

論文審査の結果の要旨

論文提出者 細入 勇二

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。巻貝の胚はらせん卵割様式で卵割を行い、右巻と左巻の種ではその卵割の方向が鏡像対称的であることが 100 年以上前に観察されている。また、淡水産巻貝と陸産巻貝の中に、非常に稀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。こうした巻貝の 1 種である淡水産巻貝 *Lymnaea peregra* では右巻と左巻の古典的交配実験が行われており、その遺伝学的挙動から、巻型決定遺伝子は遅滞遺伝という遺伝様式で遺伝する単一遺伝子であることが約 80 年前に示唆されている。さらに、この *L. peregra* の右巻の 1 細胞期胚の細胞質を左巻の胚に移植すると、らせん卵割の方向が逆転することが 20 年以上前に報告されており、この巻型決定因子と巻型決定遺伝子の関係が示唆されている。しかし、この巻貝の巻型決定遺伝子は未だに同定されていない。細入氏は巻型決定遺伝子の遺伝学的手法による同定を目指し、第 1 章では *L. peregra* と同じ科に属する淡水産巻貝 *Lymnaea stagnalis* の右巻と左巻の交配を行って F₂ 個体群を養成し、これを用いた巻型決定候補遺伝子の判定システムを構築した。第 2 章では DNA マーカーを数多く作出することにより、巻型決定遺伝子近傍の連鎖地図の作製を行った。その結果、巻型決定遺伝子に関するいくつかの遺伝学的知見を得た。

第 1 章では巻型決定遺伝子の同定を目指し、はじめに *L. stagnalis* の右巻系統と左巻系統（以後、各系統を R、G と称す）の間で交配を行った。P 世代の交配から得られる F₁ 個体のうち、G 個体の産んだ左巻の F₁ 個体のみを選別して育成した。得られた左巻 F₁ 個体が右巻と左巻のどちらを産むか、胚の巻型を調べたところ、多くの個体は右巻を産んだ。左巻を産む F₁ 個体は自家受精によるものと考えられ、右巻を産む F₁ 個体（以後 H (Hybrid) と称す）が、P 世代の交配の結果であるか確かめるため、F₁ 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 F₁ 個体では右巻系統特異的遺伝子の発現が確認された。このことにより H 個体は交配により生まれたものであることを確認した。また、同時にヘテロな状態の母貝が右巻を産むことから巻型の遺伝様式は *L. peregra* と同様右巻が優性であることが強く示唆された。さらに、得られた F₁ 個体について R 系統に特異的な DNA マーカーを調べたところ、すべての H 個体で確認できた。こうした遺伝学的解析から、巻型決定遺伝子を含む全ての遺伝子座において右巻系統と左巻系統のヘテロ接合体である個体が必ず右巻を産むことが示され、巻型決定遺伝子の浸透率がほぼ 100%であることが示された。このことは巻貝の巻型が母親の遺伝型によって完全に支配されており、母親となる貝から卵母細胞へと巻型決定因子が伝え

られていることを示している。

次に、戻し交配個体群の養成を行った。得られた F_1 個体を新たな G 個体に戻し交配し、得られた F_2 個体群のうち、左巻個体のみを育成することで、左巻 G が母親である F_2 個体を選別した。各 F_2 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_2 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_2 個体群は自家受精による左巻を産む個体である場合と、交配の結果巻型決定遺伝子を受け継いだか否かに応じて、巻型決定遺伝子座位に関してヘテロな個体である場合と劣勢ホモ接合体である場合の 3 つの場合が考えられる。左巻を産む個体のみが連続して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 F_2 個体を排除すると、交配の結果であると推定される右巻と左巻を産む F_2 個体の比はほぼ 1 : 1 の分離比を示した。このように遺伝的分離比は、巻型決定遺伝子座が単一であると仮定した場合の期待値に沿うことが示された。これらの個体において、 R 特異的遺伝子の発現を調べた結果、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により、交配によって得られた個体であることが示された。以後の解析にはこのような交配によって得られた個体を用いた。こうした個体群をパネルとして用いることにより、巻型決定遺伝子の候補となる遺伝子の連鎖判定を行うことで、その遺伝子が巻型決定遺伝子であるかどうかを判定することができる。このように細入氏は巻型決定候補遺伝子の連鎖判定システムの構築を行った。

第 2 章ではこれらの F_2 個体群を用いて、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法によって遺伝的分離を示す DNA マーカーの作出を行った。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、増幅された産物の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_2 個体群から抽出した $gDNA$ について様々な組み合わせのプライマーペアを用いて AFLP を行い、その結果、 F_2 個体群において遺伝的分離を示す DNA マーカーを数百個見出した。このうち、巻型決定遺伝子と強く連鎖する AFLP マーカーを 3 個確認した。これらのマーカーのうち、最も巻型決定遺伝子との組み換え率が少なかったマーカーの巻型決定遺伝子からの遺伝学的距離は約 1cM であった。また、巻型決定遺伝子と連鎖している他の 2 つのマーカーについてそれぞれ巻型決定遺伝子との組換え個体を比較することによって、巻型決定遺伝子は全ゲノム領域のうち、これらの AFLP マーカーに挟まれた特定の領域に存在する単一遺伝子座であることが示された。

従って、本論文は博士(学術)の学位論文としてふさわしいものであると審査委員会は認め、合格とした。