

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03030

研究課題名(和文) 同所性近縁種間の生殖隔離機構を利用した完全不妊サバ雑種集団の作出

研究課題名(英文) Production of sterile hybrid mackerel population utilizing a mechanism of reproductive isolation between two related species.

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、マサバとゴマサバが同所的な種分離を示すことから、生殖隔離が成立している系群が存在すると推測し、この機構を使うことで全個体不妊となるサバ雑種集団の作出を試みた。日本各地のマサバとゴマサバ各系群の交雑を実施し、完全不妊集団となる系群の組み合わせを見出すことを試みた。しかし、同所的なマサバおよびゴマサバ集団による交雑を試みたものの、完全な不妊集団とならないことが示唆された。この結果から、完全不妊集団を作成するためには、系群の組み合わせではなく、個体レベルでの組み合わせに依存することが示唆された。また、若齢時に不妊であっても、成魚時点で配偶子の生産能を回復すること可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、マサバとゴマサバのF1交雑魚が不妊となるメカニズムおよびそれを利用した全個体不妊化サバ集団の作出を試みた。本課題中では、完全な不妊化集団を確実に作出する両親種の組み合わせを見出すには至らなかった。しかし、本課題を進める中で、F1サバ交雑魚の不妊化に関する知見が集積された。さらに、両種のサバのゲノム情報が蓄積され、2種間で性決定機構が異なることや、これらの情報を用いた性判定技術の開発も実現した。これらの情報や技術は、現在盛んになりつつある、人工種苗を用いたサバ類養殖の発展にも大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this project, in view of the existence of a population in which reproductive isolation is established, using this mechanism, it was attempted to produce a population of mackerel hybrids in which all individuals are sterile. In order to find a possible combination of completely sterile populations, crossbreeding was conducted between the chub mackerel and blue Mackerel stocks in various regions of Japan. However, the results indicated that the attempts to crossbreed sympatric populations of chub mackerel and sesame mackerel did not result in a completely sterile population. These results suggest that the production of a completely sterile population depends on combinations at the individual level, not on combinations of stock groups. The results also suggest that even if the fish are sterile at an early stage, they may eventually recover their gametogenic potential on mature fish.

研究分野：魚類生殖工学

キーワード：雑種不妊 生殖隔離 サバ養殖

## 1. 研究開始当初の背景

マサバ (*Scomber japonicus*) およびゴマサバ (*S. australasicus*) は我が国周辺に広く分布する水産上重要種であり、最近では高付加価値を持つブランド魚として西日本を中心にその養殖が盛んになっている。申請者らは、ゴマサバとマサバの F1 交雑魚 (ゴマ・マサバ雑種) が生殖細胞を持たない不妊魚となることを見出している。

このゴマ・マサバ雑種では、生殖にかかるエネルギーが不要になるため、高成長を示し、脂質含有率も高い。さらに、サバ類養殖で大きな問題となる高水温期の感染症に対し、高い抵抗性を有していることも明らかとなっている。このように、病気に強く肉質も優れているゴマ・マサバ雑種は、関サバ等のブランドサバに劣らない、新規のサバ品種として有望であると期待される。さらに、不妊となるゴマ・マサバ雑種はその配偶子を生産しないため、海面イクスにおいて養殖を実施し、天然海域へ逃亡したとしても、自然集団との交雑は起こり得ない。つまり、逃亡魚による遺伝子汚染や、在来種との競合など、現在の海面養殖における問題が全く生じない。

しかし、ゴマ・マサバ雑種の妊性解析を進めるなかで、交雑 F1 世代において、およそ 20% の個体において不妊とならないことが明らかとなった。さらに、交雑 F1 世代の交配により生じる後代が生殖で正常な発生を示すことも確認済みである。このように、ゴマ・マサバ雑種の養殖特性の根幹である不妊性を有さない個体が生産した種苗集団中に生じることは、養殖産業としての観点からは致命的な問題であり、この点を解決することが、サバ雑種を養殖対象魚種として用いるために必須であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、以下に記す“サバ雑種における親魚系群の組み合わせによる不妊化率の差”に着目し、この課題の解決を試みた。日本近海には複数のマサバおよびゴマサバ系群がそれぞれ存在することから、同時期・同海域で産卵するにも関わらず、生殖隔離が成立している系群間を交雑すれば、全個体が不妊であるサバ雑種集団を作出できると考えた。しかし、各系群間の F1 交雑魚を作出するためには、系群ごとの成熟時期の差や、親魚の収集や輸送等が課題となる。そこで各地のマサバとゴマサバの生殖細胞を集め代理親魚技術に用いる。これにより、ドナー細胞を移植した宿主魚が生産する各系群の配偶子を用いる網羅的な交雑を実現し、完全不妊集団となる系群の組み合わせを見出す。この手法を実現するためには、まず、これまでに確立しているサバ類代理親魚技法において、生殖組織を凍結・解凍し、ドナー細胞として用いる技術が必須となる。本研究では、まず、この手法を開発を試みた。また、各種の交配試験を効率よく、かつ確実にじっしするのために、マサバ、ゴマサバ両種の遺伝的な種判別法、および性判別法の開発についても本課題において試みた。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 凍結精巣細胞をドナーとしたサバ代理親魚技法の開発

