

令和元年6月7日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07850

研究課題名(和文) DNA親子鑑定技術を用いたエゾアワビ養殖における実用的な高成長選抜育種技術の開発

研究課題名(英文) Development of practical high growth selective breeding technology in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* culture using DNA parent and child identification techniques

研究代表者

奥村 誠一 (Okumura, Sei-ichi)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：60224169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エゾアワビ養殖における効率的な種苗生産・育種技術の開発に資するため、養殖場の親貝および稚貝を用いて本研究を行った。その結果、成長優良稚貝を産するという形質が親によって異なること、養殖集団は野生集団と比べて遺伝的多様性が低いこと、および多様性低下のメカニズム、本施設においてはミトコンドリアDNA分析により生産者特定が可能であること、および種苗生産現場で軽視されがちな雄親の形質も次世代の成長に大きく影響すること等が判明した。本研究は、今後次世代シーケンサを用いた、成長に関係する遺伝マーカーを探索する上で重要な知見を与えるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漁業は後継者不足等の理由から衰退の一途を辿っている。それを盛り上げるための一つの方法として、アワビなどの高級食材の効率生産法を開発し、儲かる養殖漁業を構築することが挙げられる。本研究では、実際のアワビ養殖現場を研究の場として、効率的な種苗生産・育種技術の開発に資するために行われたものであり、高成長を示す稚貝の生産に向けた親貝の選抜方法を提案し、選抜に付き物の近親交配による遺伝的多様性低下のモニタリングと多様性変化のメカニズムを解明したと共に、食の安心・安全に資するDNA分析による生産者特定法を開発した。これらの成果は、アワビ養殖の生産性の向上に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：To contribute to the development of an effective breeding technology for Pacific abalone *Haliotis discus hannai*, this study was conducted using parental and juvenile abalones in a hatchery. The results obtained were as follows: 1) the parental trait that produces high growth juveniles varied among individuals, 2) genetic diversity in the cultured group was low compared with that in a wild group, and we revealed the mechanism of the diversity decreasing, 3) abalone manufacturer specification is possible by mitochondrial DNA analysis in this hatchery, and 4) the trait of a male parent who is often neglected at the seed production site also influences the growth of the next generation. In the future, when the genetic markers related to growth are developed using a next generation sequencer, this research could impart important knowledge.

研究分野：水族遺伝育種学

キーワード：エゾアワビ 選抜育種 DNA親子鑑定 マイクロサテライトDNA 種苗生産 ミトコンドリアDNA

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

1. 研究開始当初の背景

エゾアワビは水産重要種であり完全養殖が行われている。また最近重要視されていることとして、水産物に対しても食の安心・安全、およびトレサビリティー等が求められている。したがって、今後エゾアワビにおいてもこのような消費者のニーズに合った安定した養殖を行うことが肝要である。しかし本種の養殖においては、トレサビリティーに関する研究が乏しいことに加えて、以前より稚貝の成長差が極めて激しいことが大きな問題となっている(図1)。本研究を実施した養殖場では、長年にわたり、自身の成長が優良である親を用いて選抜育種を続けてきたが、いまだに多くの成長不良稚貝が産まれてくる。このことは、「自身が優良な成長を示した親とはいえ、優良な稚貝ばかりを産するのではなく、不良稚貝を産する場合も多くある」ことを意味するが、どの親も優良・不良を同じ程度産むのか、それとも親の違いにより偏りがあるのかについて養殖現場で調べることは困難であった。我々の以前の研究によって、成長が優良であるか否かが決まる要因として親の遺伝的な性質が大きく関わっていること、DNA 親子鑑定を行うことで、実際の養殖現場において、商業ベースに乗せながら優良な稚貝を産んだ実績のある親を選抜できることが示唆されたが、成長優良稚貝を多く産した親が、次の種苗生産の時に同様に優良稚貝を多く産するのか否かを確かめること、および出荷後のトレサビリティーの保障を強化する必要がある。本研究は、以上のような背景・動機のもと始められた。

