

ゲノムデータベースを利用したトラフグ優良形質遺伝子の探索

渡部終五^{*1}・木下滋晴^{*1}・池田大介^{*1}・古川聡史^{*1}・鈴木 讓^{*2}・菊池 潔^{*2}・甲斐 渉^{*2}

Screening of superior trait-related genes of torafugu by using the genome database

Shugo WATABE^{*1}, Shigeharu KINOSHITA^{*1}, Daisuke Ikeda^{*1}, Satoshi Furukawa^{*1},
Yuzuru SUZUKI^{*2}, Kiyoshi KIKUCHI^{*2}, and Wataru KAI^{*2}

Abstract Torafugu *Takifugu rubripes* is an attractive vertebrate model organism for genomics by virtue of its smallest genome among vertebrates and available whole-genome database. Our group has constructed the torafugu linkage map with over 400 markers. In this study, we screened superior trait-related genes of torafugu by using the genome database and linkage map. Following two groups of genes were screened and analyzed, 1: Growth and muscle formation related genes, 2: Sex determining genes. (1) Quantitative trait loci (QTL) associated with high growth were screened by linkage analysis in crosses between a high-growth selected male and wild female. By using microsatellite markers, we identified several loci which may relate to the high-growth trait. We also analyzed genes (*MYHs*) encoding myosin heavy chain, the most important functional molecule among muscle proteins. A comprehensive analysis on the genome database revealed at least 28 *MYHs* in torafugu, almost twice as many as in humans. Expression analysis of each *MYH* showed their developmental stage-specific and tissue-specific expressions. (2) By performing linkage analyses, we showed that the sex of torafugu is determined by a single chromosomal region named SDY on linkage group 19 in an XX-XY system.

Key words : genome database, myosin heavy chain, QTL, sex determination, torafugu

トラフグ *Takifugu rubripes* については近年、全ゲノム解析が行われ、この遺伝子情報を基にしたバイオテクノロジーおよびハイテクノロジーの進展が期待されている。検索が容易な遺伝子情報を利用してトラフグの優良遺伝形質を特定し、これを効率の良い養殖技術の展開に活用することが期待される。そこで我々はトラフグを主対象に、1) 筋発生および成長、2) 性統御、の2つの小課題を設定し、研究を遂行した。1) については高成長系トラフグの形質に関連する遺伝子の同定や可食部である筋肉の成長機構の解明を行うことで高成長のマーカー遺伝子が確立し、耐病性などほかの優良遺伝形質を兼ね備えた超優良品種の選抜育種の実現が可能となる。一方、2) については市場価値の高

い白子をもつ雄の選択的生産や、新しい有用な品種を作成した場合に、その無制限な拡散を防止するための技術の確立に役立つ。我々はトラフグゲノムデータベースを活用して上述した2課題に取り組み、その機構解明と関連遺伝子の同定を目指した。

トラフグゲノムの特徴

ヒトのゲノムサイズは3000Mbであるが、含まれる構造遺伝子の数は20000~27000とされ、そのゲノム全体に占める割合は僅か1.5%程度にすぎない。その他、遺伝子の発現調節に使用される転写調節領域や、最近その機能が注目されている small RNA などが

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

^{*1} 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物学研究室 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 (Laboratory of Aquatic Molecular Biology and Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan)

^{*2} 東京大学大学院農学生命科学研究科農学部附属水産実験所 〒431-0214 静岡県浜松市舞阪町弁天島2971 (Fisheries Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Maisaka, Shizuoka 431-0214, Japan)

転写される領域があるが、ゲノムの大部分は機能を持たないDNAと考えられている。一方、トラフグのゲノムサイズは365Mbであり、これはヒトの約1/8で、脊椎動物中最も小さい。ところが、遺伝子数は21000程度とヒトとほぼ同数である (Brenner et al., 1993, Aparicio et al., 2002)。すなわち、トラフグゲノムには機能をもったDNA配列が集約されており、無駄な情報が少ないと考えられる。実際に、トラフグゲノムの配列をみると、繰り返し配列の量はヒトではゲノム全体の50%にもなるが、トラフグではわずか15%以下である (Ikeda and Watabe, 2004)。また、イントロンの75%はヒトでは2609bp以下であるのに対し、トラフグでは425bp以下である。

