

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14966

研究課題名(和文)全ゲノムリシーケンスによる高効率な海産魚遺伝資源管理技術の開発

研究課題名(英文) Large-scale genotyping technologies for fish genetic resource management

研究代表者

菊池 潔 (Kikuchi, Kiyoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20292790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年のDNA解析技術の発達により、水産生物において全ゲノムレベルの遺伝情報を得ることが容易となってきた。本研究ではトラフグをモデルとして、全ゲノム情報を遺伝資源管理に活用する道筋をしめす。まず若狭湾および伊勢三河湾からトラフグ集団を採集し、全ゲノム配列を決定して、集団内および集団間の遺伝的特性を調べた。次に、全SNP座から約1000座を選び出し、安価で迅速な多検体用遺伝子型判定法の開発を試みた。その結果、既存のamplicon sequencing法を改変することで、比較的手軽に約1000個のSNPの遺伝子型を多検体について判定できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The rapid development of large-scale genotyping technology and steep drop in its costs offer an opportunities for better fisheries management. This study explores technologies of large-scale genotyping to develop the molecular genetic resource for marine fish stocks by using fugu (*Takifugu rubripes*) as a model species. We performed whole-genome resequencing of 10 fish each obtained from the Wakasa-bay and the Ise-Mikawa-bay, and discovered approximately 700 thousands SNPs per individual. We then compared two populations and found a weak genetic differentiation between them, although marked differentiations were observed locally in some genomic regions. We then chose approximately 1000 SNP sites and developed an efficient genotyping system for them (1kSNP system) by modifying an amplicon sequencing method on Illumina MiSeq platform. The 1kSNP system is suitable for genotyping a large number of individuals and, thus, useful for a large-scale genetic survey of fish stocks.

研究分野：遺伝学

キーワード：水産学 遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

近年の DNA 解析技術の発達により、水産生物において全ゲノムレベルの遺伝情報を得ることが容易となってきた。この莫大な情報は、主に「育種技術の開発」および「資源管理技術の開発」に役立つと期待されている。実際、「育種技術の開発」への効果は大きく、我が国でも先進的な研究が進められている。一方、海産魚の全ゲノム情報を「資源管理技術の開発」に効果的に活用した例は我が国ではない。この分野は欧米で進んでいるが、試行錯誤中というのが現状である。研究遅滞の最大要因は、全ゲノム遺伝情報の研究者と資源研究者との連携不足にある。

2. 研究の目的

本研究では、漁業資源の遺伝的特性や種苗放流効果の把握を目指してきた「フィールド系学者」と、研究室内でゲノムを解析してきた「ラボ系学者」が連携し、ごく最近可能となった「多個体の全ゲノム配列解析」により、海産漁業資源の遺伝的特性を解明する。さらにこの特性情報から資源管理に有効な SNP 座を 1000 個選出し、安価・高効率な SNP 判定法(1kSNP システム)を開発する。海産漁業資源のモデル生物としては、トラフグを利用する。本種は沿岸漁業の重要種であるとともに、海面養殖の重要魚種でもあり(生産額は 3-4 位)さらには栽培漁業の対象魚でもある。したがって本魚種における技術開発は、水産諸分野に多面的な波及効果を持つと予想される。

(1) 多数の野生個体の全ゲノム配列決定と多型リストの作製

トラフグ資源は、日本海・東シナ海・瀬戸内海系群と伊勢・三河湾系群にわけて管理される場合が多いが、その系群内の遺伝的多様性および系群間の遺伝的差異の詳細は不明である。そこでまず 2 つの系群を代表する地域集団を選定し、それぞれ 10 個体について、全ゲノム配列情報を取得し、集団レベルの全多型リストを作成する。

(2) 野生集団間におけるゲノム特性の差異

2 つの地域集団間における遺伝的特性の差を明らかにするため、集団内の遺伝的多様性、集団間の遺伝的分化の度合い、集団内における連鎖不平衡ブロックの崩壊パターンに着目し、(1)で得られた全ゲノム情報の比較をおこなう。

(3) 安価・高効率な SNP 判定法(1kSNP システム)の開発

漁業資源の遺伝的多様性評価において、現在もっとも広く用いられている手法は、一生物種について 5-10 個のマイクロサテライト座を用いるものである。しかし、その実験効

