特に、

トラフグ、ミドリフグ、メダカは、多くの養殖魚と同様に、棘鱗上目に属することから、これらの魚種のゲノム構造を比較することはゲノム情報に乏しい養殖魚のゲノム構造を推定する上で意義深い。トラフグの概要配列は断片化された状態（scaffold）でデータベースに登録されており、各 scaffold の染色体上の位置が不明であるが、連鎖地図を作製することができれば、ゲノム構造を比較するための研究資源になりえると考えられる。すなわち、連鎖地図を基に scaffold を染色体上に整序して全ゲノム配列の染色体上の位置を決めることができれば、トラフグと他の魚種のゲノム構造を比較することが可能になるのである。

本研究では、トラフグ養殖においてゲノム情報を用いた新しい育種法を適用するための基盤として、まず、連鎖地図の作製を行った。さらに、トラフグと他のモデル魚類のゲノム構造を比較する為の研究基盤を築く為、2002年に公開されたトラフグ概要配列 v3.0 の scaffold を連鎖地図上に整序した（第1章）。次いで、硬骨魚類のゲノム構造の類似性を調べる為、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュそしてトラフグの遺伝子地図を用いて比較ゲノム解析を行った（第2章）。さらに、トラフグ連鎖地図の高密度化を行うとともに、2005年に更新されたトラフグ概要配列 v4.0 の scaffold を連鎖地図上に整序し、全ゲノムの大部分を網羅したゲノム地図を作製した（第3章）。最後に、得られたトラフグゲノム地図を用いて、トラフグ、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのゲノム構造を詳細に比較し、硬骨魚類系統内部で起こった染色体の再編成過程を推定した。さらに、硬骨魚類系統と哺乳類系統で染色体再編成の頻度に明確な違いがあるのか否かを検証する為、硬骨魚類ではトラフグ、ミドリフグ、メダカ、哺乳類ではヒト、マウス、オポッサム (*Monodelphis domestica*) のゲノムを用いて、各種間に認められる染色体再編成の頻度を推定した（第4章）。

第 1 章 トラフグ連鎖地図の作製

連鎖地図を構成する DNA マーカーには様々な種類があるが、近年ではマイクロサテライト配列を標識としたマイクロサテライトマーカーで構成される連鎖地図が多く報告されている。マイクロサテライト配列とはゲノム DNA 内に含まれる 2-6 個程度の塩基がモチーフとなって反復している単純配列反復を指し、この配列は植物から脊椎動物まで真核生物に普遍的に存在している。マイクロサテライト配列はハプロイドゲノム当たり $10^4 - 10^5$ のオーダーで染色体上に広く散在している為、ゲノム全体に渡る解析に利用できる。また、個体レベルでの多型性が著しく高いことから、生物集団内における対立遺伝子の数が多いという利点を持っている。

マイクロサテライトマーカーを作製する上で、ゲノム配列情報に乏しい生物種では、まず、ゲノム中からマイクロサテライト配列を含む部分配列を単離し、その配列を決定しなければならず、これには膨大な労力を必要とする。一方、既にゲノム配列が公開されている生物種では、そのゲノム情報を参照することで、配列決定を行う過程を省略することが可能である。

本研究の供試魚であるトラフグについて着目すると、トラフグは 2002 年にゲノム概要配列が公開されている (Aparicio *et al.*, 2002)。さらに、Takagi *et al.* (2003) は公開されたトラフグのゲノム配列中の約 23 Mb 内に含まれるマイクロサテライト配列について調べ、9,612 個のマイクロサテライト配列を同定している (この内、75%はシトシンとアデニンの繰り返し配列)。この結果を基に、約 400 Mb のトラフグ全ゲノム中に含まれるマイクロサテライト配列の数を単純に見積もると約 17 万個となる。ゲノム情報が公開されているトラフグでは、これら膨大なマイクロサテライト配列の中から DNA マーカーとして有効な候補座を網羅的に探索し、同時にその周辺領域のゲノム配列情報を得ることが *in silico* で行える為、多数のマイクロサテライトマーカーを容易に開発することが可能である。

そこで本章の研究では、公開されたトラフグゲノム概要配列 v3.0 内に含まれるマイクロサテライト配列を DNA マーカーとし、トラフグ連鎖地図の作製を試みた。

材料および方法

連鎖解析用のゲノム DNA パネル

連鎖解析には、東京大学水産実験所において、以下の方法を用いて調整されていたトラフグのゲノム DNA を使用した。トラフグ家系は、体重 4.8 kg のトラフグ雌より得た卵と体重 2.7 kg のトラフグ雄より得た精子を Fujita (1967) および Matsuyama *et al.* (1997) の方法に従い、乾導法により人工授精させて得た。ゲノム DNA は Asahida *et al.* (1996) の方法に従い抽出した。すなわち、約 300 mg の筋肉組織または胚を 400 μ L の 8 M 尿素を含む TNESU8 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 8 M 尿素) 中で細切し、数日から数ヶ月室温で保存した。これに 20 mg/mL の Proteinase K (Wako) を 20 μ L 加え、37°C に加温して 1 - 2 日放置した後、5 M NaCl を 50 μ L 加えた。次に 500 μ L のフェノールクロロホルム (1 : 1) 溶液を加え、攪拌した後、15,000 rpm, 5 分間の遠心分離を行い、上清を得た。これに 1,000 μ L の氷冷エタノールを加え、攪拌後、7,500 rpm, 1 分間の遠心分離を行った。沈殿したゲノム DNA を 70%エタノール溶液で洗浄した後、100 μ L の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解した。そして、この溶液を連鎖解析用のゲノム DNA 溶液とした。

プライマーの作製

トラフグのゲノムアセンブリ (Joint Genome Institute, *Fugu rubripes* v3.0, <http://genome.jgi-psf.org/fugu6/fugu6.home.html>) から、シトシンとアデニンの繰り返し配列 (CA リpeat配列) を持つマイクロサテライト領域を Table 1 の条件に従って選抜し、この配列を挟む両端のゲノム配列からプライマーセットを設計した。プライマーセットは合計 389 組作製し、アッセイ番号の頭に「f」を付して表した。なお、「f」は *fugu* と Fisheries Laboratory, University of Tokyo の両者を含意する。

PCR 増幅

解析個体の PCR 増幅は、約 1 ng/ μ L のゲノム DNA 溶液 5 μ L に Forward primer (10 pmol/ μ L) および Reverse primer (10 pmol/ μ L) を各 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer (Takara) を 2 μ L, dNTP Mixture (2.5 mM, Takara) を 1.6 μ L, rTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L, Takara) を 0.1 μ L 加え、滅菌蒸留水で合計 20 μ L とし、iCycler (Bio-RAD) を用いて以下の反応条件で行った。すなわち、最初にサンプルを 95°C, 2 分間の熱変性反応を行い、その後、94°C で 30 秒間, 59°C で 2 分間の増幅反応を 35 サイクル行い、最後に 59°C で 3 分間の最終伸長反応を行った。

各マーカー座における親魚の多型性の検出

親魚のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、これら PCR 増幅産物を 8 M 尿素を含む 6%ポリアクリルアミド変性ゲル (Long Ranger[®], Takara) を用いた電気泳動に付した。PCR 反応溶液 10 μ L に対して、変性ローディングバッファー (95%ホルムアミド, 0.1%ブロモフェノールブルー, 0.1%キシレンシアノール, 10 mM EDTA, pH 8.0) を等量加え、95°C で 10 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。このサンプルをゲルに付し、2,000 V で約 2 時間の電気泳動を行った。泳動終了後、耳付ゲル板を剥がし、SYBR[®] Gold (Molecular Probes) を 1×TBE (89 mM トリス, 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA, pH 8.0) で 10,000 倍に希釈した染色液をゲルに塗布し、遮光条件下で 30 分間静置した。その後、蛍光イメージアナライザー FLA-3000GF (FUJIFILM) により電気泳動パターンを解析し、各マーカーにおける親魚の多型を検出した。

分離世代における遺伝子型の判定

親魚において多型を示したマーカー座について、分離世代 64 個体のゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅を上記と同様の方法で行い、PCR 増幅産物を変性 6%ポリアクリルアミド電気泳動に付した後、蛍光イメージアナライザーにより PCR 産物の電気泳動パターンを得て遺伝子型を判定した。分離世代および親魚の泳動パターンを基に親魚からの対立遺伝子の由来 (相) を推定した (Grattapaglia and Sederoff, 1994 ; Jacobs *et al.*, 1995 ; Sewell *et al.*, 1999)。

DNA マーカー座の連鎖解析と連鎖地図の作製

連鎖解析では、Map Manager QTX ソフトウェア (Manly *et al.*, 2001) に各マーカー座における分離世代の対立遺伝子パターンを入力し、その後 MAPMAKER ソフトウェア (Lander *et al.*, 1987) の two-point analysis 機能を用いて、最小 LOD スコアを 3.0 として連鎖群を決定し、さらに multi-point analysis 機能を用いて各連鎖群におけるマーカーの順序を特定した。二重組換えが認められたマーカー座は分離世代の対立遺伝子パターンを再検討し、マーカー間の二重組換えが最も少なくなるようにマーカーの順序に変更を加えた。連鎖地図の遺伝距離は Kosambi 関数 (Kosambi, 1944) を用いて、センチモルガン (cM) 単位で表した。

結果

マイクロサテライト領域の PCR による増幅

トラフグ両親魚のゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅を行った結果、389 組のプライマーセットの内、376 組において PCR 増幅が認められた。また、それらのプライマーセットの内、184 組 (49%) が雄親のゲノムにおいて、また 188 組 (50%) が雌親のゲノムにおいて多型性を示した。さらに、160 組のプライマーセットにおいては雄親、雌親ともに多型性が認められた。全プライマーセットのうち 212 組 (56%) が分離世代の連鎖解析において有効なマイクロサテライトマーカーであった (Supplemental Table 1)。

分離世代における連鎖の解析

雌雄の減数分裂における各マーカー座の連鎖関係を別個に解析した結果、雄親から子供へ伝達される対立遺伝子のパターンから、169 個のマーカー座からなる 24 個の連鎖群を得た。また、雌親から子供への伝達パターンから、171 個のマーカー座からなる 29 個の連鎖群を得た (Figure 1, Table 2, Supplemental Table 2, 3)。雄連鎖地図の遺伝距離の合計は 697.1 cM であり、169 個のマーカーにおいて隣接する 2 つのマーカー間の平均遺伝距離は 4.1 cM であった。各連鎖群における合計遺伝距離は最小で 0 cM (連鎖群 18)、最大で 75.0 cM (連鎖群 2) となり、各連鎖群上に同定された平均マーカー座数は 7 個であった。連鎖解析に用いた 184 個のマーカー座の内、169 個のマーカー座が他のマーカー座と連鎖を示したことから、雄連鎖地図におけるマーカーの連鎖率は 92%と算出された。雌連鎖地図の遺伝距離の合計は 1,213.5 cM であり、171 個のマーカーにおいて隣接する 2 マーカー間の平均遺伝距離は 7.1 cM であった。各連鎖群の合計遺伝距離は最小で 4.7 cM (連鎖群 15-F2)、最大で 117.4 cM (連鎖群 2) であり、各連鎖群上に同定された平均マーカー座数は 5.8 個であった。雌連鎖地図におけるマーカーの連鎖率は 91%を示した。雄親と雌親で共に多型を示すマーカーを用いて連鎖群を統合した結果、200 個のマーカー座からなる 22 個のトラフグ連鎖群を得た。連鎖解析に用いた 212 個のマーカー座の内、200 個のマーカー座が少なくとも雌雄どちらかの連鎖群において連鎖を示すことから、雌雄を統合した連鎖地図のマーカー連鎖率は 94%と算出された。

各連鎖群上のマーカーはゲノムアセンブリの scaffold を基に作製していることから、各マーカー座の連鎖群上の位置関係を基にして scaffold を連鎖群上に位置付けることが可能である。そこで、連鎖群上のマーカーの順序を基に scaffold を整序した結果、合計約 39 Mb に及ぶ scaffold を連鎖地図上に位置付けることができた。これらの

配列中には 4,452 個の予測遺伝子情報が含まれていた (Table 2).

雌と雄の減数分裂における組換え率

雄親と雌親の両方で多型を示す 104 個のマーカーを連鎖地図から選び出し、これらのマーカーにおいて隣接する 2 マーカー間の遺伝距離を雄連鎖群と雌連鎖群で比較した結果、雄に比べ雌において組換え率が高い傾向が認められた (Figure 2). しかし、例外も認められ、いくつかのマーカー間においては雌に比べ雄において組換え率が高かった。これら雌雄共通のマーカー間の遺伝距離を積算した結果、雄では 507.1 cM、雌では 1,100.8 cM となり、雄連鎖群における遺伝距離は雌連鎖群のその約半分であることが明らかとなった。

考察

トラフグ連鎖地図

本研究の結果、トラフグハプロイド染色体数（22本, Miyaki *et al.*, 1995）と一致する連鎖地図を完成させることができた。二倍体生物の連鎖地図の質を評価する1つとして、「対象生物のハプロイドゲノムの染色体数と一致する数の連鎖群が作製されているか否か」が挙げられる。一般に、マイクロサテライト配列がゲノム上に均等に位置していないことから、マーカーをランダムに設計した場合、その位置は連鎖群上で一様ではなく、クラスター状であったり、特定領域が著しく少なかったりする。また、仮にゲノム上に均等にマーカーを設定したとしても、染色体領域によって乗換え頻度が異なる為、連鎖群上のマーカー密度は一様ではない。従って、ランダムにマーカーを作製している限り、ハプロイドゲノムの染色体数と一致する数の連鎖群を得るには膨大なマーカーが必要となる（鵜飼, 2000a）。実際に、ティラピアやタイセイヨウサケではそれぞれ、525個および425個にも及ぶマーカーによる連鎖地図が報告されているが、その連鎖群数は、ハプロイド染色体数に一致していない（Lee *et al.*, 2005; Moen *et al.*, 2008）。

本研究で全染色体を網羅する連鎖地図を効率良く得ることができた背景に、比較ゲノム解析を利用したことが挙げられる。すなわち、メダカゲノム上に散在する遺伝子はある程度トラフグゲノム上に散在するであろうと仮定して、メダカゲノム上に散在する遺伝子にオーソログなトラフグ遺伝子を同定し、それに連鎖する多型マーカーをまず得た（Table 1, f201 - f368）。これに、ゲノム上の位置情報を考慮に入れないマーカー（Table 1, f5 - f200）を加えて連鎖地図を作製した結果、23個の連鎖群を得た。トラフグのハプロイド染色体数は22であることから、得られた連鎖群の内、2個の連鎖群は新規マーカーを得ることで1個の連鎖群に統合されることが予測された。次に、ミドリフグのゲノムデータを参照し、2個の連鎖群を統合しうるトラフグゲノム領域を同定し、この領域においてマーカーを作製した。これにより、200個という比較的少ないマーカー数でハプロイド染色体数と一致する連鎖群数を得た。また、マーカー連鎖率が94%を示したことから、全ゲノムの大部分を遺伝学的に網羅する連鎖地図ができたことになる。従って、トラフグの遺伝形質を解析するに当たり、ほとんどの形質を解析することが可能な研究基盤であると考えられた。また、今回得られた数多くのマイクロサテライトマーカーは養殖において個体集団のヘテロ接合性を保ちつつ育種を進める為にも有効な解析基盤であり、さらに、野生集団の集団遺伝学的解析などにも幅広く利用可能である。

連鎖群上のマーカーの順序を基に scaffold を整序した結果、本連鎖地図には 39 Mb

のゲノム配列が貼付けることができた。この配列長は概要配列 v3.0 の 10% に相当し、さらに、この配列内には 4,452 個の予測遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子を利用して、ゲノム上の遺伝子の位置を他の生物と比較できると考えられる。

雌雄間における組換え率の差

今回作製したトラフグの連鎖地図において、雄の組換え率が雌のそれに比べて全般的に低いという傾向が見られた (Figure 2)。哺乳類における雌と雄の減数分裂における組換え率については、ヒト、イヌ、ブタそしてマウスにおいて雄における組換え率が雌に比べ低いことが報告されているが、ウシにおいてはそのような傾向は見られない (Dib *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1996; Marklund *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 1999)。一方、魚類ではニジマスとゼブラフィッシュにおいて、トラフグと同様に、雄における組換え率が低いという傾向が報告されている (Sakamoto *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 2002)。これらの研究では、セントロメア領域において雄における組換え率が抑制されていることが示唆されており (Sakamoto *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 2002)、ゼブラフィッシュを用いた詳細な研究では、セントロメア領域とは逆に、テロメア領域で雌の組換え率が抑制される傾向が見られている (Singer *et al.*, 2002)。トラフグ、ニジマス、ゼブラフィッシュといった異なる系統に属する硬骨魚類において同様の傾向が認められることから、雄の組換え率が雌のそれに比べ全般的に低いという傾向は硬骨魚類に共通する現象であると考えられた。

第 1 章
Figure and Table

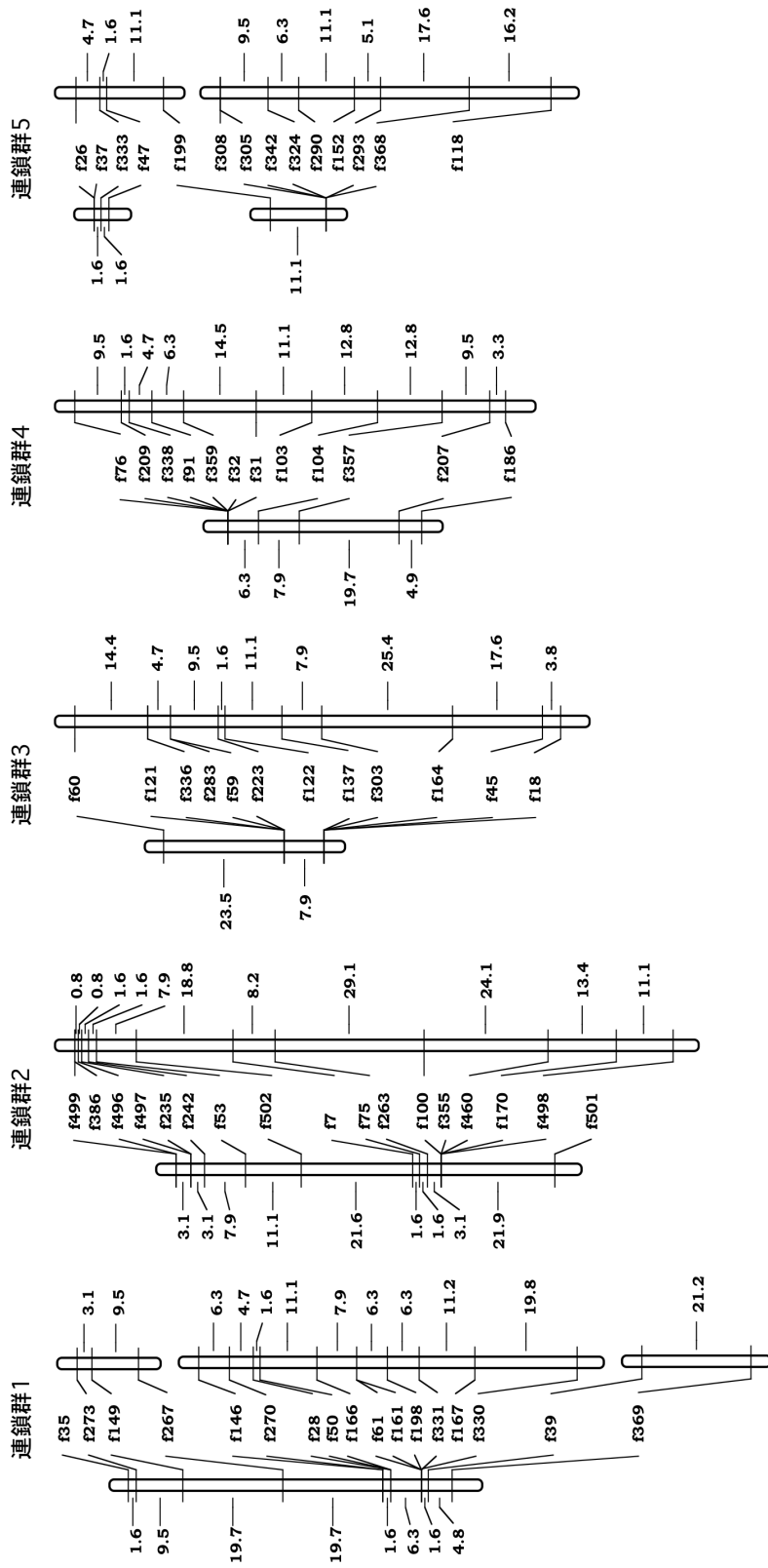


Figure 1. トラフグ連鎖地図

各連鎖群において、雄連鎖群を左、雌連鎖群を右に配置した。雌雄連鎖群の間の「f」から始まる数字はマイクロサテライトマーカー名を、また両端の数字は雌雄それぞれにおけるマーカー間の遺伝距離をcm単位で示す。

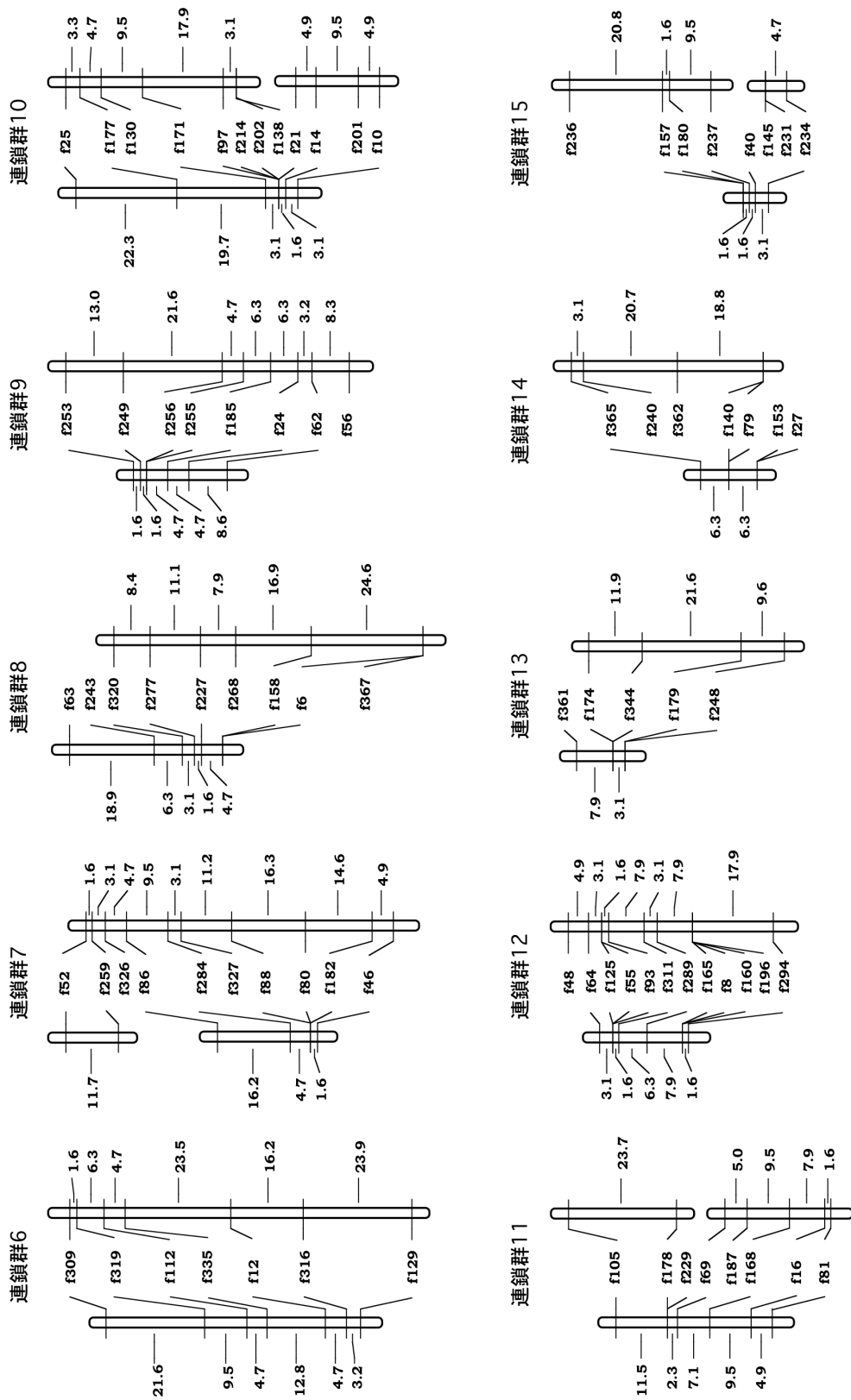


Figure 1 . 続き

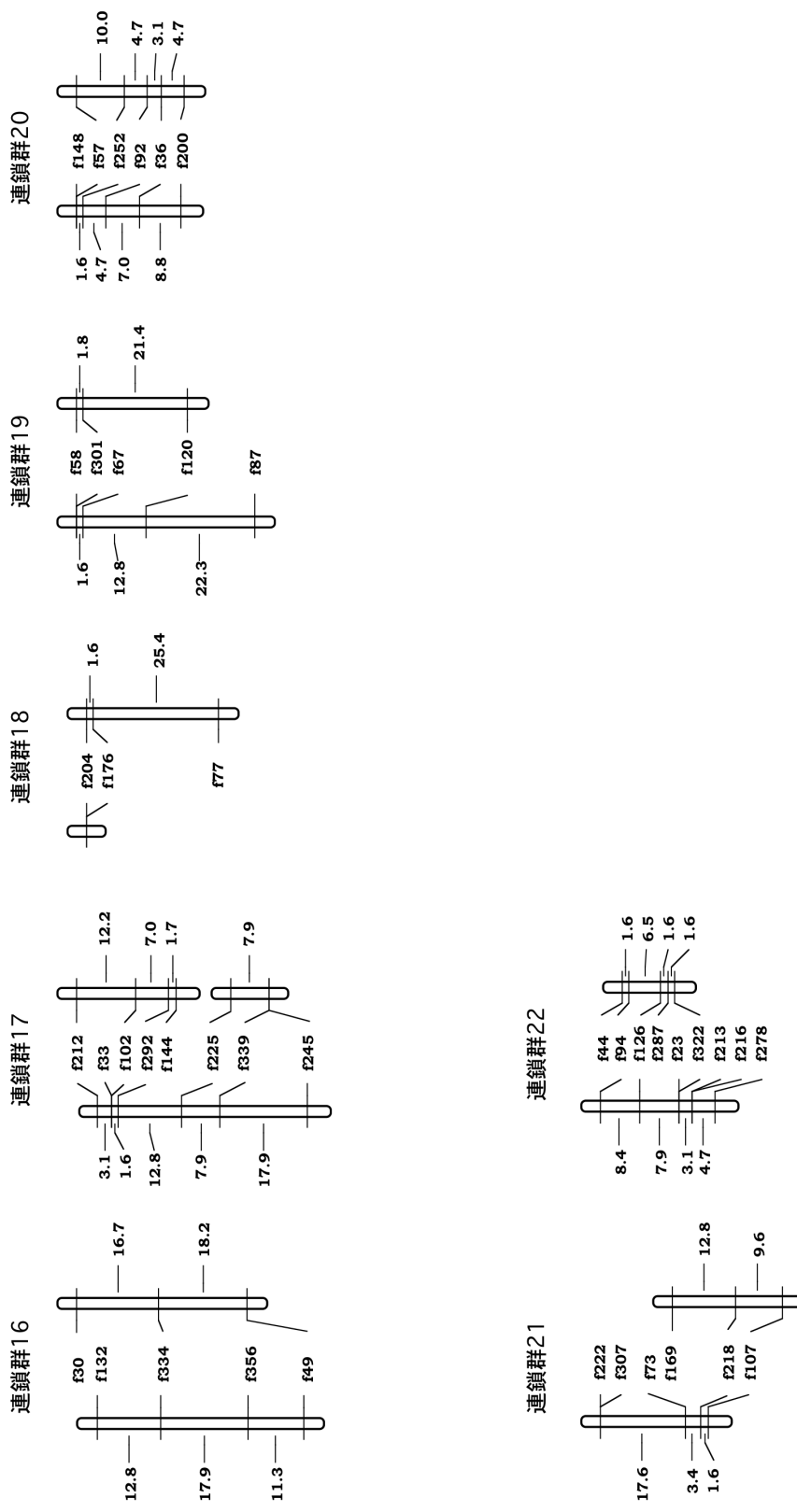


Figure 1 . 続き

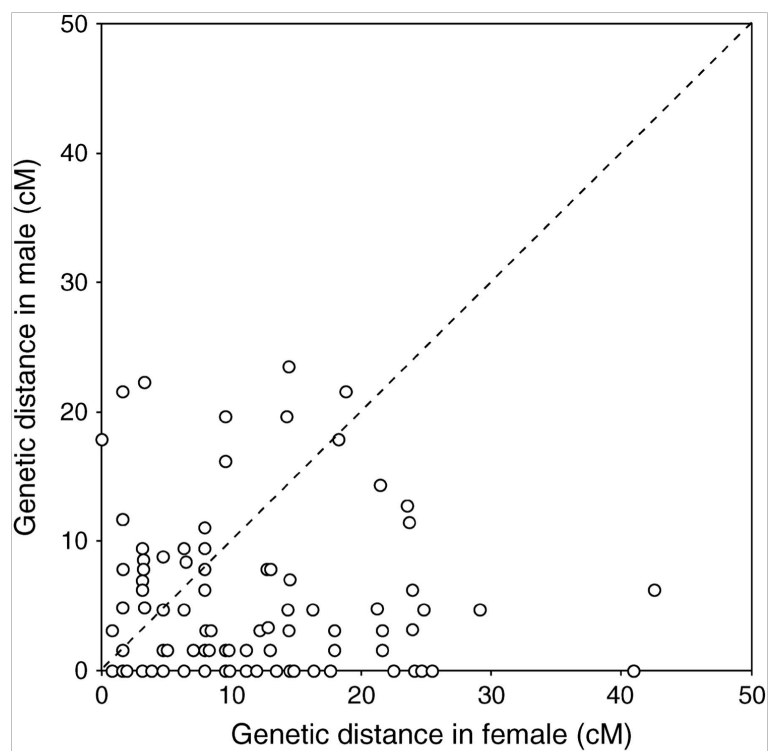


Figure 2. 雌雄共通多型マーカー間における組換え率

縦軸は雄連鎖地図における遺伝距離を、横軸は雌連鎖地図における遺伝距離を表す。隣接する2組の雌雄共通多型マーカー間の遺伝距離をプロットとした。

Table 1. マイクロサテライトマーカー名とその設計条件

マーカー名	設計条件
f5 - f168	トラフグゲノムアセンブリv3.0に対し、(CA) ₅₀ 配列をクエリー配列としたBLAST探索を行い、得られたscaffold内に含まれるCAリピート領域をマーカー座とした。
f169 - f200	トラフグゲノムアセンブリv3.0より、配列サイズの大きいscaffoldを順に選び、それらscaffold内に含まれるCAリピート領域をマーカー座とした(上記条件に含まれるscaffoldを除く)。
f201 - f368	トラフグ・メダカ・ゼブラフィッシュで共通するオーソログを同定し、そのトラフグ遺伝子を含むscaffold内のCAリピート領域をマーカー座とした(上記条件に含まれるscaffoldを除く)。
f369 - f375	
f377 - f386	ミドリフグゲノム地図を参照して、トラフグのscaffoldを選び、それらscaffold内に含まれるCAリピート領域をマーカー座とした(上記条件に含まれるscaffoldを除く)。
f460	
f496 - f502	

Table 2. 各連鎖群におけるマイクロサテライトマーカー数, scaffoldサイズおよび遺伝距離

連鎖群	マーカー数	scaffoldサイズの合計(bp) ^a	予測遺伝子数 ^a	雄連鎖群			雌連鎖群		
				連鎖群	マーカー数	合計遺伝距離(cM)	連鎖群	マーカー数	合計遺伝距離(cM)
LG1	17	3,284,077	394	LG1	16	64.8	LG1-F1	3	12.6
							LG1-F2	11	75.2
							LG1-F3	2	21.2
LG2	17	3,003,930	481	LG2	16	75.0	LG2	13	117.4
LG3	12	2,521,477	231	LG3	10	31.4	LG3	11	96.0
LG4	12	2,344,834	233	LG4	11	38.8	LG4	11	86.1
LG5	14	1,844,110	279	LG5-M1	4	3.2	LG5-F1	4	17.4
				LG5-M2	6	11.1	LG5-F2	8	65.8
LG6	7	1,543,293	190	LG6	7	56.5	LG6	7	76.2
LG7	10	1,743,445	197	LG7-M1	2	11.7	LG7	10	69.0
				LG7-M2	6	22.5			
LG8	9	1,005,816	110	LG8	7	34.6	LG8	7	68.9
LG9	8	1,526,000	146	LG9	7	21.2	LG9	8	63.4
LG10	12	2,414,664	299	LG10	9	49.8	LG10-F1	7	38.5
							LG10-F2	4	19.3
							LG11-F1	2	23.7
LG11	8	1,695,911	135	LG11	7	35.3	LG11-F2	5	24.0
							LG12	12	46.4
LG12	12	3,690,823	451	LG12	10	20.5	LG12	12	46.4
LG13	5	1,403,550	65	LG13	5	11.0	LG13	4	43.1
LG14	7	582,240	40	LG14	5	12.6	LG14	5	42.6
LG15	8	2,018,465	186	LG15	5	6.3	LG15-F1	4	31.9
							LG15-F2	3	4.7
LG16	5	645,346	76	LG16	4	42.0	LG16	3	34.9
LG17	8	906,885	139	LG17	7	43.3	LG17-F1	4	20.9
							LG17-F2	3	7.9
LG18	3	992,949	92	LG18	2	0	LG18	3	27.0
LG19	5	1,286,233	136	LG19	5	36.7	LG19	4	23.2
LG20	6	1,409,226	111	LG20	6	22.1	LG20	5	22.5
LG21	6	2,031,407	254	LG21	5	22.6	LG21	3	22.4
LG22	9	1,302,580	207	LG22	7	24.1	LG22	5	11.3
合計	200	39,197,261	4,452		169	697.1		171	1213.5

^ascaffoldサイズおよび予測遺伝子の数はトラフゲノムアセンブリ v3.0に基づく。

第 2 章

連鎖地図を利用した硬骨魚類の比較ゲノム解析

近年、複数の脊椎動物のゲノム解読の進展を受けて、脊椎動物の染色体構造がどのような再編成過程を経てきたかという謎が明らかになりつつある (Bourque *et al.*, 2004; Bourque *et al.*, 2005; Nakatani *et al.*, 2007). 硬骨魚類においてもゲノム進化に関する先駆的な研究が成されている。まず、硬骨魚類のゲノムには Hox 遺伝子クラスターなどの遺伝子のコピー数が哺乳類に比べて多く含まれていること明らかになり、このことから、硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複が起きていたという仮説が提唱された (Amores *et al.*, 1998; Meyer and Schartl 1999; Robinson-Rechavi *et al.*, 2001). さらに、近年の全ゲノムレベルでの比較解析によって、この仮説を強く支持する証拠が得られている (Postlethwait *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2000; Naruse *et al.*, 2004; Jaillon *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005). また、これらの研究では、脊椎動物の共通祖先ゲノムの構造を推定し、脊椎動物の共通祖先から硬骨魚類系統と四脚動物系統に分岐した後 (約 4.5 億年前) に、硬骨魚類系統で生じた染色体再編成の過程を明らかにしている。

一方、我が国の養殖魚の多くは棘鱗上目に属し、これらの魚種は約 2 億年前に分岐を開始したと考えられている。つまり、モデル魚類のゲノム構造から多くの養殖魚を含む非モデル魚類のゲノム構造を推定するには、硬骨魚類の染色体進化において、比較的最近に起きた再編成事象を詳細に理解する必要がある。