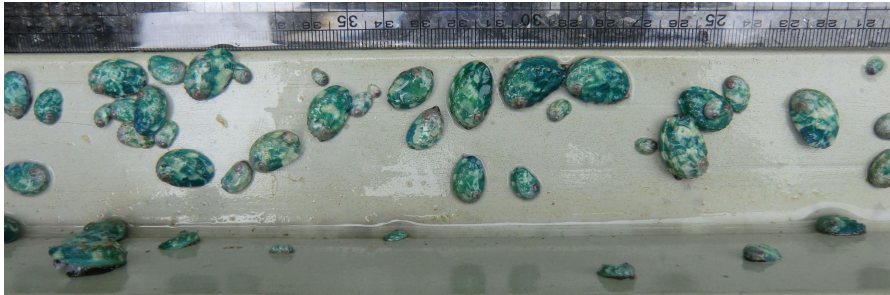


図1. 生後5か月のエゾアワビ稚貝。同時期に生まれ、同一水槽で育てられてもこれだけの成長差が現れる。

2. 研究の目的

上述したように、エゾアワビ養殖において、本種が示す極端な成長差が大きな問題となっている。また、自身の成長が優れる親を選抜育種した場合でも、成長の極端に悪い稚貝が多く出現する。しかも、養殖場では、多数の親から産まれた膨大な数の稚貝を大規模水槽で混合して養殖しなければ採算が合わないため、家畜のように親子関係を認識しながら育種することは困難である。本研究では、DNA 親子鑑定技術を実際の養殖場で実施し、自身の成長が優れるだけでなく、成長優良稚貝を偏って多く産したという実績を持つ親を特定・選抜する。そして、その親の成長優良稚貝を産むことに対する再現性の有無を確かめるとともに、再現性の高い親を更に選抜する。また、珍しいDNA型を優良系統へ組み込むことで、親子鑑定を容易・実用的にするとともに、出荷後の生産者の特定等、トレサビリティーの充実に資する。

3. 研究の方法

(1) 成長形質の親子関係と選抜

実際の種苗生産・養殖施設において、その生産過程に乗せ、メス・オス親合計100個体程度(殻に水中ポンドでタグを付け、個体識別した)を用いて種苗生産した。得られた幼生を着底の段階で混合し、その後同一の大規模水槽内で養殖した。種苗生産時に受精に関わったと考えられる親(放卵・放精が確認され、人工授精に供したもの)の上足組織の一部を生体採取し、DNA分析用として冷凍保存した。この組織を用いて親貝のマイクロサテライト(ms)DNAを10座分析した。

初期減耗の時期を終え、生残率が落ち着いた着底後4~5か月の成長優良、中間および不良稚貝を同一水槽内から採集した。採集した稚貝のmsDNAを親と同様に分析し(稚貝については個体が小さいので、筋肉全体を用いた)得られたmsDNA型を親と比較することで、個体毎に親を特定した。これらの結果を分析し、成長優良、中間および不良稚貝を産した親の出現分布を調べた。特に成長優良稚貝を偏って多く産した親については選抜対象とした。

(2) 養殖集団の遺伝的多様性

養殖場における集団の遺伝的多様性を調べることは、選抜育種による近交度の程度等を監視する上で重要であることから、msDNAおよびミトコンドリア(mt)DNAの分析データを野生集団と比較することで、養殖集団における遺伝的多様性等についても検討した。また、東日本大震災の津波の被害により、本種苗生産施設では、選抜育種を続けてきた養殖集団の親が不足したために、野生集団を親として一部導入したことがある。本研究では、その時の親および稚貝のサンプルを用いて、野生集団の導入による遺伝的多様性の変化についても検討した。

(3)本養殖集団中に見られた、他集団では珍しいDNA型を利用した生産者特定(トレサビリティー)

トレサビリティーについては、予備的に分析したところ、ミトコンドリア(mt)DNAのハプロタイプで特定できる可能性が高かったため、このDNA領域を集中して分析し、他養殖集団、野生集団と本集団間で得られたDNA型出現頻度を比較した。