現在様々な生物種で全ゲノム解析の成果が報告され、膨大なゲノム情報が蓄積されている。その中から、意味のある(機能のある)領域を抽出することは困難であり、ポストゲノム研究の課題の一つとなっている。このような状況下で、トラフグはゲノム解析のモデルとして大きく注目されている。

トラフグ連鎖地図の作成

我々は、ゲノムデータベースを利用して、標識となるDNA配列(マーカー)の抽出とそれを利用した連鎖解析を行い、トラフグの連鎖地図を作成した (Furukawa et al., 2004, Kai et al., 2005)。これまでに、マイクロサテライトを中心とする400以上の多型マーカーを用いてトラフグの染色体数に一致する22連鎖群からなる連鎖地図を作成し、全ゲノムの約60%の配列の予想遺伝子をマッピングしており、様々な形質を支配する遺伝子座を特定できる体勢になっている。現在トラフグ連鎖地図はウェブ上で公開されている (<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/Fugu-Map/map.html>)。

優良な形質を示すトラフグ系統のQTL解析

体重や体長といった連続的な値によって表される表現型を量的形質(quantitative trait, QT)と呼ぶ。量的形質の決定は複数の遺伝子座の働きの組み合わせによると考えられ、この量的形質の発現に関連する遺伝子座(quantitative trait loci, QTL)を同定するのがQTL解析である。具体的には遺伝子型が異なる個体からなる集団について調査を行い、マーカーの遺伝子型と形質の表現型の関連を統計的に解析する。

我々はトラフグの高成長と目される雄と天然魚雌の組み合わせ2組を2006年2月に長崎種苗株式会社にて人工交配させ、得られた2系統(LおよびR系統)

をQTL解析に用いた。F1集団2系統、計184個体の孵化1ヶ月後の全長を測定し、これを表現型値とした。マイクロサテライトマーカー計135個を用いて、同集団の遺伝子型決定を行った。表現型とマーカー分離型の対応関係をソフトウェアMAPLで調べ、QTL解析を行った。QTL解析に用いたL系統の体長の平均値および分散値はそれぞれ8.03および1.32mmで、R系統のそれは6.73および0.633mmであった。両系統とも表現型値はほぼ正規分布に従った。遺伝子型解析では、用いたマーカーのうちほとんどが連鎖解析上有用な多型を示した。QTL解析により、複数の遺伝子座が高成長に関与していることが示唆されたが、LOD値は統計学的に有意なピークを示さず、遺伝子座の同定には至っていない。

ミオシン重鎖遺伝子のスクリーニングと筋形成における発現制御機構

トラフグの可食部である筋肉はいかに形成されるのか、そのメカニズムの解明は、肉質の改善や効果的な育種など、産業への応用に直結する。また、上述の高成長の形質を示すトラフグについて、筋形成の制御機構を調べることで、高成長のメカニズムの解明にもつながることが期待される。筋肉には様々な筋特異的タンパク質が含まれるが、我々はII型ミオシンの重鎖サブユニット(myosin heavy chain, MYH)に着目した。MYHはATPやアクチンとの結合部位を持ち、ATPの化学エネルギーをミオシン-アクチン相互作用による運動エネルギーに変換する筋収縮運動の主体となる分子である。MYHには一次構造の異なる複数のアイソフォームが存在し、それぞれが特異的な発現パターンを示すことで、速筋や遅筋、心筋といった筋肉の性質を規定する。さらに、運動や成長などでMYHアイソフォームの組成は変化し、筋肉を適応的に変化させる。