そこで本章では、第 1 章で明らかになったトラフグ遺伝子のゲノム上の位置情報をミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのそれと比較し、硬骨魚類の染色体進化において比較的最近に起きた染色体再編成の事象を理解することを目指した。複数の生物種のゲノムを比較する場合、これらの種間で共通するオーソログを用いることが多い。オーソログとは 2 種の生物の遺伝子の内、2 種の最終共通祖先生物において同一の遺伝子に由来した同祖的關係性を持つ遺伝子を指す。また、染色体構造を比較する場合、有効な解析概念にシンテニーが挙げられる。シンテニーとは異なる生物種の染色体間でオーソログの連鎖關係が保存されていることを指し、シンテニーが保存された領域において、必ずしもオーソログの物理的順序が保存されているとは限らない。本研究では、遺伝子の染色体上の順序を表す概念として「ジーンオーダー」を、これを考慮しない遺伝子の連鎖關係を表す概念として「シンテニー」を用いた。

トラフグ・ミドリフグ間におけるオーソログなゲノム配列の同定

前章でトラフグ連鎖地図上に結び付けた 200 個の scaffold において、30 kb を超える scaffold については配列の 5'末端部、中央部、3'末端部それぞれの約 10 kb の配列をミドリフグゲノムアセンブリに対して BLAT 解析 (Kent, 2002) に付し (a minimum similarity score > 2000), 各 scaffold と相同関係にあるミドリフグゲノム配列を得て、その染色体上の位置を同定した。なお、ミドリフグにおける相同配列の染色体位置を同定する際、トラフグの 1 scaffold から抽出した 3 個の断片配列と相同関係にある 3 個のミドリフグ断片配列の内、2 個以上の断片配列が同じ染色体上に位置する場合のみ、ミドリフグにおける相同配列の染色体位置として同定した。一方、各相同配列が異なる染色体上に位置した場合、あるいは染色体上の位置が不明の場合、トラフグ scaffold と相同関係にあるミドリフグ断片配列の染色体位置を不明とした。また、30 kb 未満の scaffold については全配列を 1 個の断片配列データとして解析し、各 scaffold と相同関係にあるミドリフグ断片配列を得て、その染色体上の位置を同定した。

トラフグ・メダカ・ヒト・マウス間共通オーソログの同定

メダカ・ヒト間でオーソログ関係にある 819 個の遺伝子 (EST 配列を含む) が Naruse *et al.* (2004) において報告されている。まず、これらの塩基配列情報を DDBJ (<http://getentry.ddbj.nig.ac.jp>) より得た。次に、得られた配列データをトラフグゲノムアセンブリ v3.0 に対して BLAST 解析に付し ($E\text{-value} > e^{-10}$), トラフグの相同遺伝子配列データを得た。この際、複数のトラフグ遺伝子配列データが検出された場合は以下の手順を踏んだ。<手順 1> 検出された複数の遺伝子配列データを E-value の高いものから並べた。<手順 2> 上位 3 個の配列データの E-value を比較した。<手順 3> 最上位の E-value が最下位の E-value より 3 倍以上高い場合、最上位の配列データをオーソログと見なした。<手順 4> 最上位の E-value が最下位の E-value の 3 倍以内の場合、誤ったオーソログ関係を推定する危険性がある為、検出された遺伝子配列データを棄却した。これらの手順を経て、トラフグ・メダカ・ヒト間共通オーソログを得た。最後に、これらのオーソログから、ヒト・マウス間でもオーソログ関係にある遺伝子を、NCBI human genome resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) を参照にして探索し、最終的に 4 種間共通オーソログを得た。

トラフグ・ゼブラフィッシュ・ヒト・マウス間共通オーソログの同定

Woods *et al.* (2000) において報告されたゼブラフィッシュ・ヒト間でオーソログ

ス関係にある 792 個の遺伝子および EST の塩基配列情報を Zebrafish Information Network (<http://www.zfin.org>) より得た。次に得られた配列データを前述と同じ方法により BLAST 解析に付し ($E\text{-value} > e^{-10}$), トラフグ・ゼブラフィッシュ・ヒト間共通オーソログを得た。最後に, これらのオーソログの中から, ヒト・マウス間でもオーソログ関係にある遺伝子を, NCBI human genome resources を参照にして探索し, 最終的に 4 種間共通オーソログを得た。

オーソログの染色体位置の同定

上記の解析で得たオーソログにおいてトラフグゲノム上の染色体位置を決定する為, 前章で連鎖地図上に位置付けた scaffold 内に存在するオーソログのみを選び出し, その連鎖群上の位置を探索した。さらに, これらオーソログのメダカ染色体上の位置は Naruse *et al.* (2004), ゼブラフィッシュ染色体上の位置は Woods *et al.* (2000) をそれぞれ参照した。また, ヒトとマウス染色体上の位置は NCBI human genome resources を参照した。

シンテニー解析

トラフグ・ミドリフグ間の比較では, 相同関係にある配列の両魚種における染色体位置を Oxford grid (Edwards, 1991) 上に表し, 両魚種間で認められるシンテニーを探った。トラフグ・メダカ間およびトラフグ・ゼブラフィッシュ間の比較では, 上記の解析により得られたオーソログの各魚種における染色体位置を Oxford grid 上に表し, 各魚種間で認められるシンテニーを探った。さらに, ヒト・マウス間のデータを加えて, 硬骨魚類間と哺乳類間におけるシンテニーの保存性の差を比較した。

結果

トラフグ・ミドリフグ間の比較ゲノム解析

トラフグ・ミドリフグ間におけるシンテニーの保存性を調べる為、前章でトラフグ連鎖地図上に位置付けた 200 個の scaffold と相同関係にあるミドリフグゲノム配列を探索して、152 個の配列をミドリフグ染色体上に同定した (Figure 3, Supplemental Table 4). トラフグ連鎖群 1 (Tru1) 上の 17 個の scaffold 中、2 個の scaffold に相同なミドリフグ配列のゲノム上の位置は不明であったが、残りの 15 個の scaffold と相同関係にある配列全てがミドリフグ 2 番染色体 (Tni2) 上に位置しており、Tru1 と Tni2 は 1:1 関係を示した. 他の染色体において、両フグ間で 1:1 関係が認められた組み合わせは 14 組あり、合計で 15 組の染色体が 2 魚種間で 1:1 関係を示した (Tru1/Tni2, Tru2/Tni10, Tru3/Tni9, Tru6/Tni4, Tru7/Tni8, Tru9/Tni13, Tru11/Tni16, Tru12/Tni21, Tru13/Tni5, Tru15/Tni7, Tru16/Tni14, Tru18/Tni19, Tru19/Tni11, Tru21/Tni12, Tru22/Tni15). 一方、Tru10 上の 12 個の scaffold に相同なミドリフグ配列の内、6 個の配列は Tni6 上に位置したが、2 個の配列は Tni17 と Tni18 上に位置した. このように両フグ間で 1:1 関係が成り立たない染色体の関係は、7 個のトラフグ連鎖群 (Tru4, Tru5, Tru8, Tru10, Tru14, Tru17, Tru20) と 6 個のミドリフグ染色体 (Tni1, Tni3, Tni6, Tni17, Tni18, Tni20) の間で認められた.

トラフグ・メダカ間の比較ゲノム解析

トラフグ・メダカ間におけるシンテニーの保存性を調べる為、Naruse *et al.* (2004) のデータセットからトラフグ・メダカ間でオーソログ関係にある遺伝子対を選び出し、108 個のオーソログをトラフグ連鎖地図上に同定した (Figure 4A). この内、94 個 (87%) のオーソログは少なくとも 2 個以上の遺伝子から構成されるシンテニーブロックを形成した. また、このブロックは 22 個認められた. さらに、18 個のブロックでは少なくとも 3 個以上のオーソログが含まれた.

トラフグ・ゼブラフィッシュ間の比較ゲノム解析

上記と同様にして Woods *et al.* (2000) のデータセットからトラフグ・ゼブラフィッシュでオーソログ関係にある遺伝子を選び出し、88 個のオーソログをトラフグ連鎖地図上に同定した (Figure 5A). この内、61 個 (69%) のオーソログは少なくとも 2 個以上の遺伝子からなる 22 個のシンテニーブロックを形成した. さらに、9 個のブロックでは少なくとも 3 個以上のオーソログが含まれた.

硬骨魚類系統と哺乳類系統におけるシンテニーの保存の程度

トラフグ・メダカ間の比較解析に用いた 108 種類の遺伝子について、ヒトとマウスのオーソログを同定し、105 個のオーソログについてそれぞれの染色体上の位置を同定した (Figure 4B)。また、トラフグ・ゼブラフィッシュ間の比較解析に用いた 88 個のオーソログについても同様に、ヒトとマウスのオーソログを同定し、86 個のオーソログについてそれぞれの染色体上の位置を同定した (Figure 5B)。硬骨魚類系統と哺乳類系統の間におけるシンテニーの保存性を比較する為、シンテニーブロック外に検出されたオーソログの総数に着目したところ、トラフグ・メダカ間では 14 個、ヒト・マウス間では 28 個のオーソログがシンテニーブロック外に検出された。同様に、トラフグ・ゼブラフィッシュ間では 26 個、ヒト・マウス間では 32 個のオーソログがシンテニーブロック外に検出された。

考察

トラフグ・ミドリフグ間における染色体再編成事象

トラフグとミドリフグのゲノムを比較した結果、15組の染色体対では1:1関係が認められた (Figure 3). これらの染色体対はフグ目の共通祖先では同一の染色体であった可能性が高い. 一方、いくつかの染色体対においては1:1関係が崩れていた. これらは両フグが共通祖先から分岐した後に起こった染色体間の再編成の痕跡と考えられる. 例えば、Tru5 および Tru8 と Tni3 は2:1関係にある. このような関係をもたらす染色体進化の過程は2つのシナリオが考えられる. 第1のシナリオは、両フグが共通祖先から分岐した後、トラフグ系統内で Tni3 に相当する1つの染色体が分裂し、現存の Tru5 と Tru8 に至ったというものである. もう1つのシナリオとして、ミドリフグ系統内で Tru5 および Tru8 に相当する2つの染色体が融合し、現存の Tni3 が形成されたという過程も考えられる. 2種間での比較解析は再編成の有無を検出することは可能だが、その再編成がどちらの系統で起こったものかを特定することはできない. これを明らかにするには、両フグの外群関係に当たる魚種を加えた比較ゲノム解析が必要である.

硬骨魚類系統と哺乳類系統における染色体間再編成の程度

トラフグとメダカの共通祖先の分岐年代は、フグ目類の化石が約9,500万年前の地層に存在していたことから (Tyler and Sorbini, 1996), 少なくとも9,500万年前と考えられる. また、Yamanoue *et al.* (2006) の分子時計を基にした研究では、両種の分岐年代は約18,400-19,900万年前と推定されている. 一方、ヒトとマウスの共通祖先の分岐年代は約8,700万年前と推定されている (Springer *et al.*, 2003). 本研究で用いたデータセットにおいて、トラフグ・メダカ間でシンテニーブロック外に存在するオーソログが14個であったのに対して、ヒト・マウス間のそれは28個であった. トラフグとメダカおよびヒトとマウスが比較的同じ時期にそれぞれ分岐を開始したことを考慮すると、トラフグ・メダカ間では、ヒト・マウス間と比較して、シンテニーが極めて良く保存されていると言える. 一方、トラフグとゼブラフィッシュの共通祖先の分岐年代は、分子時計の解析から、約28,000万年前と推定されている (Kumazawa *et al.*, 1999). この分岐年代はヒトとマウスの共通祖先の分岐年代を3倍ほど遡る. しかし、本研究のデータセットにおいて、トラフグ・ゼブラフィッシュ間のシンテニーブロック外に存在するオーソログが26個であったのに対して、ヒト・マウス間のそれは32個であった. 分岐年代が大きく異なるにも関わらず、シンテニーブロック外に存在するオーソログの数に大きな差が認められなかった. つまり、トラフグ・ゼブラ

フィッシュ間のシンテニーの保存率はヒト・マウス間のそれに比べ高いと言える。

Jaillon *et al.* (2004) はミドリフグゲノムの 64%を被覆する物理的ゲノム地図とヒトゲノムの物理的ゲノム地図を用いて、硬骨魚類と哺乳類の共通祖先のゲノム構造を再構築している。彼らは、ミドリフグとヒトが共通祖先から分岐した後、ミドリフグ系統内での染色体間の再構成の頻度が少ないと推定した。また、Naruse *et al.* (2004) はメダカ、ゼブラフィッシュ、ヒトの連鎖地図を比較し、硬骨魚類と哺乳類では染色体の進化パターンが異なり、哺乳類の染色体の進化は染色体間の融合や分裂を主としているのに対し、硬骨魚類の染色体の進化は染色体内の逆位を主としていることを示唆した。本研究では、それらの研究とは異なるデータセットと解析により、哺乳類間に認められる染色体間の再編成と比較して、硬骨魚類のその頻度が少ないことを示した。この結果は Jaillon *et al.* (2004) と Naruse *et al.* (2004) の推定を支持するものであった。

硬骨魚類間におけるシンテニーの保存の程度

トラフグ・メダカ間およびトラフグ・ゼブラフィッシュ間のシンテニーの保存性に着目すると、トラフグ・メダカ間では 87%のオーソログがシンテニーブロックを形成しているのに対し、トラフグ・ゼブラフィッシュ間では 69%のオーソログがシンテニーブロックを形成していた。従って、トラフグ・メダカ間のシンテニーはトラフグ・ゼブラフィッシュ間のそれに比べ高く保存されていると言える。この結果は、トラフグ、メダカ、ゼブラフィッシュの系統的關係を考えれば当然であると考えられるが、他の解釈による説明も可能である。ゼブラフィッシュのゲノムサイズは約 1,600 Mb とトラフグやメダカに比べ大きく、ゲノム上に含まれる転移因子の割合が多いと推定されている (Venkatesh *et al.*, 2000)。一方、この転移因子の蓄積が染色体間のゲノム再編成の頻度を高くする可能性が指摘されている (Grützner *et al.*, 1999)。従って、トラフグ・ゼブラフィッシュ間に認められたゲノム再編成はゼブラフィッシュ系統における転移因子の蓄積によると考えることも可能である。転移因子量とゲノム再編成の關係については、明確な知見を得る為、より多くの生物を材料とした比較ゲノム解析が必要であろう。

第 2 章
Figure

		ミドリフグ染色体																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Un	
トラフグ連鎖群	1		15																					2
	2										16													1
	3									8														4
	4																		8	1				3
	5			4																				10
	6				4																			3
	7									8														2
	8			5																		1		3
	9														8									
	10					6													1	1				4
	11																6							2
	12																						7	5
	13					3																		2
	14	4																					2	1
	15								8															
	16															5								
	17																			6				2
	18																				3			
	19											4												1
	20	6																						
	21												6											
	22																6							3

Figure 3. トラフグ・ミドリフグ間におけるシンテニーの保存性

縦軸にトラフグ連鎖群を、横軸にミドリフグ染色体を配置した。ミドリフグのゲノムアセンブリにおいて染色体位置が不明な配列は“Un”に分類した。グリッド内の数字は2種間でオーソログ関係にある配列断片の数を示す。

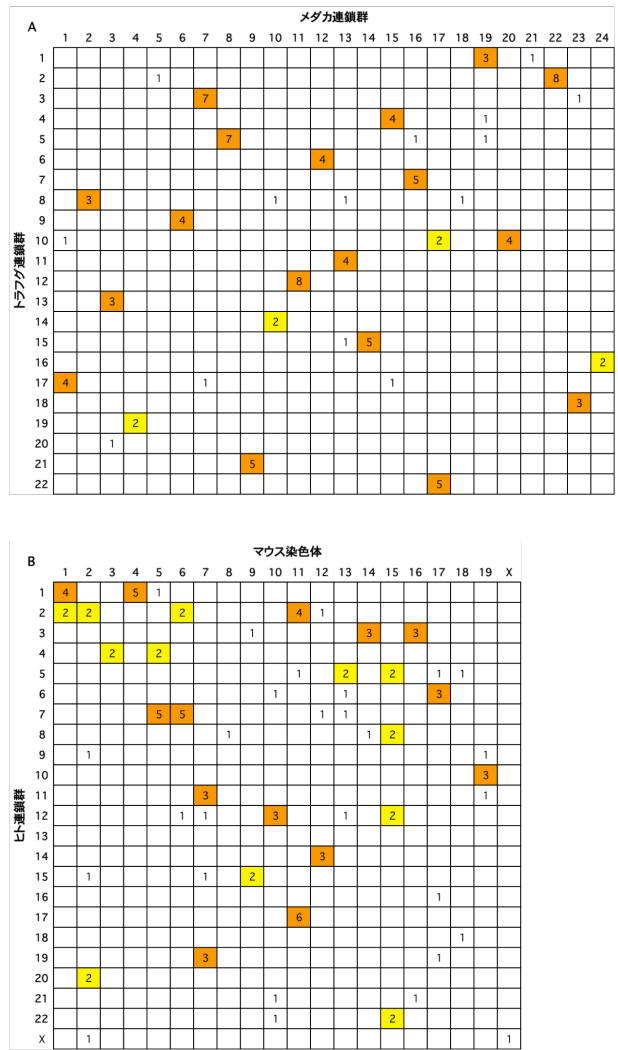


Figure 4. トラフグ・メダカ間およびヒト・マウス間におけるシンテニーの保存性

(A) トラフグ・メダカ間におけるシンテニーの保存性. 縦軸にトラフグ連鎖群, 横軸にメダカ連鎖群を配置した. グリッド内の数字は2種のオーソログの数を示す. (B) ヒト・マウス間におけるシンテニーの保存性. 縦軸にヒト染色体, 横軸にマウス染色体を配置した. オーソログセットはトラフグ・メダカ・ヒト・マウス間の4種共通オーソログを使用した(マウス染色体の位置が同定できなかったオーソログを含む. Supplemental Table 5). 各Oxford gridにおいて, グリッド内に含まれる遺伝子に応じて色分けした. オーソログが3個以上のグリッドをオレンジ, 2個のグリッドを黄, 1個以下を無色とした.

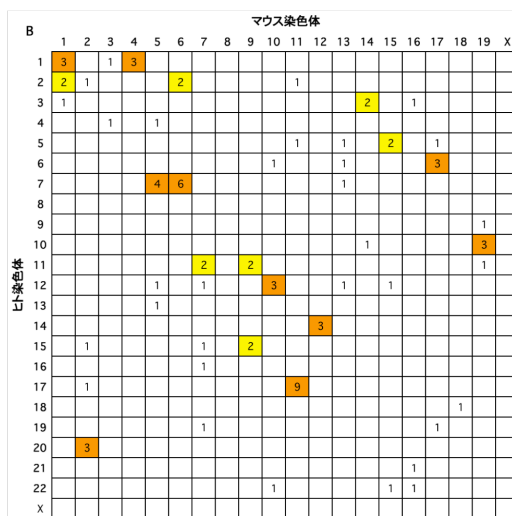
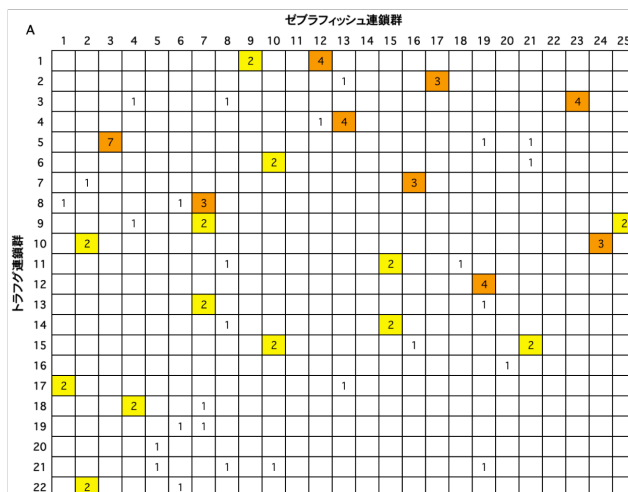


Figure 5. トラフグ・ゼブラフィッシュ間およびヒト・マウス間におけるシンテニーの保存性

(A) トラフグ・ゼブラフィッシュ間におけるシンテニーの保存性. 縦軸にトラフグ連鎖群, 横軸にゼブラフィッシュ連鎖群を配置した. グリッド内の数字は2種のオーソログの数を示す. (B) ヒト・マウス間におけるシンテニーの保存性. 縦軸にヒト染色体, 横軸にマウス染色体を配置した. オーソログセットはトラフグ・ゼブラフィッシュ・ヒト・マウス間の4種共通オーソログを使用した(マウス染色体の位置が同定できなかったオーソログを含む, Supplemental Table 5). 各Oxford gridにおいて, グリッド内に含まれる遺伝子に応じて色分けした. オーソログが3個以上のグリッドをオレンジ, 2個のグリッドを黄, 1個以下を無色とした.

第 3 章

トラフグ連鎖地図の高密度化

第 1 章の研究では 200 個のマイクロサテライトマーカーから構成されるトラフグ連鎖地図を作製した。この地図にはトラフグゲノム概要配列 v3.0 に含まれる 200 個の scaffold が貼付けられており、それら scaffold の合計配列長は約 39 Mb であった。第 2 章の研究では、これらの配列中に存在する遺伝子を用いてトラフグと他のモデル魚類のシンテニー構造を比較して染色体間再編成事象を推定することにより、硬骨魚類の染色体進化の特徴の一部を明らかにした。しかし、この解析に利用したデータセットはトラフグ概要配列の 10%の配列から得たものであり、染色体の進化過程を正確に把握するにはデータ量が不足していた。また、貼付けられた scaffold の染色体上の方向性が不明であったことから、染色体内の再編成事象は解析できなかった。より詳細な比較解析を行うには、より多くのトラフグ遺伝子のゲノム上の位置を知ることが必要である。

ゲノム解読により得られた scaffold の集積を繋ぎ合わせて染色体レベルの配列を作製するには、scaffold を連鎖地図上に整序すれば良い。この方法は、ゲノムアセンブリの質が高く、その大部分が比較的少数の長い scaffold によって構成されている場合には、特に効果的であろう (Kasahara *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008)。ところが、トラフグゲノムアセンブリ v3.0 の場合、配列長の大きな scaffold は少なく、全ゲノム概要配列 319 Mb は 20,379 個の scaffold で構成されており、概要配列の 80%を構成するには少なくとも 4,100 個の scaffold が必要であった。従って、これらのデータを用いてトラフグゲノム配列を染色体のレベルまで再構築するには莫大な作業量が必要であった。しかし、2005 年にトラフグゲノムアセンブリが v 3.0 から v 4.0 (Joint Genome Institute, *Fugu rubripes* v4.0, <http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>) へと更新され、ゲノム概要配列 393 Mb は 7,213 個の scaffold で構成されるようになった。さらに、393 Mb の 90%は、配列長の長い 1,118 個の scaffold から構成されていた。従って、これらの scaffold を選択的に連鎖地図に貼付ければ、全ゲノム配列の大部分を再構築できると予想される。

そこで本章の研究では、サイズの大きな scaffold から得た多型マーカーを中心として、トラフグ連鎖地図の高密度化を行い、トラフグゲノムの大部分を連鎖地図上に貼付けることを目的とした。この際、500 kb 以上の scaffold に関しては、1 つの scaffold につき 2 個以上の多型マーカーを用いて連鎖解析を行い、scaffold の連鎖群上の方向を決定することを目指した。さらに、マーカー間で組換えが認められなかった場合には、別途に作出した大規模連鎖解析家系を用いてマーカー間の連鎖を解析した。

真核生物の染色体構造の特徴的な部位の 1 つにセントロメアが挙げられる。セントロメアとは細胞分裂時に染色体上で一次狭窄を形成し、紡錘体が結合する着糸点を指す (松原と吉川, 1994)。各生物の持つ染色体の構造的特徴は染色体上のセントロメア領域の位置によるものであり、その位置によって染色体の形を主に 3 種類、すなわち、中部着糸型、次中部着糸型、端部着糸型に大別することができる。従って、セントロメア領域の位置情報は細胞遺伝学研究において重要な意味を持っており、染色体上のランドマークとして広く用いられている。例えば、ヒトゲノム地図では全ての染色体においてセントロメア領域の位置決定がなされ、各染色体上の遺伝子の位置情報はセントロメア領域からの距離を指標として表している (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)。また、ミドリフグにおいてもゲノム地図にはセントロメア領域の位置情報が含まれており、これにより、ミドリフグの持つハプロイド染色体 (21 本) の多くは次中部着糸型染色体であることが報告されている (Jaillon *et al.*, 2004)。一方、トラフグでは第 1 章の研究で作製した連鎖地図にセントロメア領域の位置情報が含まれていなかった。これをトラフグ連鎖群上に位置付けるには、セントロメア近傍配列を含む scaffold を連鎖群上に貼付ければ良い。ミドリフグでは 118 塩基を単位としたリピート配列がセントロメア配列として同定されており、さらに、細胞組織学的な観察によって、その配列がセントロメア領域に位置することも明らかになっている (Fischer *et al.*, 2000)。トラフグにおいてもセントロメア起源と思われるリピート配列が報告されており (Brenner *et al.*, 1993; Elgar *et al.*, 1999)、この配列はミドリフグのセントロメア配列と 57% の同一性を示す (Crollius *et al.*, 2000)。さらに、この配列を細胞組織学的に解析したところ、トラフグのセントロメア領域に位置することが明らかになっている (藤原篤志博士, 私信)。そこで本章の研究では、連鎖地図の高密度化に加え、このリピート配列のゲノム上の位置を調べ、トラフグ連鎖地図上にセントロメア近傍領域を同定することも目的とした。

材料および方法

トラフグゲノムアセンブリの更新に対応した連鎖地図情報の更新

第1章の研究では、トラフグゲノムアセンブリ v3.0 を基にマイクロサテライトマーカーを作製した。これらのマーカー座のアセンブリ v4.0 上の位置 (scaffold 番号と scaffold 上の位置) を同定する為、マーカー座のマイクロサテライト領域を挟む上流と下流各 500 塩基の配列をアセンブリ v4.0 に対して BLAST 解析 ($E\text{-value} > e^{-10}$) に付した。

プライマーの作製

トラフグゲノムアセンブリ v4.0 には、配列長が 100 kb 以上の scaffold が 516 個存在していた。この内、144 個の scaffold については、第1章の研究で既にマーカー座が得られていた。そこで、残りの scaffold に含まれるマイクロサテライト領域を選び出し、この領域を挟むゲノム配列から PCR プライマーセットを設計した。次に、配列長が 50 kb 以上 100 kb 未満の scaffold の内、マイクロサテライト座を含んだ 147 個の scaffold を選び出し、同様にして PCR プライマーセットを設計した。なお、500 kb 以上の scaffold に関しては、複数のマイクロサテライト領域について PCR プライマーセットを設計した。tailed-primer 法を用いた PCR 産物の標識を行うため、Forward primer の 5'側には M13 配列 (CACGACGTTGTAAAACGAC) を付加した。プライマーセットは合計 1,459 組作製し、マイクロサテライトマーカー名は第1章と同様の形式で表記した。

連鎖解析用のゲノム DNA パネル

高密度連鎖地図の作製には第1章と同じ解析家系を用いた。別途、連鎖群上に貼付けた scaffold の方向性を決定する為、新たに大規模なトラフグ解析家系を作出した。この家系は南伊豆栽培漁業センターにおいて乾導法により人工授精させて得た。その後、受精卵を東京大学水産実験所まで移送し飼育を続けた。ゲノム DNA の抽出は、まず、両親魚の約 0.5 cm^3 の尾鱗または仔魚を 400 μL の 8 M 尿素を含む TNESU8 緩衝液中に数日間浸した (第1章参照)。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 を抽出した。

DNA マーカーの多型情報の取得

マーカーの多型情報の取得はシンガポール国立分子細胞生物学研究所 (Institute of Molecular and Cell Biology) と共同して行った。本章の研究で設計した 1,508 組のプ

ライマーセットの内、406組のプライマーによる多型情報の取得は東京大学水産実験所にて行った。まず、以下のPCR反応液を作製した。約1 ng/μLのゲノムDNA溶液3 μLに Forward primer (10 pmol/μL) を0.025 μL, Reverse primer (10 pmol/μL) を0.25 μL, IRD 標識 M13 primer (10 pmol/μL, LI-COR) を0.25 μL, 10×PCR Buffer (Takara) を1 μL, dNTP Mixture (各2.5 mM, Takara) を0.8 μL, r Taq DNA Polymerase (5 U/μL, Takara) を0.05 μL 加え、滅菌蒸留水で合計10 μLとした。次に、iCycler (Bio-RAD) を用いて、サンプルを95°C、2分間の熱変性反応に付し、その後94°Cで30秒間、59°Cで2分間の増幅反応を35サイクル行い、最後に59°Cで3分間の最終伸長反応に付した。PCR増幅後、反応溶液10 μLに対して、変性ローディングバッファー（第1章参照）を等量加え、95°Cで10分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これを、8 M 尿素を含む6%ポリアクリルアミド変性ゲル (Long Ranger[®], Takara) を用いた電気泳動 (4300 DNA analyzer, LI-COR) に付し、各マーカーにおける分離世代の遺伝子型を判定した。一方、残りの1,102組のプライマーによるPCR反応および電気泳動は Institute of Molecular and Cell Biology にて行われた。まず、本章の研究で設計した配列を基にプライマーが合成され、ゲノムDNA増幅キット (illustra GenomiPhi V2 Kit, GE Healthcare) によって複製したゲノムDNAパネルを用いて、上記と同様の方法でPCR反応が行われた。ただし、IRD 標識 M13 primer の代わりに、FAM 標識 M13 primer が用いられた。電気泳動はABI3730xl (Applied Biosystems) を用いて行われた。得られた泳動パターンは東京大学水産実験所に送付され、これを用いて多型情報を抽出した。

DNA マーカーの連鎖解析と連鎖地図の作製

本章の研究で得た各マーカー座における分離世代の多型データを第1章のデータと合わせて、第1章と同様の方法で連鎖地図を作製した。

セントロメア領域の同定

トラフグのセントロメア近傍配列情報は独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所、藤原篤志博士より提供して頂いた。彼はトラフグにおいて報告されたセントロメア起源と思われるリピート配列 (Brenner *et al.*, 1993; Elgar *et al.*, 1999) を基に、同様のリピート配列 (相同性 90%) をトラフグゲノムからクローン化した (ACGAGAAAACGTCAAAAACGTCATAATGTGAGCGCAGCATGAGTTTTTCAGGTGATCATGTTGAATTTACCTCTGTTTTGAGAACTTGTATATCCTGACCAAAGTGTATGTTTTCCC)。さらに、この配列をプローブとした蛍光 *in situ* hybridization 法によりトラフグ末梢血球を観察し、この配列がセントロメア領域に位置することを明ら

かにしている（藤原篤志博士，私信）．この配列をクエリーとして，トラフグゲノムアセンブリ v4.0 に対する BLAST 解析に付し (E-value > e^{-20})，この配列を含む scaffold を全て同定した．次に，得られた scaffold 上のマイクロサテライト配列を探索し，PCR プライマーセットを設計した．

結果

マイクロサテライトマーカーの作製

高密度連鎖地図を作製する為、新たに 1,508 個のマイクロサテライト座を増幅するプライマーセットを設計した。これらの中、885 個 (61%) のマーカー座が雄親のゲノムにおいて、また 828 個 (57%) のマーカー座が雌親のゲノムにおいてそれぞれ多型性を示した。さらに、692 個については、両親で共に多型性が認められた。全てのマーカー座の内、1021 個 (70%) が分離世代の連鎖解析に有効であった (Supplemental Table 6)。

分離世代における連鎖の解析

新規に作製した 1,021 個のマーカー座に第 1 章において作製した 212 個のマーカー座を加え、両親から子供へ伝達される対立遺伝子のパターンを解析した。雄親から子供への伝達パターンを解析した結果、1,057 個のマーカー座からなる 22 個の連鎖群を得た (Figure 6)。また、雌親から子供への伝達パターン解析した結果、1,000 個のマーカー座からなる 22 個の連鎖群を得た。

第 1 章の結果において、雄連鎖群 5, 7 および雌連鎖群 1, 5, 10, 11, 15, 17 はそれぞれ複数の連鎖群から構成されていたが、新たにマーカー座を加えたことで、これらの連鎖群はそれぞれ 1 個の連鎖群に統合された。(Figure 6, Table 3, Supplemental Table 7, 8)。雄連鎖地図の遺伝距離の合計は 1,202.8 cM であり、隣接する 2 つのマーカー間の平均遺伝距離は 1.1 cM であった。各連鎖群における遺伝距離の合計は最小で 40.4 cM (雄連鎖群 10)、最大で 99.7 cM (雄連鎖群 1) となり、また、各連鎖群上に同定されたマーカー座の平均数は 48 個となった。第 1 章で用いた 184 個のマーカーと本章で作製した 885 個のマーカーを合計した 1,069 個のマーカーの内、連鎖を示さないマーカー座は 12 個しかなく、雄連鎖地図におけるマーカー連鎖率は 99% であった。雌連鎖地図の遺伝距離の合計は 2,189.8 cM であり、1,000 個のマーカーにおいて隣接する 2 つのマーカー間の平均遺伝距離は 2.2 cM であった。各連鎖群の遺伝距離の合計は最小で 66.8 cM (雌連鎖群 16)、最大で 179.9 cM (雌連鎖群 1) であり、また、各連鎖群上に同定されたマーカーの平均数は 45 個であった。雌連鎖地図におけるマーカー連鎖率は 98% を示した。

雄親と雌親で共に多型性を示すマーカーを用いて連鎖群を統合した結果、1,220 個のマーカー座からなる 22 個の連鎖群を得た。用いた 1,233 個のマーカーの内、1,220 個のマーカー座が少なくとも雌雄どちらかの連鎖群において連鎖を示すことから、雌雄を統合した連鎖地図のマーカー連鎖率は 99% と算出された。

連鎖地図と概要配列の統合

連鎖群上のマーカー座の順序を基に scaffold を整序した結果、749 個の scaffold からなる約 337 Mb のゲノム配列を連鎖地図上に位置付けられた (Table 4A). また、その内、195 個の scaffold (約 225 Mb) については連鎖群上の方向性まで明らかになった. 各連鎖群において、方向性が明らかになった配列の割合に着目すると、最も高い割合を示したのは連鎖群 21 であり、89%の配列について連鎖群上の方向性が同定できた. 一方、最も低い割合を示したのは連鎖群 22 で、その割合は 37%であった.

トラフグのゲノム情報を比較ゲノム解析に利用する上で、用いる配列データは染色体上に偏り無く位置していることが望ましい. そこで、全ての連鎖群で 70%以上の配列について連鎖群上の方向性を明らかにすることを目指した. まず、各連鎖群の中で方向性が明らかになっていない scaffold をサイズの大きい順に 193 個選び出した. 次に、これら scaffold 内に存在する最低二つのマーカー座の連鎖関係を明らかにする為、既に設定されていた 288 個のマーカー座に加え 42 個のマーカー座を新たに作製し (Supplemental Table 9), 大規模家系の同胞個体 190 尾を用いた連鎖解析に付した. この解析で scaffold の方向性が決定できない場合には、さらに同家系の同胞個体 124 尾を加えて再解析した (Supplemental Table 10, 11). この結果、新たに 74 個の scaffold についてその連鎖群上の方向性を同定できた. さらに、Institute of Molecular and Cell Biology では、scaffold 間のギャップの一部を繋ぎ合わせることに成功し、連鎖地図上に貼付けられた 749 個の scaffold が 696 個の scaffold に統合された (Dr. Venkatesh, 私信). これにより、最終的に 696 個の scaffold の内、278 個の scaffold (約 282 Mb) について連鎖群上の方向性が明らかとなった (Table 4B).

