

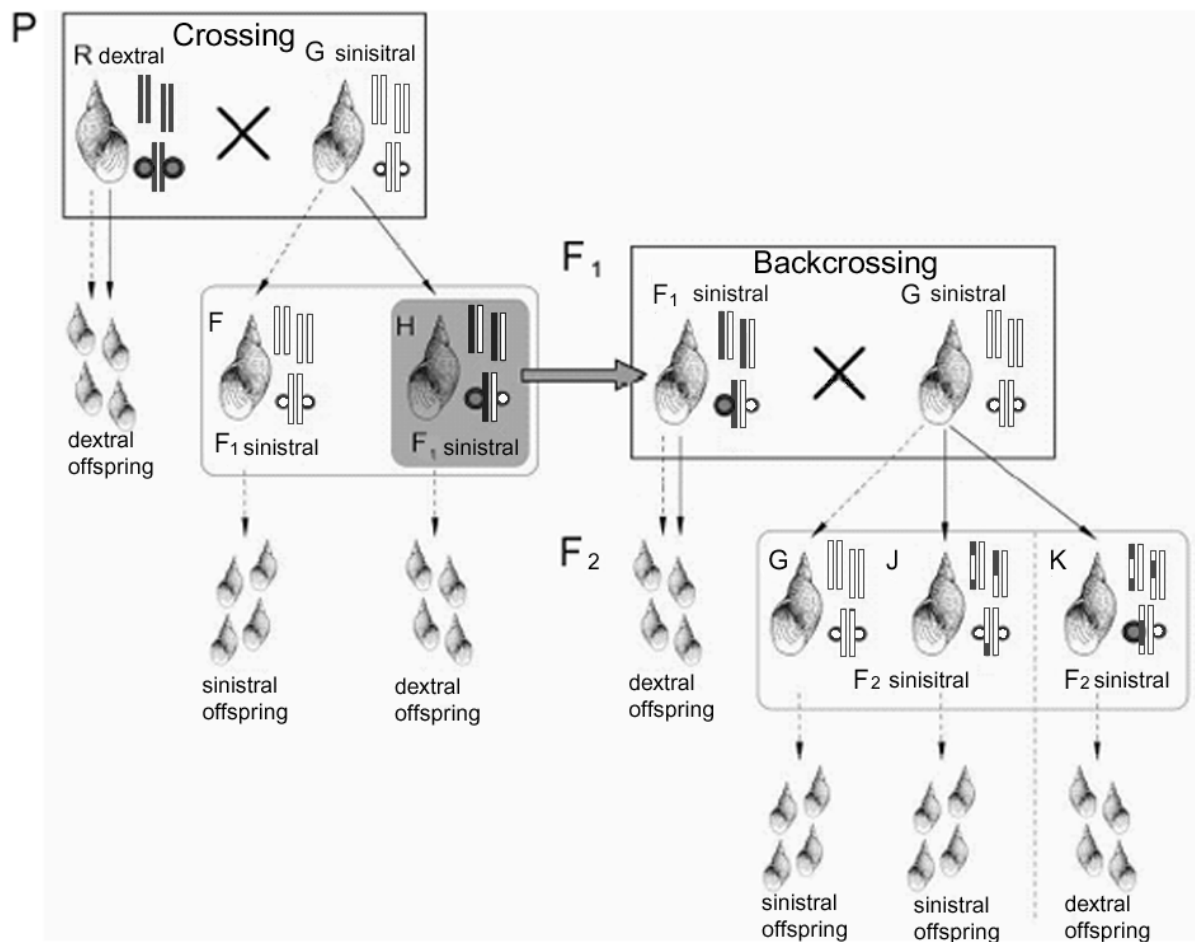
## 論文の内容の要旨

### 淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の巻型決定遺伝子の同定を目指した遺伝学的解析

細入 勇二

#### 要旨

後生動物の多くは広い範囲の動物門にわたって左右相称であり、その多くは左右非対称な器官を持っている。これに対し、軟体動物の巻貝は、左右非相称であり、体軸がねじれて発生する珍しいボディプランを持っている。自然界に存在する巻貝のほとんどは右巻であるが、正常な左巻の種も存在する。また、非常に稀に、淡水産巻貝と陸産巻貝の中に、同一種内に右巻と左巻の二型性を持つ種が報告されている。このように体の器官のすべてが左右で鏡像対称になっている正常な個体が存在する例は動物門全体を通して非常に特異な例であり、この巻貝の右巻左巻を決定している遺伝子は未だ同定されていない。*Lymnaea peregra* は左右二型が種内に見られるそうした稀な種の1つであり、右巻個体と少数の左巻個体の両方を含む野生集団が存在する。この種を用いた遺伝学的交配実験から、巻貝の巻型はそれを生んだ母親の遺伝子型によって決定されること(遅滞遺伝)、また巻型決定遺伝子は染色体上の単一の遺伝子座位上に存在することが示唆されている。巻型決定遺伝子には右巻と左巻の対立遺伝子が存在し、*L. peregra* では遺伝学的に前者が優性である。*Lymnaea peregra* の近縁種である *Lymnaea stagnalis* にも右巻と少数の左巻個体の両方を含む野生集団が存在している。