我々は、既報のコイMYHの配列を用いてトラフグゲノムデータベースをスクリーニングすることでトラフグMYHを網羅的に解析した。その結果、トラフグゲノムには少なくとも28個のMYHがあり、これはヒトの2倍に相当すること、速筋型MYHはゲノム上の5ヶ所に分散し、そのうち3ヶ所ではクラスターを形成していることを明らかにした (Figure 1) (Ikeda et al., 2004, 2007, Watabe & Ikeda, 2006)。ヒトゲノムとのシntenニー解析では、ヒトの速筋型MYHのクラスターに対応するトラフグの領域は倍数化しており、それぞれ1個のMYHを含むことが示された。トラフグMYHについては、翻訳産物の一次構造から速筋、遅筋、心筋などの組織特異的タイプに分類し、その

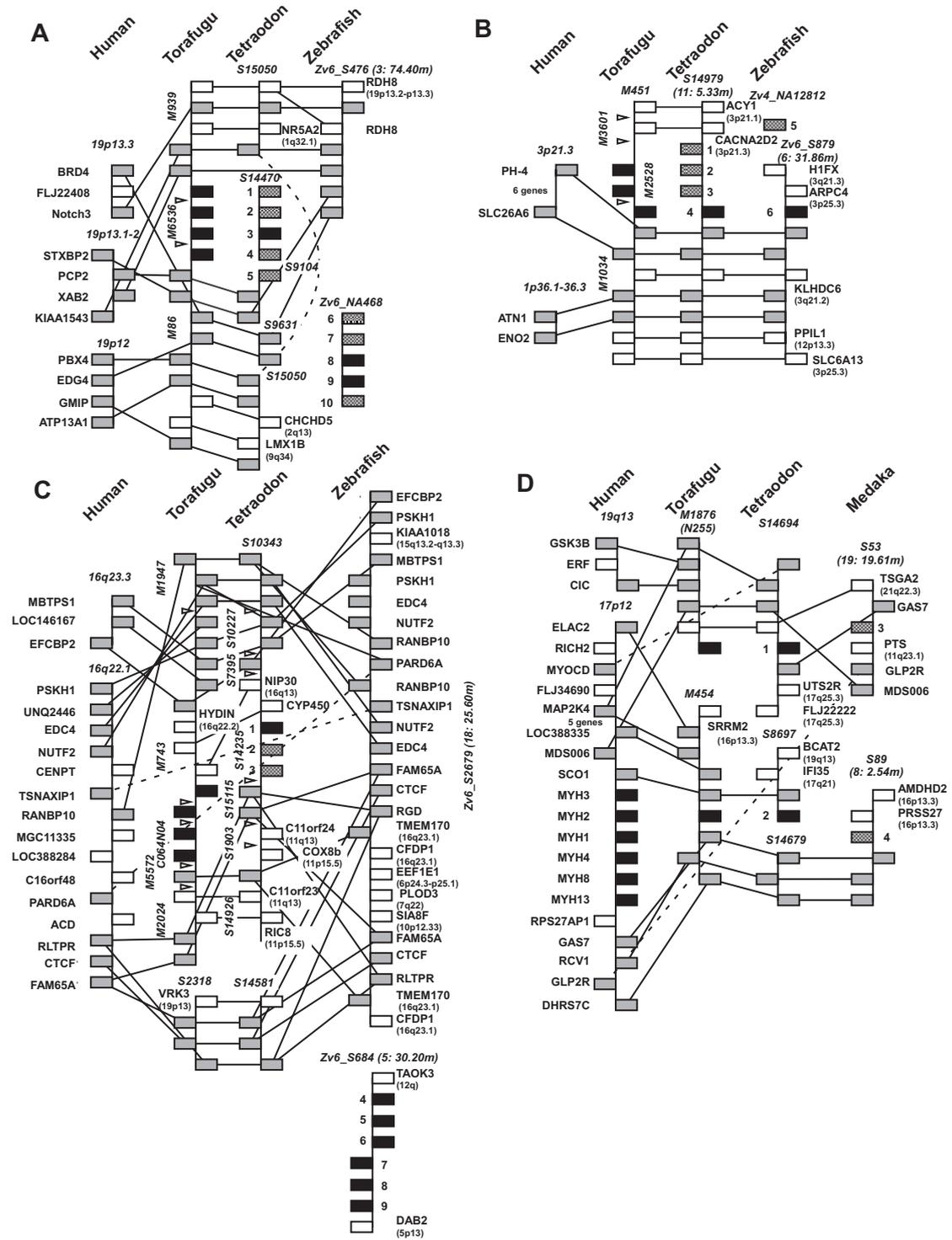


Fig. 1. Physical maps of human, torafugu, Tetraodon and zebrafish syntenic regions containing fast skeletal myosin heavy chains (*MYHs*). Data cited from Ikeda et al. (2007). Gray and open rectangles indicate syntenic and non-syntenic genes between fish and human, respectively. *MYHs* of torafugu and human are shown as filled rectangles. *MYHs* of Tetraodon, zebrafish and medaka are shown as filled and checked rectangles with numbers, which contain complete and incomplete genes, respectively. Genes displayed on the right of the midline are in forward strand (+ orientation, from top down), while those on the left are in reverse strand (- orientation, from bottom up). (A, B, C), no *MYH* is present in the human syntenic regions. (D), only a single *MYH* is contained in the torafugu and Tetraodon syntenic regions of human containing fast skeletal *MYHs* cluster. Although zebrafish syntenic regions of human *MYHs* cluster were not found, we found corresponding regions in medaka (panel D). Arrowheads indicate the boundary between two scaffold sequences.