以上のようにして高密度連鎖群地図上のマーカー座の位置を基に、696 個の scaffold からなる合計約 338 Mb のゲノム配列を整序したトラフグゲノム地図を作製した (Figure 7). この地図に含まれるゲノム配列は全概要配列の 86%にあたり、この内、染色体上の方向性が明らかになった配列の合計は、概要配列の 72%に相当した. 各連鎖群において、方向性が明らかになった配列の割合に着目すると、最も高い割合を示したのは連鎖群 9 であり、93%の配列について連鎖群上の方向性が同定できた. 一方、最も低い割合を示したのは連鎖群 11 で、その割合は 73%であった (Table 4B).

セントロメア領域の同定

トラフグのセントロメア近傍配列は 118 塩基を単位とした繰り返し配列から構成

されている（方法参照）。この配列をトラフグゲノム概要配列 v4.0 に対する BLAST 解析に付した結果、35 個の scaffold が得られた（Table 5）。この内、18 個の scaffold は 2-4 塩基を単位としたマイクロサテライト配列を含んでいた。これらのマイクロサテライト座をトラフグ連鎖地図上にマップした結果、12 個のマーカが 11 個のトラフグ連鎖群上に位置付けられた（Figure 6, 連鎖群 1, 4, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 上の赤で示した scaffold）。残りの 7 個のマーカは連鎖解析家系で多型性を示さず、連鎖群上に位置付けることはできなかった。父親と母親の両方で多型性を示す雌雄共通マーカの遺伝距離とゲノム地図上の物理距離の関係性を Figure 8 に示したところ、セントロメアマーカが位置付けられた 11 個の連鎖群の殆どで、雌雄共にマーカ間の組換えが抑制されているゲノム領域内にセントロメア領域が位置していることが明らかになった。また、雌連鎖群ではマーカ間の組換えが抑制されているゲノム領域は狭く、セントロメア領域からやや離れた領域ではマーカ間の組換え率は高くなっているのに対し、雄連鎖群ではマーカ間の組換えの抑制されているゲノム領域は、セントロメア領域を中心にして、広範に渡っていた。以上の結果から、トラフグにおいても既報のニジマスやゼブラフィッシュと同様に、セントロメア周辺領域では、精子形成時の減数分裂における組換えが著しく抑制されており、さらに、セントロメア領域に極めて近いゲノム領域では、卵形成時の減数分裂における組換えも比較的抑制されていることが明らかになった。

考察

トラフグ高密度連鎖地図

第 1 章の研究では、雌雄共通マーカーを用いて雄連鎖群と雌連鎖群を統合することで、トラフグのハプロイド染色体数に一致する 22 個の連鎖群を得た。しかし、雌雄の連鎖群の数は、それぞれ、24 個および 29 個であり、雌雄別に見た場合、連鎖地図としては不完全なものであった。本章の研究では、新たに多型マーカーを作製し、連鎖地図の高密度化を行った。この結果、雌雄の連鎖群で共にハプロイド染色体数に一致した連鎖地図が得られた (Figure 6)。さらに、マーカー連鎖率が 99%を示したことから、本連鎖地図は全ゲノム領域をほぼ網羅していると考えられた。これらのことから、本連鎖地図はトラフグの遺伝形質を解析するにあたり、極めて利便性の高い研究基盤になると言える。

ゲノム配列の位置情報

本研究では、連鎖地図上のマーカー順序を基に、ゲノム概要配列 v4.0 の 86%の配列 (約 338 Mb) を整序し、22 個のハプロイド染色体を配列レベルで再構築した (Figure 7, Table 4B)。ゲノム解読が報告された他のモデル魚類 (ミドリフグ、メダカ、トゲウオ (*Gasterosteus aculeatus*)、ゼブラフィッシュ) に目を向けると、メダカではゲノム概要配列の 90%が染色体上に位置付けられており、これはモデル魚類の中で最も高い割合である (Kasahara *et al.*, 2007)。次いで、ミドリフグにおいて概要配列の 64%が染色体上に位置付けられている (Jaillon *et al.*, 2004)。トゲウオとゼブラフィッシュについては、概要配列は公開されているものの、その具体的な数値は公開されていない。一方、トラフグでは、連鎖地図上のマーカーの高密度化とゲノムアセンブリの更新によって、ゲノム上に位置付けられた配列長は概要配列の 10% (第 1 章) から 86%へと大幅に増やすことができた。ゲノム解読が成された生物種において、そのゲノム解読情報の質を評価する点の 1 つとして、「全アセンブリの中で染色体上の位置情報が与えられた配列の割合」が挙げられる。この評価点から見れば、本研究によってトラフグのゲノム情報は、メダカに次いで魚類で 2 番目に高い質を持つゲノム情報になったと言える。

第 2 章における硬骨魚類間の比較ゲノム解析では、トラフグ連鎖群上に位置付けた各 scaffold の方向性が明らかになっていなかった為、魚種間でジーンオーダーを比較することはできなかった。また、比較に利用したトラフグのデータセットに含まれる配列は概要配列の 10%であった。これらのことから、第 2 章の比較ゲノム解析では硬骨魚類の染色体進化過程を十分に把握したとは言えない。しかし、本研究によって、

トラフグ概要配列の 86%の配列は比較ゲノム解析に有効なデータセットとなり、さらに、72%の配列については他魚種とのジーンオーダーの保存性を解析する為の有効なデータセットとなった。このデータセットを用いて、他魚種とゲノム構造の比較を行えば、硬骨魚類の染色体進化過程における染色体間の再編成事象と染色体内の再編成事象の両方を詳細に明らかにすることが可能であろう。

遺伝距離と物理距離

本研究では、高密度トラフグ連鎖地図と概要配列を統合することで、連鎖地図の遺伝距離と塩基配列の物理距離の関係も考察することが可能となった。トラフグの雄連鎖地図および雌連鎖地図における総遺伝距離は 1,202.8 cM および 2,189.8 cM であった。トラフグゲノム概要配列 v4.0 の総塩基数を全ゲノムの塩基数とみなすと、染色体の乗換え頻度 (cM/Mb) は、雌雄の地図で、それぞれ 3.1 および 5.6 となり、雌雄の地図の平均値を用いれば、4.3 となる。一方、既報のデータを基に他魚種の cM/Mb 値を算出すると、連鎖群数とハプロイド染色体数が一致し、全ゲノムに対する連鎖地図の網羅度が高いメダカおよびゼブラフィッシュでは、それぞれ 1.6 および 2.2 となった (Table 6, Naruse *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005; Ensembl) また、連鎖群数とハプロイド染色体数が一致していないものの、連鎖地図のマーカー連鎖率が 95%以上であることから、全ゲノムに対する連鎖地図の網羅度がある程度高いと見なせるトゲウオおよびティラピアで、それぞれ、1.9 および 1.2 となった (Table 6, Peichel *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Ensembl)。従って、トラフグにおける cM/Mb 値は他の魚種のそれに比べ 2.0-3.6 倍高いと言える。また、哺乳類における cM/Mb 値はヒト、アカゲザル (*Macaca mulatta*)、マウスおよびウマ (*Equus caballus*) で、それぞれ、1.1, 0.7, 0.4 および 0.9 と報告されている (Wilfert *et al.*, 2007)。これらのことから、硬骨魚類における cM/Mb 値は哺乳類のそれに比べ 1.1 - 10.8 倍高いと言える。

cM/Mb 値の差をもたらす要因は何だろうか？ヒトやマウスをはじめとした哺乳類では、cM/Mb 値とゲノムサイズの間には負の相関関係が認められている (Jenen-Seaman *et al.*, 2004)。つまり、染色体の長さが短い程、cM/Mb 値は高くなる。この傾向を説明する現象として、必須キアズマの形成が挙げられる。染色体の乗換えによって生じるキアズマの頻度には最小値があり、どんなに短い染色体でも、最低 1 個のキアズマを生じるため (必須キアズマ, Henderson, 1963)、短い染色体では、Mb あたりの頻度として見ると、乗換え頻度は高くなる傾向がある (Rodionov, 1996; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004)。実際、ヒトの最も短い染色体である 22 番染色体における cM/Mb 値は、最も長い染色体である 1 番染色体のそれに比べ高い (Groenen *et al.*, 2009)。ゲノムサイズの小さいトラフグではこの現象に

より、他の生物に比べ、cM/Mb 値が高くなっている可能性が考えられる。一方、cM/Mb 値と GC 含有率の間には正の相関性が認められることが、哺乳類やニワトリ (*Gallus gallus*)、ミツバチにおいて報告されている (Myers *et al.*, 2005; Shifman *et al.*, 2006; Beye *et al.*, 2006; Groenen *et al.*, 2009)。GC 含有率の多い領域が染色体の乗換えを増加させる具体的な機構は未だ明らかになっていないが、トラフグの cM/Mb 値が、他魚種比べ、2 倍ほど高い値を示した 1 つの説明として、この GC 含有率が考えられる。トラフグゲノムの GC 含有率はヒトゲノムのそれに比べ高いが、メダカゲノムの GC 含有率はヒトゲノムのそれとほぼ同等であることが報告されている (Aparicio *et al.*, 2002; Kasahara *et al.*, 2007)。従って、メダカに比べ GC 含有率の高いトラフグでは cM/Mb 値もメダカに比べ高いという説明が成り立つ。さらに、染色体の乗換え頻度の種間差は、遺伝的要因や環境要因にも影響を受けることも知られており (鵜飼, 2000b)、トラフグにおいても、他魚とは異なる何らかの遺伝的要因や環境要因によって、染色体の乗換え頻度が増加しているとも考えられるが、その原因は不明である。トラフグは脊椎動物で最小に近いゲノムサイズを進化の過程で得ることになったが、ある程度の乗換え頻度がその種の生存にとって必須であった為、高い cM/Mb を示す形質が進化したのではないだろうか。

セントロメア近傍領域における組換え率

トラフグ連鎖地図上のセントロメア領域を特定した 11 個の連鎖群の内、その殆どで、セントロメア領域上で雌雄共にマーカー間の組換えが抑制されていた (Figure 8)。一般に、セントロメア近傍領域はヘテロクロマチンに富み、この領域では染色体の乗換え頻度が少ないことが知られており (鵜飼, 2000b)、トラフグでも同様の傾向にあると考えられた。本研究でセントロメア領域を位置付けることができなかった 12 個の連鎖群においても、雌雄の連鎖群上のマーカー間で組換えの抑制されている領域にセントロメア領域が存在している可能性が高いと考えられた。

第 3 章
Figure and Table

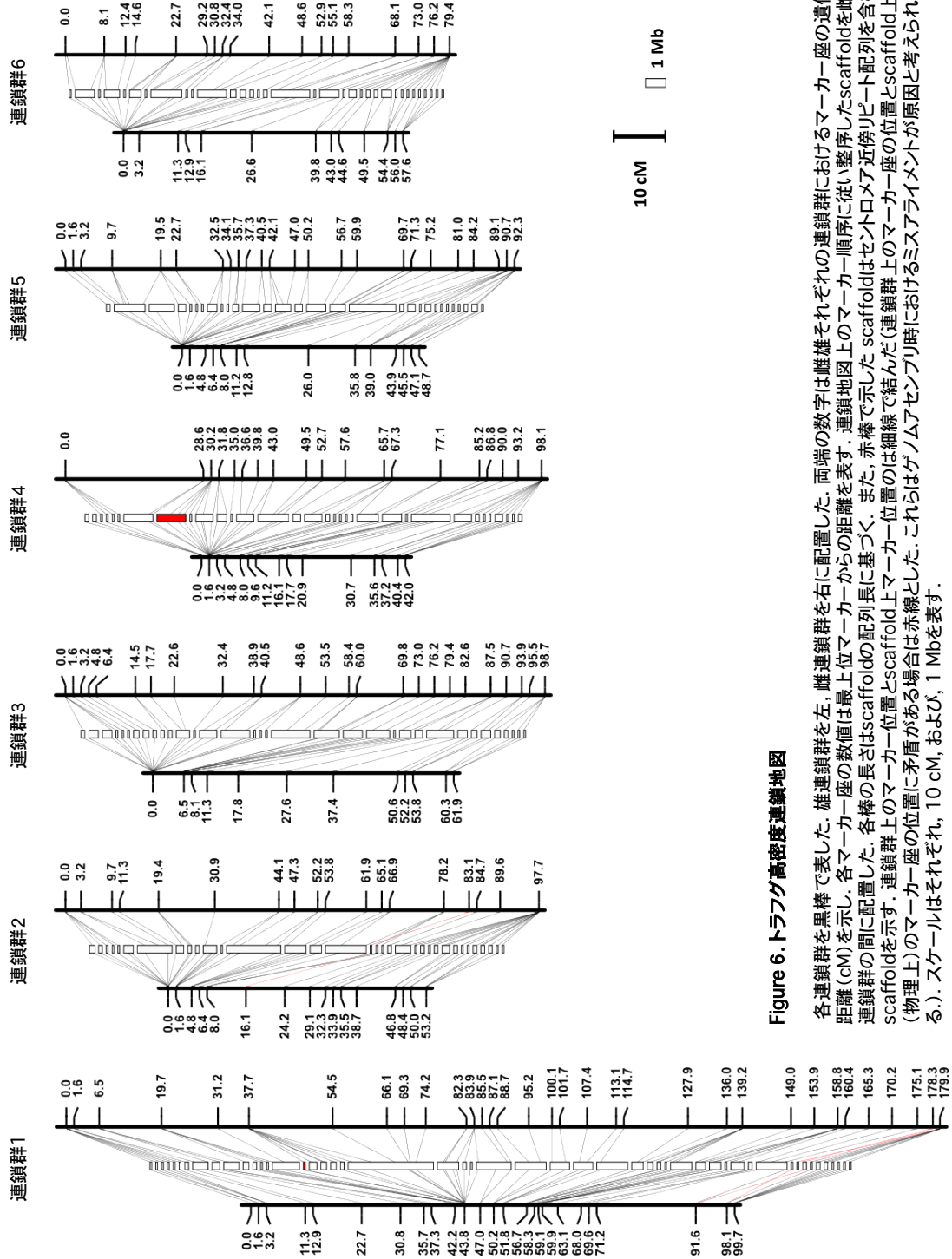


Figure 6. トラフグ高密度連鎖地図

各連鎖群を黒棒で表した。雄連鎖群を左、雌連鎖群を右に配置した。両端の数字は雌雄それぞれその連鎖群におけるマーカー座の遺伝距離 (cM) を示し、各マーカー座の数字は最上位マーカーからの距離を表す。連鎖地図上のマーカー順序に従い整序したscaffoldを雌雄連鎖群の間に配置した。各棒の長さはscaffoldの配列長に基づく。また、赤棒で示した scaffoldはセントロメア近傍リピート配列を含む scaffoldを示す。連鎖群上のマーカー位置とscaffold上マーカー位置の細線で結んだ連鎖群上のマーカー座の位置とscaffold上 (物理上) のマーカー座の位置に矛盾がある場合は赤線とした。これらはゲノムアセンブリ時におけるミスアライメントが原因と考えられる。スケールはそれぞれ、10 cM、および、1 Mbを表す。

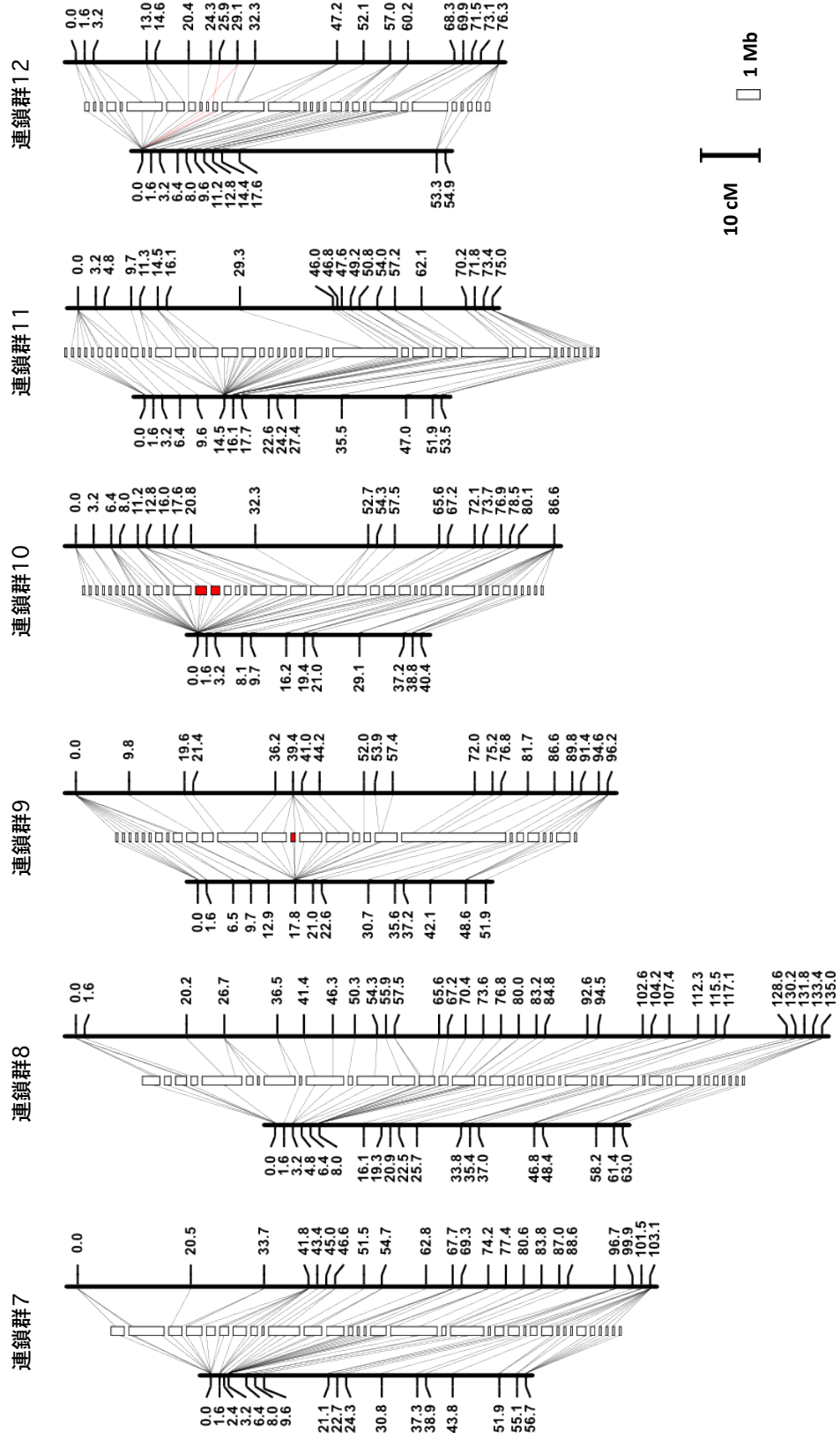


Figure 6. 続き

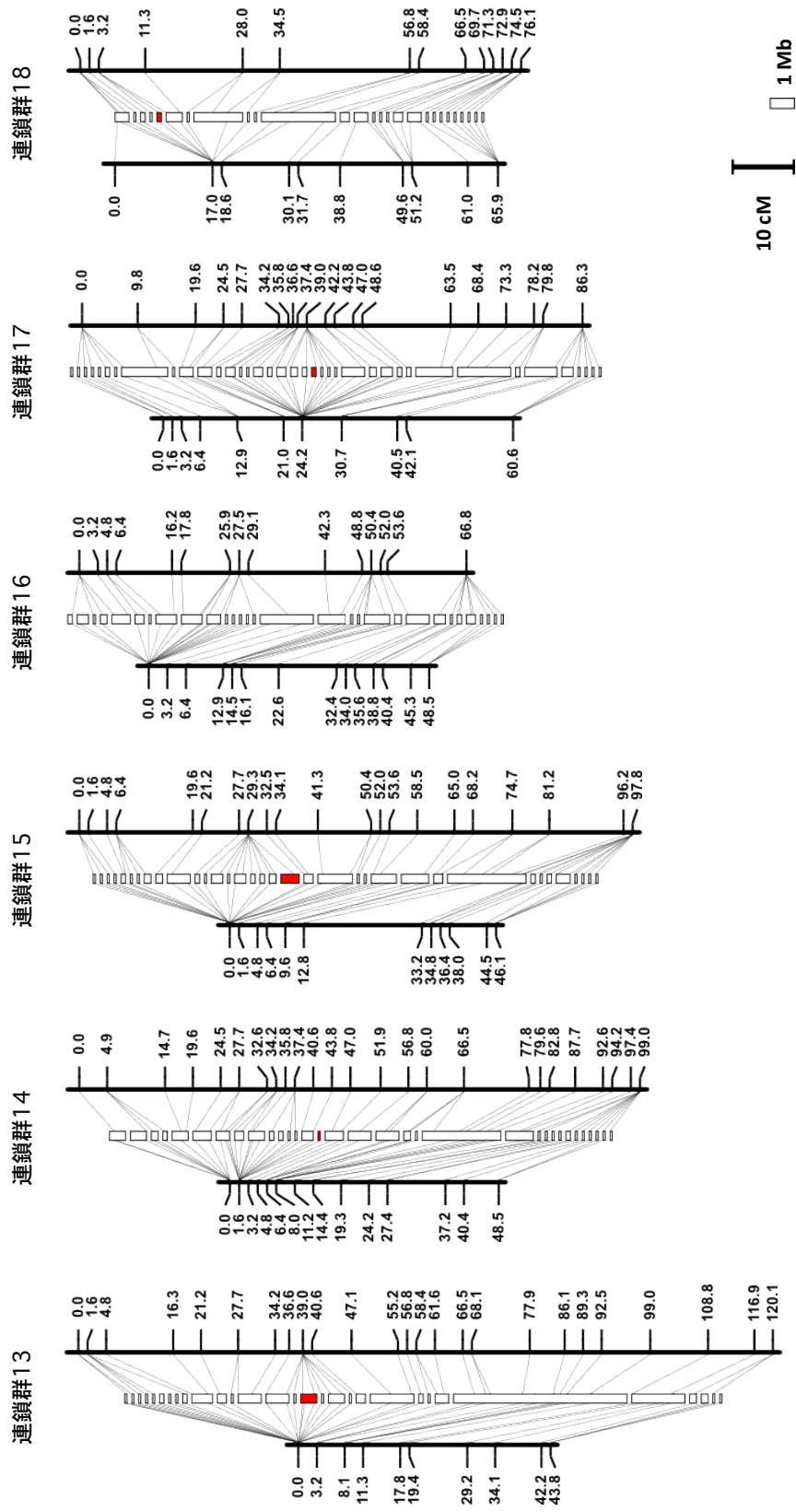


Figure 6. 続き

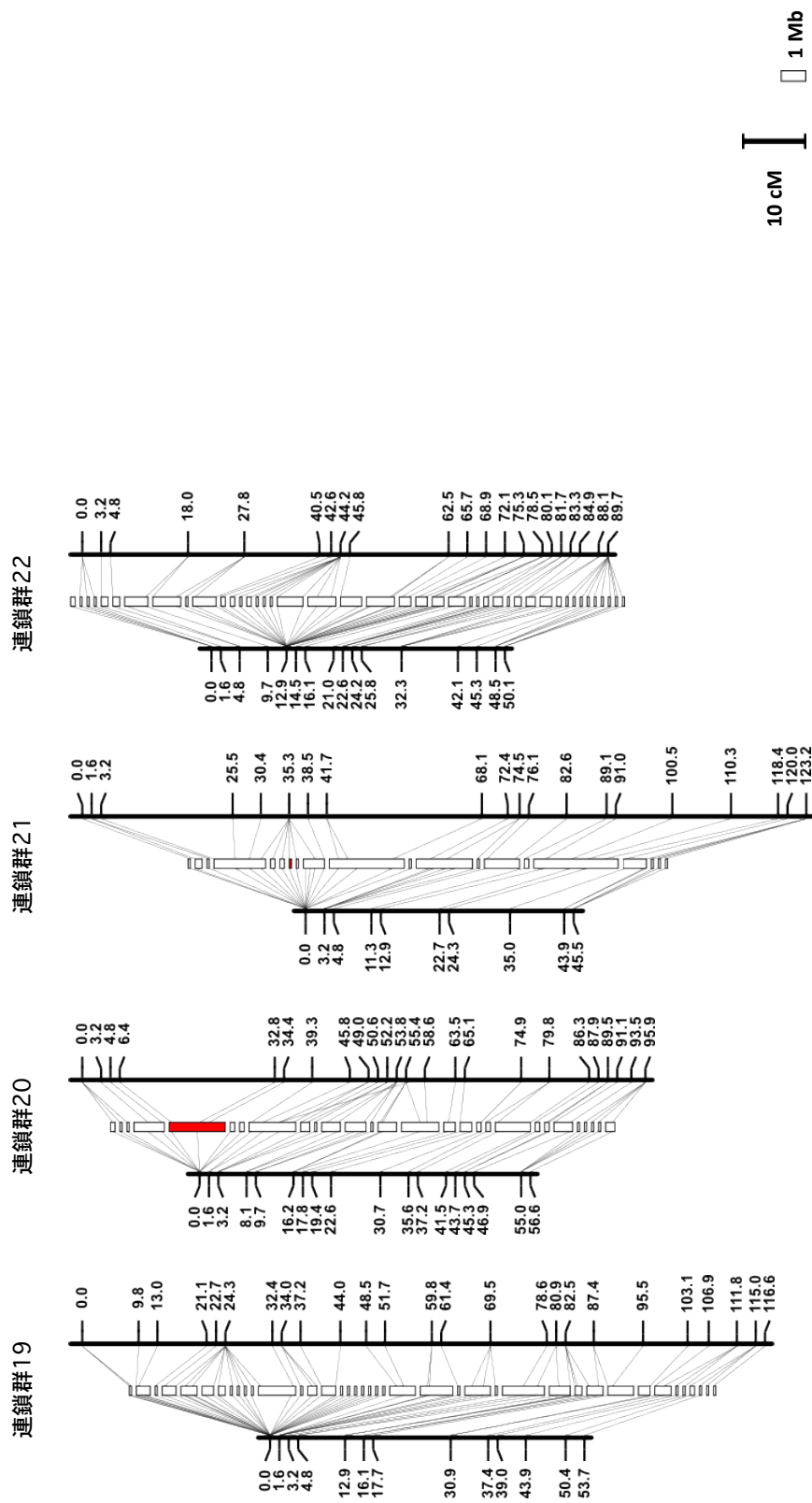


Figure 6. 続き

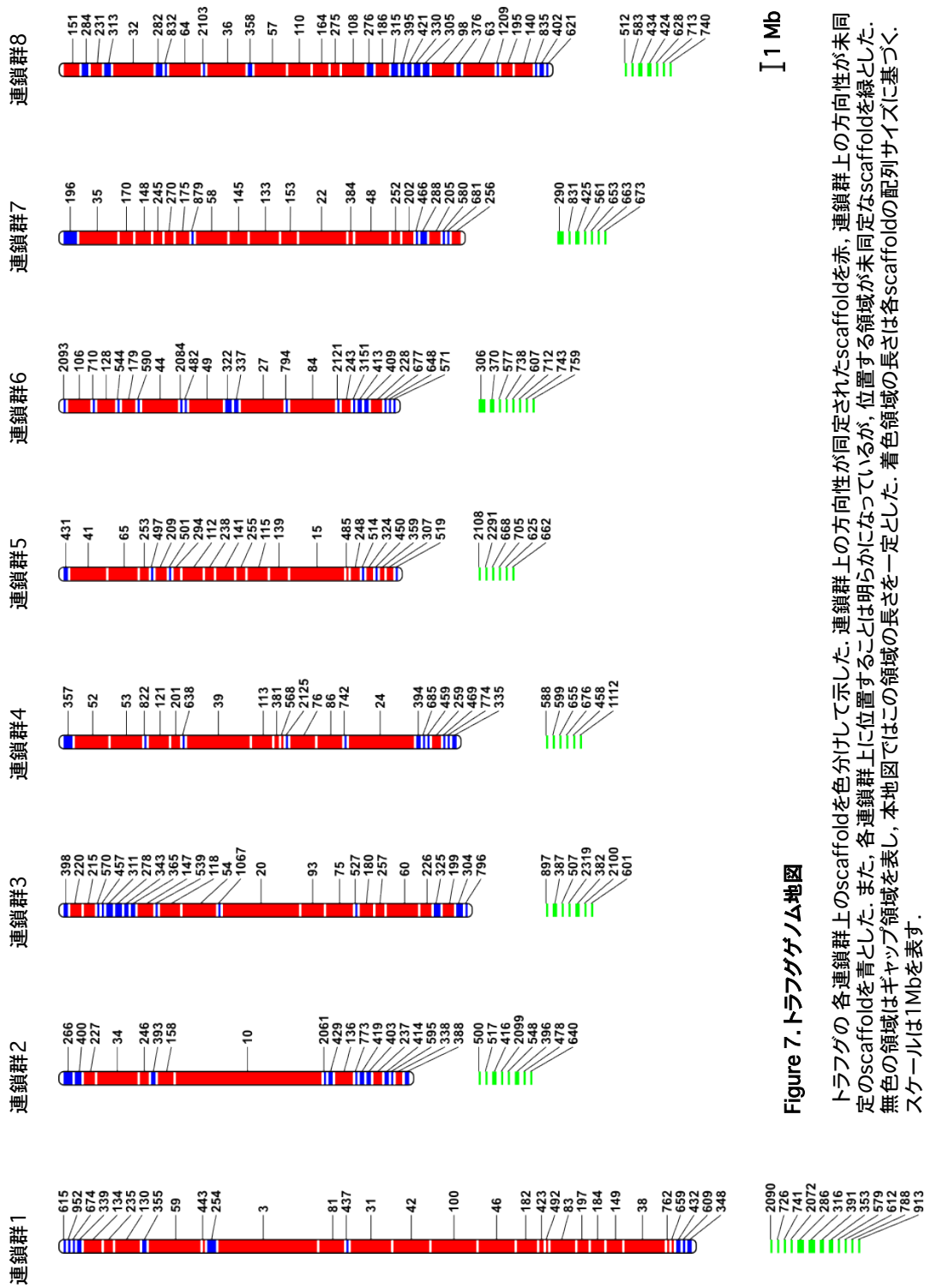


Figure 7. トラファグゲナム地図

トラファグの各連鎖群上のscaffoldを色分けして示した。連鎖群上の方向性が同定されたscaffoldを青とした。また、各連鎖群上に位置することは明らかになっているが、位置する領域が未同定なscaffoldを緑とした。無色の領域はギャップ領域を表し、本地図ではこの領域の長さを一定とした。着色領域の長さは各scaffoldの配列サイズに基づく。スケールは1Mbを表す。

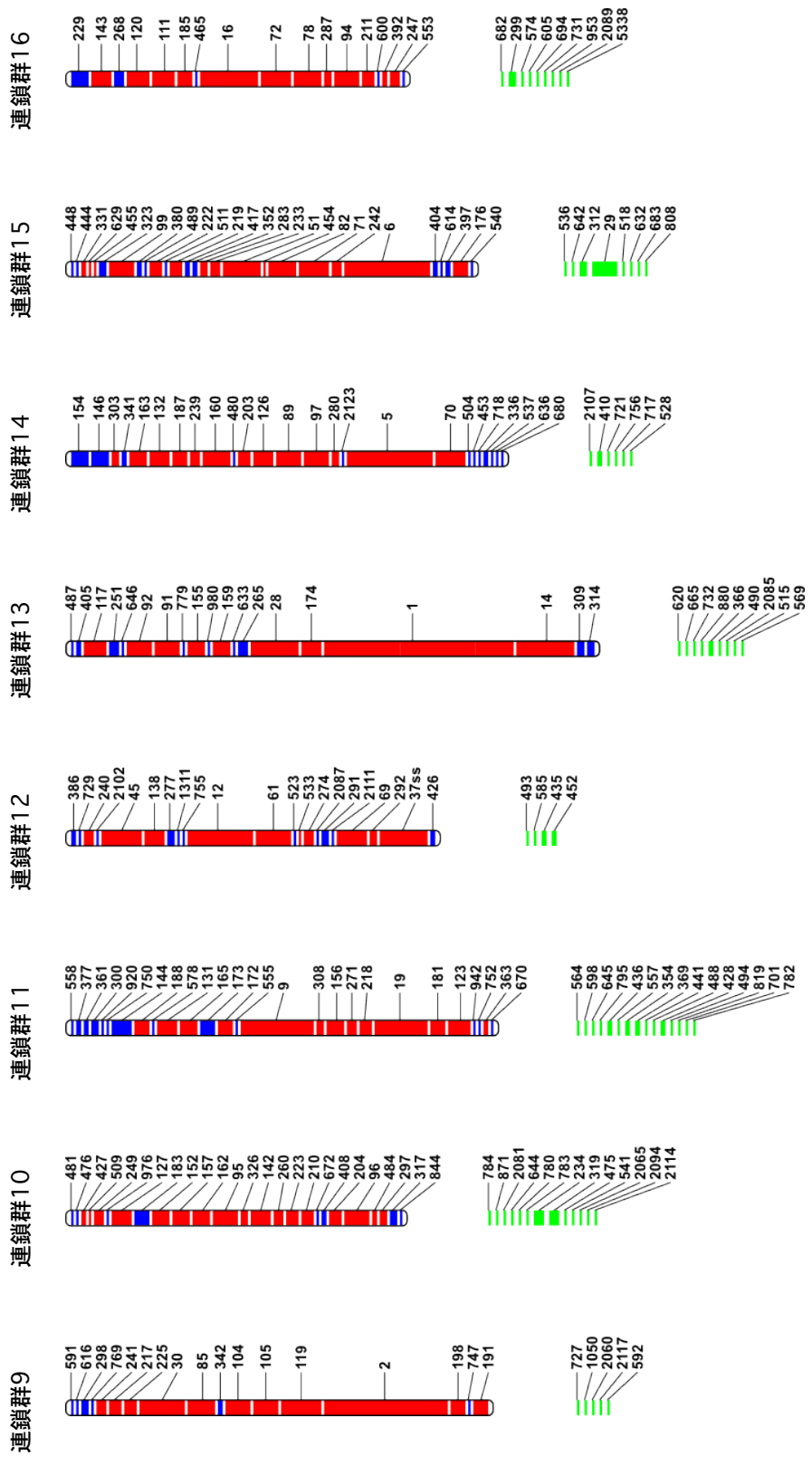
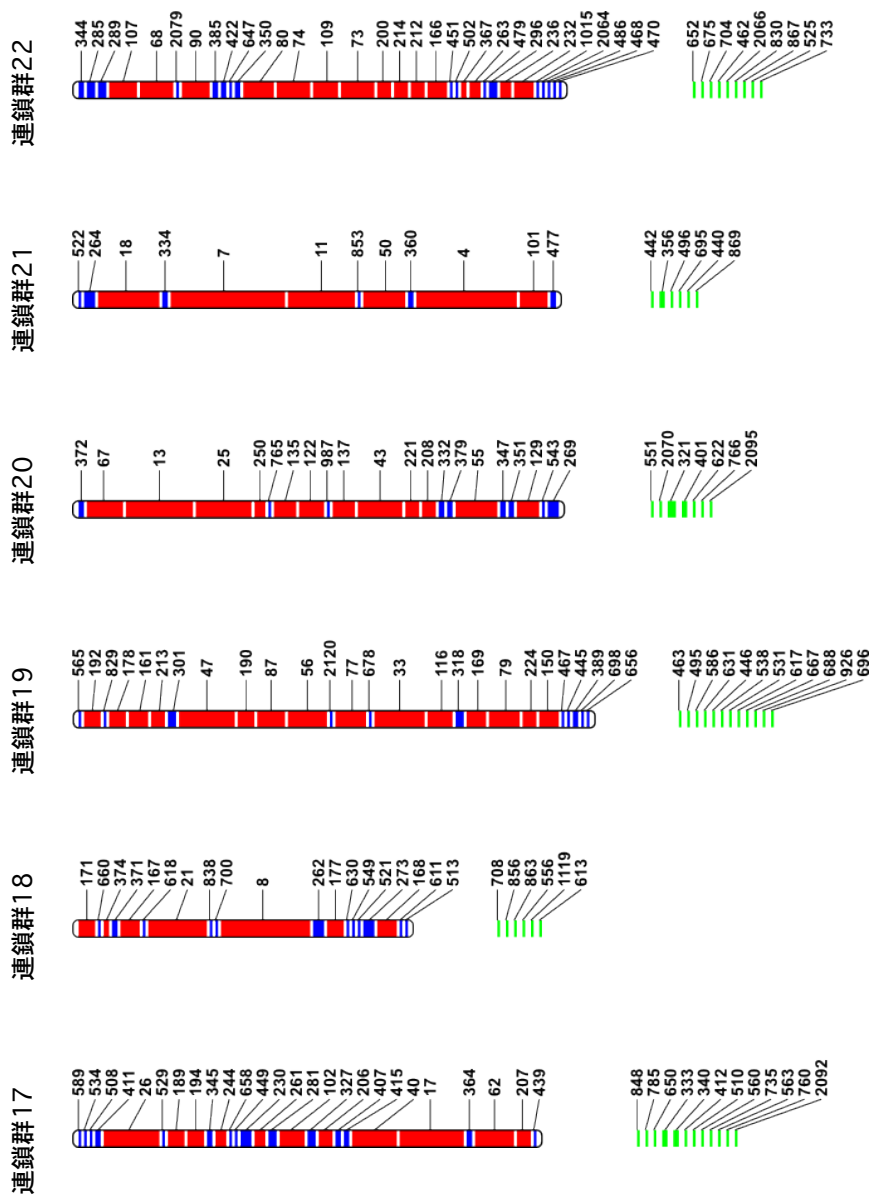


