

令和元年6月13日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04969

研究課題名(和文)代理親魚技法を利用した新規交雑種作出技術の開発～優良交雑種を自然交配で生産する～

研究課題名(英文)Development of a novel method for production of hybrid fish using surrogate broomstick technology

研究代表者

矢澤 良輔 (Yazawa, Ryosuke)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：70625863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、不妊となるゴマサバ×マサバ交雑魚を宿主としてマサバの生殖細胞を移植し、オス宿主魚からドナー由来のマサバ精子、メス宿主からドナー由来のマサバ卵を効率良く生産させることに成功した。さらにこれら雑種宿主を同一水槽内で飼育することで、自然産卵により両親ともにドナー由来次世代の生産も可能であった。今後、ゴマサバの生殖細胞をサバ雑種に移植し、ドナー由来のゴマサバ卵を生産するメス宿主を作出すれば、雑種宿主同士の自然産卵により、繰り返し、サバ雑種の大量生産が可能となる。本技術により通常では繁殖行動を行わない異種配偶子を生産する代理親の自然交配で交雑種を自動的に繰り返し生産する技術の開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では代理親魚技法を用いて、既存の手法では困難であったゴマサバ×マサバ雑種の大量生産を繰り返し行う技術を確立した。ゴマサバ×マサバ雑種は、不妊であるため産卵期の脂のりが良く、高水温期に頻発する疾病にも高い抵抗性を有することから、新たな有用サバ養殖系統として期待されている。このようなサバ雑種を、低い労力で大量に生産することが可能となれば、産業規模での生産も実現可能となる。また、本技術を用いることで、成熟時期や生息域が異なる等の理由から、交雑魚の作出が困難であった魚種の交雑育種も可能となり、交雑育種の新たな可能性に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present project, we established the surrogate hybrid mackerel that develop into germ cell-deficient sterile fish, that produced functional donor-derived chub mackerel gametes, both eggs and sperms by spermatogonial transplantation. Moreover, we confirmed that these surrogate hybrid mackerels could perform spontaneous spawning in the rearing tank by the artificial induction with hormonal treatment. Therefore, by using this technique, it is possible to interbreed the female surrogate hybrid mackerel produce donor-derived blue mackerel eggs with male surrogate hybrid mackerel produce donor-derived chub mackerel sperm. It is expected that they would produce the donor-derived hybrid offspring contentiously by the spontaneous spawning.

研究分野：繁殖生理

キーワード：海産魚養殖 サバ類 交雑種 育種 代理親魚技法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

サバ類は水産上重要魚種であり、近年、その単価は低水準となっている。一方、ブランドサバは肉付きや脂の乗りが良く、沿岸漁業で多獲されるマサバに比べ単価が 10 倍以上になることもある。これに対して養殖では、肉質の改善が可能であるうえ、アニサキスによる健康被害のリスクが低いことから生食用としての利用も可能であり、ブランドサバのように高付加価値を付与することが可能である。

今後、サバ養殖の発展のために、育種による高付加価値を有する養殖サバ系統の作出が望まれる。

交雑種は両親種それぞれの優良形質を引き継ぐことや雑種強勢により、肉質、成長、抗病性等の有用形質を示すことが多く知られており、交雑育種は水産分野においても重要な技術となっている。しかし海産魚の交雑では、産業ベースで生産されている品種はブリとヒラマサの交雑種であるブリヒラ等に限定されている。このような背景には、ほとんどの交雑種において両親種が異種間で自然交配を行わないため、人工授精が必要となることが挙げられる。人工授精は作業に多大な労力が必要となるうえ、親魚からの卵あるいは精子の搾出によるハンドリングストレスで親魚が死亡したり、スレにより感染症を発症するため、1回の種苗生産で貴重な親魚を失うことに繋がる。

#### 2. 研究の目的

本研究では、繁殖行動を行わない異種間での交雑種を自然産卵で生産する方法として代理親魚技術を用いて、異種の配偶子を生産する代理親を作出し、通常の親魚との自然交配により交雑種を自動的に繰り返し生産する技術の開発を試みた。この方法では人間の労力を全く要せず、通常の高水温期の海産魚の自然産卵による受精卵採取と全く同じ方法で、交雑種の受精卵を安定的に繰り返し生産することが可能になる。この技術は様々な魚種の交雑種作出に応用が可能であるが、本研究では、ゴマサバ(*Scomber australasicus*)とマサバ(*S. japonicus*)の交雑種(ゴママサバ)の生産に応用する。この交雑種ゴママサバは、サバ類養殖で大きな問題となっている高水温期の感染症に対し、高い抵抗性を有しているうえ、生殖細胞を全く持たない生殖細胞欠損型の不妊魚であることも明らかにしている。本研究によりゴママサバ雑種を安定供給することが実現すれば、魚病に強く肉質も優れている本雑種は、関サバ等のブランドサバに劣らない、新規の優良サバ品種として有望であると期待される。

