

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 陳 盈光

近年、表面化してきた地球温暖化によって各種動植物の生育・飼育環境が変化し、その生存／生産に多大な影響が生じることが懸念されている。ニジマスは水産的に重要な冷水性魚であり、世界各地で養殖されているが、ニジマスも地球温暖化による影響を免れ得ないことが懸念されている。現在地球温暖化に対する対策として二酸化炭素削減のための各種取り組みがなされているが、生物学的取り組みとして温暖化に対して耐性のある個体を選抜育種等の手段で準備する試みが水産生物を中心に我が国で始まっている。その一環として、宮崎県で選抜育種されてきた高温耐性ニジマスが注目されている。本申請者は同高温耐性ニジマスにおいて、最終的に高温耐性を司る遺伝的要因を同定すべく、ニジマスのゲノム解析、トランスクリプトーム解析を推進し、以下の内容から構成された博士論文を提出した。

1 COXII 遺伝子の発現解析

先行研究において初期発生の時点では COXII 遺伝子のレベルが高温耐性ニジマスと標準ニジマスで大きく異なっていることが示されていた。そこで幼魚で COXII 遺伝子の発現レベルが両者で異なっているか検討したが、有意な差は認められなかった。このことから、少なくとも幼魚では COXII 遺伝子の発現と高温耐性形質との間に強い関連はないものと考えられた。

2 雌性発生個体の作出と接合様相の確認

全ゲノムショットガン法によるゲノムアセンブルに資するため、アセンブルの障害となる「多型」のない第一卵割阻止型雌性発生ニジマスを宮崎県水産試験場に依頼して作出した。その雌性発生個体を調べるため、マイクロサテライトマーカを PCR 後にラベルする手法を導入した。16種類のマイクロサテライトマーカを用いて多型解析を行なった結果、作出した個体が目的とするホモ接合（ダブルハプロイド）個体であることが確認された。

3 次世代シーケンサーによるシーケンシングと新規アセンブル

通常のヘテロ接合個体より抽出したゲノム DNA を出発材料に、次世代シーケンサー 454 GS-FLX を用いてシーケンシングを行ない、463 万リード、平均リード長 330bp、のべ約 1.5Gb の塩基配列を得た。これらのデータから約 20 万種類のマイクロサテライト多型マーカー候補が得られた。

次に作出したホモ接合個体からゲノム DNA を抽出し、Illumina GA を用いて、平均 400bp と 700bp のゲノム DNA 断片のペア-エンドシーケンシングを行った。これらのデータを 20-30 塩基長単位で 1 塩基ずつスライドさせて構成した塩基配列の集合を構築し、

同一の配列の出現頻度を解析することで、シーケンスのエラー率とゲノムサイズの推定を行なうことができた。エラー率は約 0.5%、ゲノムサイズは約 2400Mb と推定され、ゲノムサイズについては既報の推定値とほぼ一致した。さらに、平均 2kb と 5kb のメイトペアライブラリーを調製し、同様にシーケンスに供した。これらによりのべ 100 倍ゲノム相当の塩基配列データが得られた。得られた塩基配列のうち約 60 倍ゲノム分のデータを用いて、アセンブルソフト Soapdenovo により *de novo* アセンブリを行った。アセンブルはサイズ推定のステップで行なったのと同様、塩基配列データを分割してから de Bruijn のグラフを作成するプロセスで行なうが、分割単位である k-mer 値を様々検討した結果、k=59 bp 前後で最適な結果が得られた。この条件によりアセンブルで得られた Scaffold サイズの合計は 2.2Gb、N50 値は 15,046b、推定ゲノム被覆度は 91.9%であった。

これらに加えて、一塩基多型(SNP)を主とした多型データを得るため、高温耐性系（ヘテロ接合体）、標準系のシングルリードシーケンシングを行い、データを蓄積した。

4 cDNA 配列の新規アセンブルと頻度解析

高温耐性系および標準系それぞれ一頭につき、熱ストレス付加前後の各組織から、それぞれ 50M ペア以上のリードをえた。これらからクオリティーの低位のデータを除去し、各系統・組織・条件につき 25M のシーケンスデータを用いてリードのアセンブル、頻度解析を行なった。特に試験的な解析でヒートショックタンパク質（heat shock protein, HSP）遺伝子で特徴的な結果が見いだされた鰹について、より詳細な解析を進めた。熱ストレス付加前・鰹に関して遺伝子の発現頻度を調べた結果、高温耐性系で標準系より発現が 2 倍以上多い遺伝子が 324 種類同定されたが、特に複数の HSP 遺伝子が顕著な差を示した。本結果から、HSP の恒常的な発現上昇がニジマスに高温耐性を付与している可能性が示された。

以上の成果は学術上、応用上資するところが大きく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。