Figure 7. 続き



I 1 Mb

Figure 7. 続き

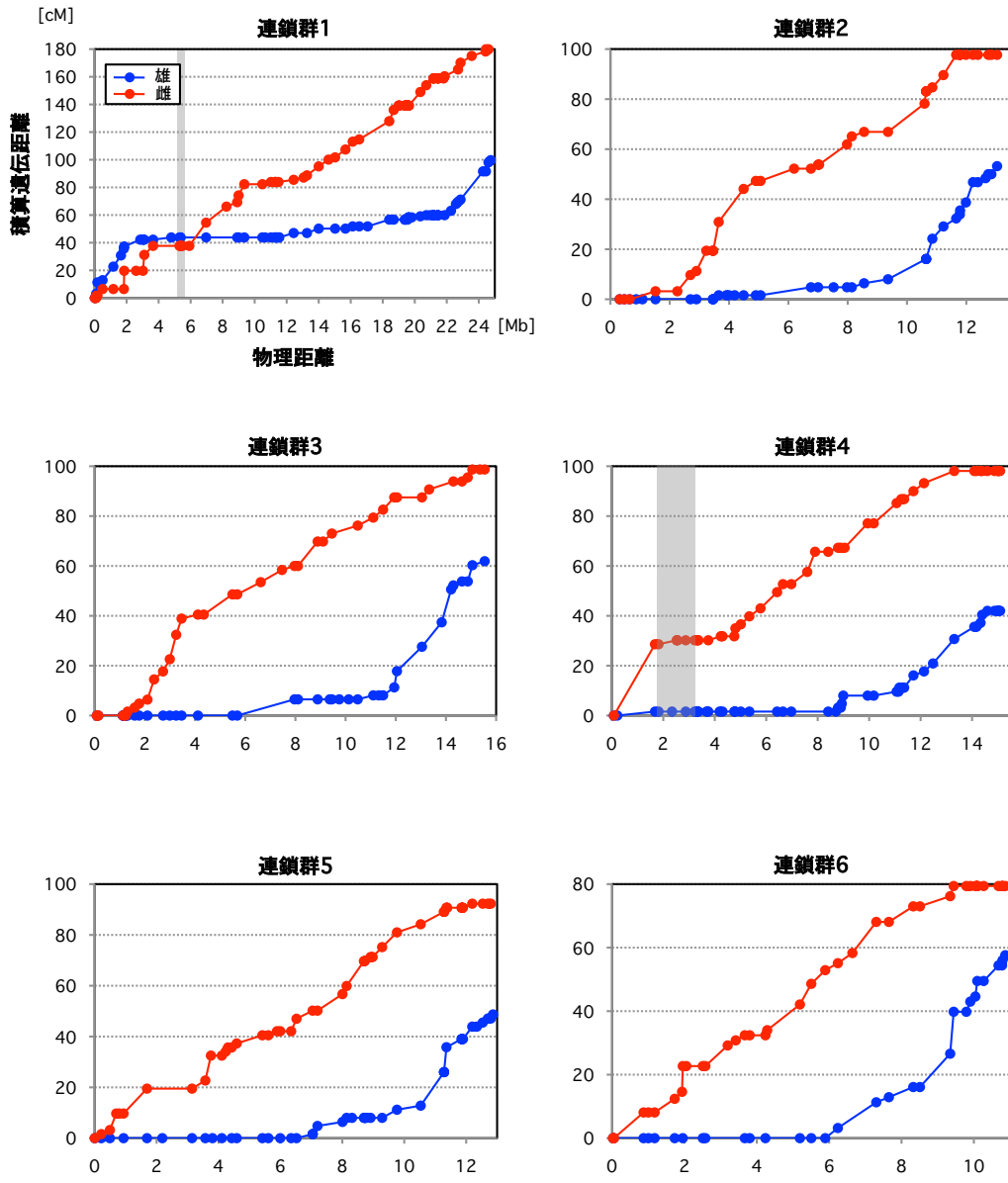


Figure 8. 多型マーカーの物理距離と遺伝距離

縦軸は雌雄の連鎖群におけるマーカー座の積算遺伝距離を、横軸はゲノム地図におけるマーカー座の物理距離を表す。雄連鎖群上のマーカー座を青、雌連鎖群上のマーカー座を赤でプロットした。灰色で示した領域は連鎖地図より予測されるセントロメア領域を示す。

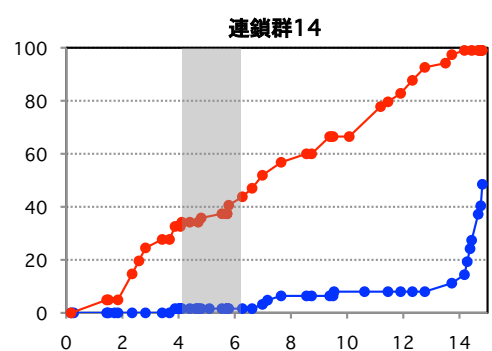
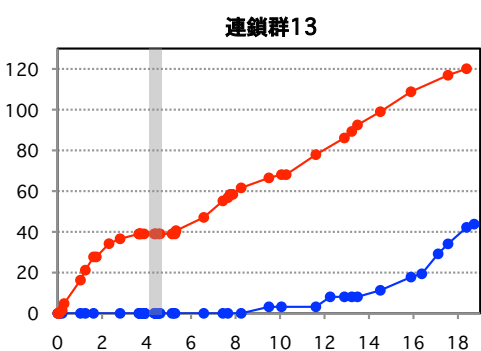
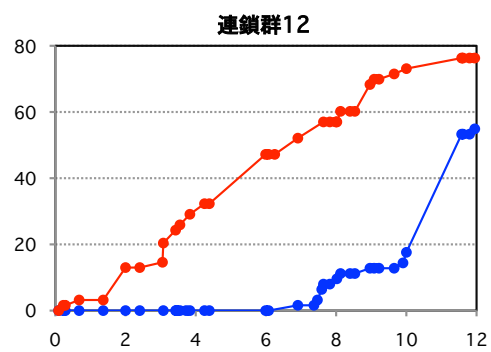
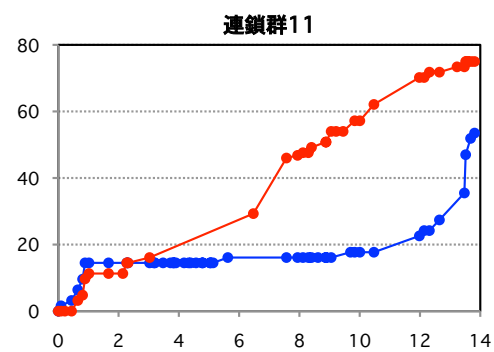
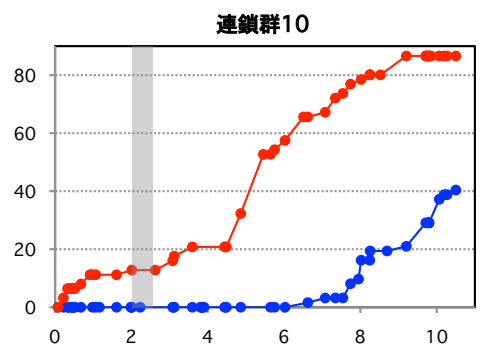
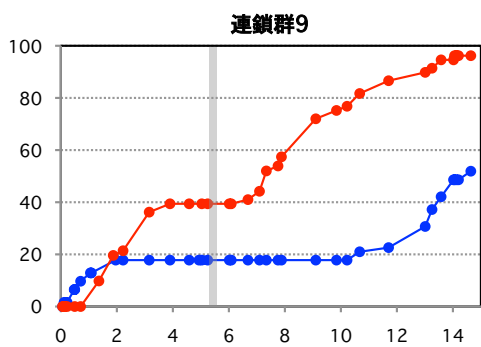
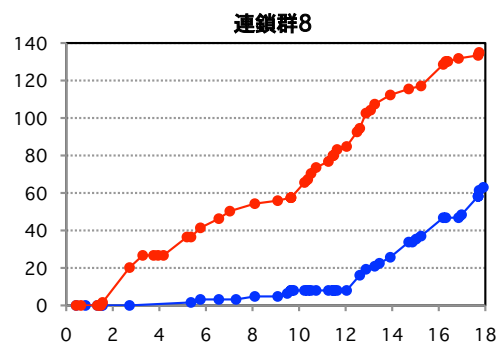
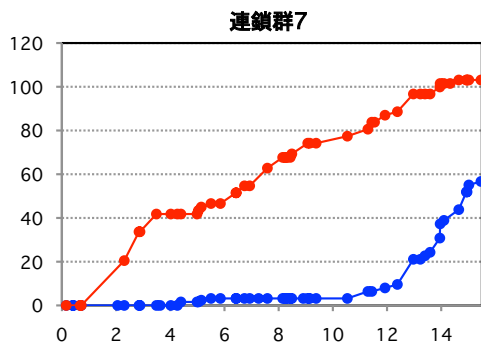


Figure 8. 続き

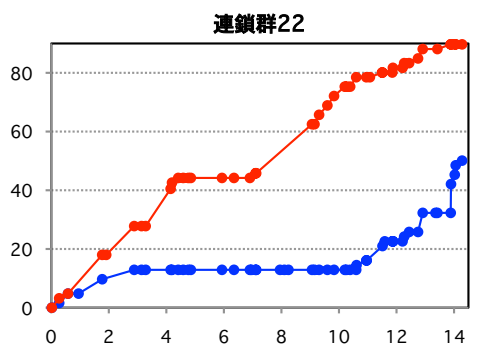
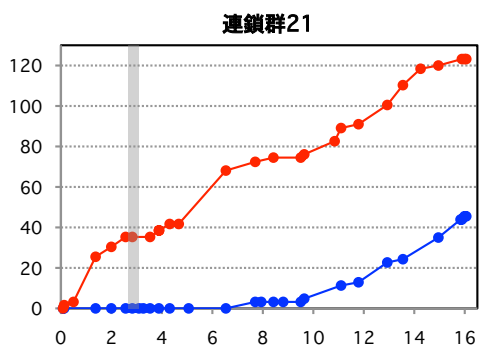
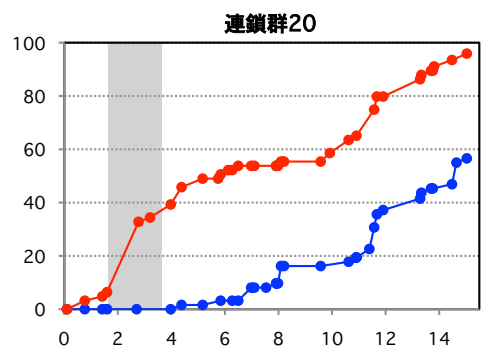
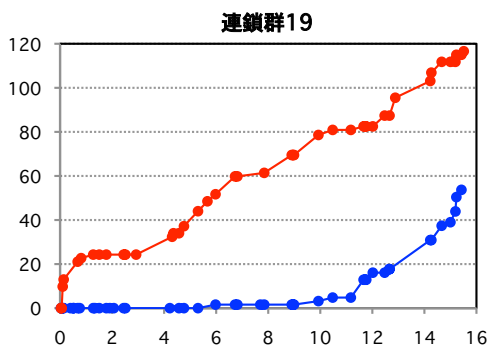
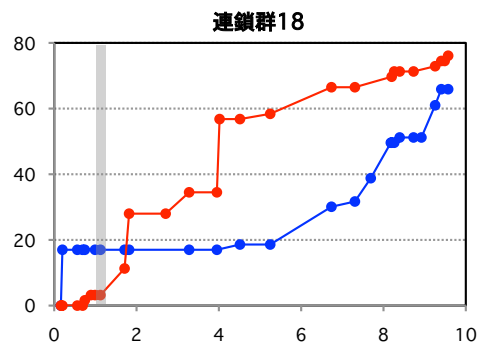
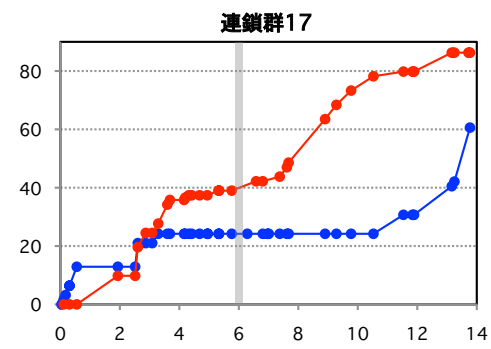
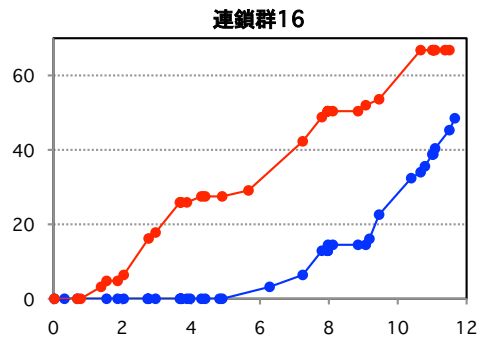
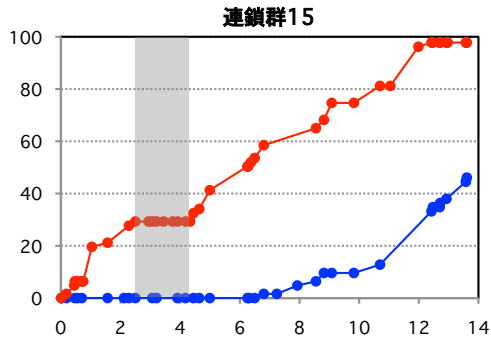


Figure 8. 続き

Table 3. 各連鎖群におけるマイクロサテライトマーカー数と遺伝距離

連鎖群	マーカー数	雄連鎖群		雌連鎖群	
		マーカー数	合計遺伝距離(cM)	マーカー数	合計遺伝距離(cM)
1	87	72	99.7	74	179.9
2	54	46	53.2	46	97.7
3	50	42	61.9	41	98.7
4	58	49	42.0	47	98.1
5	56	46	48.7	48	92.3
6	47	40	57.6	42	79.4
7	61	58	56.7	54	103.1
8	59	47	63.0	47	135.0
9	44	41	51.9	38	96.2
10	68	58	40.4	55	86.6
11	72	64	53.5	43	75.0
12	44	38	54.9	38	76.3
13	52	45	43.8	42	120.1
14	56	51	48.5	45	99.0
15	54	40	46.1	47	97.8
16	49	45	48.5	36	66.8
17	56	50	60.6	49	86.3
18	35	30	65.9	31	76.1
19	66	58	53.7	49	116.6
20	47	41	56.6	40	95.9
21	39	34	45.5	32	123.2
22	66	62	50.1	55	89.7
合計	1,220	1,057	1,202.8	1,000	2,189.8

Table 4. トラフグ高密度連鎖地図に貼付けられたscaffoldのサイズ

A. 大規模連鎖解析およびscaffold統合前

連鎖群	scaffoldサイズの合計						合計配列サイズ (bp)
	連鎖群上の方向性が同定済み		連鎖群上の方向性が不明		連鎖群内における位置が不明		
	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	
1	19,909,122	75.6	2,140,755	8.1	4,280,781	16.3	26,330,658
2	9,432,749	66.4	1,855,804	13.1	2,923,080	20.6	14,211,633
3	10,678,483	66.6	2,886,226	18.0	2,466,437	15.4	16,031,146
4	8,487,841	54.6	1,839,519	11.8	5,222,252	33.6	15,549,612
5	8,075,078	61.3	1,933,348	14.7	3,167,362	24.0	13,175,788
6	7,534,349	64.0	1,198,524	10.2	3,047,584	25.9	11,780,457
7	9,606,962	59.0	1,376,025	8.5	5,300,213	32.6	16,283,200
8	13,493,774	72.5	1,855,867	10.0	3,269,169	17.6	18,618,810
9	9,921,658	66.3	1,924,886	12.9	3,113,774	20.8	14,960,318
10	6,761,225	56.1	1,460,284	12.1	3,833,110	31.8	12,054,619
11	8,471,794	55.1	1,590,666	10.3	5,313,858	34.6	15,376,318
12	9,343,478	74.2	966,888	7.7	2,279,139	18.1	12,589,505
13	15,125,759	78.3	1,518,385	7.9	2,661,492	13.8	19,305,636
14	9,775,499	64.1	2,852,028	18.7	2,620,293	17.2	15,247,820
15	8,410,555	59.7	2,653,161	18.8	3,025,188	21.5	14,088,904
16	9,887,109	79.4	70,921	0.6	2,499,878	20.1	12,457,908
17	10,134,991	67.1	2,494,231	16.5	2,467,280	16.3	15,096,502
18	7,828,496	78.3	948,111	9.5	1,226,551	12.3	10,003,158
19	9,544,030	57.8	2,807,427	17.0	4,159,737	25.2	16,511,194
20	12,130,093	77.0	2,636,379	16.7	993,277	6.3	15,759,749
21	14,904,255	88.8	354,134	2.1	1,524,800	9.1	16,783,189
22	5,456,333	36.8	4,918,575	33.1	4,468,558	30.1	14,843,466
合計	224,913,633	66.7	42,282,144	12.5	69,863,813	20.7	337,059,590

B. 大規模連鎖解析およびscaffold統合後

連鎖群	scaffoldサイズの合計						合計配列サイズ (bp)
	連鎖群上の方向性が同定済み		連鎖群上の方向性が不明		連鎖群内における位置が不明		
	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	配列サイズ(bp)	割合(%) ^a	
1	23,259,404	88.4	1,644,389	6.3	1,398,482	5.3	26,302,275
2	11,406,866	80.7	1,872,887	13.2	855,736	6.1	14,135,489
3	13,092,473	81.7	2,298,442	14.3	636,081	4.0	16,026,996
4	13,818,288	88.8	1,491,415	9.6	248,175	1.6	15,557,878
5	12,183,748	92.5	724,627	5.5	261,917	2.0	13,170,292
6	9,411,599	80.2	1,499,553	12.8	827,854	7.1	11,739,006
7	14,303,172	88.1	1,170,188	7.2	761,044	4.7	16,234,404
8	14,689,462	78.9	3,287,233	17.7	642,115	3.4	18,618,810
9	13,921,860	93.3	777,669	5.2	215,374	1.4	14,914,903
10	9,125,214	75.9	1,412,065	11.7	1,485,567	12.4	12,022,846
11	11,238,226	73.1	2,578,742	16.8	1,559,350	10.1	15,376,318
12	10,660,899	85.5	1,323,755	10.6	488,902	3.9	12,473,556
13	16,951,613	86.9	1,825,718	9.4	728,736	3.7	19,506,067
14	12,327,306	80.6	2,576,479	16.9	384,657	2.5	15,288,442
15	11,516,131	76.0	1,893,182	12.5	1,749,687	11.5	15,159,000
16	10,309,660	83.6	1,350,383	10.9	673,952	5.5	12,333,995
17	11,183,467	74.1	2,976,705	19.7	936,330	6.2	15,096,502
18	8,052,772	81.0	1,569,602	15.8	313,248	3.2	9,935,622
19	14,184,402	86.1	1,334,228	8.1	949,420	5.8	16,468,050
20	13,411,191	85.1	1,647,142	10.5	701,416	4.5	15,759,749
21	14,900,332	88.8	1,164,932	6.9	710,807	4.2	16,776,071
22	11,608,917	78.3	2,671,212	18.0	538,016	3.6	14,818,145
合計	281,557,002	83.4	39,495,911	11.7	15,652,078	4.6	337,714,416

^a貼付けられたscaffoldの合計配列サイズに対する割合。

Table 5. セントロメア配列を含むscaffold, マイクロサテライト配列の有無, マーカー名および連鎖群上の位置

scaffold ^a	マイクロサテライト配列の有無	マーカー	連鎖群
13	有り	f1213	20
29	有り	f231	15
53	有り	f1217	4
155	有り	f248	13
183	有り	f1208	10
234	有り	f1218	10
342	有り	f1202	9
371	有り	f1220	18
378	有り	f1203	多型性無し
410	有り	f1209	14
412	有り	f1210	17
443	有り	f1221	1
496	有り	f1207	21
635	有り	f1260	多型性無し
2229	有り	f1261	多型性無し
2938	有り	f1206	多型性無し
3307	無し	-	-
3827	無し	-	-
4196	無し	-	-
4416	有り	f1262	多型性無し
5092	無し	-	-
5155	無し	-	-
5230	有り	f1263	多型性無し
6054	無し	-	-
6748	無し	-	-
7476	無し	-	-
7679	無し	-	-
8015	無し	-	-
8676	無し	-	-
9341	無し	-	-
11945	無し	-	-
11964	無し	-	-
12319	無し	-	-
12358	無し	-	-
13650	無し	-	-

^ascaffold番号はトラフグゲノムアセンブリ v4.0に基づく.

Table 6. 各生物の全ゲノムサイズと連鎖地図の総遺伝距離

生物種	全ゲノムサイズ ^b (Mb)	総遺伝距離 (cM)	cM/Mb	連鎖地図の引用論文
トラフグ	393	1,696	4.3	本研究
トゲウオ	462	886	1.9	Peichel <i>et al.</i> , 2001
メダカ	869	1,402	1.6	Naruse <i>et al.</i> , 2004
ティラピア	1,100 ^c	1,311	1.2	Lee <i>et al.</i> , 2005
ゼブラフィッシュ	1,440	3,192	2.2	Woods <i>et al.</i> , 2005
ウマ ^a	3,087	2,772	0.9	Wilfert <i>et al.</i> , 2007
マウス ^a	3,179	1,361	0.4	Wilfert <i>et al.</i> , 2007
アカゲザル ^a	3,077	2,408	0.8	Wilfert <i>et al.</i> , 2007
ヒト ^a	3,191	3,615	1.1	Wilfert <i>et al.</i> , 2007

^a哺乳類のデータはWilfert *et al.* (2007) のデータを用いた.

^b各生物種の全ゲノムサイズ情報はEnsembl (<http://www.ensembl.org/>) のGolden Path Lengthに基づく.

^cティラピアのゲノムサイズはLee *et al.* (2005) に基づく.

第4章

硬骨魚類における染色体進化過程の推定

これまでのゲノム構造の比較研究では、4億5,000万年以前に存在したとされる脊椎動物の共通祖先や硬骨魚類の共通祖先といった太古の生物のゲノム構造を推定することに焦点の一つが置かれていた (Jaillon *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005; Bourque *et al.*, 2005; Nakatani *et al.*, 2007)。一方、近年のゲノム構造の比較研究では、個々の生物種が生まれてきた歴史を理解する為、比較的最近に分岐した生物種間でゲノム構造を比較し、それぞれの系統で生じたゲノム再編成を解明しようという動きも盛んになりつつある。例えば、Bourque *et al.* (2004) は、約8,700万年前 (Springer *et al.*, 2003) に分岐したとされるヒトとマウスのゲノム構造を比較し、両種間で多くの染色体間の再編成が生じていることを明らかにしている。また、最古の分岐年代が約6,300万年前であるショウジョウバエ属12種のゲノムを解析した結果、ヒト・マウスの場合とは対照的に、ショウジョウバエ種間のゲノム構造の間に認められた染色体間の再編成事象はごくわずかであることが明らかとなった (*Drosophila* 12 Genomes Consortium 2007; Tamura *et al.*, 2004)。つまり、類似した分岐年代を持つ生物種間でも染色体進化のパターンはタクサにより大きく異なる可能性が示されたのである。これまでに硬骨魚類でも詳細な比較ゲノム解析が行われているが、その中で最も近縁な関係とされる魚種であるミドリフグとメダカであっても、その分岐年代は約18,400 - 19,900万年前と推定されており (Yamanoue *et al.*, 2006)、哺乳類や無脊椎動物のように分岐年代の浅い魚種間での比較ゲノム解析はこれまで行われていなかった。

本章の研究では、3章で得たトラフグゲノム配列の染色体上の位置情報を用いて、トラフグとミドリフグのゲノム構造を比較した。さらに、メダカやゼブラフィッシュのデータを加えて、魚類の染色体進化過程を詳細に解析した。トラフグとミドリフグの分岐年代は、分子時計を基にした研究から、約7,300 - 9,600万年前と推定されており (Yamanoue *et al.*, 2006)、硬骨魚類系統の内部で比較的最近に生じたゲノム再編成を明らかにできると期待される。また、両フグの分岐年代はヒトとマウスの分岐年代 (約8,700万年前) と近似しており、硬骨魚類系統と哺乳類系統で染色体進化のパターンを比較する上で、良いモデルとなると考えた。

第1節

染色体間のゲノム再編成

第2章の研究では、トラフグと他魚種のゲノム構造を比較し、哺乳類間に認められる染色体間の再編成事象に比べ硬骨魚類間のそれが少ないことを明らかにした。しかし、この比較解析に利用したデータセットはトラフグゲノム概要配列の10%程度の配列から得たものであり、硬骨魚類の染色体進化を正確に把握するにはデータ量が不足していた。第3章の研究では、トラフグ連鎖地図の高密度化を行い、連鎖群上のマーカー順序を基に、概要配列の86%を染色体レベルで再構築し、トラフグゲノム地図を作製したことにより、トラフグ遺伝子の大部分について、その連鎖群上の位置を明らかにした。

本節では、第3章で明らかになったトラフグ遺伝子の連鎖群上の位置情報をミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのそれと比較し、硬骨魚類の染色体進化において生じた染色体間の再編成事象を詳細に理解することを目指した。

トラフグ・ミドリフグ間オーソログの同定

Ensembl からトラフグ・ミドリフグ間で相同関係にある遺伝子セットを取得し、このデータセットから、トラフグとミドリフグの双方で 1 : 1 関係にある遺伝子対のみを選び出し、これらの遺伝子をトラフグとミドリフグのオーソログとした。なお、トラフグとミドリフグのゲノムデータセットは、それぞれ FUGU 4.0 (Ensembl version 48.4h), TETRAODON 7 (Ensembl version 48.1j) である。

トラフグ・メダカ間オーソログの同定

上記と同様に、Ensembl からトラフグ・メダカ間で相同関係にある遺伝子セットを取得し、このデータセットから、トラフグとメダカの双方で 1 : 1 関係にある遺伝子対のみを選び出し、これらの遺伝子をトラフグとメダカのオーソログとした。なお、トラフグとメダカのゲノムデータセットは、それぞれ FUGU 4.0 (Ensembl version 48.4h), HdrR (Ensembl version 48.1d) である。

トラフグ・ゼブラフィッシュ間におけるオーソログの同定

ゼブラフィッシュとミドリフグでオーソログ関係にある遺伝子が Woods *et al.* (2005) において報告されている。そこで、これらのオーソログとトラフグ・ミドリフグ間オーソログを、ミドリフグ遺伝子をもとに統合し、間接的にトラフグとゼブラフィッシュのオーソログを得た。

シンテニー解析

上記の解析で得たオーソログにおいてトラフグゲノム上の位置を決定する為、前章で作製したトラフグゲノム地図上の scaffold 内に存在するオーソログのみを選び出し、その連鎖群上の位置を決定した。その後、各魚種におけるオーソログと染色体上位置の関係を Oxford grid 上に表し、それぞれの魚種間で認められるシンテニーの保存性を調べた。

トラフグ・ミドリフグ間の比較ゲノム解析

22,421 個のトラフグ予測遺伝子と 28,653 個のミドリフグ予測遺伝子の内、両フグ間で 1:1 関係にある 15,068 個のオーソログを Ensembl より得た。この内、両魚種で染色体上の位置が明らかなオーソログは 10,482 個であった (Figure 9A, Supplemental Table 12)。第 2 章での比較解析では、両フグ間で 15 組の染色体対が 1:1 関係にあることを示したが、比較に使用したオーソログの数を増やした結果、両フグ間では合計 18 組の染色体対が 1:1 関係にあることが明らかになった (Tru1/Tni2, Tru2/Tni10, Tru3/Tni9, Tru4/Tni17, Tru6/Tni4, Tru7/Tni8, Tru9/Tni13, Tru10/Tni6, Tru11/Tni16, Tru12/Tni21, Tru13/Tni5, Tru15/Tni7, Tru16/Tni14, Tru17/Tni18, Tru18/Tni19, Tru19/Tni11, Tru21/Tni12, Tru22/Tni15)。一方、Tru5 と Tru8 上のトラフグ遺伝子にオーソログなミドリフグ遺伝子のほとんどが Tni3 上に位置しており、これらの染色体では両フグ間で 2:1 の関係が認められた。同様の関係性が Tru14, Tru20 と Tni1 の間にも認められた。また、Tru8 と Tru14 上のトラフグ遺伝子の一部は Tni20 上のミドリフグ遺伝子とオーソログな関係を示した。従って、両フグ間のハプロイド染色体数の違いはトラフグの Tru5, Tru8, Tru14, Tru20 とミドリフグの Tni1, Tni3, Tni20 の間で起こった染色体間の再編成によって説明付けることができる。

トラフグ・メダカ間の比較ゲノム解析

22,421 個のトラフグ予測遺伝子と 20,604 個のメダカ予測遺伝子の内、両魚種間で 1:1 関係にある 13,557 個のオーソログを Ensembl より得た。また、この内、両魚種で染色体上の位置が明らかなオーソログは 12,026 個であった (Figure 10A, Supplemental Table 13)。トラフグとメダカの間では 20 組の染色体対が 1:1 関係を示した (Tru2/メダカ 22 番染色体 (Ola22), Tru3/Ola7, Tru4/Ola15, Tru5/Ola8, Tru6/Ola12, Tru7/Ola16, Tru9/Ola6, Tru10/Ola20, Tru11/Ola13, Tru12/Ola11, Tru13/Ola3, Tru14/Ola10, Tru15/Ola14, Tru16/Tni24, Tru17/Ola1, Tru18/Ola23, Tru19/Ola5, Tru20/Ola4, Tru21/Ola9, Tru22/Ola17)。これら 20 組の染色体対では、約 18,400 - 19,900 万年前にトラフグ系統とメダカ系統が共通祖先から分岐して以降、どちらの系統でも大規模な染色体間の再編成が生じていないと考えられた。一方、Tru1 と Ola19, Ola21, および、Tru8 と Ola2, Ola18 ではトラフグとメダカ間で 1:2 の関係が認められた。これらの染色体間では、トラフグ系統とメダカ系統が共通祖先から分岐して以降、トラフグ系統内で Ola19 と Ola21 および Ola2 と Ola18 に相当するそれぞれ 2 個の染色体が

融合し、現存の Tru1 および Tru8 が形成されたという場合と、メダカ系統内で Tru1 および Tni8 に相当する 2 個の染色体がそれぞれ分裂し、現存の Ola19 と Ola21 および Ola2 と Ola18 が形成されたという場合の 2 つのシナリオが予測された。これらの蓋然性については第 3 節で考察した。

トラフグ・ゼブラフィッシュ間の比較ゲノム解析

上記の解析で用いた 15,068 個のトラフグ・ミドリフグ間オーソログと Woods *et al.* (2005) が報告した 1,496 個のゼブラフィッシュ・ミドリフグ間オーソログを、ミドリフグ遺伝子を基に統合し、トラフグとゼブラフィッシュで染色体上の位置が明らかな 1,125 個のトラフグ・ゼブラフィッシュ間オーソログを得た。これらオーソログの各魚種の染色体上の位置を Oxford grid に表した結果、約 31,400 - 3,300 万年前 (Yamanoue *et al.*, 2006) にトラフグ系統とゼブラフィッシュ系統が共通祖先から分岐して以降、どちらか、あるいは、両魚種の系統で多くの染色体間再編成が起きた痕跡が認められた (Figure 11A, Supplemental Table 14)。

シンテニーマップ

10,482 個のトラフグ・ミドリフグ間オーソログの内、10,441 個 (99%以上) のオーソログは少なくとも 2 個以上の遺伝子から構成されるシンテニーブロックを形成しており、このブロックは合計 38 個認められた (Figure 9A)。これらのブロックを用いてトラフグおよびミドリフグのゲノム構造を模式的に表したシンテニーマップを作製した (Figure 9B, C)。1 つのシンテニーブロックの中に含まれるオーソログ対の最大数は 952 個、各ブロックあたりのオーソログ対の平均数は 275 個であった。

トラフグ・メダカ間において、両魚種のシンテニーマップは合計 46 個のシンテニーブロックから構成された (Figure 10B, C)。これらのブロックに含まれるオーソログの総数は 11,930 個であり、解析に使用したトラフグ・メダカ間オーソログ (12,026 個) の 99%に及んだ。また、1 つのシンテニーブロックの中に含まれるオーソログ対の最大数は 627 個、各ブロックあたりのオーソログ対の平均数は 259 個となった。両フグ間およびトラフグ・メダカ間で染色体の 1 : 1 関係が認められた染色体対は、それぞれ 18 組および 20 組であったことから、両フグ間における大規模な染色体間の再編成事象の数は、トラフグ・メダカ間のそれに比べ、多いように見えた。しかし、両フグ間およびトラフグ・メダカ間においてシンテニーマップを構成するシンテニーブロック数は 38 個および 46 個であったことから、小規模な染色体間の再編成事象を含めると、両フグ間のシンテニーはトラフグ・メダカ間のそれに比べ若干高く保存されていると言える。

トラフグとゼブラフィッシュを比較した場合、シンテニーマップは 97 個のシンテニーブロックから構成された (Figure 11B, C). これらのブロックに含まれるオーソログの総数は 1,024 個であり、解析に使用したトラフグ・ゼブラフィッシュ間オーソログ (1,125 個) の 91%に相当した. また、1つのシンテニーブロックの中に含まれるオーソログ対の最大数は 43 個、オーソログ対の平均数は 11 個であった. トラフグ・ゼブラフィッシュ間の比較解析では、用いたオーソログ対の数が他の魚種間の比較解析に用いたオーソログの数に比べ 1/10 程度であった為、シンテニーマップを構成するシンテニーブロックの数は過小に見積もられる. それにもかかわらず、両魚種のシンテニーマップを構成するシンテニーブロックの数は他の魚種間のシンテニーマップを構成するブロックの数の 2.1-2.6 倍となった. 仮に、他の魚種間の比較解析に用いたオーソログの数と同程度のオーソログを用いて同様の比較解析を行った場合、シンテニーマップを構成するシンテニーブロックの数が増える可能性は高いが、減ることはない. 従って、トラフグ・ゼブラフィッシュ間のシンテニーの保存性は他の魚種間で認められたそれに比べ相当低いと言える.

