

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K14526
研究課題名（和文）温帯ウナギと熱帯ウナギの交雑を通じてウナギ属魚類の大規模回遊への進化機構に迫る

研究課題名（英文）The production of hybrid species temperate eel and tropical eel for studying evolutionary mechanism of large-scale Migration of anguillid eels

研究代表者
須藤 竜介（Sudo, Ryusuke）
国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・グループ長

研究者番号：60722676
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：奄美大島で採集したオオウナギの雄をrLHにより催熟させ、精子を得た。得られた精子を凍結精子として保存できることを確認した。次に、ニホンウナギの雌とオオウナギの雄から交雑種を作出し、同時に同じ母親に由来するニホンウナギも作出した。作出した仔魚をシラスウナギへと変態するまで飼育したところ、ニホンウナギよりも交雑種は仔魚期間が短い傾向であることが明らかとなった。さらに、交雑種の遺伝学的解析の基盤整備のために、ゲノムデータを取得した。ナノポアウルトラロングシーケンス解析により約50Gbpのオオウナギのゲノム配列情報を取得し、Flye2.9でアッセムブリしたところ、良好なドラフトゲノムが構築出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により熱帯ウナギであるオオウナギと温帯ウナギであるニホンウナギの種間交雑種の作出が可能であることを示すことができた。さらに、交雑種はニホンウナギよりも仔魚期間が短くなる可能性があることが示唆された。仔魚期間は回遊距離と関連する形質であり、回遊の大規模化の進化機構解明に向けて、試験材料の確保に目処を付けることが出来た。加えて、完全養殖のウナギの社会実装の必要性が高まっている状況において、仔魚期間の短い交雑種を利用することは、養殖種苗としての適性があるとも考えられる。以上のように、本研究は基礎生物学的な価値とともに、水産学上も有用な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Male *Anguilla marmorata* (giant mottled eels) were caught in freshwater river in Amami Island, Kagoshima Prefecture, Japan. For obtaining sperm, weekly injection of recombinant LH to eels were conducted. Hybrid larvae from female *Anguilla japonica* (Japanese eel) and male *A. marmorata* were produced and at the same time *A. japonica* larvae derived from the same female was also produced. The duration of the larval period of hybrid was shorter than that of *A. japonica*. In addition, genomic data of *A. marmorata* were obtained to develop the basis for genetic analysis of hybrids. Approximately 50Gbp of *A. marmorata* genome sequence were obtained by using next generation sequencer and assembled it with Flye2.9 to construct a draft genome.

研究分野：水圏生物学

キーワード：ニホンウナギ オオウナギ 交雑種 仔魚期間 ゲノム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水棲動物が見せる特定の季節や生活史のある段階に対応して起こる生息域間の移動のことを「回遊」といい、シロサケの遡河回遊やアカウミガメの産卵回帰など大規模な回遊はテレビ番組や新聞にしばしば取り上げられるように、人々の好奇心をかき立てる魅力がある。ある種の生物はこうした大規模な回遊をなぜするに至ったのか、すなわち「大規模回遊への進化機構」は動物学的に興味深く、生物の地理分布の決定に関わる生態学的にも重要な課題であるが、その知見は乏しい。

ウナギ属魚類全種の分子系統解析から、ウナギは熱帯の海産魚を起源として生まれていることが分かっており、熱帯域内の小規模な回遊をする種から熱帯の産卵場と温帯の生育場を行き来する大規模な回遊をする種へと進化した歴史を有している。現在でも熱帯に分布し祖先型の小規模な回遊をする「熱帯ウナギ」と温帯に分布し派生型の大規模な回遊をする「温帯ウナギ」がいる。ウナギ属魚類の仔魚は葉の形に似たレプトセファルスと呼ばれる形態をしており、海洋で浮遊生活をしており、大規模回遊が成立するには長く仔魚として過ごし長距離輸送される必要がある。実際、耳石の微細構造解析から温帯ウナギは熱帯ウナギに比べて、仔魚期間がより長いことが明らかとなっている。つまり、仔魚期間という計測可能な形質を調べることで回遊規模を間接的に把握出来る。さらにウナギ属魚類は属内での種間交雑が可能であることが確認されている。これを利用し、熱帯ウナギと温帯ウナギの交雑家系を作出することで、ウナギの回遊の大規模化の責任遺伝子群を表現型から遺伝子を探る順遺伝学の俎上に載せることができる。以上のことから、ウナギ属魚類は大規模化への進化機構の材料として最適であるといえる。

