

Studies on genetic markers and linkage mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri*

(マツカワにおける遺伝マーカーと連鎖地図作成に関する研究)

学位論文内容の要旨

マツカワ *Verasper moseri* は主に北海道周辺に生息する冷水性の大型カレイである。本種は成長が速く、商業的価値の高い高級魚であるが、その天然資源の水準は著しく低い。北海道ではその資源回復と漁業生産量の向上を目的として、100 万尾規模での人工種苗生産および放流が行われている。

多くの魚類では、その性は遺伝的に決定すると考えられているが、環境の性決定への関与も多くの魚種で報告されている。マツカワにおいても性分化期に高水温条件下 (18℃) で飼育すると、遺伝的雌が雄化し、性比が雄に偏るが、14℃で飼育すると性転換が起こらず、雌雄 1:1 家系が得られる。マツカワにおいては雌が早く成長し大型化する。従って雌は短期間で出荷サイズに達することから、養殖の場合には全雌生産が生産効率の向上につながる。本研究はマツカワの性統御技術確立に向けて、性決定機構解明に資することを目的として行った遺伝学的研究をまとめたものである。

第一章ではマツカワの遺伝的研究のために必要であるマイクロサテライト DNA マーカーの開発を行った。すなわち、核ゲノム中のマイクロサテライト (MS) 領域のクローニングを行ない、得られたシーケンス配列から 348 組のプライマーを設計した。第二章ではそれら MS マーカーを用いて雌性発生二倍体の誘導の確認を行った。遺伝的性決定が XX-XY 型の種では、雌性発生群は Y 染色体を持たないため、全て雌となることが期待される。しかしながら、性転換が生じないとされる低水温 (12℃~14℃) で飼育した場合、雌比率が 95%を示す群もある一方で、雌比率 7%の群も生じた。この結果が、不完全な精子の遺伝的不活性化処理による雌性発生誘導の失敗によるのかは不明であった。そこで、雌性発生二倍体誘起の成否について分子遺伝学的手法により検討した。すなわち、第一章で開発した MS マーカーのうち、多型性を示した 34 マーカーを用いて通常交配群におけるメンデル遺伝の確認を行った後、第二極体放出阻止型雌性発生二倍体 4 家系の遺伝学的確認を行った。その結果、いずれの雌性発生個体においても精子由来ゲノムの関与は認められなかった。従って、一部の雌性発生家系において 100%に近く雌が生じたことは、本種の性決定が基本的に XX-XY 型であり、雄は遺伝的な雌の性転換により生じるものと考えられた。しかし、ある家系では 70-95%が雌であったのに対し、別の家系では約 85%が雄であった。これらの事実から、水温に対する感受性は家系毎に遺伝的に異なり、より複雑な性決定システムが関与することが予想された。

以上のように、マツカワでは性比異常により、雌親魚確保のみならず、放流魚の自然繁殖に問題が予想される。従って、マツカワの性比が偏る原因を明らかにし、性比が等しくなる種苗育成技術を開発することは重要である。本種の性については、親魚の遺伝的な背景が影響することもあると考えられる。そこで、第三章では、性分化期において同一水槽中で複数家系を混合飼育し、その性比を比較することで、親魚による影響の有無を調べた。雌雄 1 : 1 交配により作出した複数家系 F1 (422E-2618)、F2 (0C38-683A)、F3 (3642-395B)、F4 (3642-2618)、F5 (422E-683A) を性分化期以前に混合し、同一環境で 5 ヶ月間飼育した。水温 8℃ で受精、孵化をさせた後、F1、F2 および F3 交配群家系は孵化後 5 日、F4 および F5 交配群家系は孵化後 3 日に、それぞれを同一の 1 t 水槽 (M1 および M2) に混合した。また、比較のため、F2 のみを入れた水槽 (M4) を用意した。混合飼育開始後、飼育水温を 1 日 0.5℃ ずつ、14.5℃ まで上昇させ、孵化後 26 日まで維持、孵化後 27 日以降、サンプリング時 (孵化後 136 日～147 日) まで、水温 13.5～14.5℃ で飼育した。M4 の水槽の水温も同様の条件とした。全長 60mm のステージで、M1 水槽より 150 個体、M2 水槽より 100 個体、M4 水槽より 50 個体を採集した。性判別は生殖腺の外部形態あるいは組織像の違いに基づき判別を行った。4MS 座 (*Vemos32*, *Vemos39*, *Vemos105*, *Vemos207*) の分析の後、PAPAver. 2.0 を用いて親子鑑定を行った。各家系の性比の雌雄 1 : 1 からのずれについての有意差を検討するために χ^2 検定を行った。各家系間の性比の差を検討するには多重比較検定 (Ryan の対比較) を行った。その結果、M1、M2 集団において、それぞれ 99% (149/150)、97% (97/100) の親子鑑定ができた。各家系 (F1、F2、F3、F4、F5) の性比 (雌 : 雄) はそれぞれ、1:44、18:33、16:37、14:47、16:20 であり、M4 水槽で飼育された F2 家系の性比は 13:37 であった。F1、F2、F3 と F4 家系の雌比率は有意に低く、同一水槽内においても家系間で性比は異なった。一方、異なる水槽で飼育した同一家系 F2 において性比の差は見られなかった。以上のことから、親魚によって水温に対する感受性が異なることが示唆された。