優良(あるいは不良)稚貝を産することに対する親貝の再現性については、本研究を進める中で判明してきたことに、前年度以前に採卵・採精に用いられた親貝が次年度までに斃死または次年度採卵の際に成熟が充分でない等の理由で、次年度に親として用いることができなくなることが頻繁に起こった。このことは、前年度に優良な稚貝を産した親を次年度も用いることで選抜していくことが、実用化を目指す場合に実践的であるとは言い難い可能性を示している。そこで、実用化を目指すためには、前年度の優良な親を用いること(選抜)に拘らずに効率的に優良稚貝を生産するための方策も考えておく必要がある。そこで、その解決に資するための一貫として、以下の2項目(4)(5)についても検討した。

(4)親の性別と優良形質の発現

種苗生産の現場では、卵質などのよし悪しを考慮するがために、雌親が重要視され、雄親については軽視されがちである。しかし、親の雌雄の差が次世代の成長形質に与える影響については知見がない。このことは、選抜育種をしていく以前の問題として、その年々の雌親・雄親の選び方に関係する重要な知見である。本研究では、本施設の生産用養殖集団についてDNA親子鑑定を行い、同じ雌親または同じ雄親から産まれた稚貝の殻長を親ごとに集計し、異なる親間で殻長分布を比較した。また同母異父および異母同父の組み合わせで交配組を作製し、環境条件を揃えるために幼生の段階で各交配組を混合して比較的小規模な同一水槽内で飼育した。着底稚貝の初期減耗が落ち着いた後にサンプルを採集し、msDNAで親子判別を行い、由来する雌雄の親ごとに稚貝の成長を比較した。得られたデータから、これまで不明であった稚貝の成長に対する雌親および雄親の関与の程度について詳細に検証した。

(5)成長形質と関係するDNAマーカーの探索

選抜に拘らずに優良種苗を生産する最も優れた方法は、成長と関係する遺伝マーカーを開発することである。そこで本研究では、mtDNAのハプロタイプと成長との関係を調べた。mtDNAは母系遺伝するので、本養殖施設が長年にわたり成長の優良な雌親を選抜していく過程で、無意識に「ある雌親系統」を選抜していた可能性がある。この雌親系統を突き止めることができれば、予め雌親のmtDNAを調査して選抜することができるようになる。さらに、msDNAアレルのデータを解析し、成長と関係する遺伝マーカーを探索した。

4. 研究成果

(1)成長形質の親子関係と選抜

各集団の親子鑑定の結果、年度の異なる4集団において特定の親が成長優良稚貝を偏って多く産していることが判明した(典型例を図2に示す)。この結果は、成長優良稚貝を産するという形質が親によって異なることを示すものである。また、これらの親貝を今後の選抜対象とした。さらに、珍しいアレルを有する親についても選抜候補とした。これらの結果より、成長優良稚貝を多く産し、かつ成長不良稚貝を産しない実績をもつ親をmsDNA親子鑑定法により特定・選抜して育種することが、低成長性の問題を解決する効果的な選抜法だと考えられた。上記したように、前年度選抜した親が次年度の採卵・採精に用いられないことが多くあったため、直接的に優良(あるいは不良)稚貝を産することに対する親貝の再現性を検討することは困難であった。しかし昨年度までに、成長優良稚貝を産した先代の親は、次世代の親として選抜された成長優良親貝を産した親と一致することを明らかにした。