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) とオオウナギ (*A. marmorata*) の産卵場は共通しているが、成育場は、ニホンウナギは温帯であり、オオウナギは熱帯から亜熱帯 (オオウナギ) と分かれるため、両種の回遊規模は異なる。このことを利用し、2種を交雑させて雑種第2世代を作出し、仔魚期間に関連する遺伝子座を探索することで、ウナギの大規模回遊の進化機構の解明に向けた実験的なアプローチが可能となる。大規模回遊という魅力的な生命現象に対するこのようなアプローチは前例がなく、本研究は世界で初めて回遊の大規模化の遺伝基盤に迫るものである。

また、ウナギは我が国の伝統的食文化を担う重要な水産資源でもある。しかし近年、その漁獲は安定しておらず、水産・養殖業にとって問題となっている。こうした中で養殖用シラスウナギの安定供給に耐えうる大量生産技術の開発は喫緊の課題である。人工種苗量産化の実現には飼育コストがかかる仔魚期間を短縮することが非常に重要である。本研究で作出する交雑種は仔魚期間が短いことが見込まれるため、水産学的にも有意義な知見を得られる。

以上のように、本研究は基礎と応用の両側面において重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究は、回遊規模に密接に関連する仔魚期間に着目し、温帯ウナギと熱帯ウナギの種間交雑家系の遺伝学的な解析から、「ウナギの回遊を大規模化させた責任遺伝子はなにか？」という問いに迫ることを目的とする。また、解析家系の構築過程で種間交雑種を作出し、水産分野で研究が立ち後れている交雑育種に関する知見を副次的に得ることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) オオウナギのサンプリングと催熟および凍結精子の作製

研究材料であるオオウナギは2018年と2020年に鹿児島県奄美大島の河川で採集した。電気ショックによる採集を試みたところ、合計10尾のウナギを採集できた。事前の生態学的調査により採集した河川は性比が雄に偏っていることが分かっている。そのため、精子を得るために採集したオオウナギは海水馴致させた後、ウナギ組換え黄体形成ホルモン (rLH) を週に1度投与し催熟させた。その結果、10尾のうち7尾で投与後3~6週間後には排精が確認された。得られた精子は、常法により凍結精子を作製し、人工交配まで液体窒素中で保存した。

(2) 人工交配による交雑種の作出

ニホンウナギの雄はオオウナギの雄と同様に催熟させ、精子を得た。次に、ニホンウナギの雌をウナギ組換え濾胞刺激ホルモン (rFSH) を投与することで催熟させた。常法により採卵し、人工交配のよりオオウナギの精子と掛け合わせて交雑種を作出した。同時に、同じ雌に由来するニホンウナギも同様に作出した。本研究では下記の2ロットを作出した。

➤ LotA: 交雑種A (雌: No.7 × 雄: 8D1) とニホンウナギA (雌: No.7 × 雄: 795)

➤ LotB: 交雑種B (雌: No.5 × 雄: 8D1) とニホンウナギB (雌: No.5 × 雄: 792)

No.5, No.7, 792, 795, 8D1 は各個体のID。

作出した各ロットはプレート法にて、受精率とふ化率を調べた。また、卵とふ化仔魚はウナギ仔魚飼育用の水槽 (ポウル水槽) へ収容するまでは200Lアルテミア水槽で管理した。

(3) 交雑種の飼育

交雑種およびニホンウナギのふ化仔魚は、5日齢でポウル水槽へ500尾/水槽の密度で収容し

た。LotA はふ化仔魚の尾数が少なかったため、1 水槽のみを用い、LotB は 3 水槽を用いて収容した。7 日齢から 40 日齢まではボウル水槽を、41 日齢以降は 30L 水槽を用いて変態が開始するまで飼育した。なお、LotB は 3 組のボウル水槽の仔魚を 30L 水槽 1 組へ統合した。飼育期間中、感染症予防として給餌前に硝酸銀を添加した。20, 40, 60, 80, 119, 160, 200, 250, 300 日齢において、水槽内の生残尾数を計数および全長を測定した。変態を開始した個体は適宜仔魚水槽から取り出し、変態開始尾を記録した上で、変態した個体を管理する水槽へ移した。