率と情報量には大きな制限があり、放流魚の大規模な識別・追跡試験は困難であった。また、この手法では地域集団間の差異が見逃されがちで、誤った保全単位の策定を導く可能性も指摘されている。この問題を解決する方法は、実験効率が高く、情報量の大きいゲノムワイド SNP セットを利用することである。ところが、SNP 解析で常法とされている DNA チップ法は高価で、通常の漁業資源解析への適用は現実的ではなかった。RAD-seq 法の利用も提唱されているが、実験間で必ずしも同じ遺伝子座の情報が得られないという大問題が残されていた。本研究では、マイクロサテライト法よりはるかに情報量が大きくて実験効率が高く、DNA チップ法より安価で、RAD-seq 法より再現性が高い方法を、Amplicon sequencing 法をベースに開発する。

3. 研究の方法

(1) 多数の野生個体の全ゲノム配列決定と多型リストの作製

まず、日本海・東シナ海・瀬戸内海系群および伊勢・三河湾系群を代表する地域として、それぞれ若狭湾および伊勢三河湾に焦点を絞る。各地域から野生個体を採集し、そのうち 10 個体程度から高品質ゲノム DNA を抽出し、これを次世代シーケンサー(イルミナ HiSeq)に付して、ショートリードデータを得る。得られたデータを BWA によってリファレンス配列(fugu v5/fr3)にマップし、GATK 等により、多型リストを作成する。

(2) 野生集団間におけるゲノム特性の差異

若狭湾集団および伊勢・三河湾集団の遺伝的特性、およびその差を明らかにするため、ゲノムワイド SNP 情報を用いて、個体間の遺伝的距離、集団内の塩基多様度、集団間の Fst 値、集団内における多型座間の連鎖不平衡値を測定する。

3) 安価・高効率な SNP 判定法(1kSNP システム)の開発

以下のような手順で手法の開発をおこなう。上記 1)の解析から得られた SNP リストから、リピート領域の有無、アリル頻度の高低、連鎖関係の強弱に留意しつつ、全ゲノムあたり約 1000 個の SNP 座をえらびだし、これをマーカー座候補とする。それら SNP 座を挟みこむようなプライマーを 1000 セットを設計して合成する。これを 1 個体のゲノムと混ぜて、一つのチューブ内で反応させ、1000 種のアンプリコンを得る。この行程を 96 個体についておこなう。各個体についてアンプリコン群をラベルした後、96 個体を集約して、ベンチトップ型次世代シーケンサーイルミナ MiSeq に付す。得られたリード(約 0.5Gb)を BWA でマッピングした後、GATK で各

SNP 座の遺伝子型を判定する。

4. 研究成果

(1) 多数の野生個体の全ゲノム配列決定と多型リストの作製

2 つの集団（若狭湾および伊勢三河湾）各 10 個体について、全ゲノム配列を次世代シーケンサー-HiSeq で取得し、得られたリードを解析したところ、1 個体あたり約 70 万個の一塩基多型(SNP)が存在することがわかった。トラフグのゲノムサイズは約 400Mb なので、ある 1 個体をみた場合、約 500bp にひとつの割合で SNP が存在することがわかった。また一集団（10 個体）レベルでみると、合計約 350 万個の SNP 座が存在していた。

(2) 野生集団間におけるゲノム特性の差異

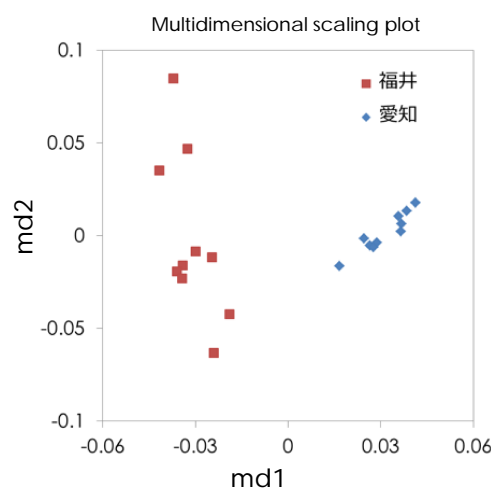


図1 Multidimensional scaling plot

若狭湾集団および伊勢三河湾集団の遺伝的特性を Multidimensional scaling 法で比較したところ、明瞭な 2 つのクラスターが認められ、2 集団が分化していることが示唆された(図 1)。ただし、Fst 値は 0.0057 と低く、分化の程度は小さいと考えられた。また、若狭湾集団と比較して、伊勢三河湾集団のほうが遺伝的多様性が低いことも示唆された。両集団の塩基多様度の差をとったところ、集団間に差のある局所ゲノム領域が、第 3, 4, 8 染色体上などに存在する可能性がしめされた。連鎖不平衡ブロックの崩壊パターンを調べたところ、そのブロックは家畜類に比べて著しく短く、1kb 以下であることがわかった。