比較解析に用いた魚種の分岐年代の関係性を Yamanoue *et al.* (2006) のデータを基に考えると、フグ系統とメダカ系統の分岐年代はトラフグ系統とミドリフグ系統の分岐年代を約 2-3 倍遡る (トラフグ系統とミドリフグ系統の分岐年代は約 7,300 - 9,600 万年前、フグ系統とメダカ系統の分岐年代は約 18,400 - 19,900 万年前). さらに、フグ系統とメダカ系統の分岐年代を約 2 倍遡った年代がフグ・メダカ系統とゼブラフィッシュ系統の分岐年代に相当する (フグ・メダカ系統とゼブラフィッシュ系統の分岐年代は約 31,400 - 33,300 万年前). 従って、両フグ間に認められる染色体間の再編成の少なさと、トラフグ・ゼブラフィッシュ間に認められる染色体間の再編成の多さは、歴史的な時間経過に再編成事象の数が正比例すると考えれば当然と言えよう. しかし、トラフグ・メダカ間において認められた染色体間の再編成数が、両フグ間のそれと大差ないことは、時間経過に再編成事象の数が正比例するという仮説と矛盾する. この結果を説明できる染色体進化パターンは 3 つ挙げられる. 第 1 は、フグ・メダカの最終共通祖先以降の染色体再編成頻度が、分岐する以前の系統、あるいはゼブラフィッシュ系統のそれに比べて低かったというパターンである. 第 2 は、4 魚種の共通祖先からフグ・メダカ共通系統とゼブラフィッシュ系統が分岐して以降、フグ・メダカ共通系統内で起こった染色体間の再編成頻度がゼブラフィッシュ系統のそれに比べて高かったというパターンである. 第 3 は、4 種の共通祖先からフグ・メダカ系統とゼブラフィッシュ系統が分岐以降、ゼブラフィッシュ系統でのみ染色体間の再編成頻度が高かったというパターンである. Kasahara *et al.* (2007) はミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュの共通祖先のゲノム構造を再構築し、そのゲノム構造とメダ

カゲノム構造が類似していることから、3種の共通祖先から現存するメダカに至るまでに大規模な染色体再編成は起こっていないと推定している。この結果を考慮すると、第3の進化パターンが妥当であると考えられる。従って、トラフグ・ゼブラフィッシュ間でシンテニー関係が著しく崩れていることは2魚種間の分岐年代が他の魚種のそれに比べ古いことに加えて、ゼブラフィッシュ系統内で起こった染色体間の再編成頻度が高いことに起因すると考えられた。

第2節

共通祖先ゲノムの再構築

Kasahara *et al.* (2007) はヒトを外群としてミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのゲノム構造を比較し、硬骨魚類の共通祖先ゲノムを再構築した。彼らのモデルでは、硬骨魚類系統が四肢動物系統に分岐した後（約 45,000 万年前, Yamanoue *et al.*, 2006), 硬骨魚類系統では系統特異的な全ゲノム重複を受け、13 本の染色体が 26 本の染色体に倍化し、その後、ミドリフグ・メダカ・ゼブラフィッシュ共通祖先系統では 8 回の大規模な染色体間の再編成が起こったことを示している。さらに、この再編成以降、現存のメダカに至るまでに大規模の再編成は起こっていないと推定した。一方で、ミドリフグとメダカが共通祖先から分岐して以降、ミドリフグの系統では複数回の染色体間再編成が起こっていることも推定している。しかし、この再編成事象がミドリフグとメダカが分岐した直後に起こった事象なのか、あるいは、ミドリフグの系統で最近に起こった事象なのか否かは不明であった。また、本章第 1 節におけるトラフグとミドリフグの比較ゲノム解析から両フグ間には複数回の染色体間の再編成が起こった痕跡が認められているが、その再編成事象がどちらの系統で起こった事象であるかは不明であった。

そこで本節では、メダカを外群としてトラフグとミドリフグのゲノム構造を比較してフグ共通祖先のゲノム構造を再構築し、両フグの系統で起こった染色体間の再編成の歴史を推定することを目指した。さらに、推定したフグ共通祖先のゲノム構造とメダカ、ゼブラフィッシュのゲノム構造を比較し、フグ系統とメダカ系統が最終共通祖先から分岐して以降、各系統に起こった染色体間の再編成事象についても検証した。

材料および方法

トラフグ・ミドリフグ・メダカ・ゼブラフィッシュ間オーソログの同定

Ensembl からトラフグ・ミドリフグ・メダカ間で相同関係にある遺伝子セットを取得し、このデータセットから、3 魚種間で 1:1 関係にある遺伝子 (triplet) のみを選び出した。次に、これらの遺伝子の内、3 魚種で染色体上の位置が同定されている遺伝子対を選抜し、これをトラフグ・ミドリフグ・メダカ間オーソログとした。なお、各魚種のゲノムデータセットは、それぞれ FUGU 4.0 (Ensembl version 48.4h), TETRAODON 7 (Ensembl version 48.1j), HdrR (Ensembl version 48.1d) である。次に、得られたオーソログと Woods *et al.* (2005) が報告した 1,496 個のゼブラフィッシュ・ミドリフグ間オーソログを、ミドリフグ遺伝子を基に統合し、トラフグ・ミドリフグ・メダカ・ゼブラフィッシュ間オーソログを間接的に得た。

トラフグ・ミドリフグ・メダカ間共通連鎖ブロックの作製

得られた 4 魚種間オーソログにおいて、トラフグ・ミドリフグ・メダカ間で共通してシンテニー関係にある複数のオーソログを 1 つのオーソログ集団としてグループ化し、これを 1 つの 3 種共通連鎖ブロックとした。また、どのオーソログともシンテニー関係を持たない単一のオーソログも 1 つの連鎖ブロックとした。

フグ共通祖先ゲノムの再構築

作製した 3 魚種共通連鎖ブロックを用いて、フグ共通祖先のゲノム構造を再節約的手法 (Nakatani *et al.*, 2007) に基づき再構築した。すなわち、2 つの連鎖ブロックが、3 魚種の内、少なくとも 2 魚種のそれぞれの染色体上において同一の染色体上に位置する場合、この 2 つの連鎖ブロックはフグ共通祖先のゲノム上でも同一の染色体上に位置するものとした。次に、2 つの連鎖ブロックが、3 魚種の内、1 魚種の染色体上でのみ同一の染色体上に位置する場合、この 2 つの連鎖ブロックはフグ共通祖先のゲノム上では異なる染色体上に位置するものとした。3 魚種の内、どの魚種においても他の連鎖ブロックとシンテニー関係を持たない連鎖ブロックについては、フグ共通祖先の染色体上の位置は不明とした。

フグ・メダカ共通祖先ゲノムの再構築

フグ・メダカ共通祖先のゲノムはフグ共通祖先、メダカ、ゼブラフィッシュのゲノム構造を比較して再構築した。すなわち、まず、4 魚種間オーソログを用いて、フグ共通祖先・メダカ・ゼブラフィッシュ共通連鎖ブロックを作製し、この連鎖ブロッ

クセットを用いて, 上記と同じ解析方法でフグ・メダカ共通祖先ゲノムを再構築した.

フグ共通祖先およびフグ・メダカ共通祖先ゲノムの再構築

22,421 個のトラフグ予測遺伝子, 28,653 個のミドリフグ予測遺伝子および 20,604 個のメダカ予測遺伝子の内, 3 魚種間で 1 : 1 関係にある 7,755 個のオーソログを Ensembl より得た (Supplemental Table 15). さらに, これらのオーソログと Woods *et al.* (2005) が報告した 1,496 個のゼブラフィッシュ・ミドリフグ間オーソログを, ミドリフグ遺伝子を基に統合し, 758 個の 4 魚種間オーソログを得た (Supplemental Table 16). 次に, フグ共通祖先のゲノム構造を再構築する為, これらのオーソログにおけるトラフグ, ミドリフグ, メダカ染色体上の位置情報を用いてオーソログをグループ化し, 合計 33 個のトラフグ・ミドリフグ・メダカ共通連鎖ブロックを得た (Supplemental Table 16). これにより, トラフグ, ミドリフグ, メダカのそれぞれのゲノム構造はこれら 33 個の連鎖ブロック同士の組み合わせ方によって表現することが可能となった. 再節約的手法に基づき, フグ共通祖先のゲノム構造を再構築した結果, フグ共通祖先のゲノムは 23 個のハプロイド染色体から構成された (Figure 12). 同様に, フグ・メダカ共通祖先のゲノム構造を再構築する為, 得られたオーソログにおけるフグ共通祖先, メダカ, ゼブラフィッシュ染色体上の位置情報を利用して, 合計 168 個のフグ共通祖先・メダカ・ゼブラフィッシュ共通連鎖ブロックを得た (Supplemental Table 16, 17). これらの連鎖ブロックを用いて, フグ・メダカ共通祖先のゲノム構造を再構築したところ, フグ・メダカ共通祖先のゲノムは 24 個のハプロイド染色体から構成された (Figure 12).

再構築したフグ・メダカ共通祖先の 24 個のハプロイド染色体を祖先染色体 A から X (AncA - AncX) と名付け, トラフグ, ミドリフグ, メダカおよびゼブラフィッシュのゲノム構造から推定された硬骨魚類の染色体進化過程のモデルを Figure 12 に示した. まず, 現存のトラフグに至るまでに起こった染色体進化過程に着目すると, フグ・メダカ共通祖先からフグ系統とメダカ系統に分岐した後, 両フグ系統が分岐する以前に 1 回の大規模な染色体間の再編成が認められ, これにより, 祖先染色体 AncA と AncB が融合し, 新たな染色体 (AncA/B) を形成し, 現存のトラフグ連鎖群 1 (Tru1) およびミドリフグ 2 番染色体 (Tni2) に至ったと考えられた. さらに, 両フグ系統が分岐した後, トラフグ系統に特異的な染色体間の再編成事象が認められ, これにより, 祖先染色体 AncI と AncJ が融合し, 現存の Tru8 を形成したと考えられた.

次に, 現存のミドリフグに至るまでに起こった染色体進化過程に着目すると, フグ・メダカ共通祖先から現存のミドリフグに至るまでには合計 3 回の大規模な染色体間の再編成事象が認められ, この内, 2 回の再編成事象はミドリフグ系統内で起こっ

た事象であった。一方、フグ・メダカ共通祖先から現存のメダカに至るまでには大きな再編成は認められなかった。Kasahara *et al.* (2007) の研究ではミドリフグ系統とメダカ系統が分岐して以降、メダカの系統では大規模な染色体間の再編成は生じていないと推定している。本研究ではその研究とは異なるデータセットを用いた解析により、同様の結果を示した。

両フグ系統における染色体間再編成の詳細解析

Kasahara *et al.* (2007) の研究ではミドリフグ系統とメダカ系統が分岐して以降、ミドリフグ系統では合計 4 回の染色体間の再編成事象が認められ、この内、3 回の再編成は大規模なもので 1 回の再編成は小規模なものと推定した。しかし、本研究ではミドリフグに至るまでの系統内では 3 回の染色体間の再編成しか認められなかった。この違いは本研究で用いたオーソログセットの不足による為と考えられた。そこで、トラフグとミドリフグのそれぞれの系統で起こった再編成事象を詳細に把握する為、7,755 個のトラフグ・ミドリフグ・メダカ間オーソログを用いて、新たに 96 個の 3 種共通連鎖ブロックを作製し、再びフグ共通祖先のゲノム構造を再構築した (Figure 12, Supplemental Table 15, 18)。これにより、オーソログセットは約 10 倍に増え、作製された連鎖ブロック数も約 3 倍となった為、解像度の高い解析が期待できた。再構築したフグ共通祖先のゲノムは 23 個のハプロイド染色体から構成され、この結果は上記の解析と同じ結果であった。しかし、本解析では上記の解析では認められなかった染色体間の再編成の痕跡を新たに発見した (Figure 12 の点線で示した再編成)。すなわち、AncH に由来する一部のゲノム領域 (Supplemental Table 18 の連鎖ブロック 27) はトラフグとミドリフグ染色体上では AncI に由来する Tru8 および Tni3 上に位置するのに対し、メダカ染色体上では AncH に由来する Ola8 上に位置していた。従って、このゲノム領域はフグ・メダカ共通祖先からフグ系統とメダカ系統が分岐した後、フグ系統において AncH から AncI へ転座したと考えられた。このように一部のゲノム領域が転座したと考えられる染色体間の再編成の痕跡が、フグ共通祖先からトラフグ系統とミドリフグ系統が分岐した後、ミドリフグ系統において 3 つ認められた。なお、本研究では、オーソログの数が 4 個未満の連鎖ブロックの転座を微小な再編成事象とみなし、Figure 12 上に示さなかった。

第3節

染色体内のゲノム再編成

ゲノム進化の過程で起こった染色体再編成事象は2つに大別して捉えられる。1つは染色体間の再編成であり、もう1つは染色体内再編成である。これまでの研究から、これら2つの事象の頻度はタクサで異なることが示唆されている。例えば、哺乳類系統では多くの染色体再編成事象が認められるが、線虫やショウジョウバエ種間のゲノムには染色体間の再編成に比べ染色体内の再編成の痕跡が多く認められている (Hillier *et al.*, 2007; *Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007)。線虫やショウジョウバエは染色体数が少ない為、染色体間の再編成が起こりづらく、結果として染色体内再編成が多くなったとも考えられたが (Hillier *et al.*, 2007; *Drosophila* 12 Genomes Consortium 2007)、その後、Hill *et al.* (2008) は比較的ハプロイド染色体数の多いホヤ種間のゲノムにも線虫やショウジョウバエのゲノムと同様の傾向が認められることを報告し、この傾向は無脊椎動物共通の染色体進化パターンである可能性を示した。

一方、硬骨魚類では、これまでの研究から、フグ・メダカ共通祖先から分岐して以降、現存のトラフグ、ミドリフグ、メダカに至るまでに起きた染色体間の再編成が極めて少ないことが明らかになっており、また、Kasahara *et al.* (2007) のミドリフグとメダカを用いた研究でも同様の結果が得られている。従って、硬骨魚類の染色体進化パターンは哺乳類より無脊椎動物の進化パターンに似ていることが予測される。

そこで本節では、トラフグ・ミドリフグおよびトラフグ・メダカ間でジーンオーダーを比較し、各魚種間における遺伝子の共線性(ジーンコリアリティー)を調べ、染色体進化の過程で生じた染色体内の再編成事象を詳細に理解することを目指した。さらに、染色体内および染色体間の両再編成事象を合わせて解析し、各魚種間のジーンコリアリティーを調べ、ヒト・マウス間およびヒト・オポッサム間のそれと比較し、硬骨魚類系統と哺乳類系統で染色体の再編成頻度に違いがあるか否かを検証することも目指した。

各種間オーソログの同定

Ensembl からトラフグ・ミドリフグ間, トラフグ・メダカ間, ヒト・マウス間, ヒト・オポッサム間それぞれで相同関係にある遺伝子セットを取得し, このデータセットから, 各種間で 1 : 1 関係にある遺伝子対のみを選び出した. 次に, これらの遺伝子対の内, 染色体上の位置情報を持つ遺伝子対を選抜し, これを各種間のオーソログとした. なお, 各種のゲノムデータセットは, それぞれ FUGU 4.0 (Ensembl version 50.4j), TETRAODON 8.0 (Ensembl version 50.8), HdrR (Ensembl version 50.1f), NCBI (Ensembl version 50.36I), monDom5 (Ensembl version 50.5e) である.

トラフグ・ミドリフグ間およびトラフグ・メダカ間におけるジーンオーダーの比較

各魚種間のジーンオーダーの比較では, オーソログの遺伝子座の位置に着目し, 個々のオーソログにおける方向性の違いは考慮しなかった. オーソログの遺伝子座の位置は, Ensembl のアノテーション情報に基づき, その遺伝子の第 1 エクソンの開始点とした. また, 比較解析はオーソログ間関係を持つ染色体対の間でのみ行い, それら染色体内においても, 他の染色体への転座が認められるオーソログについては解析に含めなかった. 各魚種間においてジーンオーダーが保存されたオーソログ群をコリアリティーセグメントとし, このセグメントの各魚種における染色体上の位置および方向性から, 各魚種間に認められる染色体の逆位回数を GRIMM アルゴリズム (Pevzner and Tesler, 2003) に基づき算出した.

各生物間におけるジーンコリアリティーの比較

トラフグ・ミドリフグ間, トラフグ・メダカ間, ヒト・マウス間, ヒト・オポッサム間の各種間においてシンテニーとジーンオーダーの保存性を合わせて解析し, 各種間のコリアリティーセグメントを作製した. 次に, セグメント内に含まれるオーソログの数を各種間で比較した. この際, トラフグ・ミドリフグ間およびトラフグ・メダカ間の比較では以下に記述した事象に留意した.

硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複と相互遺伝子消失

硬骨魚類の染色体は古代に起こった全ゲノム重複により, 2 本 1 組のパラログス関係を持つ (Jaillon *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005; Kasahara *et al.*, 2007). これら染色体上の倍化した重複遺伝子は, 進化の過程の中で, 一方の遺伝子が残り, 他方の遺伝子

は消失することが多い (Jaillon *et al.*, 2004). 例えば, 全ゲノム重複以前の染色体 P 上に 3 個の遺伝子, A, B, C があるとする (便宜上, P (ABC) と表記する). 全ゲノム重複後, 染色体 P とパラログス関係を持つ染色体 p が形成され, この染色体上にも 3 個の遺伝子, a, b, c が存在する (p (abc)). この染色体構造を持つ 2 つの生物種 (種 1 および種 2) が共通祖先から分岐した後, 両種の系統それぞれにおいて重複遺伝子 B と b の内, 遺伝子 B が消失した場合, 各種のゲノム構造は共に, P (AC), p (abc) となる. この場合, 両種間のジーンオーダーは保存されている. しかし, 種 2 で遺伝子 b が消失した場合, 種 1 のゲノム構造は P (AC), p (abc) であるのに対し, 種 2 では P (ABC), p (ac) となる. このような状況を相互遺伝子消失 (reciprocal gene loss) と言う (Scannell *et al.*, 2006; Sémon and Wolfe, 2007a). この状況で通常の双方向 BLAST 法によるオーソログ同定を行うと, 種 1 の遺伝子 b と種 2 の遺伝子 B が 1 : 1 関係のオーソログとして検出される為, 両種間では染色体間, 染色体内のいずれの再編成も生じていないにも関わらず, 転座が起きたと見なされ, 両種間のジーンコリアリティーは破壊されたものとして誤認されてしまう (Sémon and Wolfe, 2007b).

この問題を解決する為, トラフグ・ミドリフグ間およびトラフグ・メダカ間のオーソログセットから, 相互遺伝子消失を受けた可能性が高いオーソログを取り除いた. まず, トラフグ・ミドリフグ間およびトラフグ・メダカ間でゲノム構造を比較し, パラログ染色体対の間で転座したと推定されるオーソログをデータセットから抽出した. なお, ミドリフグとメダカそれぞれのゲノム上におけるパラログ染色体対は Kasahara *et al.* (2007) のモデルに従った. また, トラフグゲノム上におけるパラログ染色体対はミドリフグおよびメダカとのシンテニー関係を基に決定した. 次に, 転座したオーソログ周辺のゲノム領域を調べた. もし, 対象となるオーソログス関係を持つ遺伝子対が相互遺伝子消失の結果により生まれたものであるならば, その遺伝子周辺のゲノム領域は全ゲノム重複以前の古代祖先においては同一のゲノム領域であるはずである. そこで, 対象遺伝子座を中心として上流側, 下流側それぞれ 10 個の遺伝子の範囲内にその遺伝子と同様に転座として見なされる遺伝子あるいはパラログ染色体間で重複遺伝子として現残する遺伝子が含まれるか否かを調べた. これらの遺伝子が含まれる場合, 対象とする遺伝子対は相互遺伝子消失により形成されたものとみなし, そのオーソログは相互遺伝子消失の結果, 転座と誤認されたオーソログとして両魚種間オーソログセットから削除した. また, これらの遺伝子が含まれない場合, その遺伝子は実際に単独で転座した可能性が高いと考え, 両魚種間のオーソログセットに含めた.

トラフグ・ミドリフグ間における染色体内の再編成事象

Ensembl より得た 14,204 個のトラフグ・ミドリフグ間オーソログの内、第 1 節の研究で明らかにした 18 組のオーソログ染色体対において、両フグの各染色体上のオーソログの位置をプロットした (Figure 13, Supplemental Table 19 のオーソログセットから転座したオーソログを除く)。Tru1 と Tni2 の比較では 1,061 個のオーソログをプロットした。この内、トラフグにおいて染色体上の位置が不明なオーソログは 80 個 (8%)、ミドリフグにおいて染色体上の位置が不明なオーソログは 87 個 (8%) であった。そして、両フグ共に染色体上位置が明らかなオーソログは 894 個 (84%) であった。これらオーソログの Tru1 および Tni2 上の遺伝子座の位置を比較した結果、ほとんどのオーソログは染色体間でジーンオーダーが保存されていた。一方、Tru21 と Tni12 では染色体内再編成の痕跡が認められた。これら染色体間の比較では 674 個のオーソログを用いた。この内、トラフグにおいて染色体上の位置が不明なオーソログは 37 個 (6%)、ミドリフグにおいて染色体上の位置が不明なオーソログは 72 個 (11%) であった。両フグ共に染色体上位置が明らかなオーソログ 565 個 (84%) のプロットの様子から大規模な範囲に渡ってオーソログのジーンオーダーが逆順していた。ジーンオーダーが逆順したゲノム領域内には 134 個のオーソログが含まれており、この領域のトラフグおよびミドリフグのゲノム上における物理的距離は、それぞれ、2.8 Mb および 2.4 Mb であった。

このような領域は、染色体進化の過程において、トラフグとミドリフグどちらかの系統で染色体の逆位が生じたことを示している。Tru1 と Tni2 間 (Tru1/Tni2, 以下同様に TruX/TniX と表記した。X は染色体番号) には大規模な領域に渡る逆位は認められなかったが、小規模な領域における逆位の痕跡があり、ジーンコリアリティーが崩れる 6 個の切断点が認められた。従って、この染色体間にはジーンオーダーが保存された 7 個のコリアリティーセグメントが同定できた。他のオーソログ染色体対の間に認められるコリアリティーセグメントを Table 7 に示した。各染色体対におけるセグメント数は最多で 15 個 (Tru7/Tni8)、最少で 1 個 (Tru22/Tni15) であった。また、その平均数は 7 個となった。今回認められたコリアリティーセグメントの配置関係は、両フグが分岐した後に生じた複数回の染色体逆位の結果である。この配置を最節約的に説明する逆位回数を各染色体対について算出したところ、最多で 8 回 (Tru7/Tni8)、最少で 0 回 (Tru22/Tni15) であった。また、その平均は 4 回となった。両フグ間で 18 組の染色体対における平均逆位回数が 4 回であったことから、全ゲノム領域内 (全ての染色体) で起こった逆位回数は 88-92 回と見積もることができた。

なお, 1 個のオーソログから構成されるセグメントは染色体上の方向性を持たない為, データセットから除いた.

トラフグ・メダカ間における染色体内の再編成事象

Ensembl より得た 13,743 個のトラフグ・メダカ間オーソログの内, 第 1 節の研究で明らかにした 20 組のオーソログ染色体対において, 各染色体上のオーソログの位置をプロットした (Figure 14, Supplemental Table 20 のオーソログセットから転座したオーソログを除く). トラフグ・メダカ間のジーンコリアリティーは両フグ間のそれに比べて低く, コリアリティーセグメントは細分化されていた. 各染色体対のセグメント数は最多で 54 個 (Tru17/Ola1), 最少で 12 個 (Tru14/Ola10) であった (Table 8). また, その平均数は 36 個となった. コリアリティーセグメントの配置を最節約的に説明する逆位回数を算出した結果, 最多で 41 回 (Tru12/Ola11), 最少で 7 回 (Tru14/Ola10) であった. また, その平均は 23 回となった. 両魚種間で 20 組の染色体対における平均逆位回数が 23 回であったことから, 両魚種間の全ゲノム領域内で起こった逆位回数は 507-553 回と見積もることができた.

各生物種間におけるジーンコリアリティーの保存性

上記の解析では染色体内の再編成事象に焦点を絞って, 各魚種間のジーンコリアリティーを明らかにした. しかし, 実際のゲノム上では, ジーンオーダーの保存されたコリアリティーセグメントは他の染色体から転座した遺伝子により破壊され, より細分化されていると考えられる. そこで, 上記の解析結果に染色体間で転座したオーソログを加え, 各魚種間のジーンコリアリティーを比較した.

Ensembl より得た 14,204 個のトラフグ・ミドリフグ間オーソログおよび 13,743 個のトラフグ・メダカ間オーソログの内, 少なくとも一方の魚種において染色体上位置が明らかなオーソログは, それぞれ, 13,006 個および 13,409 個であった. この内, 硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複により倍化した遺伝子の一方が相互遺伝子消失を受けた可能性の高いオーソログが両フグ間で 3 個, トラフグ・メダカ間で 6 個見つかり, それらのオーソログはデータから除いた. 残りのオーソログにおける各魚種の染色体上の位置をプロットした結果を Figure 15 および Figure 16 に示した. 両フグ間では 13,003 個のオーソログの内, 染色体上の位置が不明なオーソログはトラフグにおいて 1,203 個 (9%), ミドリフグにおいて 2,146 個 (17%) であった. 両フグ共に染色体上位置が明らかな 9,657 個 (74%) のオーソログは 189 個のコリアリティーセグメントを形成した. 次に, トラフグ・メダカ間では 13,403 個のオーソログの内, 染色体上の位置が不明なオーソログはトラフグにおいて 1,934 個 (14%), メダカにお

いて 720 個 (5%) であった。両魚種共に染色体上位置が明らかな 10,749 個 (80%) のオーソログは 945 個のコリニアリティーセグメントを形成した。

比較的サイズの小さいコリニアリティーセグメントの数に着目すると、両フグ間において、1 個のオーソログから構成されるセグメント数は 23 個であった (Figure 17A, Table 9)。一方、トラフグ・メダカ間のそれは 243 個であり、両フグ間のセグメント数の 11 倍であった。また、両フグ間において、10 個未満のオーソログから構成されるセグメントの総数は 79 個であり、合計 259 個のオーソログが含まれていた。このオーソログ数は解析に用いたオーソログの 3% に相当した (Figure 17C)。一方、トラフグ・メダカ間のそれは 677 個であり、合計 2,097 個のオーソログが含まれていた。このオーソログ数は解析に用いたオーソログの 20% に相当した (Figure 17C)。

比較的サイズの大きいセグメントの数に着目すると、両フグ間において、100 - 199 個のオーソログから構成されるセグメントの総数は 16 個であり、合計 2,370 個のオーソログが含まれていた (Figure 17B)。トラフグ・メダカ間のそれは 10 個であり、合計 1,522 個のオーソログが含まれていた。両種間共に、サイズの大きいセグメント区分の内、このセグメント区分において解析オーソログ数に対する区分内のオーソログ総数の割合が最大となった。しかし、その割合は両フグ間では 25% に達したのに対し、トラフグ・メダカ間では 14 % に留まった。これらのことから、両フグ間のジーンコリニアリティーはトラフグ・メダカ間のそれに比べ極めて高いと言える。

トラフグとミドリフグおよびトラフグとメダカの分岐年代は、それぞれ、約 8,500 (7,300-9,600) 万年前および約 19,100 (18,400 - 19,900) 万年前と推定されている (Yamanoue *et al.*, 2006)。一方、ヒトとマウスおよびヒトとオポッサムの分岐年代は、それぞれ、約 8,700 万年前および約 18,000 万年前と推定されており (Springer *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2007)、これらの分岐年代は各魚種間の分岐年代と近似していることから、ヒト、マウス、オポッサムのゲノム情報は硬骨魚類のジーンコリニアリティーと哺乳類のそれを比べる上で、良い研究材料と言える。ヒト・マウス間およびヒト・オポッサム間の比較では、それぞれ、15,030 個および 12,518 個のオーソログを同定した (Supplemental Table 21, 22)。各種間におけるジーンコリニアリティーの保存性は、硬骨魚類と同様に、ヒト・マウス間の方がヒト・オポッサム間に比べ高く、各種の系統的關係に従った (Figure 17, Table 9)。さらに、分岐年代の近似したヒト・オポッサム間のジーンコリニアリティーとトラフグ・メダカ間のそれを比較すると、比較的サイズの大きいセグメント区分におけるセグメント数とそれに含まれるオーソログ数はトラフグ・メダカ間で若干多い傾向にあるが、両 2 種間の全体的なジーンコリニアリティーのパターンは類似した傾向にあった (Figure 17C)。対照的に、分岐年代の近似したヒト・マウス間のジーンコリニアリティーと両フグ間のそれは異なる

パターンを示した。特に、比較的サイズの大きいセグメント区分ではその違いが顕著であり、ヒト・マウス間ではセグメントサイズの大きい上位3区分(200 - 299, 300 - 399, >400)の中に含まれるオーソログは解析オーソログの13.9%であったのに対し、両フグ間ではそれらの区分の中に45.6%のオーソログが含まれていた。これらのことから、両フグ間に認められたジーンコリアリティーの極めて高い保存性は、両フグがその共通祖先から比較的最近に分岐したことだけでは説明付けられず、フグ系統に特異的に染色体再編成の生じる頻度が低くなっている可能性が示された。

第 4 節 染色体再編成速度

本章第 3 節の研究ではトラフグ・ミドリフグ間のジーンコリアリティーとトラフグ・メダカ間のそれを比較し、両フグ間のジーンコリアリティーが極めて高く保存されていることを明らかにした。また、硬骨魚類間のジーンコリアリティーの保存程度と哺乳類間のそれを比較した結果、両フグ間で認められた高い保存性は、フグ系統で特異的に染色体の再編成頻度が低くなっていることに起因するのではないかと考えられた。

本節の研究では、種間の染色体再編成事象の数と各種間の分岐年代を基に、100 万年あたりに生じた染色体再編成の頻度を算出し、各系統内で起こった再編成速度を明らかにすることを目的した。2 種間のジーンコリアリティーを破壊する染色体の再編成事象は、どちらか一方の種において、染色体上で隣接する遺伝子対の間に切断点を形成する。本解析では、染色体再編成事象の頻度を、2 種間における遺伝子の隣接性（ジーンプロキシミティー）の保存、および、この保存性を破壊する切断点の数を基に計算し、得られた値を染色体内再編成速度と染色体間再編成速度に分けて各種間で比較した。

各種間オーソログの同定

本章第 3 節で同定したオーソログデータセットに加え，新たに Ensembl からミドリフグ・メダカ間，マウス・オポッサム間でそれぞれ相同関係にある遺伝子セットを取得し，このデータセットから，各種間で 1 : 1 関係にある遺伝子対のみを選び出した．次に，これらの遺伝子対の内，染色体上の位置情報が得られている遺伝子対を選抜し，これを各種間のオーソログとした．なお，ゲノムデータセットは第 3 節と同じものを用いた．

各種間におけるジーンプロキシミティーの比較

各種間のジーンプロキシミティーは以下の方法に従って算出した．まず，比較する 2 種の内，一方の種を基準種とし，他方の種を対象種とした．次に，2 種間オーソログから，基準種の染色体上で隣接して位置する 2 個の遺伝子を抽出して解析単位（遺伝子対）とした．そして，この遺伝子対が対象種の染色体上においても隣接しているか否かを調べ，隣接関係の崩れる頻度を算出した．この値は，比較対象種のハプロイド染色体数の違いなどにより，どちらの種を基準種とするかで若干ながら変化する (McLysaght *et al.*, 2000; Sémon and Wolfe 2007b)．従って，本解析では 2 種間におけるジーンプロキシミティーを双方向に渡って解析した．

硬骨魚類系統におけるジーンプロキシミティの保存性と染色体再編成速度

トラフグ・ミドリフグ間の比較においてトラフグを基準種とした場合、トラフグゲノム上には9,635個の遺伝子対が同定できた。この内、9,466対(98.2%)は対象種であるミドリフグゲノム上でもジーンプロキシミティを保持していた(Table 10)。一方、残りの169個の遺伝子対は両フグ間に起こった染色体再編成により、ジーンプロキシミティが保存されていなかった。従って、全ゲノム領域におけるジーンプロキシミティの切断度は0.018と算出された。トラフグの各染色体におけるジーンプロキシミティに着目すると、Tru12でジーンプロキシミティの切断が最も頻繁に生じ、その値は0.049(10/206遺伝子対)であった(Supplemental Table 23A)。最も低い切断頻度を示した連鎖群はTru14で、その値は0.005(424/426遺伝子対)であった。両フグ間のゲノム全体に渡るジーンプロキシミティの切断度が0.018であること、両フグの分岐年代が8,500万年前であることから(Yamanoue *et al.*, 2006)、100万年当たりにおけるジーンプロキシミティの切断度は 2.06×10^{-4} と算出された(Table 10)。ミドリフグを基準種とした場合、ミドリフグゲノム上には9,636個の遺伝子対が同定できた。この内、9,445対(98.0%)は対象種であるトラフグゲノム上でもジーンプロキシミティを保持していた。また、全ゲノムにおけるジーンプロキシミティの切断度および100万年当たりの切断度は、それぞれ、0.020および 2.33×10^{-4} であった(Table 10, Supplemental Table 23B)。

トラフグ・メダカ間の比較では、トラフグを基準種とした場合、ゲノム全体における切断度および100万年当たりの切断度は、それぞれ、0.086および 4.52×10^{-4} であった(Table 10, Supplemental Table 23C, D)。メダカを基準種とした場合、それらの値は、それぞれ、0.085および 4.47×10^{-4} であった。

ミドリフグ・メダカ間の比較では、28,653個のミドリフグ予測遺伝子と20,604個のメダカ予測遺伝子の内、両魚種で染色体上の位置が明らかな9,530個のオーソログをEnsemblより得た(Supplemental Table 24)。次に、このデータセットから、前節と同様にして、相互遺伝子消失を受けた可能性の高い21個オーソログを解析データから除いた。9,509個のミドリフグ・メダカ間オーソログを用いて、両魚種間のジーンプロキシミティの保存性を解析した結果、ミドリフグを基準種とした場合、ゲノム全体におけるジーンプロキシミティの切断度および100万年当たりの切断度は、それぞれ、0.081および 4.26×10^{-4} となり、メダカを基準種とした場合、その値は、それぞれ、0.079および 4.26×10^{-4} となった(Table 10, Supplemental Table 23E, F)。

トラフグ・メダカ間およびミドリフグ・メダカ間において、100万年当たりのジーン

プロキシミティーの切断度は、双方向解析に基づくデータを平均して、それぞれ、 4.50×10^{-4} および 4.19×10^{-4} であったのに対し、両フグ間のそれは 2.20×10^{-4} であり、トラフグ・メダカ間およびミドリフグ・メダカ間の 1/2 程度であった。このことから、両フグの共通祖先系統における染色体再編成速度と各フグ系統におけるそれは異なっており、フグに至る硬骨魚類の染色体再編成速度は時代を下るにつれ低下傾向にあることが示唆された。

