

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870937

研究課題名(和文) クロマグロ産卵親群編成の為の、精度良い雌雄判別DNAマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of a high fidelity sex genotyping DNA marker of Pacific bluefin tuna for organization of spawning group.

研究代表者

阿川 泰夫 (AGAWA, Yasuo)

近畿大学・水産研究所・助教

研究者番号：00398116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：完全養殖クロマグロ雄特徴的DNA多型を詳細に調査するため、F2世代雄の全血をより、ファージゲノムライブラリーを作成した。約6万のファージから雄特徴的配列を含む2つの独立のファージクローンを得た。2クローンの全塩基配列決定を行い、データベースを用いて他生物との相同解析を行った。その結果、2クローンは相同性が高いものの独立の配列である事、2クローン計34 kbpのゲノム配列にコーディング遺伝子がない事が明らかとなった。該当クローンには他生物で報告されているTRIM14遺伝子と相同性があった。該当領域を完全養殖F3雌雄で比較したところ、X染色体特徴的マーカー(97%雌陽性、n=32)を同定した。

研究成果の概要(英文)：To determine the detail of male characteristic DNA marker, phage genomic DNA library was established using F2 generation of cultured Pacific Bluefin tuna male whole blood. Two phage clones containing male characteristic sequence were screened from 60,000 phages. Nucleotide sequence of the insert was identified and the resultant sequences were analyzed by international data base. It revealed that the two clones were highly homologous but they were independent sequence, and totally 34 kbp of the Pacific bluefin tuna genomic sequence did not contain coding gene. However, the sequence had similarity to TRIM14 gene. We determined male characteristic sequence region between F3 male and female, then found X chromosome characteristic marker (97% female positive, n=32).

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマグロ 雌雄判別DNAマーカー

1. 研究開始当初の背景

天然クロマグロ資源は深刻な枯渇に直面しており、その漁獲規制は今日も続いている。天然ヨコワ資源に依存しない生産、すなわち完全養殖クロマグロは持続可能な本魚養殖に必須である。クロマグロ生産の第一段階である受精卵の取得は、現在のところ気温、水温に大きく委ねられており、また、雌の性成熟が産卵期において個体間で大きく異なるので性成熟した雌が多く産卵魚群にいと生産に有利である。雄よりも雌の比率を高めた産卵魚群が望ましい。

クロマグロでは、性成熟期に雌雄を外観で判別することは不可能である。出来るにしても成熟大型魚を編成することは大変危険であり、またハンドリングに弱い魚であるので魚群編成後は死んでしまう。

研究代表者阿川らは完全養殖クロマグロ雄に特徴的な DNA 多型を同定した。該当マーカーを用いた F3 世代での雌雄判別正答率は 94%(F3 雌雄 32 尾計 64 尾中)であった。DNA 鑑定を用いれば、幼魚期に鱗の一部を標本採取することで雌雄判別が可能となる。クロマグロ幼魚期であればハンドリングが難しいものの、生残率 50%程度で魚群編成可能である。

2. 研究の目的

近い将来において、雌の比率を高めた産卵魚群を編成するため、精度良いクロマグロ性判別 DNA 多型マーカーの同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1)クロマグロ雄に特徴的な配列 400 bp を研究開始時に同定済であった。本配列を特異的に PCR 増幅させる事が出来るので、これを用いてファージゲノムライブラリーより本断片を含む配列をスクリーニングにより得た。完全養殖クロマグロ F2 世代雄より全血を得て、制限酵素部分消化後、17 kbp のインサートをファージアームと結合した。当研究室にはハイブリ、蛍光検出システムが無いので、ファージライセートに目的断片が含まれるか否かで試験した。数千のファージをプレートに接種し、そのライセート DNA を精製、PCR で検査し、雄特徴的断片陽性であれば、数百ずつプレートに接種、さらに数十、数個と減数させ、最終的にファージを単離した。本方法で 2 つの雄特徴的断片陽性クローンを単離した。

(2)得られたファージクローンをプライマーウォーキング法で配列解析した。明らかになった DNA 配列を国際データベース(DDBJ, NCBI 併用)、DNA 解析ソフトを活用し、既知 DNA 情報との相同性を解析した。

(3)雄で明らかになった配列に相同な部分にプライマーをデザインし、雌雄で配列を比較解析した。

4. 研究成果

(1)ファージライブラリー作成のため、ゲノム DNA をなるべく切れないように調整しなくてはならなかった。クロマグロ全血、心臓、肝臓で調査した内、全血が最も切断が少なく調整出来ると確認できた(図 1 は一例として全血と心筋のみ)。

