

報道関係者各位
プレスリリース

令和4年11月11日
国立大学法人東京海洋大学
国立大学法人熊本大学
国立研究開発法人水産研究・教育機構

ヒラメ性決定遺伝子が明らかになりました ～遺伝的性判別が正確に～

1. 発表者

研究代表者：坂本 崇（東京海洋大学 教授）

北野 健（熊本大学 教授）
山口 寿哉（水産研究・教育機構水産技術研究所 主任研究員）
山本 榮一（研究当時：鳥取県水産試験場 特別研究員）
服部ヒカルドショウヘイ（研究当時：東京海洋大学 博士研究員）
熊沢 溪一郎（研究当時：東京海洋大学大学院 博士前期課程）
中本 正俊（研究当時：東京海洋大学 博士研究員）
中野 佑紀（研究当時：東京海洋大学大学院 博士前期課程）
藤 加菜子（研究当時：東京海洋大学 博士研究員）

※本件に関するお問い合わせにつきましては、「6. お問い合わせ先」までお願いします。

2. 発表ポイント

- ◆ヒラメの性決定遺伝子が Y 特異的な *amh* 対立遺伝子 *amhy* であることを明らかにした。
- ◆ヒラメの遺伝的な雌雄判別が正確に実施可能になった。
- ◆性転換を起こした個体の識別が可能になるため、全雌生産のための性転換をしにくいヒラメ系統作出に向けた研究の進展が期待される。

3. 発表内容

ヒラメは重要な水産魚種の一つであり、おもに陸上養殖で生産される。身が引き締まって癖がないことが特徴の白身魚で、寿司や刺身といった代表的な日本食の食材として好まれている。

ヒラメは XX-XY 型の性決定様式を持ち、雄の Y 染色体上に存在する性決定遺伝子によって性が決まると考えられる。ヒラメは、雌雄で成長差（雌>雄）があることが知られており、養殖効率の更なる向上のための手段の1つとして、全雌生産がある。性分化時期に遺伝的雌（XX）個体に高水温処理や雄性ホルモンであるアンドロゲンを投与すると雄へ性転換（遺伝的雌（XX）・表現的雄）し、遺伝的雄（XY）個体に雌性ホルモンであるエストロゲンを投与すると雌に性転換（遺伝的雄（XY）・表現的雌）することが知られている。この技術を用いて偽雄化した XX 個体（遺伝的雌（XX）・表現的雄）と正常雌（XX 個体）（遺伝的雌（XX）・表現的雌）を交配すると仔はすべて XX の雌（遺伝的雌（XX）・表現的雌）になると考えられる。しかしながら、性分化時期までの飼育水温、飼育密度（ストレス）などで XX の雌稚魚が雄に性転換（遺伝的雌（XX）・表現的雄）してしまうため、全雌生産に至らないことが報告されている。そのため、養殖生産時に飼育環境の影響を受けても性転換しにくい系統を作出する必要がある。

また、これまでの技術では性転換雄（遺伝的雌（XX）・表現的雄）と正常雄（遺伝的雄（XY）・表現的雄）は全く見分けが付かず、遺伝的な雌雄を数年かかる後代検定などで確認する必要があり、簡単に性転換雄（遺伝的雌（XX）・表現的雄）を検出できなかった。このように、ヒラメの遺伝的

性を体長や成熟具合、系統に関わらず正確かつ短時間で非浸潤的に判別する手段は存在しないため、性決定遺伝子の同定が必要だった。

本研究では、解析家系を用いた遺伝解析（連鎖解析）により、雄特異的なゲノム領域を明らかにした（図 1）。また、その領域に存在する候補遺伝子の構造解析を行ったところ、発現調節領域内に塩基配列長の多型があることが明らかになった。この発現調節領域の多型について、天然魚の雌雄を用いて解析したところ、長さが短いもの（*amhy*: Y 型）を雄のみが保有、長さが長いもの（*amhx*: X 型）を雄と雌が保有することが明らかになり（図 2）、多型と性別が完全に一致することが明らかになった（なお天然魚は、自然界で性分化が決定した 5cm 程度の稚魚採捕後、1 年間飼育し解析した）（特許出願中）。さらに、候補遺伝子の発現解析を行ったところ、ヒラメの性分化が孵化後 60 日頃までに行われるなかで、発現調節領域が短い候補遺伝子（Y 型）のみが孵化後 25 日で特異的に発現していることが明らかになった（図 3）。また、ゲノム編集（CRISPR/Cas9 法）による遺伝子機能解析を実施した。その結果、抗ミューラー管ホルモン（*amh*）遺伝子がゲノム編集により破壊された遺伝的雄個体では、精巣ではなく卵巣が形成され（図 4）、この遺伝子がヒラメの性決定遺伝子であることが明らかになった。これにより、ヒラメの遺伝的性判別が正確に実施可能になった。今後、性転換雄（遺伝的雌（XX）・表現的雄）と正常雄（遺伝的雄（XY）・表現的雄）との識別が可能になり、養殖生産時に性転換しにくい系統を作出に向けて、大きな研究進展となった。

4. 発表論文：

雑誌：*Frontiers in Genetics*

タイトル：Y-specific *amh* allele, *amhy*, is the master sex-determining gene in Japanese flounder

Paralichthys olivaceus

著者：Ricardo Shohei Hattori, Keiichiro Kumazawa, Masatoshi Nakamoto, Yuki Nakano, Toshiya Yamaguchi, Takeshi Kitano, Eiichi Yamamoto, Kanako Fuji and Takashi Sakamoto

DOI 番号：10.3389/fgene.2022.1007548

論文 URL：<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1007548>

Frontiers in Genetics 13: 1007548.