#### 3. 研究の方法

本研究では、宿主としてもゴママサバ雑種を用いることとした。また、同種間で生殖細胞移植をする際の問題として、ドナー生殖細胞の調整があげられる。生殖細胞移植を成立させるためには未熟な A 型精原細胞を用いることが必須であることが明らかとなっているが、宿主を生産できる時期は、種苗生産の時期であり、当然ながらドナーとなる成魚オスは成熟している。そこで、本研究では、ドナー生殖細胞を獲得するために、1)成熟精巢中にわずかに含まれる A 型精原細胞を濃縮して使用する、2)非繁殖期の未熟なオスの精巢を凍結保存して使用する、を実施した。具体的には、マサバから摘出した排精精巢および凍結保存していた未熟な精巢を用いてドナー精巢細胞を調整し、得られたドナー精巢細胞を9日齢のゴマサバ×マサバ雑種仔魚各 500 尾の腹腔内へ移植した。1 歳齢の移植魚に hCG を投与し、排精精子の有無の調査および得られた精液 DNA を用いた種判別 PCR を行った。移植魚から得られた精子を用いて、マサバ卵との交配実験を行い、F1 世代孵化仔魚がドナー由来の精子により受精したマサバであるかを種判別 PCR およびマイクロサテライト PCR により調査した。

さらに、1 歳齢の雌雄の移植魚に GnRha ペレットを投与し、自然産卵の有無の調査および得られた F1 世代孵化仔魚がドナー由来配偶子により受精したマサバであるかを種判別 PCR およびマイクロサテライト PCR により調査した。

#### 4. 研究成果

##### 1)ドナー生殖細胞の調整

ドナーとして、図1に示した2つの発達段階のマサバ精巢を用いた。1つ目は、排精が認め

られる産卵期のマサバより摘出した成熟精巢で、2つ目は、非産卵期の未熟な個体より得た未熟精巢である。

成熟精巢については、雑種宿主に移植可能な時期に入手可能であるため、凍結等の保存操作は

不要であるものの、移植に必須である A 型精原細胞の含有率が低い。そこで、密度勾配遠心法により、A 型精原細胞を濃縮し、ドナー生殖細胞として用いた。一方、未熟精巢は、雑種宿主に移植可能な時期に入手ができないため、事前に精巢片を凍結保存し、移植時期に解凍することで、ドナー生殖細胞として移植した。未熟精巢については、A 型精原細胞の含有量が高いため、密度勾配遠心法による濃縮作業は行わなかった。

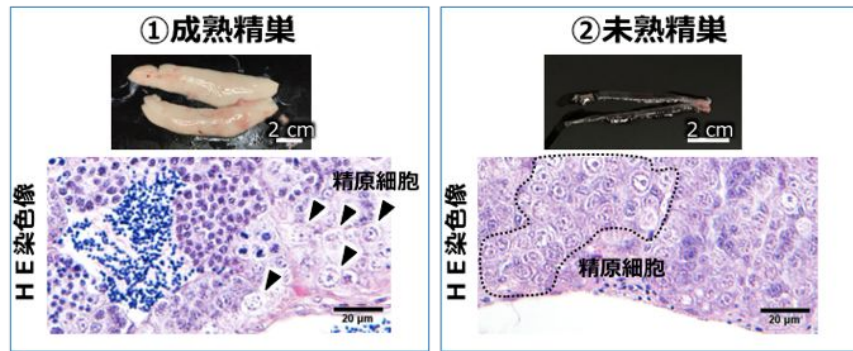


図1 ドナーとして用いたマサバ精巢

## 2) オス宿主によるドナー由来精子の生産

成熟精巢を移植したゴマサバ×マサバ雑種宿主を 1 歳齢まで飼育し、排精個体の確認を行った。その結果、1 歳齢のオスの移植魚 49 尾中 42 尾(85.7%)の雑種宿主より運動能を有する精子が得られた。これらの精子から DNA を抽出しマサバ特異的プライマーによる種判定 PCR を行ったところ、42 尾中 40 尾の精液 DNA においてマサバ特異的遺伝子配列が検出された(図2)。

さらに、得られた精子と、野生型メスから得た卵を用いて、人工交配実験を行ったところ、正常に受精・発生し孵化仔魚が得られた。浮上卵中の孵化率は 56.4%であり、マサバ精子を用いた場合(50.7%)と同等であった。このようにして得られた孵化仔魚 DNA を用いて、種判別 PCR 解析を行ったところ、50 尾中 49 尾の孵化仔魚がマサバ精子に由来することが明らかになった。またマイクロサテライト解析の結果から、排精精巢および凍結保存していた未熟な精巢いずれのドナーにおいても機能的な精子を生産可能であることが判明した。以上の結果から、ゴマサバ×マサバ雑種は、正常な運動能・受精能を有するマサバ精子を高効率で生産可能であることが明らかとなった。