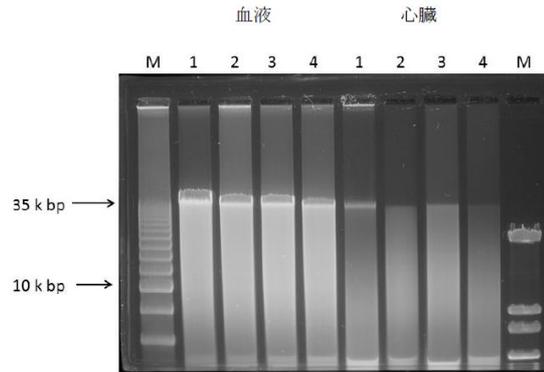


図 1 クロマグロ全血、心筋より調整したゲノム DNA の電気泳動像。左右 M は分子サイズマーカー。1-4;数字が多くなるにつれて電気泳動に用いた DNA 量減少。0.3%アガロースを用いた。

ゲノムライブラリー作成については、実験書を参考にしてみると、ゲノム DNA を超遠心機で密度勾配分離し調整するなど、丁寧ではあるが、高額機と時間のかかる例が頻りに報告されている。本研究の課程で、低密度アガロースゲルによる電気泳動(図 1)と、このゲルから目的断片およそ 17-20 kbp の切り出し精製した DNA でも何ら問題なくファージライブラリーを調整できることが分かった。本手法はとても簡単なライブラリー調整法である。

(2) 13 万のファージからスクリーニングを開始し、2 つの雄特徴的 DNA 多型マーカー(Md6)を含むファージクローン(#7, #9)を得た。

当初、#7 と #9 は Md6 配列近傍(スクリーニングに使ったプローブ部分)を含み、左右の取得配列の長さが違うのみと予想した。しかし、予想に反して、2 つのファージクローン(#7, #9)はどちらも雄特徴的配列(Md6)を含むものの、全く独立の配列である事、また互いに相同性がとても高いことが明らかとなった(図 2)。クローン #7 は 17,195 bp の、クローン #9 は 17,293 bp のインサートを保有していた。

ゲノム Ensemble browser や、DDBJ データベースで解析を行い、この配列の特徴を調査した。この配列は TRIM14(tripartite motif containing 14)遺伝子に部分的に相同性が高かったが、ORF を保有していなかった。TRIM14 に相動性の高い場所はメダカゲノムに 13、海産魚でしばしば参照されるイトヨには 70 か所報告されており、このことからクロマグロにおいても TRIM14 のシュドジーンがゲノ

ムに複数散在していると考えられた。我々の見つけた 6 塩基欠損多型(Md6)は Y 染色体上に少なくとも 2 か所あると結論した。なお、インサート計 34 kbp にコーディングジーンは無かった。コーディングジーンが見つければ、他生物の染色体上遺伝子座情報を参考に出来る可能性が高く、さらに精度良い性判別 DNA マーカーの取得につながる可能性が高い。これについては、最近中央水研グループがクロマグロの染色体地図を報告したので、クロマグロ染色体地図マーカーと Md6 連鎖解析を行えば、さらに精度良い性判別マーカー開発につながるかと期待できる。

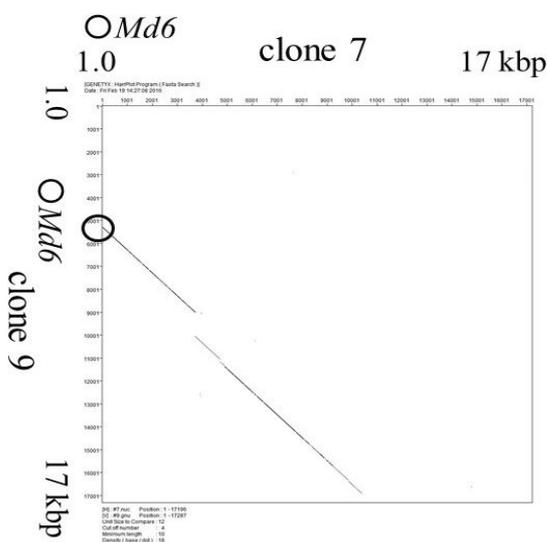


図2 Md6 を含む 2 つのファージクローンインサート、ドットプロット相同性解析結果。斜線部分は互いに相同性がとても高い。Md6 の位置を赤丸で示している。それぞれのクローンで 17 kbp インサートの半分以上相同性が高い。