そこで第四章では、性比が雌雄 1 : 1 となる人工種苗の育種を目指して、マツカワの性比変動に係る遺伝的要因の解明に向けて、連鎖地図を作成した。連鎖地図は、本種における遺伝育種学的な研究 (量的遺伝子座、QTL 解析、マーカー選抜など) の基盤となるばかりか、性連鎖マーカーの開発にもつながる。連鎖地図作成にあたっては多数のマーカーを必要とすることから、開発した 348 MS マーカーに加えて、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)、データベースで公開されている 27 のマツカワ MS プライマーと 72 のホシガレイ MS プライマーを利用した。雌 : 雄 = 3:7 の家系について分析したところ、合計 571 (453 MS、109 AFLP、9 SNP) マーカーのうち、207 (139 MS、65 AFLP、3 SNP) マーカーが雌親で、188 (139MS、44 AFLP、5 SNP) マーカーが雄親で多型性を示した。Pseudo test cross 法による連鎖解析の結果、雌の連鎖地図の全長は 1271cM で 26 連鎖群から、雄の連鎖地図の全長は 822.6 cM で 19 連鎖群から構成されていた。これらのうち、13 連鎖群は雌雄で共通した。マーカーの不足により、連鎖群の数がマツカワの半数体染色体数 ($2n=23$) と一致せず、性に連鎖した DNA マーカーは得られなかった。

そこで、分析に用いた家系の雄と雌の子孫ですべてのマーカーについて分離比を検討した。その結果、11MS (*Vemos 4*, *Vemos 12*, *Vemos 20*, *Vemos 32*, *Vemos 39*, *Vemos 49*, *Vemos 61*, *Vemos 62*, *Vemos 221*, *Vva*

14, *Vmos* 17), 2AFLP (182p6, 356p28) と 1 SNP (Poli21S318) の合計 13 マーカーにおいて雌雄間で分離に有意な偏りがみられた。これらのうち 7 つは第 5 連鎖群、6 つが第 6 連鎖群にあった。MS マーカー

一の分離を他の 3 つの雌 1 : 雄 1 家系 (500B, 500E, F5) で調べた結果、F 5 家系と 500E 家系では第 6 連鎖群のマーカーに分離比のゆがみが見られた。一方、500B 家系では全てのマーカーは均等に分離をした。以上のように、家系により第 5 および第 6 連鎖群のマーカーで雌雄間に分離の偏りが生じることがあった。

本研究により、マツカワの遺伝的解析に利用可能な多数の DNA マーカーが開発された。これらを用い雌性発生二倍体作出が成功していることが判明した。雌性発生二倍体群で全雌に近い性比が生じたことから、XX-XY 型の性決定が推定された。親子鑑定の結果 性分化期を同一水槽で飼育した家系間で雌比率が著しく低い家系が見られ、性比への遺伝的背景の関与が示唆された。連鎖地図を作成したが、性に連鎖した DNA マーカーを見出すことはできなかった。しかし、家系により第 5 および第 6 連鎖群のマーカー分離比が雌雄の子孫間で歪む傾向があることが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 阿 部 周 一

副 査 教 授 山 羽 悦 郎 (北方生物圏フィールド
科学センター)

学 位 論 文 題 名

Studies on genetic markers and linkage mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri*