隣接する 2 つのオーソログの切断をもたらす染色体再編成は染色体間再編成と染色体内再編成の 2 つの事象に大別することができる。そこで、各魚種間に認められたジーンプロキシミティーの切断度を、これら 2 つの事象に分け、100 万年当たりのジーンプロキシミティーの切断度を算出した。この結果、全ての魚種間で染色体間再編成による切断度に比べ、染色体内再編成のそれが高くなり、また、その比（染色体間再編成：染色体内再編成）はトラフグ・ミドリフグ間で 0.47：1.82、トラフグ・メダカ間で 0.78：3.72、ミドリフグ・メダカ間で 0.81：3.38 となった（染色体間再編成による切断度を 1 とした場合、それぞれ、1：3.87, 1：4.77, 1：4.17, Table 10）。トラフグ・メダカ間およびミドリフグ・メダカ間において、100 万年当たりのジーンプロキシミティーの切断度は、それぞれ 4.50×10^{-4} および 4.19×10^{-4} であり、若干の違いが見られた。この違いはトラフグとミドリフグが共通祖先から分岐して以降の染色体再編成速度が異なることを示している。本章第 2 節ではミドリフグ系統において染色体間の再編成事象が多いことを示したが、本節の研究でも同様の傾向が見られ、染色体間再編成による切断度はトラフグ・メダカ間で 0.78×10^{-4} 、ミドリフグ・メダカ間で 0.81×10^{-4} となり、ミドリフグ系統において、染色体間の再編成速度が速かった。一方、染色体内再編成による切断度はトラフグ・メダカ間で 3.72×10^{-4} 、ミドリフグ・メダカ間で 3.38×10^{-4} となり、トラフグ系統において染色体内の再編成速度が速く、染色体間再編成事象とは逆の傾向にあった。両再編成を統合すると、結果的に、トラフグ系統において染色体の再編成速度が若干速いことが明らかになった。

硬骨魚類系統と哺乳類系統における染色体再編成速度の違い

硬骨魚類と同様に、哺乳類間におけるジーンプロキシミティーの保存性を調べた結果を Table 10 および Supplemental Table 23G - L に示した（マウス・オポッサム間の比較では 12,447 個のオーソログを用いた。Supplemental Table 25）。各種間において、100 万年当たりのジーンプロキシミティーの切断度は、双方向解析に基づくデータを平均して、それぞれ、ヒト・マウス間で 4.64×10^{-4} 、ヒト・オポッサム間で 4.84×10^{-4} 、マウス・オポッサム間で 5.32×10^{-4} であった。硬骨魚類系統では染色体再編成速度は

時代を下ると共に低下傾向にあることが示唆されたが、哺乳類系統では、ヒト・マウス間およびヒト・オポッサム間の 100 万年当たりのジーンプロキシミティの切断度が似ていることから、染色体再編成速は時代を経ても変化しないと考えられた。また、ヒト・オポッサム間とマウス・オポッサム間の 100 万年当たりのジーンプロキシミティの切断頻度はマウス・オポッサム間で高かった。これは、ヒトとマウスが共通祖先から分岐して以降、マウスに至る系統で多くの染色体再編成が生じたことを示している。これまでの哺乳類の比較ゲノム研究は、霊長類と齧歯類が共通祖先から分岐して以降、齧歯類の系統において染色体再編成が多く生じたことを示唆しており (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004; Bourque *et al.*, 2005), 本研究の結果はこれを支持するものとなった。

硬骨魚類間および哺乳類間における 100 万年当たりのジーンプロキシミティの切断度を、それぞれ平均すると、 3.62×10^{-4} および 4.93×10^{-4} となり、硬骨魚類系統の染色体再編成速度は哺乳類系統のそれに比べ遅いことが明らかになった。特に、染色体間再編成の速度は硬骨魚類間で 0.68×10^{-4} 、哺乳類間で 1.85×10^{-4} となり、哺乳類間の染色体間再編成の速度は硬骨魚類間のそれに比べ約 3 倍速かった。一方、染色体内再編成の速度は硬骨魚類間で 2.97×10^{-4} 、哺乳類間で 3.08×10^{-4} となり、両種間における差はほとんど認められなかった。

Comai (2005) は全ゲノム重複を受けたゲノムでは、染色体の倍数化によって不等乗換えを引き起こし易いこと、また、繰り返し配列が倍化したこと等の理由から、全ゲノム重複直後は染色体の再編成頻度が増加するという仮説を提唱した。詳しい機構は不明だが、全ゲノム重複により倍数化した染色体は時代と共に再び 2 倍体の形に戻ることが知られている (Comai, 2005; Ma and Gustafson, 2005; Chen and Ni, 2006)。Sémon and Wolfe (2007b) はこの現象に伴い染色体再編成の頻度も減少していくという仮説を提唱している。実際に、彼らは硬骨魚類 (トラフグ, ミドリフグ, ゼブラフィッシュ) と四脚動物 (ヒト, マウス, ニワトリ) で共通する 1,150 個のオーソログを用いて、各ゲノム間のジーンプロキシミティの保存性を解析し、硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複直後の染色体再編成速度が四脚動物系統のそれに比べ速いことを明らかにしている。また、ミドリフグに至る系統ではその速度が時代を下ると共に低下傾向にあることを示した。一方、彼らの研究は、トラフグとゼブラフィッシュの系統における再編成速度が硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複直後のそれに比べ、むしろ増加傾向にあることを示していた。彼らはトラフグのゲノムデータが断片化していたことや、ゼブラフィッシュにおいて利用可能なデータが不十分であったことから、不正確な値しか得られなかった可能性について言及している。本節の研究におけるデータセットは、トラフグの染色体上の位置が明らかであり、また、ゼブラフィッシュ

の代わりに十分なデータセットが利用できるメダカのゲノム情報を用いた。さらに、解析に用いる全種で共通のオーソログを使用することを避け、2種間ごとに共通するオーソログをそれぞれ用いたことで、使用したオーソログの数は Sémon and Wolfe (2007b) の研究の約 10 倍となり、より小規模な再編成についても検出することが可能であった。この結果、ミドリフグ系統だけでなくトラフグ系統においても染色体の再編成速度が時代を下るにつれ低下傾向にあることが示唆された。しかし、このような哺乳類には見られない現象が硬骨魚類一般に認められるものなのか、あるいは、フグ系統に特異的に認められるものなのかは、本研究だけでは定かではない。より明確な知見を得る為には、他の魚種における同様の研究結果を待たなければならない。

第4章の総合考察

本章の研究では、第3章で得たトラフグゲノム配列の染色体上の位置情報を用いて、トラフグ、ミドリフグ、メダカを中心として硬骨魚類のゲノム構造を比較し、約18,400-19,900万年前から現代に至るまでに起こった染色体進化の過程を詳細に解析した。その結果、トラフグ、ミドリフグ、メダカ間のシンテニーは極めて高く保存されており、3種の最終共通祖先から現存する各魚種に至る歴史の中で生じた染色体間の再編成はごくわずかであることが明らかになった（第1節、第2節）。また、ジーンコリアリティーおよびジーンプロキシミティーの保存性から推測される硬骨魚類系統の染色体進化パターンと哺乳類系統のそれを比較した結果、硬骨魚類系統では染色体の再編成速度が哺乳類系統に比べて遅いことが明らかになった。この遅さには染色体間の再編成の少なさが大きく寄与していた。特に、フグ系統内の再編成速度は著しく遅く、硬骨魚類系統では時代を下るにつれてその速度が低下傾向にあることが示唆された。

染色体間の再編成が少ない無脊椎動物（線虫、ショウジョウバエ、ホヤ）では染色体進化は染色体内再編成に強いバイアスが掛かり、その頻度は哺乳類に比べ極めて高いことが報告されている（Hillier *et al.*, 2007; *Drosophila* 12 Genomes Consortium 2007; Hill *et al.*, 2008）。同様に染色体間の再編成が少ない硬骨魚類は無脊椎動物と似た染色体進化パターンを持つと予測されたが、本研究の結果、染色体内の再編成速度は哺乳類のそれとほとんど変わらないことが明らかとなった。これらのことから、硬骨魚類の染色体進化パターンはこれまで知られている哺乳類や無脊椎動物のそれとは一致せず、硬骨魚類特有の染色体進化パターンを持つことが示唆された。

無脊椎動物の染色体進化過程において、染色体間の再編成頻度が少ない理由として種の有効集団サイズ (N_e) が脊椎動物に比べ極端に大きいことが挙げられている（Hillier *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008）。染色体間の再編成による変異は染色体の異数性を生じる為、個体の生存にとって有害である場合が多い。しかし、有効集団サイズが大きい種では淘汰圧が高い為、この変異は排除され易い（Hillier *et al.*, 2007）。一方、有効集団サイズが小さい種では淘汰圧が低い為、この変異が緩やかながら蓄積される可能性が高く、遺伝的浮動により変異が固定されやすい。実際、ヒトの有効集団サイズは $N_e = 10,000$ であるのに対し、ユウレイボヤの有効集団サイズは $N_e = \sim 1,500,000$ と見積もられており、一般に脊椎動物に比べ無脊椎動物の N_e は大きい（Yu *et al.*, 2001; Small *et al.*, 2007）。では、硬骨魚類も無脊椎動物のように N_e が大きいのだろうか？ DeWoody and Avise (2000) は78魚種（約4万個体）から得た合計524座のヘテロ接合体率に基づき有効集団サイズを算出し、海水魚で $N_e = 250 - 25,000$ 、淡水魚で $N_e =$

30 - 3,000 と推定している。他の魚種に関する研究でも類似した数値が得られており、クロブチメヌケ (*Sebastes crameri*) では $N_e = 9,157$ 、マツカワ (*Verasper moseri*) では $N_e = 14,730$ と算出されている (Gomez-Uchida and Banks, 2006; Taniguchi, 2007)。また、マダイ (*Pagrus major*) の野生集団における有効集団サイズもおおよそ 1 万程度と見積もられている (Taniguchi, 2007)。つまり、硬骨魚類ではその有効集団サイズが哺乳類と比べて極端に大きいとは言えないにも関わらず、染色体間の再編成が少ないということになる。これは無脊椎動物の研究で提唱された仮説では説明できない。硬骨魚類が哺乳類と比べて、染色体間の再編成が少ないのはなぜだろうか？ その原因の 1 つとして硬骨魚類の多くが採用する多産多死という繁殖戦略が考えられる。哺乳類に比べて硬骨魚類の産卵数は、一般的に、極めて多く、1 対の親魚から得られる稚魚の数は膨大である。しかし、初期減耗によりほとんどの稚魚は死亡する為、次世代に子を残す親魚の数はごく僅かである。例えば、マダイの研究では、50 万尾の稚魚 (人工種苗集団) の内、次世代に子を残した親魚の数は僅か 50 尾程度であったことが示されている (Taniguchi, 2007)。また、Araki *et al.* (2007) は、サケ科魚類を用いた実験で、初期減耗期における浄化選択圧を緩めた場合、有害な突然変異が多く蓄積される可能性を指摘している。逆に考えれば、多産多死という繁殖戦略により、野生集団では稚仔魚期に浄化選択が強く働き、染色体間の再編成によって生じた突然変異個体は集団から直ちに排除されるのではないだろうか。

染色体進化の過程で起こった染色体の再編成事象は種の分化をもたらす大きな原動力となると考えられている (Navarro and Barton, 2003)。無脊椎動物においては染色体内の再編成が、哺乳類においては染色体間の再編成がそれぞれの系統における種分化に大きな影響を与えてきた。対照的に、硬骨魚類では少なくともフグとメダカが分岐した約 18,400 - 19,900 万年前から現代にかけて起こった染色体再編成は他の系統のそれに比べ少ない。それにも関わらず、硬骨魚類は脊椎動物の中で最も種の多様性を持つ生物群であり、その種は~25,000 種に及び、脊椎動物種の約半数を占める (Nelson 1994)。また、硬骨魚類の約半数の種が比較的最近多様化した棘鱗上目に属し (棘鱗上目魚種の分岐開始年代は約 20,600 - 21300 万年前, Yamanoue *et al.*, 2006)、トラフグやメダカもこの属に含まれる。なぜ、染色体構造の保存性が比較的高い生物群で、このように多くの種が生じてきたのだろうか？ この謎を解き明かすには、無論、生息環境やライフサイクルを含む様々な要因を考慮しなければならないのだろう。しかし、ゲノム構造や配列の進化という点にのみ着目すると、無脊椎動物や哺乳類では染色体構造の変化が種の多様化に大きく寄与したのに対し、硬骨魚類ではこれに依存しない何か別のメカニズムが種の多様化に貢献したのではないかと考えられる。その 1 つとして、硬骨魚類の祖先に起こった全ゲノム重複によって、ゲノム上の遺伝子セ

ットが倍化したことが挙げられる (Naruse *et al.*, 2004; Jaillon *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005; Steinke *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2006; Sémon and Wolfe, 2007a; Kasahara *et al.*, 2007). 重複遺伝子対の内, 一方の遺伝子はその機能を維持する場合, 他方の遺伝子に変異が起きても表現型への影響が少ない為, 遺伝子の変異蓄積率は高くなり, 片方が偽遺伝子となる場合が多い (Ohno, 1970; Nowak *et al.*, 1997; Dehal and Boore, 2005). この偽遺伝子化は種の分化に大きな影響を与える. 例えば, 同種であるが2つの集団を形成している生物群があるとして, この2つの生物群は同じ重複遺伝子を持つとする. この2つの生物群において重複遺伝子の相互遺伝子消失が起こった場合, もし, 集団間で交配した時には F₁ 世代ではその2つの遺伝子座では機能を持つ遺伝子と持たない遺伝子のヘテロ接合体となる. 次に, F₂ 世代を考えると, 1/16 の確率で機能を全く持たない個体が生じる. この重複遺伝子が生存や生殖に欠かせない遺伝子である場合, F₂ 世代では致死や不妊となる為, 重複遺伝子座の遺伝子型は遺伝的浮動により固定化される (Dobzhansky-Muller 不和合モデル, Lynch and Force, 2000; Lynch and Conery, 2000; Taylor *et al.*, 2001; Sémon and Wolfe, 2007a). この為, 相互遺伝子消失は種の分化を加速させると考えられている. また, Scannell *et al.* (2006) は酵母を用いた研究により, 重複遺伝子の消失頻度は全ゲノム重複直後で最も多く, 時代を経ると伴に加速的に少なくことを示している. 彼らの算出した遺伝子消失曲線によると, 全ゲノム重複が起こった時期を 0T とし, 現在を 1T とした場合, 0.1T 期間内に重複遺伝子として現存する割合は 50%以下と推定している. これを便宜的に硬骨魚類に当てはめてみると, 硬骨魚類系統特異的な全ゲノム重複は約 36,000 万年前に生じたとされているので (Christoffels *et al.*, 2004; Vandepoele *et al.*, 2004; Hoegg *et al.*, 2004; Crow *et al.*, 2006), 約 32,400 万年前には多くの重複遺伝子が消失し, その間に起こった相互遺伝子消失が種分化に大きな影響を与えたと考えられる. しかし, 相互遺伝子消失は最近も生じており, 例えば, ミドリフグ・ゼブラフィッシュ間では遺伝子消失を受けた重複遺伝子対の内, 約 7%は相互遺伝子消失を受けていると予想されている (Sémon and Wolfe, 2007a). また, 本章の解析結果では, 少なくともトラフグ・メダカ間で 10 個, トラフグ・ミドリフグ間で 3 個の遺伝子対が相互遺伝子消失を受けていると考えられた. これらの相互遺伝子消失が比較的最近の種分化に影響を与えたのかもしれない.

重複遺伝子対への変異蓄積は偽遺伝子化に加え, 遺伝子対の機能分担をもたらす場合もある (Golding and Dean, 1998; Force *et al.*, 1999). また, 変異がもたらした新機能が生存に有利に働き, 正の選択を引き起こす可能性も示されている (Zhang *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2000). Steinke *et al.* (2006) はトラフグ, ミドリフグ, メダカ, ゼブラフィッシュのゲノム上においてパラログとして存在し, かつ, ヒト遺伝子とオーソログな関係にある 2,466 組の重複遺伝子を同定し, 220 組の重複遺伝子はそれ

ぞれの魚種において系統特異的な変異率を示すことを明らかにした。次に、これらの重複遺伝子において、それぞれの遺伝子間における変異率を調べた結果、66%に及ぶ重複遺伝子が正の選択の下に進化していることを報告している。2つの生物集団の内、どちらかの集団で遺伝子変異による新機能の獲得や機能の分担化が起これば、2つの生物集団が生殖隔離を引き起こす可能性も高くなり、これらの変異も偽遺伝子化と同様に種の分化を加速させると考えられている (Sémon and Wolfe, 2007a)。Brunet *et al.* (2006) はトラフグとミドリフグのゲノム上で現存している重複遺伝子を用いて、トラフグ・ミドリフグ間における変異率を調べた結果、遺伝子対のどちらか一方における変異率は他方の遺伝子対のそれに比べ高いことを示した。そして、彼らは、トラフグ・ミドリフグ間の分岐年代とヒト・マウス間の分岐年代が近似していることを考慮すると、硬骨魚類では重複遺伝子の変異速度が速い為、変異による新機能の獲得や機能を分担化による種分化の機会も多いのではないかと指摘している。これらのことから、硬骨魚類系統において太古の時代に起こった全ゲノム重複という1回の大規模な染色体構造の変化は、全ゲノム重複直後の時代だけでなく、今なお魚類の多様性の拡大に大きな影響を与え続けているのではないかと考えられる。勿論、トラフグ・ミドリフグ間に認められるタンパク質の正の選択の痕跡は種分化の原因ではなく、種分化の結果であるという可能性は免れ得ない。現在、分化途上にある種内分集団において、重複遺伝子に記された正の選択の痕跡が検出できれば、魚類では重複遺伝子の進化が現在も種分化に寄与しているという仮説を強く支持する証拠となるであろう。全ゲノムレベルでゲノム配列の多様度を調べ、これを分集団間で比較できれば、重複遺伝子に記された正の選択の痕跡を検出できるかもしれない。このような研究には、本研究で作製したゲノム地図が強力な研究資源となる。実際、このような方向性の研究が進行中である (菊池潔博士, 私信)。

第 4 章
Figure and Table

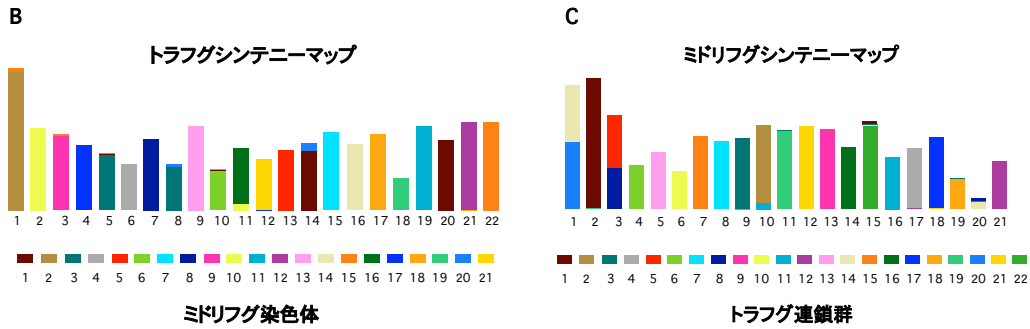
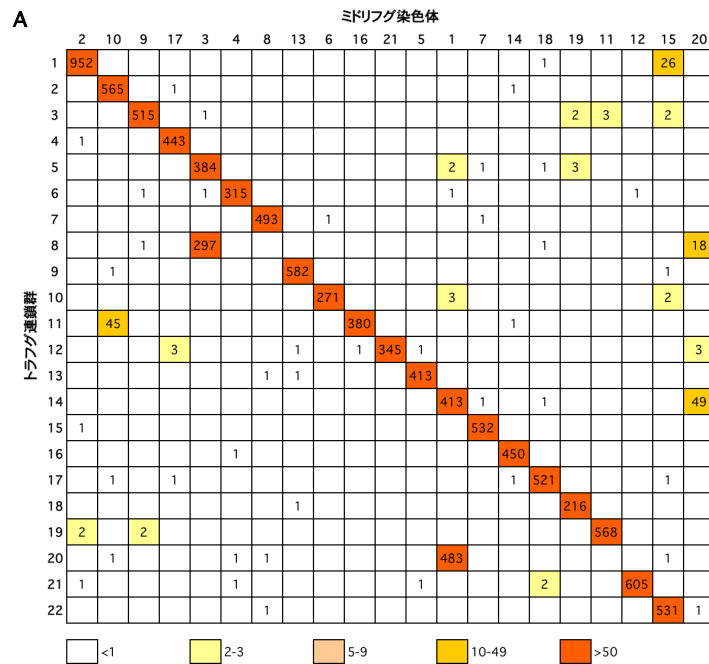


Figure 9. トラフグ・ミドリフグ間におけるOxford gridとシンテニーマップ

(A) トラフグ・ミドリフグ間のOxford grid. 縦軸にトラフグ連鎖群を、横軸にミドリフグ染色体を配置した。グリッド内の数字は2種間でオーソログス関係にある遺伝子対の数を示す。グリッド内に含まれるオーソログの数を5つのカテゴリーに分け、色分けして表した。(B) トラフグシンテニーマップ。Oxford gridにおいて、2個以上のオーソログを含むグリッドをシンテニーブロックとし、これらのシンテニーブロックのトラフグゲノム上の位置を示した。各シンテニーブロックはミドリフグ染色体に基づき色分けして表した。(C) ミドリフグシンテニーマップ。各シンテニーブロックはトラフグ連鎖群に基づき色分けして表した。

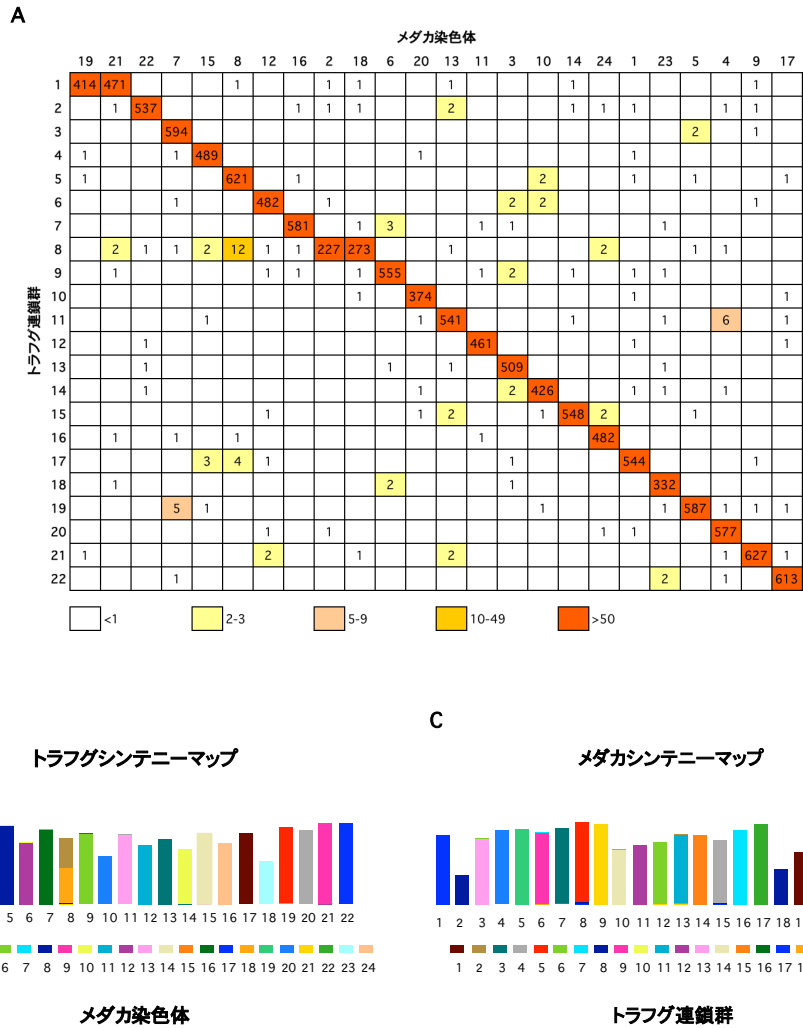
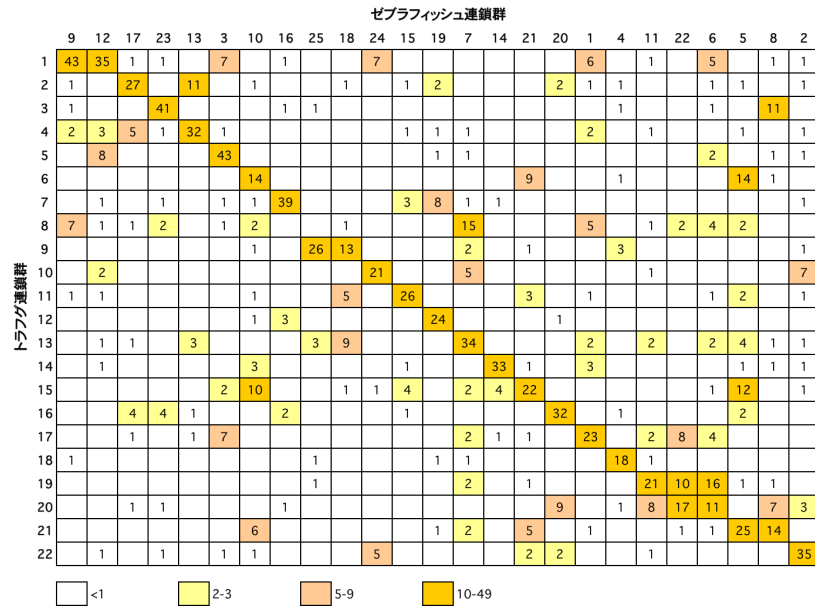


Figure 10. トラフグ・メダカ間におけるOxford gridとシンテニーマップ

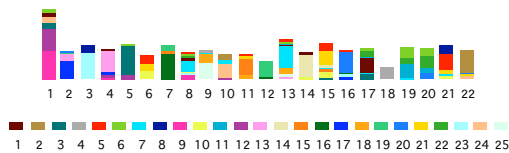
(A) トラフグ・メダカ間のOxford grid. 縦軸にトラフグ連鎖群を、横軸にメダカ染色体を配置した。グリッド内の数字は2種間でオーソログス関係にある遺伝子対の数を示す。グリッド内に含まれるオーソログの数を5つのカテゴリーに分け、色分けして表した。(B) トラフグシンテニーマップ。Oxford gridにおいて、2個以上のオーソログを含むグリッドをシンテニーブロックとし、これらのシンテニーブロックのトラフグゲノム上の位置を示した。各シンテニーブロックはメダカ染色体に基づき色分けして表した。(C) メダカシンテニーマップ。各シンテニーブロックはトラフグ連鎖群に基づき色分けして表した。

A



B

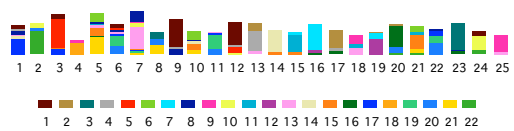
トラフグシンテニーマップ



ゼブラフィッシュ連鎖群

C

ゼブラフィッシュシンテニーマップ



トラフグ連鎖群

Figure 11. トラフグ・ゼブラフィッシュ間におけるOxford gridとシンテニーマップ

(A) トラフグ・ゼブラフィッシュ間のOxford grid. 縦軸にトラフグ連鎖群を, 横軸にゼブラフィッシュ連鎖群を配置した. グリッド内の数字は2種間でオーソログ関係にある遺伝子対の数を示す. グリッド内に含まれるオーソログの数を4つのカテゴリーに分け, 色分けして表した. (B) トラフグシンテニーマップ. Oxford gridにおいて, 2個以上のオーソログを含むグリッドをシンテニーブロックとし, これらのシンテニーブロックのトラフグゲノム上の位置を示した. 各シンテニーブロックはゼブラフィッシュ連鎖群に基づき色分けして表した. (C) ゼブラフィッシュシンテニーマップ. 各シンテニーブロックはトラフグ連鎖群に基づき色分けして表した.

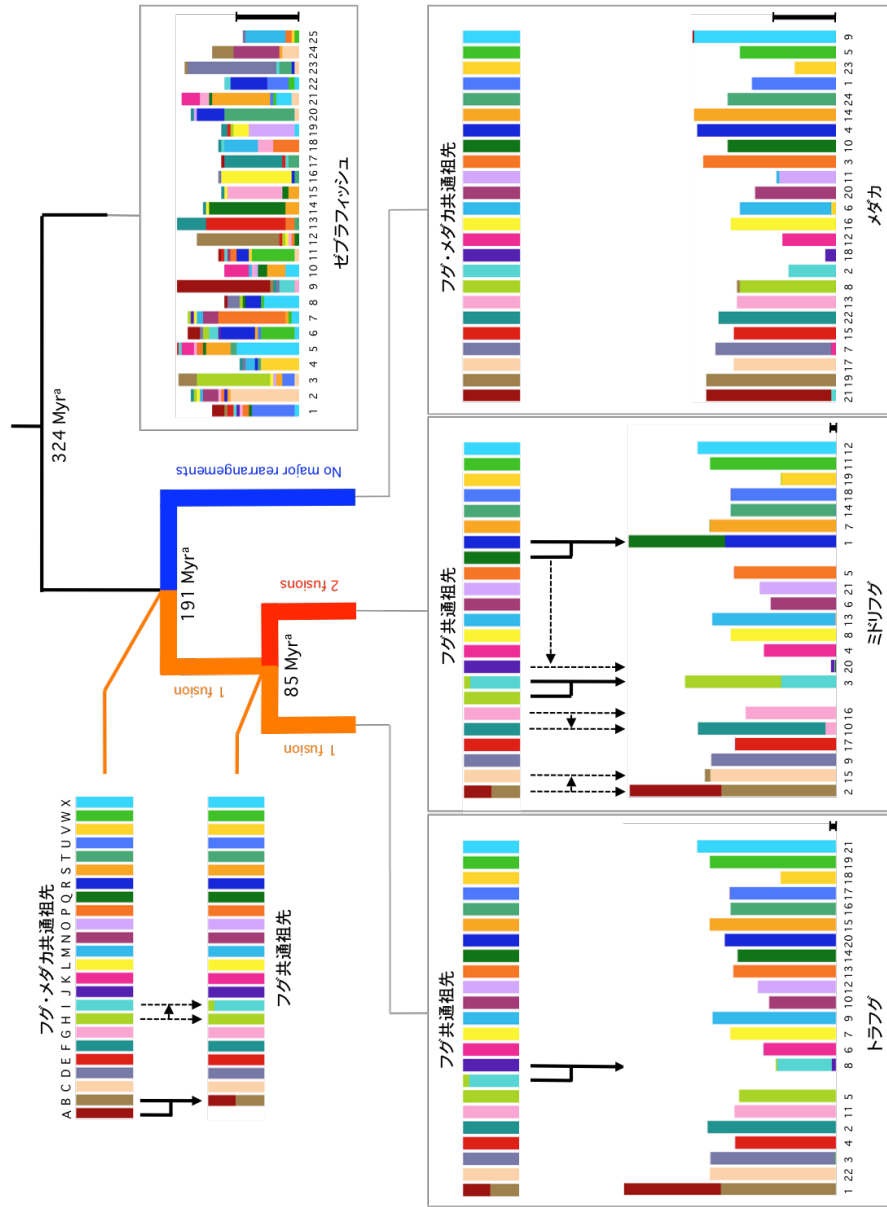


Figure 12. 硬骨魚類の染色体進化過程

フグ・メダカ共通祖先の24個の染色体をA-Xとし、染色体ごとに色分けして表した。トリアゲ、ミドリアゲ、メダカ、セブラフィッシュの各ゲノムを構成する連鎖ブロックは、フグ・メダカ共通祖先の染色体を構成するアンカーと同じ色で示す。各魚種の染色体上のアンカーの位置はフグ・メダカ共通祖先の染色体順に並べ表した。染色体の長さはアンカー内に含まれるオーソログの数に基づく。スケールは20個のオーソログを含む染色体サイズを表す。実線の矢印は大規模な染色体間再編成を、点線の矢印は小規模な染色体間再編成を示す。*各系統の分岐年代はYamanoue et al. (2006)に基づく。

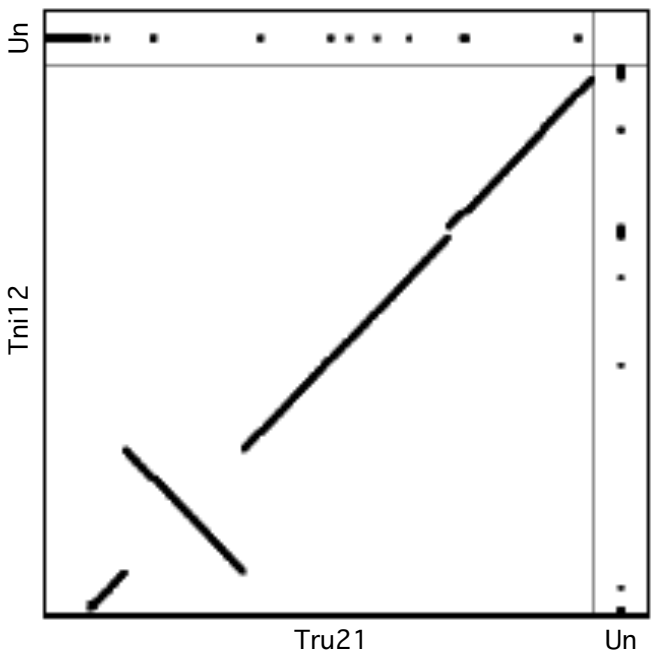
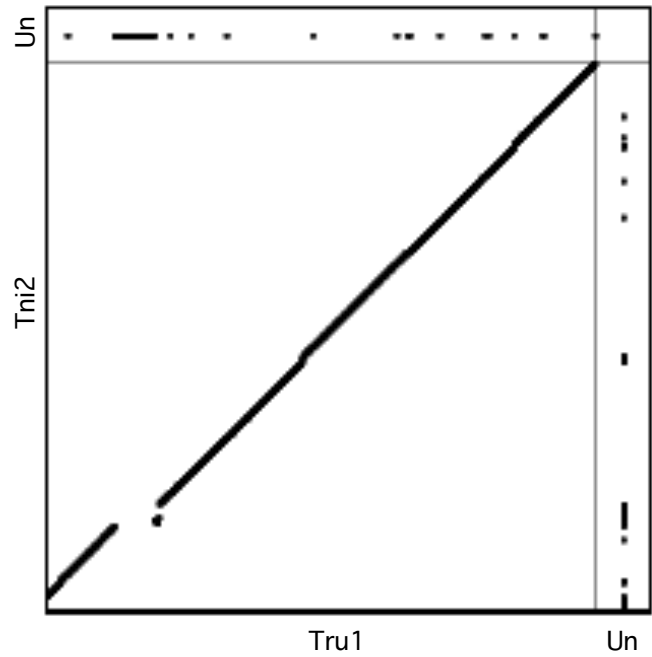


Figure 13. トラフグ・ミドリフグ間におけるオーソログの分布

横軸はトラフグ連鎖群(Tru)における遺伝子順序を、縦軸はミドリフグ染色体(Tni)における遺伝子順序を表す。両フグ間でオーソログ関係が成り立つ染色体対において、各染色体上のオーソログの位置をプロットした。各フグのゲノムアセンブリにおいて染色体上の位置が明らかになっていないオーソログは“Un”に分類した。

