

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 17 年度博士課程進学  
氏 名 古川 聡史  
指導教員名 渡部 終五

### トラフグの高成長に関する遺伝学的および分子生物学的研究

トラフグ *Takifugu rubripes* のゲノムは、サイズが約 400 Mb とヒトの約 8 分の 1 でありながら、ほぼ同数の遺伝子を持つという特徴から、脊椎動物ではヒトに続いてその概要配列が明らかにされた。一方、トラフグは水産上重要な魚種の 1 つで単価が高い。しかしながら、天然魚の漁獲高はわずかで市場ではほとんどが養殖魚で占められおり、さらに近年では海外での養殖生産の伸びや寄生虫の蔓延などで、わが国のトラフグ養殖生産は苦戦を強いられている。したがって、わが国では品種改良による効率的なトラフグ養殖が期待され、民間業者により高成長と目される系統（以下、高成長系と略記）が選抜育種されつつあるが、その遺伝的な性質は明らかでなく、系統も完全ではない。高成長形質に複数の遺伝子座がかかわっていると仮定すると、連鎖地図に基づく量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) 解析を行う必要がある。連鎖地図の作製には、数塩基単位の繰り返し配列で多型性をもちゲノム中に普遍的に存在するマイクロサテライト (以下、MS) が DNA マーカーとしてよく利用される。一方、候補遺伝子を絞り、目的の形質を遺伝子レベルで明らかにする方法もよく利用される。近年、多くの脊椎動物でインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) が体サイズを決める例が報告されており、この IGF はトラフグの高成長に関与する分子の有力候補である。

以上のような背景の下、本研究では、トラフグを対象に MS マーカーを開発し、

連鎖地図を作製して高成長の QTL 解析を行った。次に、IGF の cDNA クローニングと発現解析を行って成長との関連性を調べたもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

## 1. ゲノムデータベースを用いたマイクロサテライトマーカーの作製

公開されているフグゲノムデータベース v3.0 を対象に MS を抽出するためのコンピュータプログラムを作成した。本データベースは scaffold と呼ばれる数百万から百万 bp 程度のゲノム配列の断片からなるが、本研究ではデータベース v3.0 の scaffold 1 - 25 につき、MS 遺伝子座の分布を調べた。その結果、2 塩基リピートの MS の密度に scaffold 間で約 2 倍の差があった。また、リピート回数の少ない MS は各 scaffold に多く存在したが、リピート回数が多くなるに従って MS の数が減少することも明らかになった。Scaffold 1 - 25 に含まれる 2 - 5 塩基を単位とする MS は異なるリピート数のものも含めて計 408 個で、平均して 74.5 kb に 1 つの MS 座があることがわかった。この割合でトラフグゲノム中に MS 座が分布すると仮定すると、トラフグのゲノムサイズは約 400 Mb であることから、5000 個以上の MS 座があると推測される。

次に、抽出した MS の隣接領域にプライマーを設計し、2003 年 2 月に山口県下関市の南風泊漁港に水揚げされた対馬産天然トラフグの中、ランダムに選んだ 4 個体の肝臓から調製したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。さらに、アガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により、抽出した MS の DNA マーカーとしての有効性を調べた。その結果、検討した 251 MS 座のうち約 60% の 148 座において個体間で多型を示し、その有効性が認められた。

## 2. トラフグ家系の作出

連鎖地図作製および QTL 解析のためにトラフグの交配を行った。まず、民間から供与された高成長系雄と福井県産天然雌魚の卵で人工授精し、受精卵を海水中で強く曝気して孵化させて F<sub>1</sub> 世代を得た。飼育は受精卵の段階から東京大学で行い、水温は 20°C に保った。孵化後はシオミズツボムシ、ブラインシュリンプおよび固形ペレットを成長段階に応じて飽食給餌した。1 cm 前後の F<sub>1</sub> 生体および 3 cm まで成長した死亡個体の計 69 個体をエタノールで固定し、連鎖地図作製用試料とした。次に、3 年以上飼育して成熟間近の F<sub>1</sub> 雄魚 1 個体 [以後、バッククロス (BC) 用精子提供雄親とする] の飼育水温を 3 ヶ月かけて 20°C から 12°C まで下げ、この温度でさらに 2 ヶ月間飼育を続けた。次に、2 ヶ月かけて水温を 12°C から 16°C まで上昇させた後、この温度で飼育を続けて催熟を試みたところ、排精

が認められたので、ペレット法により凍結精子を計 650 粒調製した。凍結精子に海水を滴下して顕微鏡下で観察したところ、精子の高い遊泳活性がみられた。さらに、その凍結精子を用いて 2008 年に熊本産天然雌魚との交配を行い、BC 世代を得た。得られた BC 世代は  $F_1$  と同様の方法で飼育した。