うち胚に発現する速筋および遅筋タイプの *MYH* をそれぞれ、*MYH_{M743-2}* および *MYH_{M5}* と同定した。これらについては、胚における局在を *in situ hybridization* で明らかにし、*MYH_{M743-2}* が速筋、*MYH_{M5}* が遅筋と心筋に特異的であることを示した (Figure 2) (Ikeda et al., 2007)。次に、トラフグ成体の様々な部位の筋肉から、*MYH* をコードする cDNA のランダムクローニングを行い、*MYH* アイソフォームの組成を検討した。その結果、成体の速筋、遅筋および心筋において、複数の *MYH* アイソフォームが混在するが、その組成は筋肉間で異なることが示され、それぞれの筋組織で優先的に発現するアイソフォームが同定された。本結果はノーザンブロット解析でも支持された。*MYH_{M743-2}* および *MYH_{M5}* については、上流配列をゲノムデータベースから抽出し、ゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* レポーター解析を行った。遅筋と心筋に特異的な *MYH_{M5}* につき、翻訳開始点から上流 4kb を連結したレポーターベクターの導入により、ゼブラフィッシュ胚の表皮直下の遅筋線維と心室の心筋細胞でレポーター遺伝子の発現が観察された。さらに、欠損変異体を導入することで、特異的な発現パターンは上流 1-2kb のシス制御を受けることが示された。同様の解析で、速筋特異的に発現する *MYH_{M743-2}* についても、翻訳開始点から上流 2kb がその発現に必要であることが示された。

性決定遺伝子の探索

雌と雄という性の二型は、多くの生物に認められる進化的に保存された現象である。しかし、雌雄の決定は、性決定遺伝子に依存する種から環境要因による種まで知られており、性決定機構には不明な点が多く残されている。脊椎動物においては、1991年にほとんどの哺乳類の性を決定している遺伝子 *SRY* が同定されたが、哺乳類以外の種には当てはまらなかった (Capel, 2000)。2002年に脊椎動物としては2番目となる性決定遺伝子 *DMY* がメダカで同定されたが (Matsuda et al., 2002)、この遺伝子はメダカの近縁種以外では存在しないことが示されており、魚類を含む多くの動物の性決定遺伝子は不明のままである。トラフグは、水産上重要な魚種であり、雄の精巢は食品としての市場価値が高い。我々の研究により、トラフグの性は、LG19上に存在していて *XX-XY* 型の遺伝様式を示す単一のゲノム領域に支配されており、雄決定遺伝子座 *SDY* (Figure 3) を決定することができた (Kikuchi et al., 2007)。その領域には280個以上の予想遺伝子が存在していた。この連鎖解析の過程で、あ

