

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古川聡史

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。そこで本研究では、トラフグを対象にマイクロサテライト (MS) マーカーを開発し、連鎖地図を作製して高成長の量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) 解析を行った。次に、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, 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。

まず、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 と呼ばれる数百から百万 bp 程度のゲノム配列の断片からなる。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。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た。

次に、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天然雌魚の卵を人工授精し F₁ 世代を得た。1 cm 前後の F₁ 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 F₁ 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熊本産天然雌魚との交配を行い、BC 世代を得た。

MS マーカーおよび F₁ 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。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はそれぞれ 9.40 ± 1.22 mm および 2.69 ± 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。しかしながら、Sh 群および Lw 群において高成長タイプの対立遺伝子が有意に多く出現するという、予想とは逆の結果を示す MS マーカー座がそれぞれ 1 つずつ見つかった。

飼育中の 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。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。F₁ 世代作出に使用した親世代 2 個体、F₁ 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、IGF-1 の 493 bp のイントロン領域についても 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、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 ($P < 0.05$) であった。一方、IGF-2 では各群間で発現量に有意な差はなかった ($P > 0.05$)。

以上、本研究は、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を示し、それを基に QTL 解析を行うことができることを示唆した。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を強く示唆したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。