(3) クロマグロ雄特徴的 6 塩基欠損配列(Md6)より近傍のゲノム配列を雌雄で比較した。完全養殖 F3 クロマグロ全血標本より雌雄 2 尾ずつ選び、ゲノム DNA を調整した。次に、制限酵素 *Dra* , *EcoR* , *Pvu* , *Sca* , *Stu* を用いてゲノムウォーキングライブラリーを作成した。該当ライブラリーより、Md6 特異的 PCR スクリーニングで Md6 を含むゲノム断片を *Stu* ライブラリーから単離に成功した。該当配列を雌雄で精査したところ、Md6 より 1.5kbp 離れた位置に、雌に特徴的な連続する 210 bp の欠損多型を同定した。該当配列の F3 浸透率を調査する目的で、210 bp 欠損を挟み、検出するよう PCR プライマーと PCR 系を確立した。本手法で F3 雌雄 32 尾ずつ、計 64 尾を調査したところ、F3 雄 32 尾中 28 尾を 210bp 欠損無しと判別した。F3 雌では 32 尾中 31 の 210 bp 欠損ありと判別した(判別率 97%)。F3 雌を高精度で雌雄判別できる雌 210 bp 欠損マ

ーカーを同定したが、これは X 染色体上に位置すると予想されるので、雌雄判別を高精度で行えるのは F3 世代に限るので使用には注意が必要であると考えられた。しかし、X 染色体上であるならば、もう少し雄でも多く検出されても良いように考えられ、今後の精査を必要とする。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y. Agawa, M. Iwaki, T. Komiya, T. Honryo, K. Tamura, T. N. Yagishita, T. Kobayashi, Y. Sawada. Identification of male sex-linked DNA sequence of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*. 2015. 81, 113-121. DOI:10.1007/s12562-014-0833-8.

〔学会発表〕(計 5 件)

阿川泰夫、岩城真由結、山根由行、高田義紘、小宮貴文、澤田好史 完全養殖クロマグロ雄に特徴的な DNA 多型について。日本水産学会 2016 年 3 月 26-30 日東京海洋大学、東京品川

Y. Agawa, Y. Takada, Y. Yamane, Y. Sawada. Identification of male and female characteristic DNA marker of Pacific bluefin tuna. *Aquaculture* 2016 February 22-16th. USA., Las Vegas.

Y. Agawa, Y. Takada, Y. Yamane, M. Iwaki, T. Honryo, Y. Sawada. Identification of male and female characteristic DNA marker of aquacultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture Europe* 2014 October 14-17th. Spain, San Sebastian.

阿川泰夫、本領智記、倉田道雄、岡田貴彦、澤田好史 クロマグロ雄に特徴的な DNA 多型マーカーについて。日本水産学会 2014 年 3 月 27-30 日北海道大学水産学部、北海道函館市

Y. Agawa, Y. Takada, K. Tamura, M. Awa, T. Honryo, T. Kobayashi, M. Kurata, T. Okada, Y. Sawada. Identification of male and female characteristic DNA marker of aquacultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Asia Pacific Aquaculture* 2013 December 10-13th. Vietnam, Ho Chi Ming city.

〔図書〕(計 1 件)

Advances in Tuna Aquaculture. Edited by Dr. Daniel Benetti. Chapter; Genetics in tuna aquaculture. Y. Sawada and Y. Agawa. Elsevier, 2015. 323-329 ページ担当。総 379 ページ。

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.flku.jp/>

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/02suisan/zosyoku/staff/agawa.html>

招待講演 2 件-クロマグロ性判別について
紹介-

Y. Agawa, SATERPS International symposium.
“Walk together towards the future”; stably
supplying high quality food. 2015 November 3rd.
Panama republic, Panama city.

Y. Agawa, N. Yagishita, S. Cusatti, K. Adames,
I. Tapia, A. Cano, D. Margulies, V. Scholey, T.
Kobayashi, Y. Sawada. Recent progress of
spawning ecology team. SATREPS 水産養殖技
術開発プロジェクトネットワークシンポジ
ウム 2015 December 19-20th. Tokyo,
Shinagawa.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿川 泰夫 (AGAWA, Yasuo)

近畿大学・水産研究所・助教

研究者番号：00398116

最後に、科研費若手 B 採択、研究資金、研
究の加速支援を頂いた日本学術振興会に厚
くお礼申し上げます。

以上