Published on line: September 16, 2022.

5. 研究助成

本研究は、JSPS 科研費 25292118、16H04970、L19549 および JST/JICA SATREPS プロジェクトの交付を受けて実施しました。

6. 問い合わせ先

東京海洋大学 学術研究院 海洋生物資源学部門

教授 坂本 崇（さかもと たかし）

Tel : 03-5463-0450 / E-mail : takashis@kaiyodai.ac.jp

熊本大学 大学院先端科学研究部（理学系）

教授 北野 健（きたの たけし）

Tel : 096-342-3031 / E-mail : tkitano@kumamoto-u.ac.jp

水産研究・教育機構 水産技術研究所

主任研究員 山口 寿哉（やまぐち としや）

Tel : 0599-66-1864 / E-mail : yamaguchi_toshiya41@fra.go.jp

7. 参考図

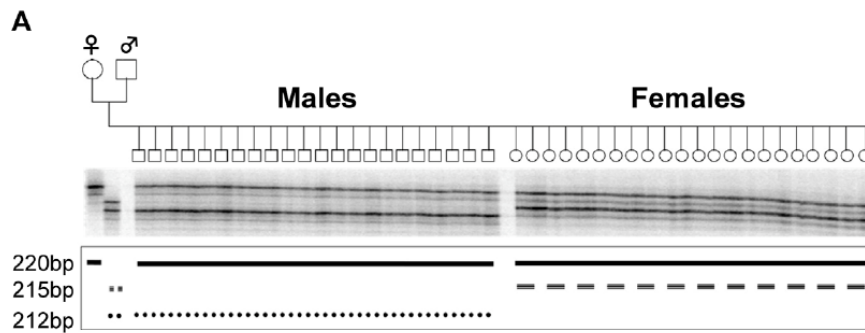


図 1：性に関する連鎖解析

ヒラメ解析家系において、遺伝マーカー (Poli185TUF) を用いて性に関する連鎖解析を行ったところ、雄親由来の 212bp が子孫に遺伝すると雄になることが明らかになり、XX-XY 型の性決定システムであることがわかった。さらに、他の遺伝マーカーや解析家系を用いることで、性決定遺伝子の存在する領域を特定した。

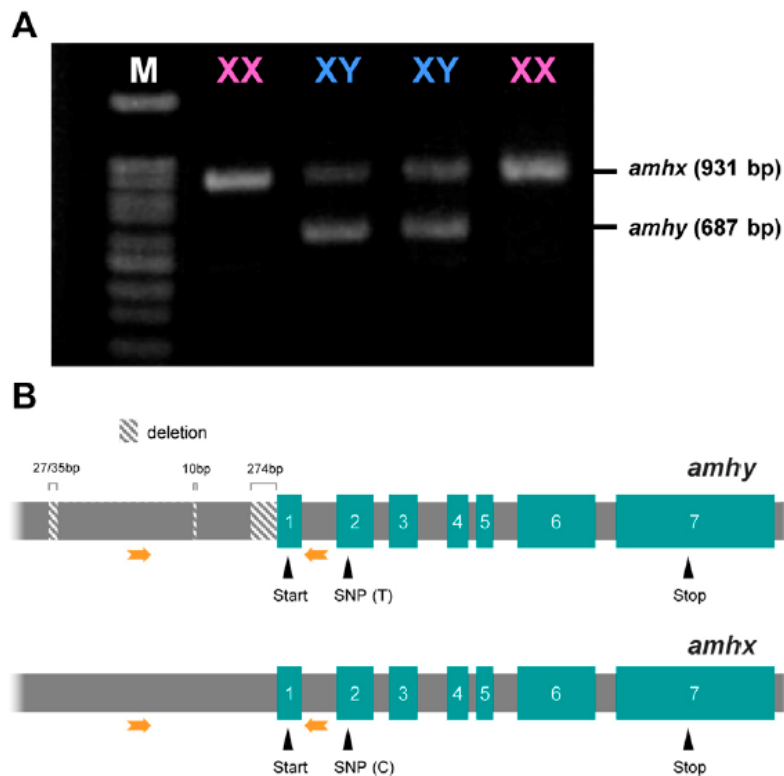


図 2：性に関する関連解析

(A) 抗ミュラー管ホルモン遺伝子の発現調節領域配列を対象として、ヒラメゲノム DNA を用いて PCR 法により増幅後、アガロースゲル電気泳動による解析の結果、雄個体では 931bp と 687bp の DNA 断片が検出され、雌個体では 931bp の DNA 断片のみが検出された。天然魚の雌雄とも完全に一致し、ヒラメにおいて遺伝的な性別判別が正確に実施可能になった。(B) 抗ミュラー管ホルモン遺伝子の発現調節領域に多型 (*amhy* : Y 型に deletion : 斜線部) が存在した。