当研究室では本種の右巻、左巻の個体群を実験室で飼育、維持しており、本研究では淡水産巻貝 *L. stagnalis* の巻型決定遺伝子の同定を目指して実験を行った。遺伝学的手法を用いて巻型決定遺伝子を同定するため、右巻系統と左巻系統(以後簡便のため、各々の系統を R 系統、G 系統と呼ぶ)の間で交配を行った。P 世代の交配から得られる F<sub>1</sub> 個体のうち、右巻の個体は R 個体の産んだ個体であり、左巻の個体は G 個体の産んだ個体である。左巻の F<sub>1</sub> 個体のみを選別して育成した。得られた左巻 F<sub>1</sub> 個体が産卵を開始した時点で個別に隔離して飼育した。F<sub>1</sub> 個体が右巻と左巻のどちらを産むか、胚の巻型を調べた結果、巻型が確認できた 111 個体のうち 71% が右巻を産んだ。これらの右巻を産む F<sub>1</sub> 個体 (以後 H (Hybrid) と呼ぶ) が、P 世代の交配によるものか確かめるため、F<sub>1</sub> 個体について右巻 R 系統特異的に発現を示す遺伝子の発現を調べた。その結果、右巻を産む F<sub>1</sub> 個体では発現が確認され、左巻を産む F<sub>1</sub> 個体 (以後 F と呼ぶ) では確認されなかった。このことから H 個体は交配により生まれたものであることが分かった。同時にヘテロな状態の母貝 H が右巻を産むことから巻型の遺伝様式は *Lymnaea peregra* と同様右巻が優性であることが強く示唆された。また、得られ H26 個体、F19 個体で R 系統に特異的な AFLP マーカーを調べたところ、すべての H 個体で確認でき、F 個体ではすべての個体において確認できなかった。このことは、巻型決定遺伝子の浸透率が 100% 近いことを示している。

次に H 個体を新たな G 個体に戻し交配し、F<sub>2</sub> 世代の個体群の養成を行った。F<sub>1</sub> 個体群を作

製したときと同様、得られた卵蕪のうち G 個体の産んだ左巻個体のみを育成することで、左巻 G が母親である F<sub>2</sub> 個体を選別した。また、各 F<sub>2</sub> 個体に関して、右巻を産む個体か左巻を産む個体か各個体の産んだ胚の巻型を調べた後、肝臓/生殖巣のサンプルから gDNA と RNA の抽出を行った。このようにして F<sub>2</sub> 約 300 個体の RNA と DNA からなるコレクションを構築した。

得られた F<sub>2</sub> 個体には、戻し交配により、巻型決定遺伝子座に関して、ヘテロな個体 (K) と劣勢ホモ接合体である個体 (J) と、自家受精による左巻を産む個体 (G ; selfed) の 3 つの場合が考えられる。H 個体と G 個体の戻し交配から、右巻、左巻を産む個体の両方が得られている時期と、左巻を産む個体のみが得られている時期があり、交配が成功している時期と、失敗している時期があることが示唆された。左巻を産む個体のみが得られた時期については自家受精によって得られた個体と見なし、それ以外の個体と区別した。このような自家受精の可能性のある左巻を産む F<sub>2</sub> (G) を排除すると、右巻と左巻を産む F<sub>2</sub> 個体の比はほぼ 1 : 1 の分離比を示した。これらの個体において、F<sub>1</sub> の時と同様に R 特異的遺伝子の発現を調べ、これらの遺伝子の発現が確認された個体は R 由来の遺伝的寄与が確認できたことから、交配によって得られた個体であることが示された。以後の解析にはこれらの交配によって得られた個体を用いた。

次に、これらの F<sub>2</sub> 個体群において、遺伝的分離を示す DNA マーカーを AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法を用いて検出した。AFLP は DNA を特定の制限酵素で切断し、切断された DNA 断片を PCR によって増幅し、増幅された DNA 断片の長さの違いを検出する手法である。制限酵素で切断した DNA 断片の PCR を行う際に、制限酵素認識配列とアダプター配列に数塩基のアンカーをつけたプライマーで増幅して行う。増幅された産物を電気泳動によって分離し、フィンガープリントを分析することによってサンプルの多型を検出する方法である。この手法は解析対象の生物の遺伝配列情報を必要としないという利点を持っている。

F<sub>2</sub> 個体群から抽出した gDNA を様々な組み合わせのプライマーセットを用いて AFLP を行い、これらのうち、バンドの数が豊富なプライマーセットを選んで次の実験に用いた。選んだプライマーセットを用いて R、G 各 4 個体、K、J 各 20 個体に関して AFLP を行った。その結果、F<sub>2</sub> 個体群において遺伝的分離を示す DNA マーカーを約 200 個見出した。このうち、巻型決定遺伝子と挙動をともにするマーカー、つまり、巻型決定遺伝子と連鎖している AFLP マーカーを 3 個確認することができた。これら 3 つの巻型決定遺伝子と連鎖するマーカーの巻型決定遺伝子からの遺伝学的距離を調べるため、K85 個体、J99 個体を用いて、AFLP を行い、これらのマーカーと巻型決定遺伝子との間の組換え率を求めた。求めた組換え率から、3 つのマーカーの巻型決定遺伝子からの遺伝学的距離求めた。それぞれの巻型決定遺伝子からの遺伝学的距離は約 1cM、5cM、11cM であった。この 3 つのマーカーを簡便のため、A、B、C とする。A と B のマーカーでは巻型決定遺伝子との間で、共通の個体で組換えが起きていた。また、C のマーカーに関しては A と B の共通の個体では組換えが起きていなかった。このことから、A と B の 2 つのマーカーは巻型決定遺伝子から見てゲノム上の同じ側に存在しており、C のマーカーはその反対側に位置していることが示唆される。これらのことから、巻型決定遺伝子は A のマーカーと C のマーカーの間に存在している単一遺伝子座であることが示された。

また、今回得られた F<sub>2</sub> 個体のうち K 個体をさらに新たな G 系統に戻し交配させていくことで、連続的に戻し交配を行い、G 系統の遺伝的背景に、巻型決定遺伝子座に関してのみ R 系統の遺伝子を持つコンジェニック系統の確立を目指し、現在 F<sub>4</sub> の戻し交配を行っている。