る1つの家系において、遺伝子型が *XX* 型であるにもかかわらず精巢を持つ個体が見つかった。このことから、トラフグの性は、LG19上の性決定遺伝子以外の要因でも決定される場合があることが示された。

おわりに

トラフグは、そのコンパクトなゲノムサイズから、脊椎動物のゲノムの構造や機能、進化を考察する比較ゲノム解析のモデルとして注目されてきた。一方で、トラフグは我が国において最高級の食用魚であり、養殖も盛んに行われている。基礎的にも応用的にも、トラフグは重要かつ魅力的な研究対象である。

我々が目指した高成長に関連する遺伝子座を同定する *QTL* 解析はまだ途中にあり、その形質には複数の遺伝子座が関与することが示唆されたものの、候補遺伝子座は絞り込めていない。今後、*F2* 集団を用いた解析を進め、遺伝子座を同定するとともに、本研究で明らかにした *MYH* アイソフォームなど筋特異的遺伝子の発現制御との関連を明らかにしたい。また、性決定遺伝子座が同定されたが、遺伝子そのものは同定できていない。当該遺伝子座には他生物種で既報の性決定遺伝子は検索されず、トラフグの性決定遺伝子の同定は、脊椎動物の新規の性決定機構の解明にもつながる大きな波及効果を持つ成果となることが期待される。一方で、当該遺伝子座に依らない性転換があることも示され、今後その機構を明らかにする必要がある。

