

Study on the Epigenetic Modulation and Phenotypic Plasticity of Reproduction-Related Genes in Chub Mackerel (*Scomber japonicus*)

ガロッタ, マリエル

<https://hdl.handle.net/2324/7329530>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名	ガロット マリエル (Galotta Mariel)			
論文名	Study on the Epigenetic Modulation and Phenotypic Plasticity of Reproduction-Related Genes in Chub Mackerel (<i>Scomber japonicus</i>) (マサバ (<i>Scomber japonicus</i>) における生殖関連遺伝子のエピジェネティック制御機構に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	太田耕平
	副 査	九州大学	准教授	荻野由紀子
	副 査	九州大学	助教	チャクラボーティ タパス

論文審査の結果の要旨

世界の漁業生産量が頭打ちとなる中、養殖生産量は過去 25 年で約 5 倍と著しく増大しており、人口増加に伴う安定的かつ良質な動物性タンパク質の供給源として、水産養殖のさらなる生産性向上が期待されている。一般的に魚類の成長速度や繁殖特性（初回成熟年齢、産卵時期、産卵量など）は、水温、日長、餌条件をはじめとする様々な環境要因の影響を受けて変化する。こうした変化にはエピジェネティック制御機構が関与すると示唆されているが、繁殖特性の変化に関わる各遺伝子レベルでの発現制御機構についてはよくわかっていない。スズキ目サバ科のマサバ (*Scomber japonicus*) は世界で多く漁獲される重要な水産資源であるのみならず、国内においては養殖の生産が拡大している。また、九州大学ではこれまでに完全養殖による各種実験系やゲノム情報を整備しており、エピジェネティック制御機構を解析するための研究環境が整ってきている。そこで本論文はマサバを研究材料として、エピジェネティック制御機構の 1 つである DNA メチル化に焦点を絞り、性成熟関連遺伝子の発現制御に対するエピジェネティック制御機構の関与とそのメカニズムについて理解することを目的としたものである。

本論文ではまず、魚類の脳下垂体から分泌され、生殖腺の発達および成熟を促進する 2 つの生殖腺刺激ホルモン (GTH)、すなわち濾胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) に着目した。それぞれのホルモンを構成する β サブユニットの遺伝子である *fshb* と *lhb* について、DNA メチル化修飾が起これば予測される CpG 部位をゲノム情報から特定し、転写開始点の上流と下流に存在する CpG 部位を対象とした Targeted Bisulfite Sequencing (Targeted BS-seq) を行った。異なる成熟段階の個体から採取した様々な組織に対して、複数の CpG 部位の DNA メチル化をハイスループットで解析するために、次世代シーケンサーを利用した Target BS-seq をマサバにおいて至適化し、解析を行った。その結果、脳下垂体における *fshb* と *lhb* の発現はともに成熟期の方が未成熟期よりも高い値を示した。一方、転写開始点の上流における DNA メチル化頻度は *fshb* では低く、*lhb* では高い傾向を示した。また、脱メチル化酵素として知られる *tet1*、*tet2*、*tet3*、および DNA メチル基転移酵素の *dnmt1* の発現量を調べた結果、各遺伝子は組織毎に異なる発現挙動を示した。なかでも脳下垂体においては生殖腺が発達を開始する 1 月に一時的に *tet1* の発現低下と *dnmt1* の発現上昇が起こり、その後、産卵期の 4 月にかけて *tet1* の発現上昇と *dnmt1* の発現低下がみられた。すなわち、成熟開始時から産卵期にかけて脳下垂体の DNA メチル化修飾に特異的な変化が起こる可能性を示した。

次に、卵巣特異的に発現し、エストロゲン合成に関わる卵巣型の芳香化酵素遺伝子 *cyp19a* のゲノ

ム配列をマサバ系統間や魚種間で比較した。完全養殖により継代したマサバ系統と天然由来マサバ、マグロ属2種、メダカ、ティラピア、ホシササノハベラ、ヒラメとの間で比較した結果、解析した全ての魚種において開始コドン上流に TATA ボックスが認められ、さらにその約 80 bp 上流に転写因子 Foxl2 の結合予測配列が保存されていた。また、これらの特徴的配列の近傍に CpG 部位が存在した。一方、その他の Foxl2 結合配列や他の転写因子の結合配列は、数や位置に様々な魚種間の相違が認められた。興味深いことに、養殖マサバと天然マサバとの間においても異なる転写因子結合配列がみられた。次に、*cyp19a* の転写開始点の上流と下流の DNA メチル化頻度について、卵巣と精巣との間で比較した結果、解析した 14 箇所全ての CpG 部位でオスの方が高い値を示し、そのうち 13 箇所で有意差が認められた。また、DNA メチル化頻度と遺伝子発現量は負の相関を示した。生殖腺における DNA メチル化頻度の雌雄差について、雌雄異体のカタクチイワシと性転換魚のホシササノハベラとの間で比較を行った結果、メチル化頻度はいずれの種においても雄で高い値を示したが、その雌雄差は雌雄異体魚で大きく、性転換魚で小さい傾向がみられ、*cyp19a* のメチル化頻度の雌雄差が生殖腺の性的可塑性と関連している可能性を示唆した。加えて、マサバ *cyp19a* については開始コドンの上流配列を用いた *in vitro* レポーターアッセイにおいて、CpG 部位をメチル化することにより転写活性が低下したことから、DNA メチル化が *cyp19a* の発現抑制に関与することを示した。

ところで卵巣で特異的に発現する *cyp19a* に加え、魚類では脳で特徴的に発現する脳型の芳香化酵素遺伝子 *cyp19b* も存在する。そこで、これら 2 つの遺伝子の性別と成熟段階におけるメチル化頻度を解析した。その結果、*cyp19a* については、未成熟の生殖腺における DNA メチル化頻度に雌雄間で顕著な差はみられなかった。また、成熟した雌の生殖腺では未成熟の雌雄の生殖腺とほぼ同様の DNA メチル化頻度であったのに対し、成熟した雄では著しく高い DNA メチル化頻度を示した。すなわち、生殖腺の *cyp19a* の DNA メチル化頻度は、性と成熟段階の組み合わせにより変動することを見出した。一方、*cyp19b* の脳における DNA メチル化頻度については性別に関係なく、解析した全ての個体において高いことを示した。

最後に、本論文で対象とした *fshb*、*lhb*、*cyp19a*、*cyp19b* の 4 つの遺伝子について、*in silico* 解析により広範囲に CpG 部位を探索した。各遺伝子上流 100 kb および下流 10 kb についてゲノム情報をもとに解析した結果、CpG 部位の出現頻度が高い領域である CpG アイランド (CGI) が *fshb*、*lhb*、*cyp19a*、*cyp19b* のそれぞれにおいて 6、12、4、3 箇所で認められ、各遺伝子の発現機構との関連を解析するための情報基盤が整備された。

以上要するに、本論文は漁業および養殖業の重要種であるマサバを研究材料として、繁殖特性に関わるエピジェネティック制御機構の関与を明らかにするために、性分化・性成熟関連遺伝子を対象に DNA メチル化解析を行い、各遺伝子特有の性別や成熟段階に特徴的な DNA メチル化動態とその遺伝子発現への関与を明らかにした。気候変動等による海洋環境変化が魚類の繁殖特性に及ぼす影響を解析する上でも有益な基盤情報となることから、海洋生物学ならびに水産科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。