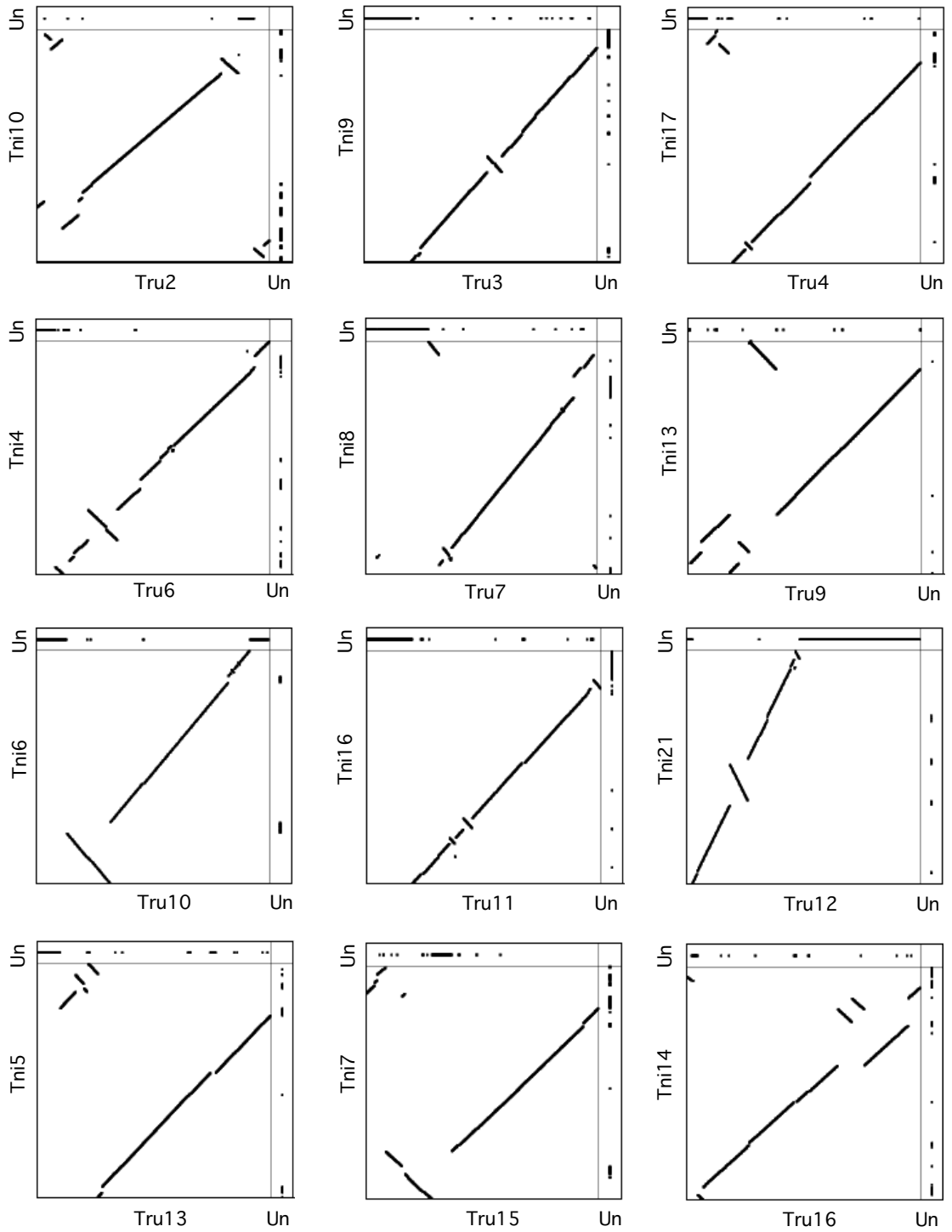


Figure 13. 続き

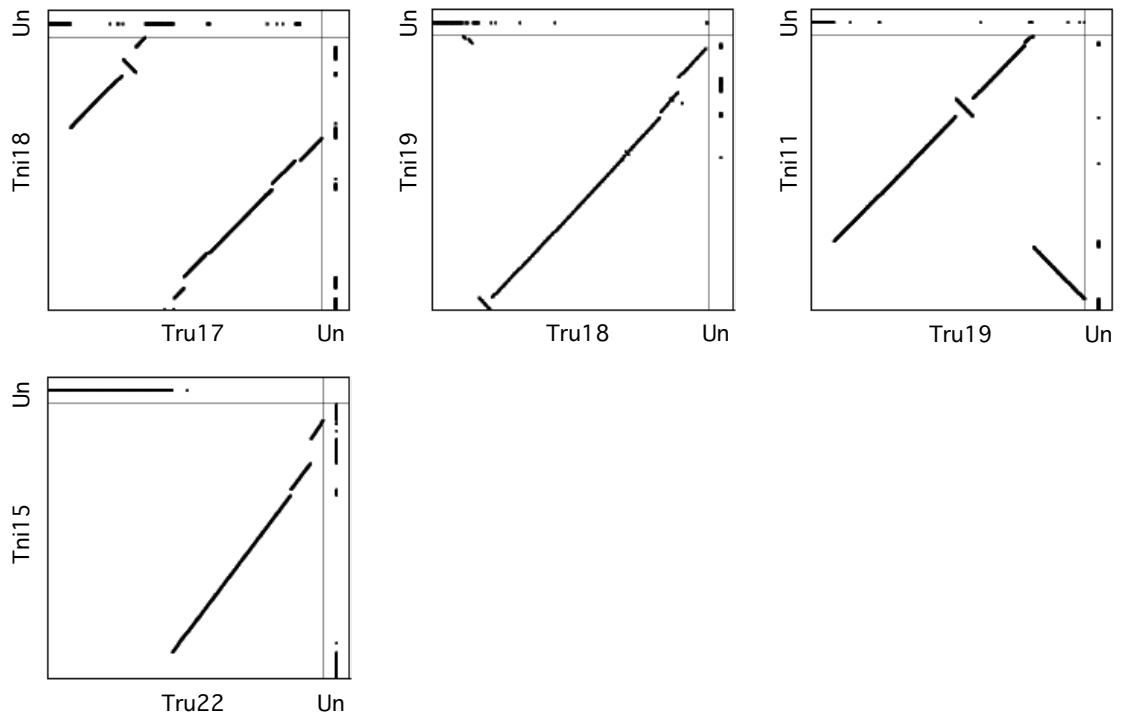


Figure 13. 続き

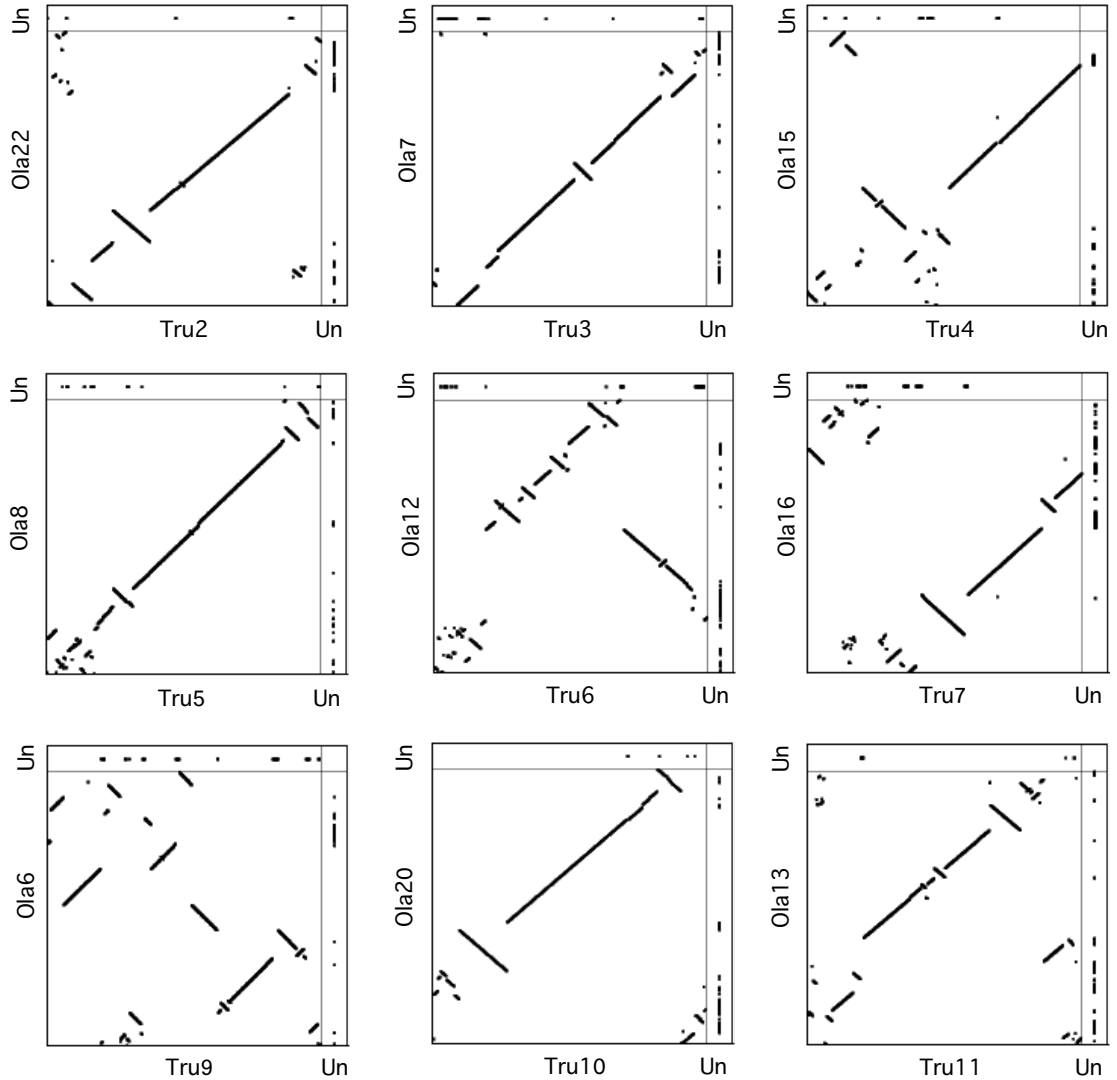


Figure 14. トラフグ・メダカ間におけるオーソログの分布

横軸はトラフグ連鎖群(Tru)における遺伝子オーダーを、縦軸はメダカ染色体(Ola)における遺伝子オーダーを表す。両魚種間でオーソログ関係が成り立つ染色体対において、各染色体上のオーソログの位置をプロットした。各魚種のゲノムアセンブリにおいて染色体上の位置が明らかになっていないオーソログは“Un”に分類した。

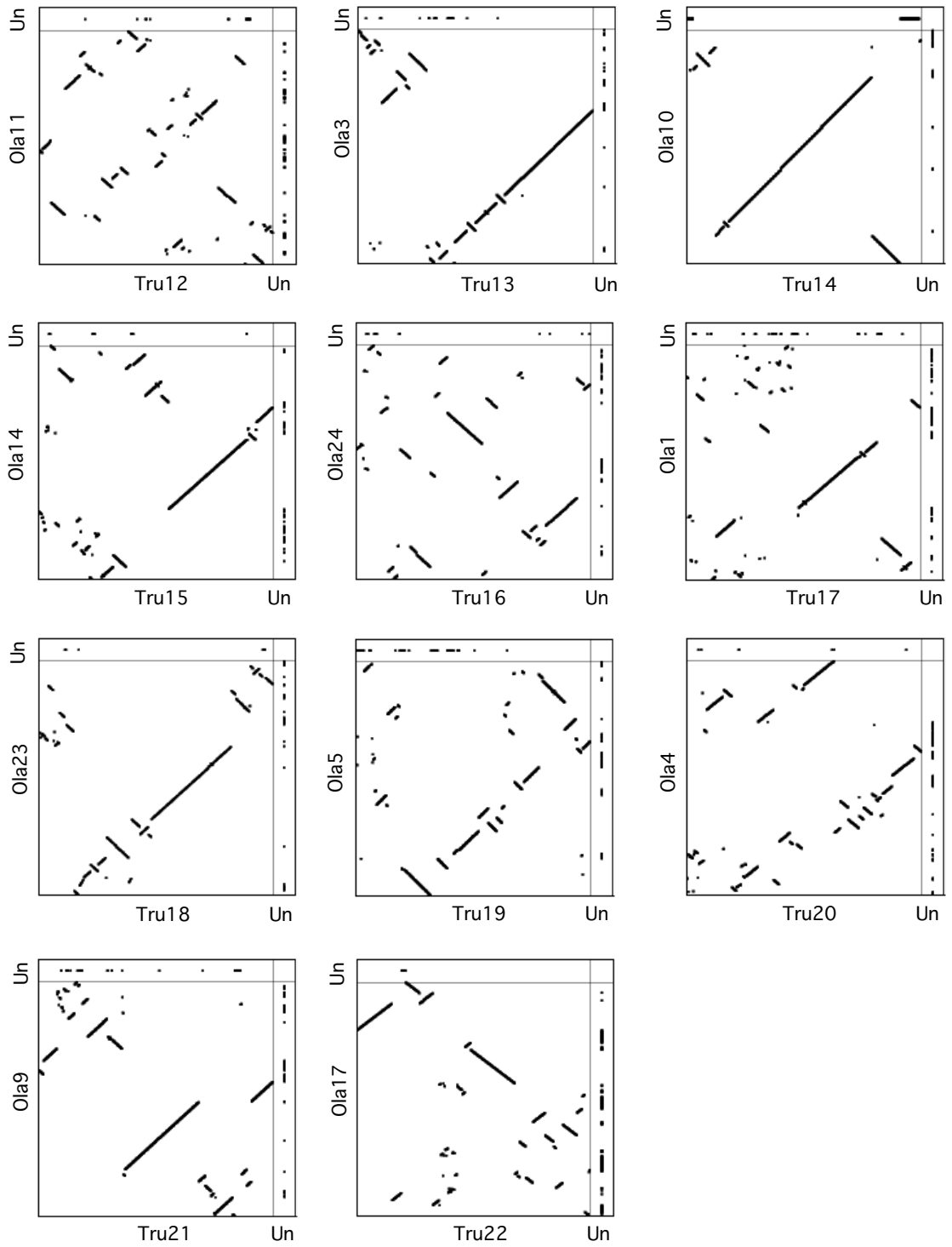


Figure 14. 続き

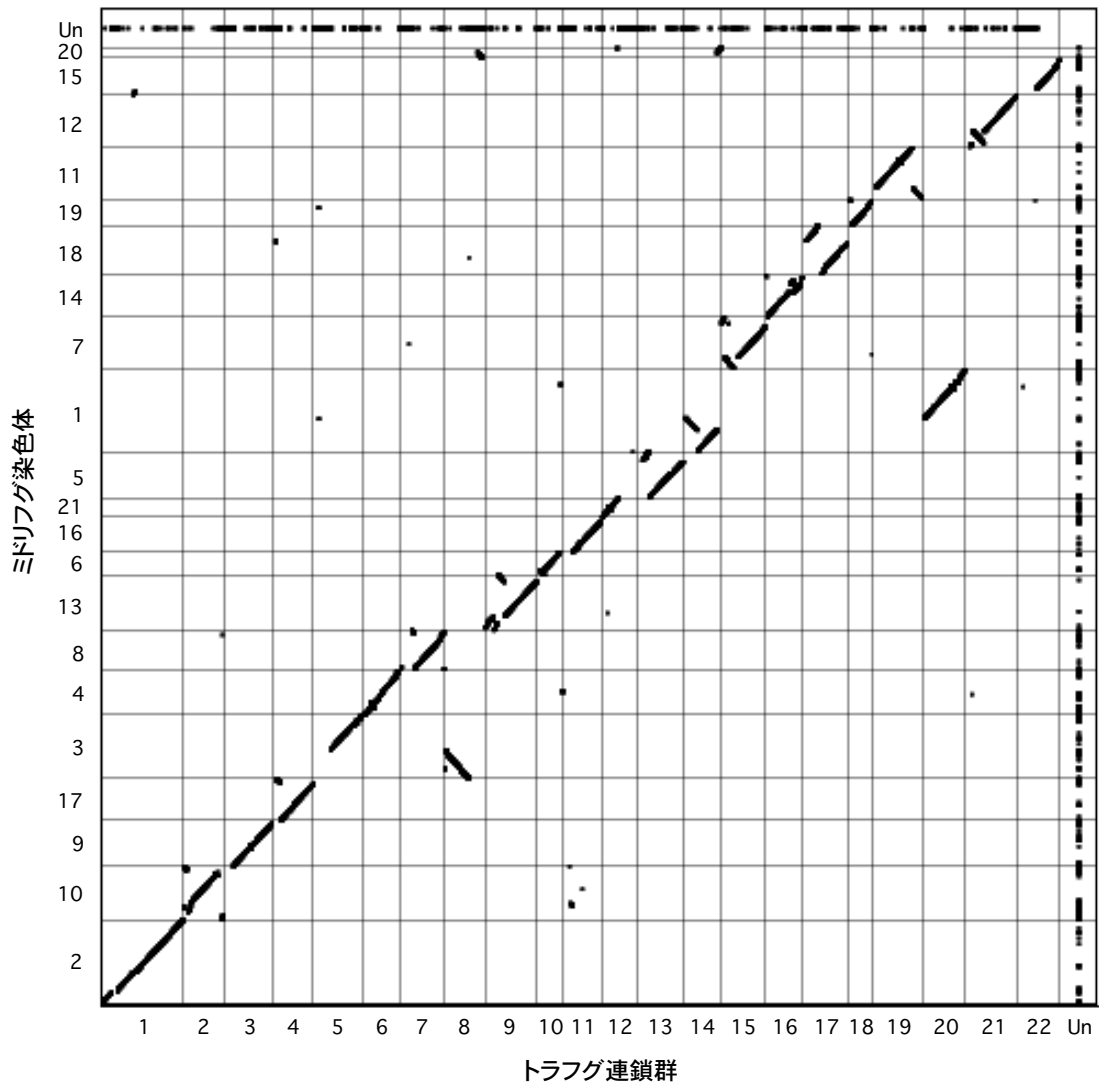


Figure 15. トラフグ・ミドリフグ間における遺伝コリアリティーの保存性

横軸はトラフグの各連鎖群とその内部の遺伝オーダーを、縦軸はミドリフグの各染色体とその内部の遺伝オーダーを表す。両フグ間でオーソログ関係が成り立つ遺伝子対をプロットした。各フグのゲノムアセンブリにおいて染色体上の位置が明らかになっていないオーソログは“Un”に分類した。

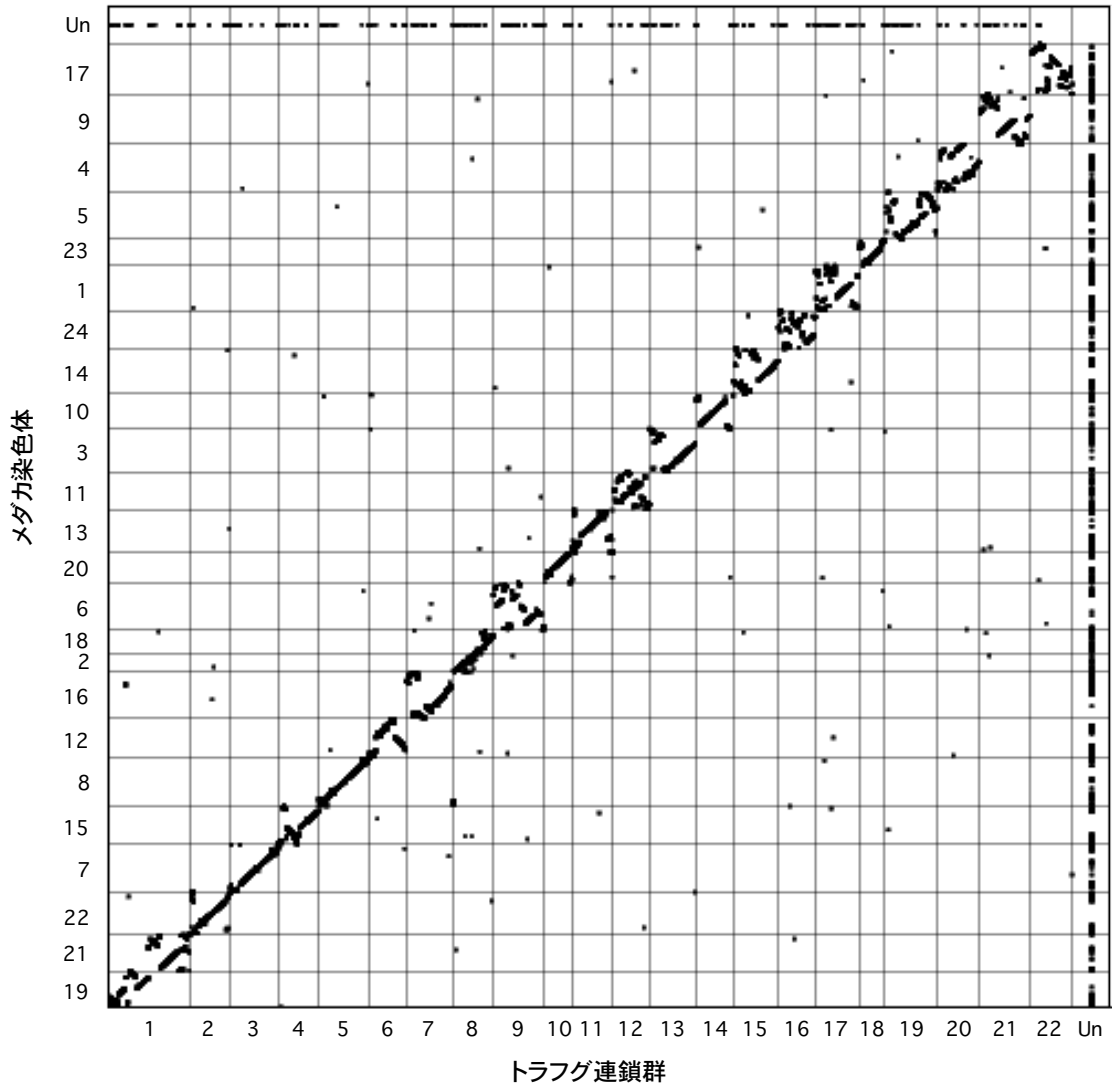


Figure 16. トコグ・メダカ間におけるジーンコリアリティーの保存性

横軸はトコグの各連鎖群とその内部のジーンオーダーを、縦軸はメダカの各染色体とその内部のジーンオーダーを表す。両魚種間でオーソログス関係が成り立つ遺伝子対をプロットした。各魚種のゲノムアセンブリにおいて染色体上の位置が明らかになっていないオーソログは“Un”に分類した。

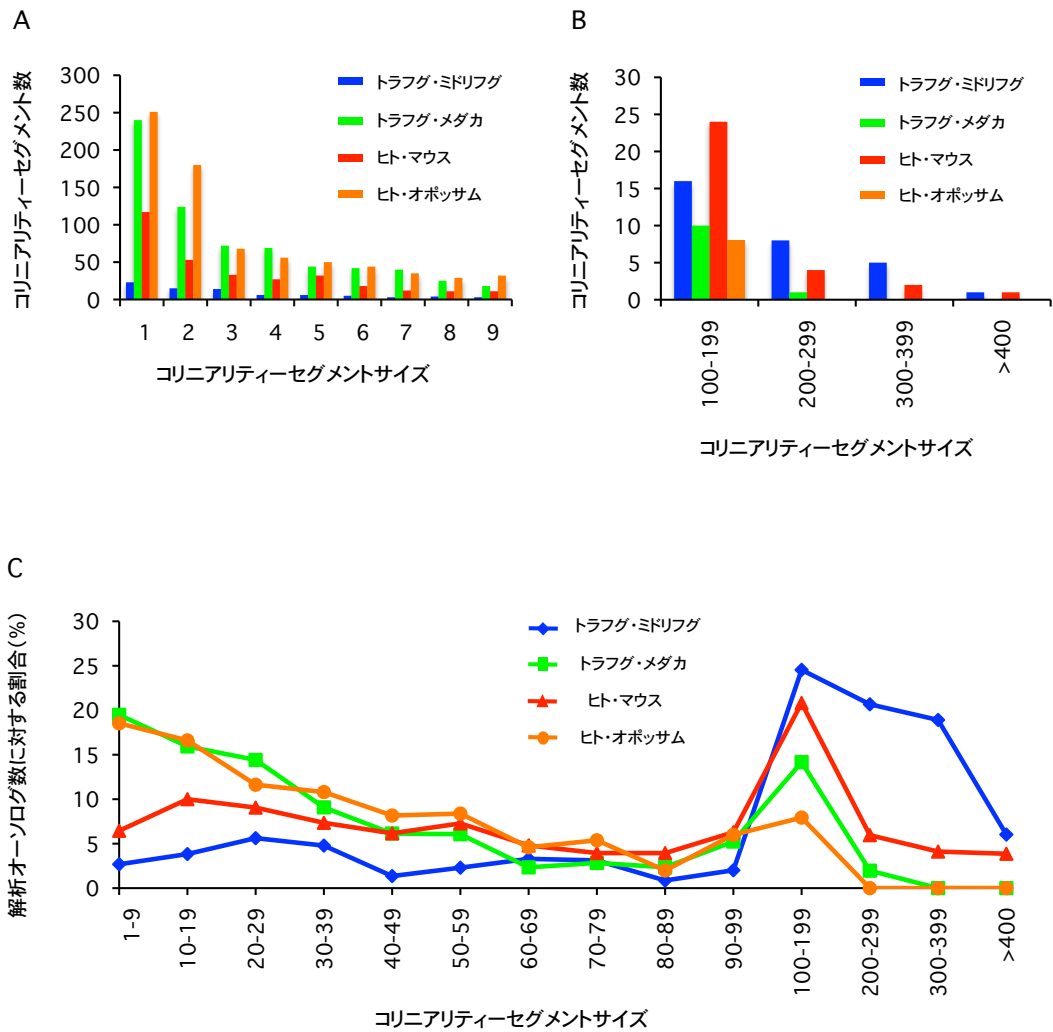


Figure 17. 各生物種間におけるコリアリティーセグメント数とそのサイズ

(A, B) 縦軸はコリアリティーセグメント数, 横軸はコリアリティーセグメントサイズをそれぞれ示す。セグメントサイズは1つのセグメントに含まれるオーソログの数に基づき区分した。(C) 縦軸は解析に用いた全オーソログに対する各セグメントサイズ区分に含まれるオーソログ数の割合を示す。横軸はコリアリティーセグメントサイズを示す。

Table 7. トラフグ・ミドリフグ間オーソログス染色体対におけるコリアリティーセグメント数および逆位回数

トラフグ連鎖群	ミドリフグ染色体	コリアリティーセグメント数 ^a		逆位回数
		n>2	n=1	
1	2	6	1	2
2	10	8	1	7
3	9	5	1	1
4	17	5	0	4
6	4	11	3	6
7	8	13	2	8
9	13	7	0	6
10	6	6	0	3
11	16	8	0	5
12	21	6	0	4
13	5	4	0	3
15	7	7	0	6
16	14	7	0	4
17	18	5	0	4
18	19	11	1	5
19	11	8	0	4
21	12	6	1	3
22	15	1	0	0

^anは1つのコリアリティーセグメント内に含まれるオーソログの数を示す。

Table 8. トラフグ・メダカ間オーソログ染色体対におけるコリアリティーセグメント数および逆位回数

トラフグ連鎖群	メダカ染色体	コリアリティーセグメント数 ^a		逆位回数
		n>2	n=1	
2	22	23	7	17
3	7	12	4	9
4	15	26	4	19
5	8	21	8	16
6	12	33	13	23
7	16	34	13	27
9	6	34	4	27
10	20	16	3	13
11	13	31	1	25
12	11	45	7	41
13	3	21	7	15
14	10	11	1	7
15	14	35	4	30
16	24	35	2	29
17	1	45	9	40
18	23	29	6	19
19	5	34	7	25
20	4	37	12	27
21	9	31	3	25
22	17	31	14	27

^anは1つのコリアリティーセグメント内に含まれるオーソログの数を示す.

Table 9. 各生物間におけるコリアリティーセグメント数およびオーソログ総数

コリアリティー セグメントの区分	コリアリティー セグメントサイズ ^a		トラフグ・ミドリフグ		トラフグ・メダカ		ヒト・マウス		ヒト・オポッサム	
	コリアリティー セグメント数	オーソログ総数	コリアリティー セグメント数	オーソログ総数	コリアリティー セグメント数	オーソログ総数	コリアリティー セグメント数	オーソログ総数	コリアリティー セグメント数	オーソログ総数
1	1	23	23	243	243	243	115	115	251	251
2	2	15	15	124	124	124	53	53	180	180
3	3	14	14	42	72	216	33	99	68	204
4	4	6	6	24	69	276	27	108	56	224
5	5	6	6	30	44	220	32	160	50	250
6	6	5	5	30	42	252	18	108	44	264
7	7	3	3	21	40	280	12	84	35	245
8	8	4	4	32	25	200	11	88	29	232
9	9	3	3	27	18	162	11	99	32	288
10	10-19	26	26	370	123	1,712	104	1,503	156	2,088
11	20-29	22	22	543	65	1,549	56	1,361	62	1,454
12	30-39	13	13	462	28	976	32	1,104	39	1,351
13	40-49	3	3	131	15	660	21	927	23	1,021
14	50-59	4	4	222	12	651	20	1,094	19	1,048
15	60-69	5	5	318	4	251	11	722	9	575
16	70-79	4	4	301	4	305	8	593	9	673
17	80-89	1	1	83	3	252	7	592	3	248
18	90-99	2	2	194	6	563	10	944	8	750
19	100-199	16	16	2,370	10	1,522	24	3,129	8	992
20	200-299	8	8	1,996	1	211	4	895	0	0
21	300-399	5	5	1,826	0	0	2	618	0	0
22	>400	1	1	582	0	0	1	581	0	0
合計	—	189	189	9,657	948	10,749	612	15,030	1,081	12,518

^a1個のコリアリティーセグメントに含まれるオーソログ数

Table 10. 各種間における染色体再編成頻度および速度

基準種 対象種	トラフグ		ミドリフグ		トラフグ		メダカ		ミドリフグ		メダカ		マウス		ヒト		オポッサム		マウス		オポッサム		
	ミドリフグ	トラフグ	ミドリフグ	トラフグ	メダカ	トラフグ	メダカ	トラフグ	ミドリフグ	メダカ	ミドリフグ	メダカ	マウス	ヒト	マウス	ヒト	オポッサム	ヒト	オポッサム	マウス	ヒト	オポッサム	マウス
基準種における遺伝子対の総数(B)	9,635	9,636	10,727	10,727	10,725	10,725	9,488	9,485	15,006	15,009	12,495	12,495	15,009	12,495	12,509	12,509	12,427	12,427	12,438	12,427	12,438	12,438	12,438
対象種における遺伝子対の総数(C)	9,466	9,445	9,801	9,801	9,809	9,809	8,716	8,739	14,416	14,389	11,427	11,427	14,389	11,427	11,399	11,399	11,281	11,281	11,202	11,281	11,202	11,202	11,202
ジーンプロキシミティの保存度 ^a	0.982	0.980	0.914	0.914	0.915	0.915	0.919	0.921	0.961	0.959	0.915	0.915	0.959	0.915	0.911	0.911	0.908	0.908	0.901	0.908	0.901	0.901	0.901
ジーンプロキシミティの切断度 ^b	0.018	0.020	0.086	0.086	0.085	0.085	0.081	0.079	0.039	0.041	0.085	0.085	0.041	0.085	0.089	0.089	0.092	0.092	0.099	0.092	0.099	0.099	0.099
BP-inter切断度 ^c	0.003	0.005	0.015	0.015	0.014	0.014	0.017	0.014	0.019	0.017	0.018	0.018	0.017	0.018	0.029	0.029	0.028	0.028	0.049	0.028	0.049	0.049	0.049
BP-intra切断度 ^d	0.015	0.015	0.071	0.071	0.071	0.071	0.065	0.065	0.021	0.024	0.067	0.067	0.024	0.067	0.060	0.060	0.064	0.064	0.050	0.064	0.050	0.050	0.050
分岐年代 ^e (Myr)	85	85	191	191	191	191	191	191	87	87	180	180	87	87	180	180	180	180	180	180	180	180	180
染色体再編成速度 ^f	2.06	2.33	4.52	4.52	4.47	4.47	4.26	4.12	4.52	4.75	4.75	4.75	4.75	4.75	4.93	4.93	5.12	5.12	5.52	5.12	5.52	5.52	5.52
BP-inter速度 ^g	0.33	0.60	0.81	0.81	0.74	0.74	0.88	0.73	2.15	1.98	1.01	1.01	1.98	1.01	1.62	1.62	1.57	1.57	2.74	1.57	2.74	2.74	2.74
BP-intra速度 ^h	1.73	1.73	3.71	3.71	3.73	3.73	3.38	3.38	2.37	2.77	3.74	3.74	2.77	3.74	3.31	3.31	3.55	3.55	2.78	3.55	2.78	2.78	2.78

^aジーンプロキシミティの保存度はC/Bとした。

^bジーンプロキシミティの切断度は (B-C)/Bとした。

^cBP-interは染色体間の再編成により生じた切断数とし、その切断度をBP-inter/Bとした。

^dBP-intraは染色体内の再編成により生じた切断数とし、その切断度をBP-intra/Bとした。

^e各種間の分岐年代は、それぞれ Yamanoue *et al.* (2006), Springer *et al.* (2003) および Mikkelsen *et al.* (2007) に基づく。

^f染色体再編成速度は(B-C)/B/Myr/10⁻⁴とした。

^gBP-inter速度はBP-inter/B/Myr/10⁻⁴とした。

^hBP-intra速度はBP-intra/B/Myr/10⁻⁴とした。

有用遺伝子を同定するためのモデル魚類としてのトラフグ

本研究では 1,220 個のマイクロサテライトマーカーから構成されるトラフグ高密度連鎖地図を作製した。この地図の連鎖群数はトラフグハプロイド染色体数に一致した。さらに、マーカー連鎖率が 98.9%を示したことから、連鎖地図は全ゲノム領域をほぼ網羅していると考えられた。従って、本連鎖地図はトラフグの遺伝形質を解析するにあたり、極めて利便性の高い研究基盤となるであろう。現在、東京大学水産実験所では、この連鎖地図を用いて、トラフグ養殖において有用な形質となる性決定、耐病性、行動、成長に関する遺伝子座の同定が進められている (Kikuchi *et al.*, 2007; 木戸慎一氏と細谷将博士, 私信)。今後、これらの成果を基にトラフグ養殖において MAS を適用した品種改良が期待される。

他の養殖魚においても MAS による品種改良を目指した連鎖地図の作製が行われ、養殖上有用とされる形質に関与した遺伝子座の同定に向けた研究も進みつつある。そして、有用形質に関する遺伝子座に連鎖した DNA マーカーもいくつか得られてきた。中には、有用遺伝子座の情報を基に、有用品種の確立に成功した事例もある (Fuji *et al.*, 2007)。しかし、今後、養殖業において MAS を効果的に適用する為には、有用形質に関する遺伝子を持つ個体を確実に選抜することが可能なマーカーが必要となる。つまり、MAS に使用するマーカーは有用形質を支配する責任遺伝子自体であることが望ましい。ところが、ゲノム情報に乏しい多くの魚種では、マーカーを任意の位置に設定することが不可能な為、一旦、有用遺伝子座の大まかな位置が同定できても、より近傍に存在するマーカーを得るには、マーカーの高密度化を全ゲノムレベルで行わなくてはならない。この作業には多大な努力と時間が必要となる。一方、トラフグでは本研究により連鎖地図とゲノム概要配列が対応付けられたことから、配列情報を参照しながらマーカーを任意の位置で作製することが可能であり、一旦、有用遺伝子座の位置がおおよそ決まれば、その近傍に位置するマーカーを迅速に得ることができる。従って、連鎖地図とゲノム配列情報という 2 つのゲノム科学の基盤が揃ったトラフグは有用遺伝子座を同定する為の重要なモデル養殖魚になると期待される。また、塩基長あたりの乗換え率が高いというトラフグの生物学的特徴も、有用遺伝子座の同定に大きく寄与すると考えられる。

比較的最近に起こった硬骨魚類のゲノム進化

本研究では、トラフグゲノム配列の染色体上の位置情報を用いて、トラフグ、ミドリフグ、メダカを中心として硬骨魚類のゲノム構造を比較し、約 18,400 - 19,900 万

年前から現代に至るまでの染色体進化の過程を詳細に解析した。この結果、これら3種の最終共通祖先から現存する各魚種に至る染色体進化の過程の中で起こった染色体間の再編成事象はごくわずかであることが明らかになった。一方、染色体内の再編成事象は、無脊椎動物の研究から予測される結果に反し、その頻度は硬骨魚類と哺乳類の間で明確な差は認められなかった。これらのことから、硬骨魚類系統の染色体進化パターンはこれまで報告されている無脊椎動物や哺乳類のそれとは異なり、独自の染色体進化パターンを持っているものと考えられ、硬骨魚類における多様性の拡大や種分化は、染色体の構造変化に頼らない、何か別の機構によって引き起こされている可能性が示された。