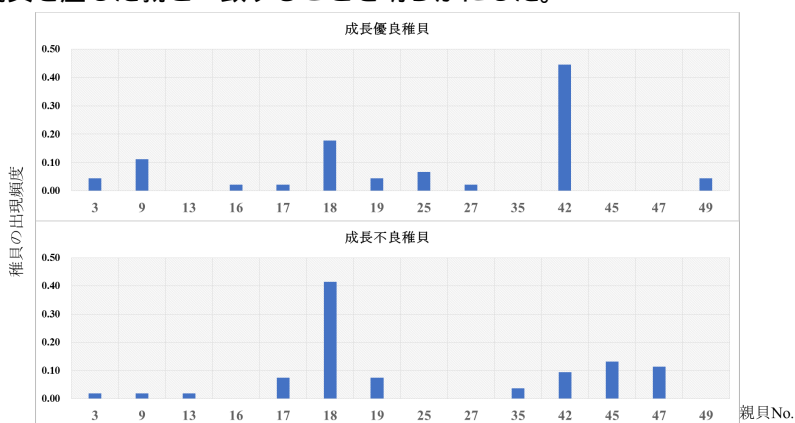


図2. 雌親における成長優良稚貝および成長不良稚貝の出現頻度

(2) 養殖集団の遺伝的多様性

msDNA および mtDNA 解析の結果、養殖集団は全般的に野生集団と比べて遺伝的多様性が低かった。また、ペアワイズ FST 値を求めた結果、養殖集団内でも有意な分化が示され、多くの組み合わせで遺伝的な差異が認められた。すなわち、本養殖集団は未だ均一化されておらず、また平均ヘテロ接合体率の観察値が高かったことから、今後も選抜による効果を期待できることが示唆された。

さらに遺伝的多様性は、本施設で野生集団を親として一部用いた時に一時的に上昇したが、その直後に低下する傾向にあることがわかった。ストラクチャー解析の結果、野生集団で寡占的なクラスターは、野生個体を親として一部用いた集団の成長不良・中間稚貝で多かったのに対して、成長優良稚貝ではほとんど見られなかった。このことから、野生親個体は成長優良稚貝をほとんど産することができず、養殖場での親貝選抜の時に野生個体の遺伝的要素が淘汰されたことにより、次世代で遺伝的多様性が急激に減少したことが考えられた。

(3) 本養殖集団中に見られた、他集団では珍しい DNA 型を利用した生産者特定(トレサビリティー)

生産者特定の指標として有効な DNA 領域を mtDNA において 4 領域見出した。各領域とも、野生集団および他養殖集団では全く出現しない、もしくは極めて出現頻度の低い DNA 型(ハプロタイプ)が本養殖集団では多数出現していた。これらを指標とした場合、本施設のアワビを 94% の確率で特定することができた。今後これらを雌親に用いて大量生産することにより、安定した生産者特定が可能になる。また、複数の領域およびハプロタイプを指標として使えることから、雌親の選択にバリエーションが得られること、および本領域は母系遺伝するため、様々な DNA 型を持つ雄親を交配に用いてもハプロタイプ頻度には影響しないことなど、親貝選抜の幅を広げながら生産者特定に資することができる点においても本指標は優れた指標といえる。さらに、この領域を msDNA 分析に加えて分析することで、親子判別がより容易になった。

(4) 親の性別と優良形質の発現

本施設生産用養殖集団において、交配した雄親に関わらず 1 個体の雌親が成長不良稚貝を多く産する場合や、交配した雌親に関わらず 1 個体の雄親が成長不良稚貝を、またそれとは逆に、交配した雌親に関わらず 1 個体の雄親が成長優良稚貝を多く産する場合のあることが観察された(図 3)。