(4) オオウナギのゲノムデータ整備

オオウナギから全血を採取し、すぐに液体窒素で凍結させ、解析まで液体窒素中で保存した。UHMW DNA Aux Kit、Nanobind CBB Big DNA Kit (Circulomics) もしくは Monarch HMW DNA Extraction Kit for Cells & Blood / Monarch HMW DNA Extraction Kit for Tissue (New England Biolabs) を用いて、キット付属のプロトコルに準じて超高分子 DNA を抽出しました。NanoDrop、Qubit、パルスフィールド電気泳動(PAGE)による定性、定量測定を実施、サンプルの品質を確認した。

ナノポアシーケンサーとイルミナシーケンサーを用いたシーケンシングを実施した。各機器のライブラリー調整およびシーケンシングの条件は表 1 の通りである。

表1 オオウナギの各機器のゲノムシーケンシングの条件

	ナノポアシーケンサー	イルミナシーケンサー
機器	PromethION	Novaseq 6000
ライブラリーキット	Ultra-Long DNA Sequencing Kit	TruSeq DNA PCR-Free
フローセル	R9.4.1 (FLO-PRO002) 2セル	-
ベースコール	Guppy Ver.5.0	-
断片化処理	-	~ 550bp (Covaris)
リード長	-	2 x 150bp

ナノポアシーケンサーから得られたデータは fly.2.9 でアセンブリし、purge_dups1.2.5 で重複配列を除去し、イルミナシーケンサーによる配列を利用し、nextpolish1.4 で配列を補正した。作成したアセンブリを J-eel2.0 (Chr1-19 のみ) へ Regtag2.1 で整列化し、ニホンウナギとのゲノム配列の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 交雑種のふ化率と受精率

作出した交雑種およびニホンウナギの各ロットの受精率とふ化率は、どちらのロットでも交雑種よりもニホンウナギの方が 20% 以上高くなった (表 2)。

表2 ニホンウナギとオオウナギの受精率とふ化率

	LotA		LotB	
	交雑種	ニホンウナギ	交雑種	ニホンウナギ
受精率	73.5%	97.4%	77.2%	95.8%
ふ化率	64.1%	87.1%	50.4%	68.3%



図 1 作出した交雑種とニホンウナギ

(2) 交雑種の仔魚期の飼育成績

作出したオオウナギとニホンウナギに形態学上の大きな違いはなかった (図 1)。交雑種とニホンウナギの飼育期間中の生残率を比較したところ、LotA では 40 日齢以降は交雑種がニホンウナギよりも生残率高く、300 日齢時点ではニホンウナギが 2.2% であったのに対して、交雑種は 7.8% であった (表 3)。LotB の生残率は、飼育期間を通して大きな差は無かった。

表3 各日齢における交雑種およびニホンウナギの生残率

日齢	LotA		LotB	
	交雑種	ニホンウナギ	交雑種	ニホンウナギ
5	100%	100%	100%	100%
20	52.0%	52.6%	53.1%	65.1%
40	40.8%	22.2%	45.7%	53.1%
60	30.4%	13.2%	21.0%	17.1%
80	23.4%	11.6%	15.4%	12.8%
119	11.2%	8.6%	10.3%	9.5%
160	9.2%	5.8%	7.7%	6.9%
200	8.4%	4.4%	7.5%	6.1%
250	7.6%	3.2%	6.9%	5.4%
300	7.8%	2.2%	6.6%	5.0%