勿論、本研究により明らかにした染色体進化のパターンがフグ系統に特異的なものである可能性も残されている。今後、他の魚種において同様の研究が行われることで、本研究により明らかにした染色体進化のパターンが硬骨魚類に一般的に認められるものであるか否かが明らかになると期待される。

トラフグをはじめとしたモデル魚類ゲノムの応用性

モデル魚に認められたゲノム構造の高い保存性はモデル魚以外の魚種の遺伝学的研究を行う上で大きな利点となる可能性がある。上記で述べたように、多くの養殖魚においてMASを適用した育種の展開が期待されており、連鎖地図の作製や有用形質を示す遺伝子座の同定に向けた研究が行われている。しかし、ほとんどの魚種においては、ゲノム配列情報が乏しい為、有用遺伝子座の詳細な解析が制限された状況にある。その為、個々の養殖魚においてゲノム配列情報の蓄積が望まれているが、多岐に渡る魚種全てにおいてゲノム配列を解読することは未だ困難である。しかし、本研究により同じ棘鱗上目に属し、かつ、棘鱗上目内部における位置関係が比較的遠縁なトラフグ・メダカ間のゲノム構造が高い保存性を示したことから (Yamonoue *et al.*, 2006)、同じ棘鱗上目に属する多くの養殖魚のゲノム構造もトラフグやメダカあるいはフグ・メダカ共通祖先のゲノム構造に類似していると考えられる。すなわち、これらのゲノム構造を参照することで、ゲノム配列情報に乏しい魚種であっても、ゲノム構造を推定することが可能なのである。さらに、トラフグやメダカなどのモデル魚類のゲノム情報を用いて、多くの魚種で汎用性のある多型マーカーが開発できれば、ゲノム配列情報の乏しい養殖魚であっても、連鎖地図の作製やマーカーの高密度化を容易に行うことが可能となるであろう。仮に、汎用性マーカーが有効な養殖魚があったとして、この魚種で連鎖地図を作製する場合、トラフグやメダカにおける汎用性マーカーの染色体上の位置情報を参照することで、マーカー間の連鎖関係はある程度予め予測できる。その為、連鎖地図作製の労力が軽減され、さらに、地図作製と同時にモ

デル魚類のゲノム構造と比較が可能となる。

また、汎用性多型マーカーは連鎖地図の作製のみならず、養殖上有用な形質を示す遺伝子座の探索にも非常に有効であると考えられる。例えば、ある養殖魚において有用形質に関する遺伝子座に連鎖した汎用性多型マーカーが得られた場合、他の養殖魚において同様の有用遺伝子座が存在するか否か、同じマーカーで容易に調べることが可能となる。

本研究においてトラフグ連鎖地図の作製、ゲノム配列の整序化、そして硬骨魚類の比較ゲノム解析を行ったことで、トラフグのゲノム配列情報をトラフグの遺伝形質の解析のみならず、他の養殖魚の遺伝形質の連鎖解析に活用できる可能性が見えてきた。本研究の成果が今後の水産養殖の発展に寄与することを期待する。

論文内容の要旨

近年、ゲノム解読の進む一部の農業生物では、ゲノム情報を遺伝学的解析に活用することにより有用遺伝子座に関する情報の蓄積が急速に進み、これが品種改良の大幅な効率化に寄与すると期待されている。いくつかの養殖魚においても、有用遺伝子座の同定による新品種作出に向けて、遺伝子座の解析基盤である連鎖地図の作製が進んでいる。しかし、ほとんどの養殖魚でゲノム解読計画は進んでおらず、農業生物のようなゲノム情報に基づく遺伝学的解析はなされていない。そうした中で、トラフグはゲノム概要配列が公開された例外的な養殖対象魚であり、魚類ゲノムのモデルとして注目されてきた。しかし、連鎖地図が存在しなかった為、ゲノム配列情報を遺伝形質と結び付けることはできなかった。また、こうしたモデル生物のゲノム配列情報を種間で比較することで、ゲノムが解読されていない非モデル生物のゲノム構造を推定し、連鎖解析の効率化に結び付ける試みが穀物などでなされているが、トラフグの概要配列は断片化された状態 (scaffold) でデータベースに登録されており、各 scaffold の染色体上の位置が不明である為、ゲノム構造を比較するための研究資源とはなり得なかった。トラフグのゲノム情報を有効に活用するには、何よりも連鎖地図の作製が重要なのである。

本研究では、まず、トラフグ養殖においてゲノム情報を活用した遺伝学的解析の基盤を得る為、連鎖地図の作製を行い、連鎖地図と概要配列を統合したゲノム地図を作製した。次に、多くの養殖魚を含む非モデル魚のゲノム構造を推定する基礎として、トラフグのゲノム地図を、他のモデル魚類のゲノム地図と比較し、硬骨魚類のゲノム構造の類似性や進化過程を明らかにした。これにより、トラフグのゲノム情報をトラフグのみならず、他の多くの養殖魚の効率的な育種へと応用していく基盤を整備することができた。

第1章 トラフグ連鎖地図の作製

マイクロサテライト (MS) 配列は、真核生物のゲノム上に広く散在しており、個体レベルでの多型性が著しく高いことから、この配列を DNA マーカーとした連鎖地図の作製が多くの生物種において行われている。しかし、ゲノム配列情報に乏しい生物種では、マーカーを作製するにあたり、MS 配列を含む領域の配列を決定しなければならず、膨大な労力を必要とする。一方、ゲノム配列が公開されている生物種では、ゲノム情報を参照することで、MS 座のマーカーを容易に作製することが可能である。そこで、公開されたトラフグゲノムデータベースの中から MS 配列を探索し、これを DNA マーカーとしたトラフグ連鎖地図の作製を行った。その結果、200 個のマーカー

一から構成される 22 個の連鎖群を得た。マーカー連鎖率は 94.3%を示したことから、本地図はトラフグの全ゲノム領域をほぼ網羅するものと考えられた。各 scaffold 上に存在するマーカー間の遺伝距離をもとに scaffold を整序した結果、合計 39 Mb の配列が連鎖地図上に位置付けられた。以上により、トラフグの遺伝形質の解析基盤、および、トラフグのゲノム構造を他のモデル魚類のゲノム構造と比較する為の研究基盤を作り出すことができた。

第 2 章 連鎖地図を利用した硬骨魚類の比較ゲノム解析

近年、多くの生物種においてゲノム解読が進展し、各生物の染色体進化の過程が明らかになりつつある。魚類においても、2005 年の時点で、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのゲノムを用いた比較解析がそれぞれ報告されていた。これらの解析はいずれも、脊椎動物の共通祖先ゲノム構造の推定と硬骨魚類系統における太古の染色体再編成の理解に焦点を当てていた。一方、多くの養殖魚は棘鱗上目に属し、これら各魚種の共通祖先は約 2 億年前に存在したと考えられている。つまり、モデル魚類のゲノム構造から非モデル魚類のゲノム構造を推定するには、硬骨魚類の染色体進化において、比較的最近に起きた事象を理解する必要がある。そこで、本章では、第 1 章で明らかになったトラフグ遺伝子のゲノム上の位置情報をミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュのそれと比較し、染色体進化において比較的最近起きた再編成事象の理解に焦点を当てた。その結果、トラフグと各魚種間（特にミドリフグとメダカ）のシンテニーは高い保存性を示した。また、シンテニーの保存性の度合いを魚類間と哺乳類間で比較したところ、哺乳類間に比べ魚類間のシンテニーの保存性は極めて高かった。したがって、魚類と哺乳類では染色体進化のパターンが異なっており、硬骨魚類の染色体進化の過程では染色体間再編成事象が哺乳類と比べて少なかったと考えられた。

第 3 章 トラフグ連鎖地図の高密度化

前章での比較解析に利用した配列は公開されたトラフグ概要配列の 10%程度であった為、硬骨魚類の染色体進化を正確に把握するには至っていなかった。より詳細な比較を行うには、より多くの遺伝子のゲノム上の位置を知る必要がある。2005 年のトラフグ・ゲノムアセンブリの更新により scaffold 間のギャップが埋められたので、比較的少数の scaffold を連鎖地図に位置付けることで、全ゲノム配列を染色体レベルで再構築できると考えられた。そこで、サイズの大きな scaffold から得た多型マーカーを中心として、トラフグ連鎖地図の高密度化を行った。第 1 章で得た 212 個の多型

マーカーに加え、新たに 1021 個のマーカーを作製し、これらのマーカー座の連鎖関係をもとに連鎖地図を作製した。その結果、1,220 個のマーカーから構成される 22 個の連鎖群を得た。749 個の scaffold に存在するマーカー間の遺伝距離をもとに各 scaffold を整序した結果、合計 337 Mb の配列が連鎖地図上に位置付けられた。この内、195 個の scaffold については連鎖群上の方向性まで明らかとなった。より多くの scaffold の方向性を明らかにするため、330 個のマーカーについて、別途に作出した解析家系を用いて連鎖解析を行った。その結果、さらに 83 個を加えた合計 278 個の scaffold について連鎖群上の方向性を明らかにした。すなわち、トラフグ連鎖地図と概要配列の統合により、概要配列の 86%にあたる 338 Mb の配列を連鎖群上に再構築し、この内、282 Mb の配列については連鎖群上の方向性まで明らかにすることができた。

第 4 章 硬骨魚類における染色体進化過程の推定

様々な生物種においてゲノム解読が進んだことで、ゲノム構造の比較研究により、太古の共通祖先生物のゲノム構造を推定することが可能となった。さらに近年では、多様な生物種が生まれてきた歴史を推定する為、比較的最近生じたゲノム再編成を解明しようという動きも盛んになりつつある。トラフグとミドリフグの分岐年代は約 7300 - 9600 万年前と推定されている。近似した年代に分岐した哺乳類にヒトとマウスが挙げられる（約 8700 万年前）。そして、両種のゲノム構造の間には多くの染色体間再編成が認められている。また、無脊椎動物で同様の範囲に分岐年代を示すショウジョウバエの種間（約 6300 万年前）では、染色体間再編成が少なく、染色体内再編成が高い頻度で生じているという進化パターンが明らかとなっている。ここでは、トラフグとミドリフグのゲノム構造の比較を中心としながら、メダカやゼブラフィッシュのデータを加えて、魚類の染色体進化過程を詳細に解析し、そのパターンを哺乳類や無脊椎動物のパターンと比較した。まず、両フグ間のシンテニーの保存性を調べた結果、両魚種のハプロイド染色体中（トラフグ 22 本、ミドリフグ 21 本）、18 組の染色体が 1:1 関係を保持しており、ほとんどの染色体はフグ目の共通祖先から分岐して以降、染色体間再編成を受けていなかった。次に、フグのデータにメダカとゼブラフィッシュのゲノムデータを加えて解析を行ったところ、フグ・メダカの共通祖先から両フグに至る系統で起きた数少ない染色体間再編成の歴史を推定できた。さらに、両フグ間のジーンオーダーの保存性を調べた結果、ジーンオーダーは非常に良く保存されており、染色体間再編成に加え、染色体内再編成もほとんど起こっていなかった。この染色体進化のパターンは哺乳類や無脊椎動物で示されている進化のパターンとは異なっていた。最後に、両フグ間で認められた染色体間および染色体内の再編成頻

度と両フグの推定分岐年代をもとにゲノム再編成速度を算出し、トラフグ・メダカ間や哺乳類間のゲノム再編成速度と比較した。この結果、両フグ間で認められる再編成速度はトラフグ・メダカ間のその1/2程度であった。また、両フグとほぼ同時期に分岐したとされるヒト・マウス間の再編成速度は両フグ間の再編成速度の約2倍であった。これらのことから、フグに至る硬骨魚類のゲノム再編成速度は時代を下ると共に低下傾向にあることが示唆された。

以上、トラフグ高密度連鎖地図の作製により、トラフグ養殖においてゲノム情報を活用した効率的な育種法を適用する為の基盤が形成された。また、連鎖地図と概要配列を統合したことで、ゲノム配列の大部分を染色体レベルで再構築できた。得られたデータを用いて他のモデル魚類のゲノム構造と比較した結果、硬骨魚類のゲノム構造は哺乳類と比較して著しく保存性が高いことが示され、モデル魚類のゲノム構造から非モデル魚類のゲノム構造を精密に推定できると考えられた。今後、非モデル魚類の連鎖解析にトラフグを含むモデル魚類のゲノム配列情報が活用されることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり，終始御指導，御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教授 鈴木讓博士に深く感謝致します．研究遂行に際して，終始適切な御指導，御助言を賜った同実験所助教 菊池潔博士，末武弘章博士に深く感謝致します．また，実験魚の飼育および飼育技術を教えて頂いた同実験所 水野直樹技術官，城夕香技術官に深く感謝致します．DNA マーカーの多型情報の収集にあたり，Institute of Molecular and Cell Biology, Byrappa Venkatesh 博士ならびにその研究室の方々に御協力頂いたことを深く感謝致します．トラフグセントロメア近傍配列の塩基配列情報を寄与して頂いた水産総合研究センター養殖研究所 藤原篤志博士に深く感謝致します．研究遂行に際して，御協力頂いた諸先輩方ならびに後輩方に深く感謝致します．

最後に，これまで温かく見守ってくれた家族に心より感謝致します．

参考文献

- Amores, A., Force, A., Yan, Y., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y., Westerfield, M., Ekker, M., and Postlethwait, J. H., (1998) Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science* **282**: 1711-1714
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M. D. S., Roach, J., Oh, T., Ho, I. Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S. F., Clark, M. S., Edwards, Y. J. K., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S. V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y. H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., and Brenner, S., (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* **297**: 1301-1310
- Araki, H., Berejikian, B. A., Ford, M. J., and Blouin, M. S., (2007) Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evolutionary Applications*. **1**: 342-355
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., and Nakayama, I., (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* **62**: 727-730
- Beye, M., Gattermeier, I., Hasselmann, M., Gempe, T., Schioett, M., Baines, J. F., Schlipalius, D., Mougél, F., Emore, C., Rueppell, O., Sirviö, A., Guzmán-Novoa, E., Hunt, G., Solignac, M., and Page Jr., R. E., (2006) Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. *Genome Res.* **16**: 1339-1344
- Bourque, G., Pevzner, P. A., and Tesler, G., (2004) Reconstructing the genomic architecture of ancestral mammals: Lessons from human, mouse, and rat genomes. *Genome Res.* **14**: 507-516
- Bourque, G., Zdobnov, E. M., Bork, P., Pevzner, P. A., and Tesler, G., (2005) Comparative architectures of mammalian and chicken genomes reveal highly variable rates of genomic rearrangements across different lineages. *Genome Res.* **15**: 98-110

- Bouza, C., Hermida, M., Pardo, B. G., Fernández, C., Fortes, G. G., Castro, J., Sánchez, L., Presa, P., Pérez, M., Sanjuán, A., Carlos, A., Álvarez-Dios, J. A., Ezcurra, S., Cal, R. M., Piferrer, F., and Martínez, P., (2007) A microsatellite genetic map of the Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* **177**: 2457-2467
- Brenner, S., Elgar, G., Sanford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S., (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* **366**: 265-268
- Brunet, F. G., Crollius, H. R., Paris, M., Aury, J. M., Gibert, P., Jaillon, O., Laudet, V., and Robinson-Rechavi, M., (2006) Gene loss and evolutionary rate following whole-genome duplication in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 1808-1816
- Chen, Z. J., and Ni, Z., (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays* **28**: 240-252
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A. S., Tsigenopoulos, B., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A., and Volckaert, F. A. M., (2005) A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* **170**: 1821-1826
- Christoffels, A., Koh, E. G. L., Chia, J. M., Brenner, S., Aparicio, S., and Venkatesh, B., (2004) Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 1146-1151
- Clark, M. S., Smith, S. F., and Elgar, G., (2001) Use of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) in comparative genomics. *Mar. Biotechnol.* **3**: S130-S140
- Cnaani, A., Hallerman, E. M., Ron, M., Weller, J. I., Indelman, M., Kashi, Y., Gall, G. A. E., and Hulata, G., (2003) Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid. *Aquaculture* **223**: 117-128
- Coimbra, M. R. M., Kobayashi, K., Koretsugu, S., Hasegawa, O., Ohara, E., Ozaki, A., Sakamoto, T., Naruse, K., and Okamoto, N., (2003) A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **220**: 203-218

- Comai, L., (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 836-846
- Crollius, H. R., Jaillon, O., Dasilva, C., Ozouf-Costaz, C., Fizames, C., Fischer, C., Bouneau, L., Billault, A., Quetier, F., Saurin, W., Bernot, A., and Weissenbach, J., (2000) Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res.* **10**: 939-949
- Crow, K. D., Stadler, P. F., Lynch, V. J., Amemiya, C., and Wagner, G. P., (2006) The “fish-specific” Hox cluster duplication is coincident with the origin of teleosts. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 121-136
- Dehal, P., and Boore, J. L., (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* **3**: e314
- DeWoody, J. A., and Avise, J. C., (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* **56**: 461-473
- Dib, S., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Kazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., and Weissenbach, J., (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154
- Dietrich, W., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M. J., Ingalls, K. A., Taraj, O’connorevans, C. A., Deangelis, M. M., David, M., Levinsonkruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Hawkins, T. L., Stein, L., Page, D. C., and Lander, E. S., (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149-152
- Drosophila* 12 Genomes Consortium, (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**: 203-218
- Edwards, J. H., (1991) The Oxford Grid. *Ann. Hum. Genet.* **55**: 17-31

- Edwards, M. D., and Page, N. J., (1994) Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 376-382
- Edwards, Y. J. K., Elgar, G., Clark, M. S., and Bishop, M. J., (1998) The identification and characterization of microsatellite in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J. Mol. Biol.* **278**: 843-854
- Elgar, G., Clark, M. S., Meek, S., Smith, S., Warner, S., Edwards, Y. J. K., Bouchireb, N., Cottage, A., Yeo, G. S. H., Umrania, Y., Williams, G., and Brenner, S., (1999) Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning. *Genome Res.* **9**: 960-971
- Erickson, D. L., Fenster, C. B., Stenoien, H. K., and Prices, D., (2004) Quantitative trait locus analysis and the study of evolutionary process. *Mol. Ecol.* **13**: 2505-2522
- Fadiel, A., Anidi, I., and Eichenbaum, K. D., (2005) Farm animal genomics and informatics: an update. *Nucleic Acids Res.* **33**: 6308-6318
- Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Crollius, H. R., Dasilva, C., Jaillon, O., Bouneau, L., Bonillo, C., Weissenbach, J., and Bernot, A., (2000) Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**: 50-55
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., Postlethwait, J., (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531-1545
- Franch, R., Louro, B., Tsalavouta, M., Chatziplis, D., Tsigenopoulos, C. S., Sarropoulou, E., Antonello, J., Magoulas, A., Mylonas, C. C., Babbucci, M., Patarnello, T., Power, D. M., Kotoulas, G., and Bargelloni, L., (2006) A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* **174**: 851-861
- Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M. R. M., Sakamoto, T., and Okamoto, N.,

- (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **254**: 203-210
- Fuji, K., Hasegawa, O., Honda, K., Kumasaka, K., Sakamoto, T., and Okamoto, N., (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **272**: 291-295
- Fujita, S., (1967) Artificial interspecific and intergeneric hybridization among the Tetraodontid puffers (preliminary report). *Jpn. J. Microbiol. Biol.* **3**: 5-11
- Gharbi, K., Gautier, A., Danzmann, R. G., Gharbi, S., Sakamoto, T., Høyheim, B., Taggart, J. B., Cairney, M., Powell, R., Krieg, F., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E., and Guyomard R., (2006) A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*) : chromosome homeologies and comparative genome organization with other salmonid fish. *Genetics* **172**: 2405-2419
- Gomez-Uchida, D., and Banks, M. A., (2006) Estimation of effective population size for the long-lived darkblotched rockfish *Sebastes crameri*. *J. Hered.* **97**: 603-606
- Golding, G. B., and Dean, A. M., (1998) The structural basis of molecular adaptation. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 355-369
- Grattapaglia, D., and Sederoff, R., (1994) Genetic linkage map of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* **137**: 1121-1137
- Groenen, M. A. M., Wahlberg, P., Foglio, M., Cheng, H. H., Megens, H. J., Crooijmans, R. P. M. A., Besnier, F., Lathrop, M., Muir, W. M., Wong, G. K. S., Gut, I., and Andersson, L., (2009) A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. *Genome Res.* **19**: 510-519
- Grützner, F., Lütjens, G., Rovira, C., Barnes, D. W., Ropers, H., and Haaf, T., (1999) Classical and molecular cytogenetics of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*.

Chromosome Res. **7**: 655-662

- Haidle, L., Janssen, J. E., Gharbi, K., Moghadam, H. K., Ferguson, M. M., and Danzmann, R. G., (2008) Determination of quantitative trait loci (QTL) for early maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* **10**: 579-592
- Hedges, S. B., and Kumar, S., (2002) Genomics: vertebrate genomes compared. *Science* **297**: 1283-1285
- Henderson, S. A., (1963) Chiasma distribution at diplotene in a locust. *Heredity* **18**: 173-190
- Hill, M. M., Broman, K. W., Stupka, E., Smith, W. C., Jiang, D., and Sidow, A., (2008) The *C. savignyi* genetic map and its integration with the reference sequence facilitates insights into chordate genome evolution. *Genome Res.* **18**: 1369-79
- Hillier, L. D., Miller, R. D., Baird, S. E., Chinwalla, A., Fulton, L. A., Koboldt, D. C., and Waterston, R. H., (2007) Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* genome sequences reveals extensive conservation of chromosome organization and synteny. *PLoS Biol.* **5**: e167
- Hinegardner, R., (1968) Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am. Nat.* **102**: 517-563
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. S., and Meyer, A., (2004) Phylogenetic timing of the fish –specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* **59**: 190-203
- Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J., and Bishop, S. C., (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Genetics* **178**: 1109-1115
- Hughes, A. L., Green, J. A., Garbayo, J. M., and Roberts, R. M., (2000) Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally expressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3319-3323

International Chicken Genome Sequencing Consortium, (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**: 695-716

International Rice Genome Sequencing Project, (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800

Jacobs, H. J. van Eck, Arens, P., Verkerk-Bakker, B., te Lintel Hekkert, B., Bastiaanssen, H. J. M., El-Kharbotly, A., Pereira, A., Jacobsen, E., and Stiekema, W. J., (1995) A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons and classical markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 289-300

Jaillon, O., Aury, J., Brunet, F., Petit, J., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biémont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K. J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J., Guigo, R., Zody, M. C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quétier, F., Saurin, W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E. S., Weissenbach, J., and Crollius, H. R., (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**: 946-957

Jensen-Seaman, M. I., Furey, T. S., Payseur, B. A., Lu, Y., Roskin, K. M., Chen, C. F., Thomas, M. A., Haussler, D., and Jacob, H. J., (2004) Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res.* **14**: 528-538

Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, H., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., and Kohara, Y., (2007) The medaka draft genome and insights into

vertebrate genome evolution. *Nature* **447**: 714-719

Kent, W. J., (2002) BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* **12**: 656-664

Khoo, S. K., Ozaki, A., Nakamura, F., Arakawa, T., Ishimoto, S., Nickolov, R., Sakamoto, T., Akutsu, T., Mochizuki, M., Denda, I., and Okamoto, N., (2004) Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology* **39**: 95-101

Kikuchi, K., Kai, W., Hosokawa, A., Mizuno, N., Suetake, H., Asahina, K., and Suzuki, Y., (2007) The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* **175**: 2039-2042

Kikuchi, K., Kai, W., Suetake, H., and Suzuki, Y., (2008) The tiger pufferfish (fugu) genome mapping project and its application in aquaculture. *Fish genetics and breeding science* **38**: 25-30

Kosambi, D. D., (1944) The estimation of map distance from recombination value. *Ann. Eugenics* **12**: 172-175

Kumazawa, Y., Yamaguchi, M., and Nishida, M., (1999) Mitochondrial molecular clocks and the origin of euteleostean biodiversity: familial radiation of perciforms may have predated the Cretaceous/Tertiary boundary. pp.35-52 in *The Biology of Biodiversity*, edited by Kato, M. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany/New York.

Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., and Newburg, L., (1987) MapMaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-181

Lee, B. Y., Lee, W. J., Streelman, J. T., Carleton, K. L., Howe, A. E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J. E., Terai, Y., and Kocher, T. D., (2005) A second-generation genetic linkage map of Tilapia (*Oreochromis spp.*). *Genetics* **170**: 237-244

- Lynch, M., and Conery, J. S., (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**: 1151-1155
- Lynch, M., and Force, A. G., (2000) The origin of interspecific genomic incompatibility via gene duplication. *Am. Nat.* **156**: 590-605
- Ma, X. F., and Gustafson, J. P., (2005) Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet. Genome Res.* **109**: 236-249
- Manly, K. F., Cudmore, Jr. R. H., and Meer, J. M., (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* **12**: 930-932
- Marklund, L., Johansson, M. M., Hoyheim, B., Davies, W., Fredholm, M., Juneja, R. K., Marani, P., Coppieters, W., Ellegren, H., and Andersson, L., (1996) A comprehensive linkage map of the pig based on wild pig-Large White intercross. *Anim. Genet.* **27**: 255-269
- 松原謙一と吉川寛, (1994) ヒト染色体の分染法. 「細胞工学別冊 実験プロトコール シリーズ FISH 実験プロトコール —ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで—」 第1版, pp. 22-32
- Matsuyama, M., Chida, H., Ikeda, Y., Tanaka, H., and Matsuura, S., (1997) Induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tigger puffer *Takifugu rubripes* by differential hormonal treatments. *Suisanzousyoku* **45**: 67-73
- McLysaght, A., Enright, A. J., Skrabanek, L., and Wolfe, K. H., (2000) Estimation of synteny conservation and genome compaction between pufferfish (*Fugu*) and human. *Yeast* **17**: 22-36
- Meyer, A., and Schartl, M., (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 699-704

Mikkelsen, T. S., Wakefield, M. J., Aken, B., Amemiya, C. T., Chang, J. L., Duke, S., Garber, M., Gentles, A. J., Goodstadt, L., Heger, A., Jurka, J., Kamal, M., Mauceli, E., Searle, S. M. J., Sharpe, T., Baker, M. L., Batzer, M. A., Benos, P. V., Belov, K., Clamp, M., Cook, A., Cuff, J., Das, R., Davidow, L., Deakin, J. E., Fazzari, M. J., Glass, J. L., Grabherr, M., Greally, J. M., Gu, W., Hore, T. A., Huttley, G. A., Kleber, M., Jirtle, R. L., Koina, E., Lee, J. T., Mahony, S., Marra, M. A., Miller, R. D., Nicholls, R. D., Oda, M., Papenfuss, A. T., Parra, Z. E., Pollock, D. D., Ray, D. A., Schein, J. E., Speed, T. P., Thompson, K., VandeBerg, J. L., Wade, C. M., Walker, J. A., Waters, P. D., Webber, C., Weidman, J. R., Xie, X., Zody, M. C., Broad Institute Genome Sequencing Platform, Broad Institute Whole Genome Assembly Team, Graves, J. A. M., Ponting, C. P., Breen, M., Samollow, P. B., Lander, E. S., and Lindblad-Toh, K., (2007) Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* **447**: 167-178

美濃部侑三, 門奈理佐, 王子軒, (2003) ゲノム育種 ポストゲノムシーケンス時代のイネ育種技術. 「蛋白質 核酸 酵素」 **48**: 253-256

Miyaki, K., Tabeta, O., and Kayano, H., (1995) Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fish. Sci.* **61**: 594-598

Moen, T., Sonesson, A. K., Hayes, B., Lien, S., Munck, H., and Meuwissen, T. H., (2007) Mapping of a quantitative trait locus for resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparing survival analysis with analysis on affected/resistant data. *BMC Genet.* **8**: 53

Moen, T., Hayes, B., Baranski, M., Berg, P. R., Kjøglum, S., Koop, B. F., Davidson, S. W., and Lien, S., (2008) A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC Genomics* **9**:223

Moghadam, H. K., Poissant, J., Fotherby, H., Haidle, L., Ferguson, M. M., and Danzmann, R. G., (2007) Quantitative trait loci for body weight, condition factor and age at sexual maturation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Genet. Genomics* **277**: 647-661

- Myers, S., Bottolo, L., Freeman, C., McVean, G., and Donnelly, P., (2005) A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science* **310**: 321-324
- Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara, Y., and Morishita, S., (2007) Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res.* **17**: 1254-1265
- Naruse, K., Tanaka, M., Mita, K., Shima, A., Postlethwait, J. H., and Mitani, H., (2004) A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome Res.* **14**: 820-828
- Navarro, A., and Barton, N. H., (2003) Chromosomal speciation and molecular divergence--accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* **300**: 321-324
- Neff, M. K., Broman, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegler, J. S., Ostrander, E. A., and Rine, J., (1999) A second-generation genetic linkage map of the domestic dog *Canis familiaris*. *Genetics* **151**: 803-820
- Nelson, J. S., (1994) *Fishes of the world*. New York: John Wiley and sons.
- Nichols, K. M., Edo, A. F., Wheeler, P. A., and Thorgaard, G. H., (2008) The genetic basis of smoltification-related traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Genetics* **179**: 1559-1575
- Nowak, M. A., Boerlijst, M. C., Cooke, J., and Smith, J. M., (1997) Evolution of genetic redundancy. *Nature* **388**: 167-171
- Ohara, E., Nishimura, T., Nagakura, Y., Sakamoto, T., Mushiake, K., and Okamoto, N., (2005) Genetic linkage map of two yellowtails. *Aquaculture* **244**: 41-48
- Ohno, S., (1970) *Evolution by Gene Duplication*. New York, Springer-Verlag
- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R. M., Akutsu, T., and Okamoto, N., (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics* **265**: 23-31

Palti, Y., Parsons, J. E., and Thorgaard, G. H., (1999) Identification of candidate DNA markers associated with IHN virus resistance in backcross of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). *Aquaculture* **173**: 81-94

Peichel, C. L., Nereng, K. S., Ohgi, K. A., Cole, B. L. E., Colosimo, P. F., Buerkle, C. A., Schluter, D., and Kingsley, D. M., (2001) The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. *Nature* **414**: 901-905

Pevzner, P., and Tesler, G., (2003) Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. *Genome Res.* **13**: 37-45

Postlethwait, J. H., Woods, I. G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y., Kelly, P. D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., and Talbot, W. S., (2000) Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* **10**: 1890-1902

Rat Genome Sequencing Project Consortium, (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**: 493-521

Reid, D. P., Szanto, A., Glebe, B., Danzmann, R. G., and Ferguson, M. M., (2005) QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) : comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* **94**: 166-172

Reid, D. P., Smith, C. A., Rommens, M., Blanchard, B., Martin-Robichaud, D., and Reith, M., (2007) A genetic linkage map of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Genetics* **177**: 1193-1205

Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P. L., Zelus, D., Hughes, S., and Laudet, V., (2001) Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Res.* **11**: 781-788

Rodionov, A. V., (1996) Micro vs. macro: structural-functional organization of avian micro-

and macrochromosomes. *Genetika* **32**: 597-608

Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K., Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L., Guyomard, R., and Hoyheim, B., (2000) A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterization by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**: 1331-1345

Sarropoulou, E., Nousdili, D., Magoulas, A., and Kotoulas, G., (2008) Linking the genomes of nonmodel teleosts through comparative genomics. *Mar. Biotechnol.* **10**: 227-233

Scannell, D. R., Byrne, K. P., Gordon, J. L., Wong, S., and Wolfe, K. H., (2006) Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. *Nature* **440**: 341-345

Sémon, M., and Wolfe, K. H., (2007a) Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends Genet.* **23**: 108-112

Sémon, M., and Wolfe, K. H., (2007b) Rearrangement rate following the whole-genome duplication in teleost. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 860-867

Sewell, M. M., Sherman, B. K., and Neale, D. B., (1999) A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics* **151**: 321-330

Shifman, S., Bell, J. T., Copley, R. R., Taylor, M. S., Williams, R. W., Mott, R., and Flint, J., (2006) A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biol.* **4**: e395

Singer, A., Perlman, H., Yan, Y., Walker, C., Corley-Smith, G., Brandhorst, B., and Postlethwait, J., (2002) Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* **160**: 649-657

Small, K. S., Brudno, M., Hill, M. M., and Sidow, A., (2007) Extreme genomic variation in a natural population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 5698-5703

- Springer, M. S., Murphy, W. J., Eizirik, E., and O'Brien, S. J., (2003) Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 1056-1061
- Steinke, D., Salzburger, W., Braasch, I., and Meyer, A., (2006) Many genes in fish have species-specific asymmetric rates of molecular evolution. *BMC Genomics* **7**: 20
- Takagi, M., Sato, J., Monbayashi, C., Aoki, K., Tsuji, T., Hatanaka, H., Takahashi, H., and Sakai, H., (2003) Evaluation of microsatellites identified in the tiger puffer *Takifugu rubripes* DNA database. *Fish. Sci.* **69**: 1085-1095
- Tamura, K., Subramanian, S., and Kumar, S., (2004) Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Mol. Biol. Evol.* **21**:36-44
- Taniguchi, N., (2007) Studies on conservation and utilization of genetic divergence in fish and shellfish population. *Nippon Suisan Gakkaishi* **73**: 408-420
- Taylor, J. S., Van de Peer, Y., and Meyer, A., (2001) Genome duplication, divergent resolution and speciation. *Trends Genet.* **17**: 299-301
- Tyler, J., and Sorbini, L., (1996) New superfamily and three new families of tetraodontiform fishes from the Upper Cretaceous: the earliest and most morphologically primitive plectognath. *Smithsonian Contrib. Paleobiol.* **82**: 1-59
- 鵜飼保雄, (2000a) DNA マーカーと連鎖地図. 「ゲノムレベルの遺伝解析」. pp. 33-58
- 鵜飼保雄, (2000b) 組換えと乗換え. 「ゲノムレベルの遺伝解析」. pp. 3-32
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J. S., Meyer, A., and Van de Peer, Y., (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 1638-1643
- Venkatesh, B., Gilligan, P., and Brenner, S., (2000) Fugu: a compact vertebrate reference

genome. *FEBS Lett.* **476**: 3-7

Waldbieser, G. C., Bosworth, B. G., Nonneman, D. J., and Wolters, W. R., (2001) A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics* **158**: 727-734

Wang, C. M., Lo, L. C., Zhu, Z. Y., and Yue, G. H., (2006) A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F₁ family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *BMC Genomics* **7**: 274

Wilfert, L., Gadau, J., and Schmid-Hempel, P., (2007) Variation in genomic recombination rates among animal taxa and the case of social insects. *Heredity* **98**: 189-197

Woods, I. G., Kelly, P. D., Chu, F., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y., Huang, H., Postlethwait, J. H., and Talbot, W. S., (2000) A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res.* **10**: 1903-1914

Woods, I. G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D. K., Nix, R., Kelly, P. D., Chu, F., Postlethwait, J. H., and Talbot, W. S., (2005) The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosome. *Genome Res.* **15**: 1307-1314

Yamanoue, Y., Miya, M., Inoue, J. G., Matsuura, K., and Nishida, M., (2006) The mitochondrial genome of spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Genes Genet. Syst.* **81**: 29-39

Yu, N., Zhao, Z., Fu, Y. X., Sambuughin, N., Ramsay, M., Jenkins, T., Leskinen, E., Patthy, L., Jorde, L. B., Kuromori, T., and Li, W. H., (2001) Global patterns of human DNA sequence variation in a 10-kb region on chromosome 1. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 214-222

Zhang, J., Rosenberg, H., and Nei, M., (1998) Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl. Acad. Sci.* **95**: 3708-3713