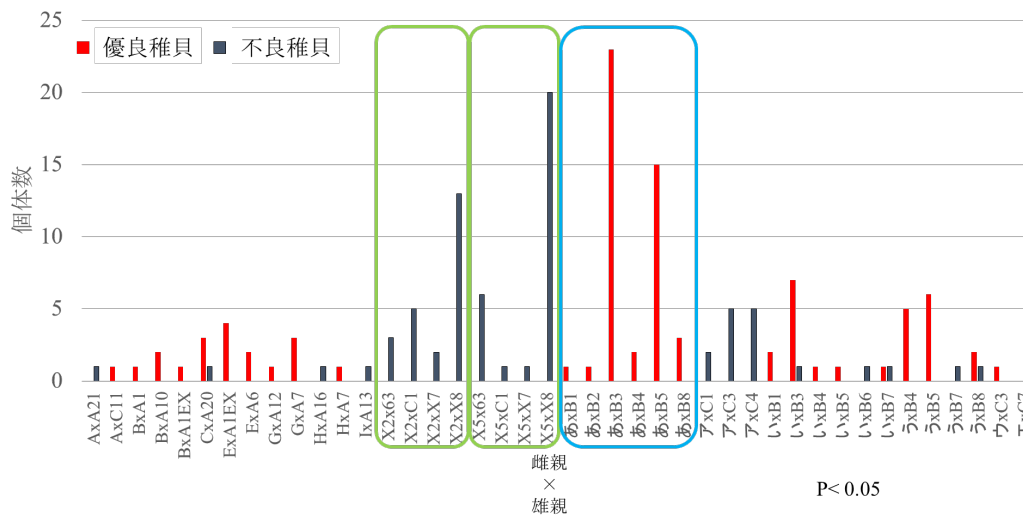


図 3. 親の交配組み合わせと、それに由来する成長優良・不良稚貝の出現数

緑枠： 雄親 No. X2 と X5 が複数の異なる雌親と交配した場合でも、不良稚貝が多く産まれている。

青枠： 雄親 No. あ が複数の異なる雌親と交配した場合でも、優良稚貝が多く産まれている。

1 個体の雌親と複数の雄親を組み合わせた同母異父の交配実験では、雄親の違いにより稚貝の平均殻長および生残率に有意な差が見られた。1 個体の雄親と複数の雌親を組み合わせた異母同父の交配実験では、雌親の違いにより稚貝の生残率に有意な差が見られた。これらのことから、稚貝の成長形質の発現および着底後の生存能力に雌雄共に大きな影響を与えていることが判明し、雌親に限らず雄親もまた稚貝の成長形質に大きく関係していることが考えられる。

前述の通り、養殖場では雌親の形質は雄親より重要視される傾向にあるが、雌親および雄親が稚貝の成長形質または生残率に影響を与えていることから、雄親も重要であると考えられる。このような雄親の重要性が実際の養殖場集団内で見出されたことは極めて重要で、今後効率的に優良種苗を生産するための方策に繋がる知見である。

(5)成長形質と関係する DNA マーカーの探索

mtDNA 解析の結果、分析した 2 領域の各ハプロタイプ間で成長優良および不良稚貝の出現頻度に大きな差は見られなかった。また msDNA 10 座においても成長優良および不良稚貝間で各アレル頻度に大きな差は見られなかった。これらのことから、本研究で調べた mtDNA 領域のハプロタイプおよび msDNA 座のアレルにおいては、成長形質と関連する DNA マーカーを見つけ出すことができなかった。今後は、次世代シーケンサを用いて大量の変異をスクリーニングすることにより、成長に関わる効果的な遺伝マーカーを探索する必要がある。

以上、本研究において、本施設の生産者特定を可能にする DNA 領域を発見したことで、食の安心・安全といった消費者のニーズに応えるエゾアワビの養殖業を営むことが可能となった。また、成長優良稚貝の効率生産に対しては、自身の成長が優れるだけでなく、成長優良稚貝を偏って多く産したという実績を持つ親を特定・選抜することの重要性を更に明確にしたが、同時に、本研究を行う過程で経験した、前年度選抜群の頻繁な斃死等を鑑みること、前年度選抜群に拘らない方法についても検討することができた。その過程で、これまで軽視されていた雄親遺伝形質の重要性を明らかにしたと共に、今後、次世代シーケンサを用いて有効な遺伝マーカーを開発する重要性を明確にした。さらに、選抜育種には付き物の、遺伝的多様性の減少を抑えることができたとともに、野生集団を導入してもすぐに多様性が減少してしまうメカニズムをストラクチャー解析によって明らかにすることができた。以上の結果は、前述した次世代シーケンサを用いた遺伝マーカーの開発を含め、今後国内外のアワビ類育種に対して貢献するものである。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

山口宇門・下田悠介・足立賢太・森山俊介・古川史也・小山夢玄・古川季宏・石橋朋弥・奥村誠一： エゾアワビ優良種苗の効率生産に関する研究 .平成 30 年度日本水産学会秋季大会、2018.

下田悠介・島文華・多田桐子・足立賢太・古川季宏・奥村誠一： エゾアワビ養殖集団における遺伝的集団構造解析と DNA マーカーを用いた優良親貝の探索 .平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

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。