(3) 安価・高効率な SNP 判定法(1kSNP システム)の開発

(1)の解析から得られた SNP リストから、970 個の SNP 座をえらびだし、それらを挟み込むようにプライマーペアを設計した。真の多型とアーティファクトを区別するため、祖父母・両親・子供の合計 96 個体からなるトラフグ家系を準備した。PCR 増幅後に MiSeq で

配列を得て、リファレンス配列にマップしたところ、970 種のアンプリコンのうち、600-700 種のアンプリコンが適切にリファレンス配列にマップされていた。マップされたリードの被覆深度を平均したところ 25 本であった。世代間の多型伝達パターンを利用して、アーティファクトを取り除いたところ、有効多型座率は 67.8%であり、約 650 個の SNP 座が多型解析に利用可能であることがわかった。野生集団の遺伝的多様性は家系集団よりはるかに大きいため、野生集団を材料としたときの有効多型座率はさらに上昇することが期待される。MiSeq のキャパシティを考慮すると、一回の解析に付す個体数を大幅に増加させることも理屈のうえでは可能であった。ただしこれには、識別個体数を増やすためのインデックスプライマーセットをカスタマイズする必要があると考えられた。

現在、より広範な地域で収集したトラフグサンプルについてこの 1kSNP システムや全ゲノム配列決定法を適用し、遺伝的集団構造や地域特性を解析中である。

以上、Amplicon sequencing をベースとした手法を用いることで、これまでよりはるかに手軽に多個体のゲノムワイド多型情報が得られることがしめされた。今後、海産資源の遺伝解析には、安価な SNP チップが利用できる一部の生物種を別として、本法あるいはそれに類似した手法の活用が盛んになっていくと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

片町太輔, 池田実, 安藤大樹, 菅谷琢磨, 與世田兼三, 藤井徹生, 小畑泰弘 トラフグ放流用人工種苗の遺伝的特性. Fish Genet Breed Sci 査読無, 46, 2017, 105-110

〔学会発表〕(計 8 件)

菊池潔, 水産科学におけるゲノム情報の活用を考える. (招待講演) 第34回マリントキシン研究会 2018年3月26日 東京

平瀬祥太郎・手塚あゆみ・永野惇・菊池潔・岩崎渉, 主成分分析による地域適応遺伝子の探索 日本水産学会春季大会 2018年3月26日 ~2018年3月29日 東京

鈴木重則, 種苗放流と漁獲管理の連携による漁業生産の安定を目指した事例解析 トラフグ伊勢・三河湾系群をモデルとして. (招待講演) 日本水産学会水産増殖懇話会平成 29 年度第 1 回講演会 2017 年 3 月 26 日 東京.

菊池潔, 水産学会賞受賞者講演 ゲノムワイド解析によるフグ性決定遺伝子の同定. (招待講演) 日本水産学会春季大会 2017 年 3 月 27 日 ~2017 年 3 月 30 日 東京

平瀬祥太郎・小北智之・永野惇・菊池潔,
RAD-seqによるシロウオ太平洋型と日本海型
の交雑集団の遺伝解析. 日本水産学会春季大
会 2017年3月27日~2017年3月30日 東京

佐藤茉菜・細谷将・吉川壮太・菊池潔, ア
ンプリコシーケス法による高速ジェノタイ
ピング技術の確立. 日本水産学会春季大会
2017年3月27日~2017年3月30日 東京

菊池潔, ゲノム情報は本当に水産に役立
つのか? - 14年間の定点観測から-. (招待
講演) 第6回太平洋中海域トラフグ研究
2016年12月15日~2016年12月16日 愛
知

片町太輔, トラフグの親子判別と育種への
展望. (招待講演) 水産育種研究会シンポジ
ウム 2016年11月3日 宮城

〔図書〕(計1件)

菊池潔, 水産遺伝育種学(担当 第11章
水産育種におけるゲノム情報の利用), 東北
大学出版会, 2017, 101-132

〔その他〕

研究紹介ホームページ

[http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/hybrid.ht
ml](http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/hybrid.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 潔 (KIKUCHI, Kiyoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授
研究者番号: 20292790

(2) 研究分担者

鈴木 重則 (SUZUKI, Shigenori)
水産研究・教育機構・研究員
研究者番号: 60463105

片町 太輔 (KATAMACHI, Daisuke)
水産研究・教育機構・主任研究員
研究者番号: 60443371

(3) 連携研究者

細谷 将 (HOSOYA, Sho)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号: 60526466

平瀬 祥太郎 (HIRASE, Shotaro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号: 90635559