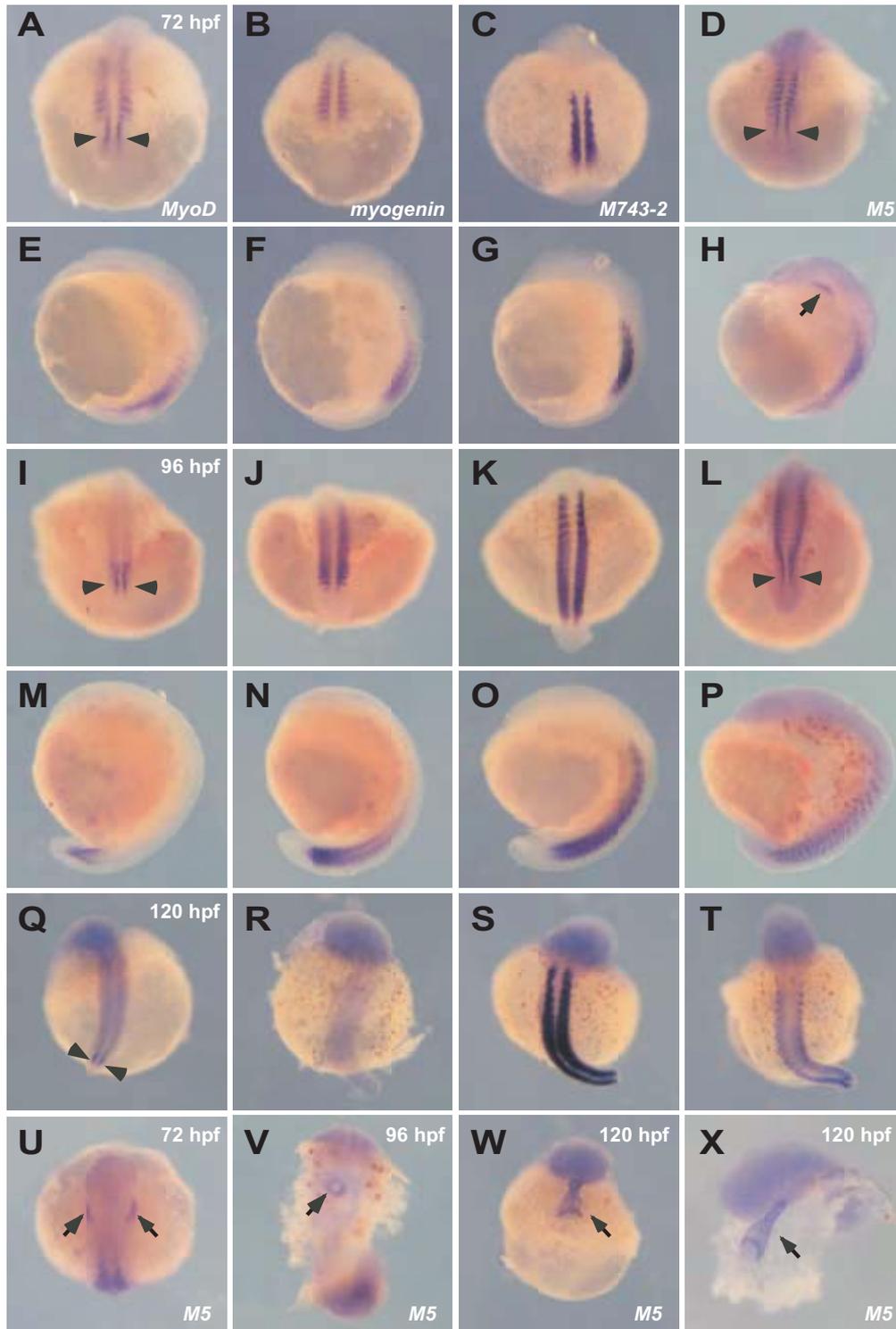


Fig. 2. Localization of the transcripts of fast skeletal myosin heavy chain gene (*MYH*), *MYHM*₇₄₃₋₂, and slow skeletal *MYH*, *MYHM*₅ in comparison with those of *MyoD* and *myogenin* in torafugu embryos. Data cited from Ikeda et al. (2007). (A-T), torafugu embryos were hybridized with probes specific to *MyoD* (A, E, I, M, Q), *myogenin* (B, F, J, N, R), *MYHM*₇₄₃₋₂ (C, G, K, O, S) and *MYHM*₅ (D, H, L, P, T) at 72 (A-H), 96 (I-P) and 120 (Q-T) hours post fertilization (hpf). Dorsal (A-D, I-L, Q-T) and lateral views (E-H, M-P) are shown. (U-X), the transcripts of slow skeletal *MYHM*₅ in developing myocardium at 72 (U), 96 (V) and 120 (W, X) hpf. Dorsal view (U), ventral view after removing the yolk (V), anterior view (W) and anterolateral view (X) are shown. Arrowheads and arrows indicate adaxial cells (A, D, I, L, Q) and developing myocardium (bilateral heart precursor cells, H and U; heart cone, V; heart tube, W and X), respectively.