(マツカワにおける遺伝マーカーと連鎖地図作成に関する研究)

マツカワ *Verasper moseri* は商業的価値の高い冷水性の大型カレイであるが、その天然資源の水準は著しく低く、北海道ではその資源回復と漁業生産量の向上を目的として100万尾規模での人工種苗生産および放流が行われている。しかし、本種では、性分化期に高水温条件下(18℃)で飼育すると、遺伝的雌が雄化するが、14℃で飼育すると性転換が起こらず、性比1:1の家系が得られるとされている。また、雌の成長が雄より良いことから、養殖の場合には全雌生産が生産効率の向上につながる。本研究はマツカワの性統御技術確立に向けて、性決定機構解明に資することを目的として行った遺伝学的研究をまとめたものであり、以下の評価すべき成果を得た。

(1) 遺伝的研究に必要とされる高多型性共優性DNAマーカーであるマイクロサテライトDNAマーカーの開発を行った。すなわち、核ゲノム中のマイクロサテライト(MS)領域のクローニングを行ない、得たシーケンス配列から348組のプライマーを設計した。

(2) 遺伝的性決定がXX-XY型の種では、雌性発生群はY染色体を持たないため、全て雌となることが期待される。しかしながら、性転換が生じないとされる低水温(12℃~14℃)で本種を飼育した場合、雌比率が95%を示す群もある一方で、雌比率7%の群も生じ、この結果が、人為的な雌性発生二倍体誘導の失敗によるのか否かは不明であった。そこで、開発した34MSマーカーを用いて、第二極体放出阻止型雌性発生二倍体4家系の遺伝学的確認を行った結果、いずれの雌性発生個体においても精子由来ゲノムの関与は認められな

かった。従って、一部の雌性発生家系において 100%に近く雌が生じたことは、本種の性決定が基本的に XX-XY 型であり、雄は遺伝的な雌の性転換により生じるものと考えられた。

(3) 水温に対する感受性に親魚の遺伝的な背景が影響している可能性を検討する為、性分化期において同一水槽中で複数家系を混合飼育し、その性比を比較することで、親魚による影響の有無を調べた。すなわち、雌雄 1 : 1 交配により受精させた複数家系 F1、F2 および F3 交配群を孵化後 5 日に M1 水槽に、F4 および F5 交配群を孵化後 3 日に M2 水槽に、また、F2 のみを M4 水槽に入れ、サンプリング時（孵化後 136 日～147 日）まで、水温 13.5 ～14.5℃で飼育し、性判定の後 4MS 座 (*Vemos32*, *Vemos39*, *Vemos105*, *Vemos207*) による親子鑑定を行なった。その結果、F1、F2、F3 と F4 家系の雌比率は有意に低く、同一水槽内において家系間で性比は異なり、親魚により水温に対する感受性が異なることが判明した。

(4) マツカワの性比変動に係る遺伝的要因の解明と本種における遺伝育種学的研究（量的遺伝子座、QTL 解析、マーカー選抜など）基盤を確立するため、連鎖地図作成を行った。地図作成にあたっては、雌：雄＝3:7 の家系を使用し、開発した 348 MS マーカーの他に、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) と Single Nucleotide Polymorphism (SNP) マーカー、さらにデータベースで公開されている 27 のマツカワ MS プライマーと 72 のホシガレイ MS プライマーも利用した。207 (139 MS, 65 AFLP, 3 SNP) マーカーが雌親で、188 (139 MS, 44 AFLP, 5 SNP) マーカーが雄親で多型性を示し、Pseudo test cross 法により解析を行った結果、雌の連鎖地図の全長は 1271cM で 26 連鎖群から構成され、雄の連鎖地図の全長は 822.6 cM で 19 連鎖群から構成されていた。これらのうち、13 連鎖群は雌雄で共通した。性に連鎖した DNA マーカーは得られなかったが、第 5 および第 6 連鎖群にある合計 13 マーカーにおいて雌雄間で分離に有意な偏りがみられた。同様の偏りは他の交配群（家系）でも認められ、家系により第 5 および第 6 連鎖群のマーカー分離比が雌雄の子孫間で歪む傾向があることが判明した。

申請者による以上の研究成果は、水産遺伝育種学上重要な成果と考えられ、審査員一同は、申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。