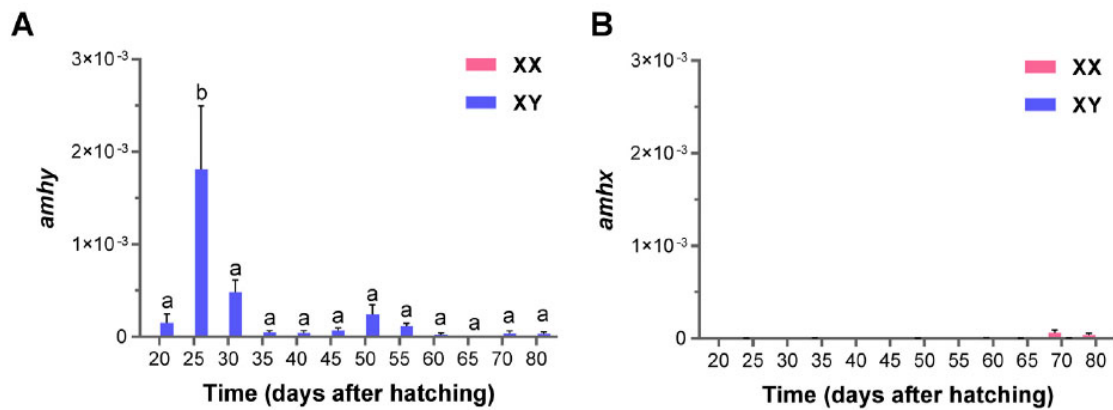


図3：性決定遺伝子候補の発現解析

(A) 抗ミュラー管ホルモン遺伝子の *amhy* : Y型と *amhx* : X型に存在する多型が発現調節領域であるため、エクソン内の多型(アミノ酸同義置換)を指標として *amhy* : Y型と *amhx* : X型の発現を識別し、孵化後20日目から80日目までの発現解析を実施した。その結果、ヒラメの性分化が孵化後60日頃までに行われる中で、孵化後25日目に *amhy* : Y型の有意な発現が検出された。

(B) *amhx* : X型は80日目までに非常に低い発現しか検出されなかった。

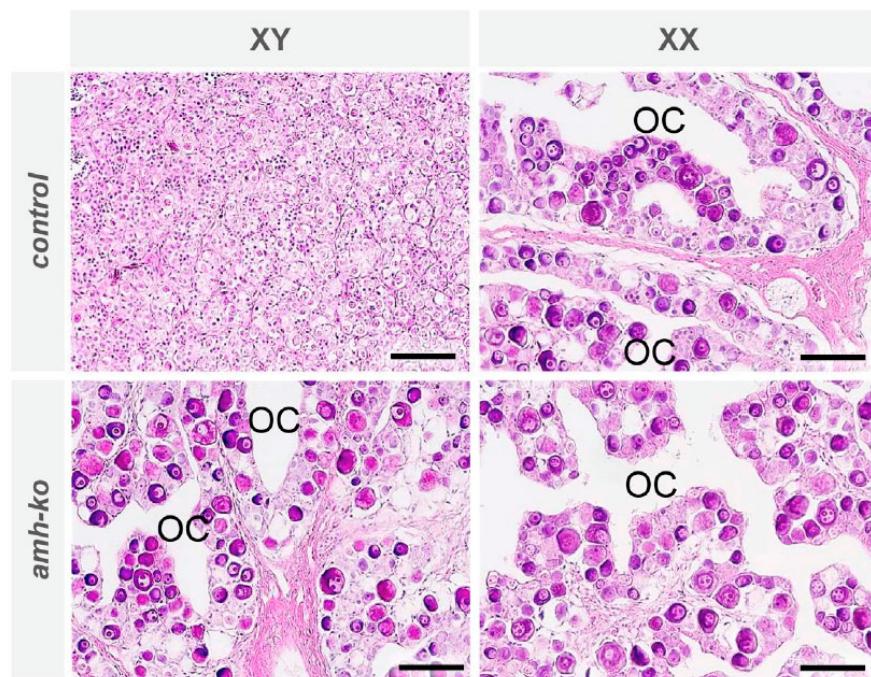


図4：性決定遺伝子候補の機能欠失実験

抗ミュラー管ホルモン (*amh*) 遺伝子に対してゲノム編集 (CRISPR/Cas9法) による遺伝子機能解析を実施した結果、ゲノム編集された遺伝的雄個体 (*amh-ko*, XY) では、精巣ではなく卵巣が形成された。多数の卵母細胞、卵巢腔 (OC) が形成され、完全な雌に性転換していた。