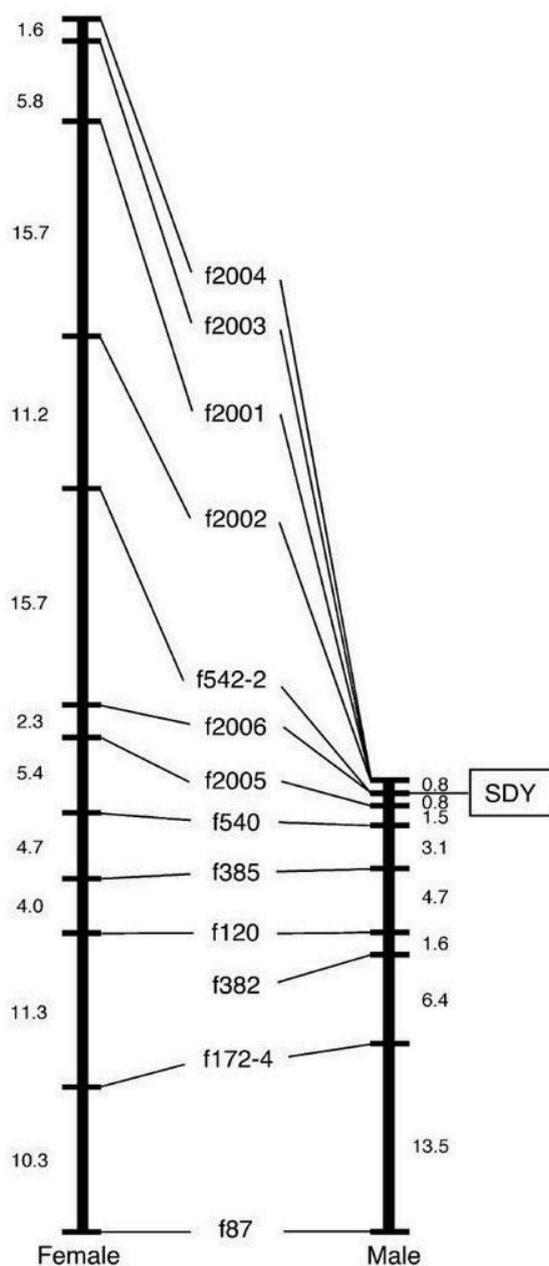


Fig. 3. Male and female meiotic maps of torafugu LG19. Data cited from Kikuchi et al. (2007). The markers f2006, f542-2, and SDY (the locus determining male sex phenotype) showed no recombination. Genetic maps were generated using 75 males and 55 females from family 1. Allelic bridges are indicated with a line connecting female (left) and male (right) linkage maps. Genetic distances in centimorgans between adjacent markers are shown. The microsatellite loci were chosen by scanning scaffolds on electronic resources available from the Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>).

文 献

- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S., 1993: Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, **366**, 265–268.
- Capel, B., 2000: The battle of the sexes. *Mech. Dev.*, **92**, 89–103.
- Furukawa, S., Takeshima, H., Otaka, T., Mitsuboshi, T., Shirasu, K., Ikeda, D., Kaneko, G., Nishida, M., and Watabe, S., 2004: Isolation of microsatellite markers by *in silico* screening implicated for genetic linkage mapping in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.*, **70**, 620–627.
- 池田大介, 渡部終五, 2004: フグゲノム: 脊椎動物で最も小さいサイズ. 蛋白質 核酸 酵素, **49**, 2235–2241.
- Ikeda, D., Clark, M. S., Liang, C. S., Snell, P., Edwards, Y. J. K., and Watabe, S., 2004: Genomic structural analysis of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) skeletal myosin heavy chain genes. *Mar. Biotechnol.*, **6**, S462–S467.
- Ikeda, D., Ono, Y., Snell, P., Edwards, Y. J., Elgar, G., and Watabe, S., 2007: Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: evidence from comparative genomic analysis. *Physiol. Genomics*, **32**, 1–15.
- Kai, W., Kikuchi, K., Fujita, M., Suetake, H., Fujiwara, A., Yoshiura, Y., Ototake, M., Venkatesh, B., Miyaki, K., and Suzuki, Y., 2005: A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, **171**, 227–238.
- Kikuchi, K., Kai, W., Hosokawa, A., Mizuno, N., Suetake, H., Asahina, K., and Suzuki, Y., 2007: The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, **175**, 2039–2042.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., et al., 2002: DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559–563.
- Watabe, S. and Ikeda, D., 2006: Diversity of the pufferfish *Takifugu rubripes* fast skeletal myosin heavy chain genes. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics*, **1**, 28–34.