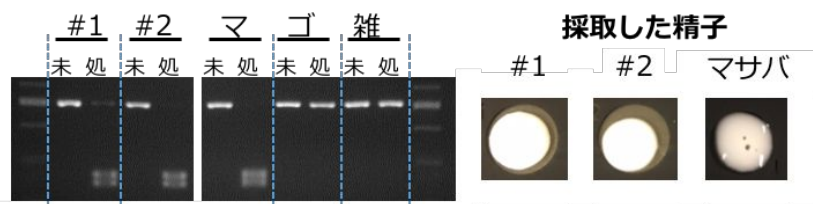


図2 ドナー由来マサバ精子の確認

## 3) メス宿主によるドナー由来精子の生産

1 歳齢の移植魚に GnRha ペレットを投与した後、2 日後から自然産卵が確認され、受精・発生した孵化仔魚が得られた。また、1 歳齢のメスの移植魚 6 尾中 2 尾の移植魚において排卵が確認された。卵を用いた PCR 解析では、マサバ特異的遺伝子配列が検出された。メス#1 では卵 30 粒中 30 粒がマサバのミトコンドリア DNA を保持しており 100%ドナー由来の卵を生産していることが明らかとなった。一方、メス#2 では、30 粒中 14 粒がマサバ由来であり、

16 粒は宿主雑種自身の卵であることが明らかとなった(図3)。

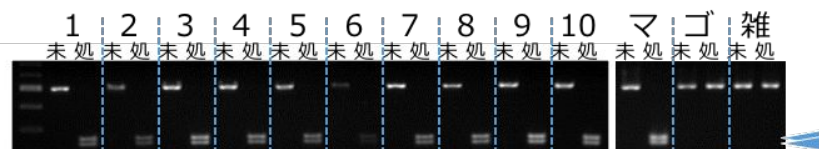


図3 ドナー由来 F1 仔魚の DNA 解析

さらに、図4に得られたF1仔魚30尾のミトコンドリアDNAの解析結果を上段ののコラムに示した。青のコラムでマサバ由来、黄色のコラムでゴマサバ由来の mtDNA を持つことを示している。また、マイクロサテライト解析の結果を下段のコラムに示した。

ドナー由来のアレルを青いコラムで、宿主ゴマサバマサバ雑種由来のアレルを黄色のコラムで示している。

赤色の枠で示したマサバ mtDNA を持ち、ドナーマサバ由来のアレルのみを持つ、両親ともにドナーマサバ由来の個体が30尾中7尾、水色の枠で示したマサバ由来の mtDNA を持ち、ドナーマサバ由来のアレルと宿主由来のアレルを一つずつもつ、ドナーマサバ卵と宿主雑種精子由来の個体が18尾、緑色の枠で示した両親共に宿主雑種由来の個体が5尾存在することが明らかとなった。

以上の結果から、雑種宿主が生産したドナー由来のマサバ卵は機能的であり、雑種宿主同士の自然交配で両親ドナー由来のF1後代を生産可能であることが明らかとなった。

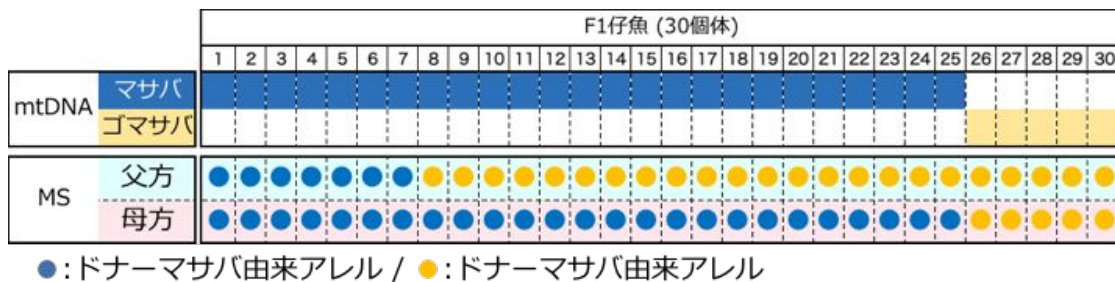


図4 ドナー由来F1仔魚のMS解析

本課題では代理親魚技法を用いて、既存の手法では困難であったゴマサバ x マサバ雑種の大量生産を繰り返し行う技術の基盤を構築した。ゴマサバ x マサバ雑種は、不妊であるため産卵期の脂のりが良く、高水温期に頻発する疾病にも高い抵抗性を有することから、新たな有用サバ養殖系統として期待されている。このようなサバ雑種を、低い労力で大量に生産することが可能となれば、産業規模での生産も実現可能となる。また、本技術を用いることで、成熟時期や生息域が異なる等の理由から、交雑魚の作出が困難であった魚種の交雑育種も可能となり、交雑育種の新たな可能性に寄与できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Ryosuke Yazawa, Yutaka Takeuchi, Yuri Machida, Kotaro Amezawa, Naoki Kabeya, Reoto Tani, Wataru Kawamura, Goro Yoshizaki. Production of triploid eastern little tuna, *Euthynnus affinis* (Cantor, 1849) (2018) Aquaculture Research in press. DOI: 10.1111/are.14017
- (2) Goro Yoshizaki and Ryosuke Yazawa. (2019) Application of surrogate broodstock technology in aquaculture Fisheries Science, in press. DOI: 10.1007/s12562-019-01299-y

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 谷 怜央人・川村 亘・矢澤良輔・吉崎悟朗, ゴマサバ x マサバ 雑種宿主によるドナー由来マサバの生産. 日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2019/3/29

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。