### 3. 連鎖地図の作製および仔魚期における高成長の QTL 解析

MS マーカーおよび  $F_1$  世代個体から抽出した DNA を用いて PCR で各 MS 座の DNA 断片のサイズから遺伝子型を決定し、各 MS 座間の独立性の検定および組換え価の推定を行った。その結果、雌で 23 の連鎖群 (linkage group, LG) 上に 88 の MS マーカー、雄で 14 の LG 上に 59 の MS マーカーを含む連鎖地図が作製できた。他の脊椎動物と同様に、雌雄間で組換え率に違いがある領域がみられた。また、同一染色体上でタンデムにクラスターを形成していると報告された速筋ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) の *MYH<sub>M86</sub>* と *MYH<sub>M939</sub>* および *MYH<sub>M2126</sub>* と *MYH<sub>M1646</sub>* の近傍に存在するマーカーそれぞれ、fms86 と M939ms2 および M2126ms2 と M1646ms1 は、異なる LG 内で緊密に連鎖していた。

次に、BC 世代を用いて簡易的な QTL 解析法の 1 つであるバルク法で高成長に関連している遺伝子座の探索を行った。まず BC 世代の孵化 38 日後の仔魚期の 70 個体を採取し、全長および体高を測定した。全長および体高の平均および標準偏差はそれぞれ  $9.40 \pm 1.22$  mm および  $2.69 \pm 0.37$  mm であった。次に、採取した 70 個体につき 12 の MS マーカーにおける遺伝子型を決定した。その中、全長が最大の 10 個体の long (Ln) 群と最小の 10 個体の short (Sh) 群および体高が最大の 10 個体の high (Hi) 群と最小の 10 個体の low (Lw) 群を選び出し、4 群の対立遺伝子の頻度が集団全体における対立遺伝子の頻度から有意にずれていないかどうかを検定した。その結果、予想に反して Sh 群および Lw 群において高成長系雄に由来する MS マーカー座がそれぞれ 1 つずつ連鎖不平衡を示したが、成長度の高い群では連鎖不平衡は認められず、高成長と連鎖する遺伝子座の同定には至らなかった。今後はさらに多くの MS 座を抽出して連鎖解析を行う必要があると考えられる。

### 4. 仔魚期における成長と関連遺伝子の解析

東京大学で飼育していた 3 歳齢のトラフグの各組織より、全 RNA を抽出して cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に 2 種類の IGF、IGF-1 および IGF-2 の cDNA クローニングを行った。その結果、IGF-1 については全翻訳領域の 182 アミノ酸残基をコードする cDNA 2536 bp (ポリ A テール含む) を得た。決定した塩基配列

とゲノムデータベースから抽出された配列の間で翻訳領域中に 1 箇所のミスセンス変異がみられ、非翻訳領域でも 2 塩基の置換および 2 箇所の欠失がみられた。演繹アミノ酸配列は、既報のオオクチバス *Micropterus salmoides* およびボラ *Mugil cephalus* の IGF-1 とそれぞれ 86%および 85%のアミノ酸同一率を示した。IGF-2 については 212 アミノ酸残基をコードする cDNA 760 bp を得た。既報のトラフグ IGF-2 の配列と合わせ全翻訳領域の塩基配列が明らかになったが、3'末端のポリ A テールまでの配列は決定できなかった。演繹アミノ酸配列では既報の IGF-2 の配列との間で 1 残基の置換がみられた。

次に、F<sub>1</sub> 世代作出に使用した親世代 2 個体、F<sub>1</sub> 世代の BC 用精子提供雄親および BC 作出に使用した雌親の間で、イヌで IGF-1 の発現量の調節により体サイズを制御すると報告された IGF-1 のイントロン 1 に変異があるかどうかを調べた。しかしながら、決定した 493 bp のイントロン領域につき 4 個体間で多型はみられなかった。

次に、BC 世代トラフグの Ln 群と Sh 群および Hi 群と Lw 群につき、リアルタイム PCR により IGF-1 および IGF-2 各遺伝子の mRNA 蓄積量を比較した。その結果、IGF-1 では Ln 群の mRNA 蓄積量は Sh 群のその約 1.4 倍 ( $P < 0.005$ )、Hi 群の mRNA 蓄積量は Sh 群のその約 1.3 倍 ( $P < 0.05$ ) と、いずれも有意に高かった。一方、IGF-2 では各群間で発現量に有意な差はなかった ( $P > 0.05$ )。これらの結果から、トラフグにおいても IGF-1 の発現量増加により高成長が誘導されることが示唆された。

以上、本研究により、トラフグにおいてゲノムデータベースを用いることで DNA マーカーを用いた連鎖地図が容易に作製できることが示され、それを元に QTL 解析できることが示唆された。さらに、トラフグ仔魚の成長速度に IGF-1 の発現が関わっていることが強く示唆された。本研究は、高成長系トラフグの遺伝的性質の一端を明らかにしたもので、魚類の分子生物学に資するのみでなく、ゲノム解析を利用した選抜育種の進展に寄与するところが大きいと考えられる。