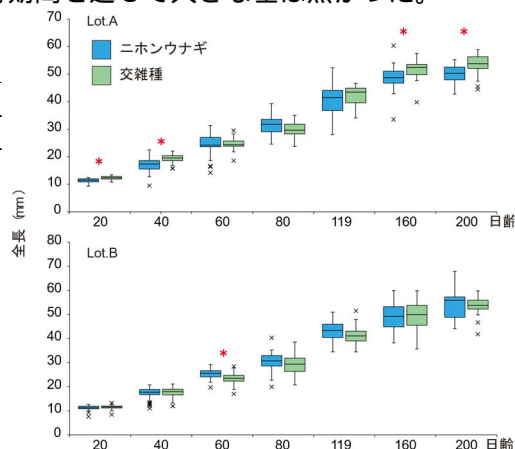


図 2 交雑種とニホンウナギの全長の推移。アスタリスクは有意差を表す (t-test, $p < 0.05$)

次に、各ロットの全長の推移を調べたところ、LotA では 20, 40, 160, 200 日齢において、有意に交雑種がニホンウナギに比べて大きかった(図2)。LotB では 60 日齢において、ニホンウナギが交雑種よりも大きかったが、その他の日齢では有意な差は認められなかった。

さらに、累積の変態開始個体数と 300 日齢時点における変態開始率を調べた。どちらの Lot も累積変態開始個体数は 200 日齢以降、交雑種はニホンウナギに比べて多い傾向が認められた(図3)。また、300 日齢時点における LotA と LotB の変態開始率は、それぞれニホンウナギは 33% と 43% であったのに対して、交雑種が 97% と 88% であり、交雑種は仔魚期間が短い傾向が認められた(図4)。この試験で用いたオオウナギは 1 個体であるため、今後はさらに家系数を増やして交雑種はニホンウナギより仔魚期間が短いのかを検証する必要がある。

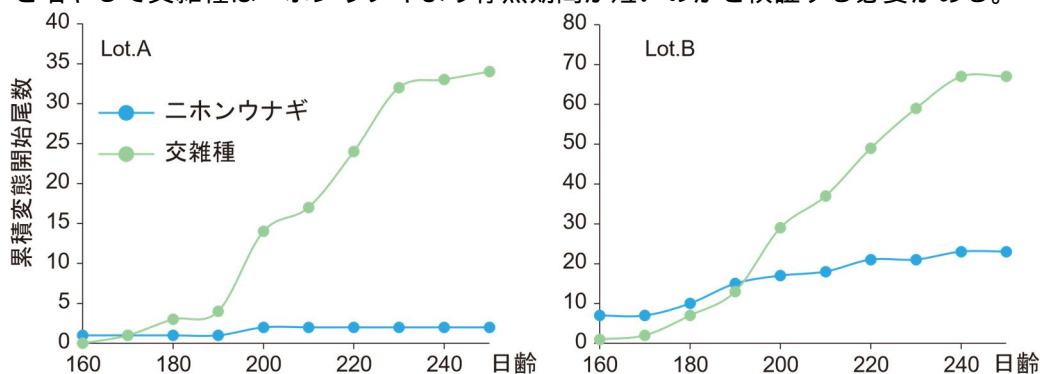


図3 交雑種とニホンウナギの累積変態開始尾数の推移。

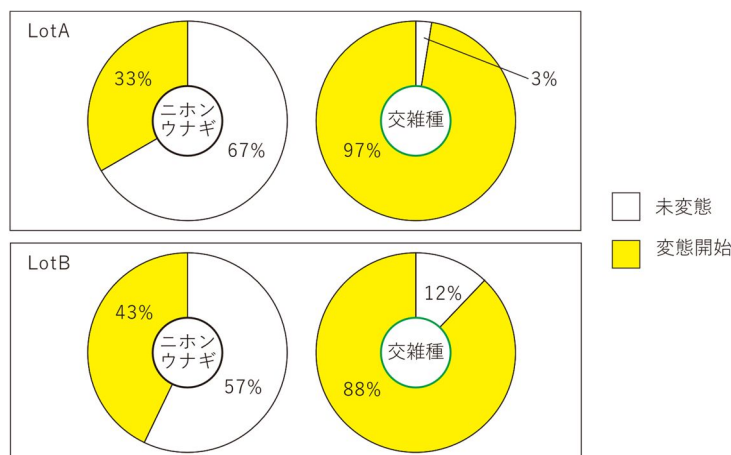


図4 300 日齢時点における交雑種とニホンウナギの変態開始率。

(3) オオウナギのゲノム

オオウナギの遺伝学的解析基盤を整備するために、次世代シーケンサーによるゲノム解析を実施し、約 50Gbp のデータを取得した。得られたデータは fly2.9 でアセンブリし、purge_dups1.2.5 で重複配列を除去し、イルミナシーケンサーによる配列を利用し、nextpolish1.4 で配列を補正し、良好なアセンブルされたゲノムデータ(Ama_V1)を構築した(表4)。Ama_V1 の統計データは表の通りである。またニホンウナギとのゲノムの比較を実施したところ、非常に類似していることが確認できた(図5)。

表4 オオウナギのゲノムの統計データ

Main genome scaffold total:	846
Main genome contig total:	846
Main genome scaffold sequence total:	1025.223 MB
Main genome contig sequence total:	1025.223 MB
Main genome scaffold N/L50:	40/6.408 MB
Main genome contig N/L50:	40/6.408 MB
Main genome scaffold N/L90:	237/821.065 KB
Main genome contig N/L90:	237/821.065 KB
Max scaffold length:	25.811 MB
Max contig length:	25.811 MB
Number of scaffolds > 50 KB:	579
% main genome in scaffolds > 50 KB:	99.51%

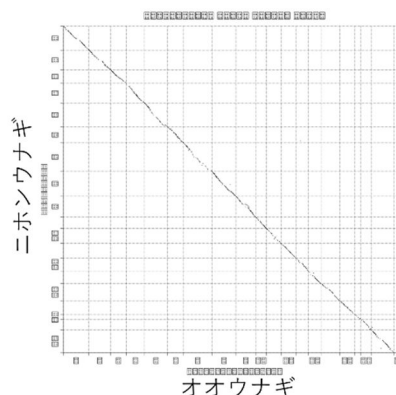


図5 ニホンウナギとのゲノムの比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuki Yokouchi, Fracoise Daverat, Michael J Miller, Nobuto Fukuda, Ryusuke Sudo, Katsumi Tsukamoto, Pierre Elie, Russel Poole	4. 巻 14
2. 論文標題 Growth potential can affect timing of maturity in a long-lived semelparous fish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Letters	6. 最初と最後の頁 20180269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsbl.2018.0269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagihara Seishi, Aoyama Jun, Sudo Ryusuke, Limbong Daniel, Ijiri Shigeho, Adachi Shinji, Tsukamoto Katsumi	4. 巻 96
2. 論文標題 Reproductive physiological characteristics of tropical Celebes eels <scp> <i>Anguilla celebesensis</i> </scp> in relation to downstream migration and ovarian development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fish Biology	6. 最初と最後の頁 558 ~ 569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfb.14231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto Masatoshi, Uchino Tsubasa, Koshimizu Eriko, Kuchiishi Yudai, Sekiguchi Ryota, Wang Liu, Sudo Ryusuke, Endo Masato, Guiguen Yann, Scharf Manfred, Postlethwait John H., Sakamoto Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 A Y-linked anti-Müllerian hormone type-II receptor is the sex-determining gene in ayu, <i>Plecoglossus altivelis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009705 ~ 1009705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Rui, Sudo Ryusuke, Yatabe Takashi, Yamano Keisuke, Nomura Kazuharu	4. 巻 100
2. 論文標題 Developmental features of Japanese eels, <i>Anguilla japonica</i> , from the late leptocephalus to the yellow eel stages: an early metamorphosis to the eel like form and a prolonged transition to the juvenile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fish Biology	6. 最初と最後の頁 454 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfb.14956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sudo Ryusuke, Kawakami Yutaka, Nomura Kazuharu, Tanaka Hideki, Kazeto Yukinori	4. 巻 317
2. 論文標題 Production of recombinant Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>) growth hormones and their effects on early-stage larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113977 ~ 113977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcn.2022.113977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須藤 竜介
2. 発表標題 ニホンウナギの産卵回遊の開始機構に関する生理生態学的研究
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤 竜介
2. 発表標題 ニホンウナギの変態期における遺伝子発現の網羅的解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 塚本 勝巳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 240
3. 書名 ウナギの科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------