ドナーマサバ個体から摘出した精巣を凍結保存し、サバ雑種宿主への生殖細胞移植によりドナー由来配偶子の生産を試みた。マサバ 1 歳魚の精巣を緩慢法で凍結保存した。凍害保護剤には、を用いた。細断した生殖腺を、凍害保護剤 (egg yolk 10%、0.1M トレハロース、1.3M DMSO) に浸漬し、氷上で 60 分間の平衡化した後、-1 /分で生殖腺を 90 分間かけて緩慢凍結した。その後、凍結ドナー清掃は液体窒素で 6 ヶ月保存した。解凍したマサバ精巣を酵素分散し、得られたドナー精巣細胞をゴマサバ×マサバ雑種仔魚の腹腔内へ移植した。移植魚は満 1 歳まで飼育し、ドナー由来のマサバ配偶子生産の有無を確認した。

### 3-2. マサバ、ゴマサバ両種の遺伝的な種判別法および性判別法の開発

マサバおよびゴマサバ両種のゲノム上に存在する性特異的な single-nucleotide variations (SNVs) を利用した PCR 法による種判別法および性判別法の開発を試みた。千葉県産の天然マサバおよびゴマサバ雌雄各 30 個体の胸ビレから DNA を抽出し、マサバの雌雄およびゴマサバの雌雄それぞれ 30 個体による pool-seq を行なった。次に、de novo アセンブリにより得られたマサバおよびゴマサバ両種の参照配列に、取得した塩基配列をそれぞれマッピングし、マサバおよびゴマサバの種特異的および、両種における性特異的な SNVs を探索し、それらの SNVs を利用した PCR プライマーセットを作成した。

### 3-3. 複数個体の組み合わせ交配によるゴマサバ×マサバ系統の作出とその解析

異なる個体の組み合わせによる F1 交雑系統において、不妊化率に差が生じるかを確認するために、ゴマサバメス 3 個体およびマサバオス 3 個体を総当たり交配し、9 系統の F1 交雑魚を作出した。その後、飼育し、4 ヶ月齢に一部をサンプリングし、生殖腺の組織学的解析により、任性について調べた。

## 4. 研究成果

#### 4-1. 凍結精巣細胞をドナーとしたサバ代理親魚技法の開発

上述した緩慢凍結法により、生精巣では、1g あたり 760 万細胞の生きた精原細胞が得られたのに対し、凍結精巣では生精巣の 77.2%にあたる、1g あたり 560 万の細胞の生きた精原細胞が得られた。本法により、6 ヶ月間凍結保存した 1 歳魚のマサバ精巣をドナーとして、宿主となるゴマ・マサバ雑種仔魚 500 尾に移植し、飼育したところ、1 歳齢時点でオス 5 尾が生残した。これらのオス移植宿主にホルモン投与することで、精子を搾出し、ミトコンドリア DNA を解析したところ、排精が確認された 5 尾全てにおいて、ドナー由来のマサバ精子の生産が確認された。さらに、オス雑種宿主の精子と野生型マサバから得た卵と受精させ、得られた F1 仔魚 8 尾を、マイクロサテライトによる親子鑑定した結果、全個体ドナー由来マサバアレルとメス由来アレルの組み合わせを持っており、8 尾すべてがドナーマサバ由来の精子が受精した個体であることが明らかとなった。このように、ゴマ・マサバ F1 交雑魚を宿主とした代理親魚技法において、凍結保存した精巣をドナーとして利用した場合でも、機能的なドナー由来の精子を効率良く生産可能であった。本技法を用いることで、ドナーとなる精巣を凍結することさえできれば、地理的、あるいは時間的な制約なく、サバ類の交雑魚を作出することが可能となった。

#### 4-2. マサバ、ゴマサバ両種の遺伝的な種判別法および性別法の開発

マサバの雌雄およびゴマサバの雌雄による pool-seq 解析の結果、マサバ、ゴマサバおよびその雑種を高精度で判別可能な PCR 法を新たに開発した。本種判別 PCR 法では、1 組のプライマーセットでマサバおよびゴマサバの同一遺伝子座に存在する種特異的な InDel マーカーを含む領域を増幅することで、種を判別するため、PCR 反応の効率や DNA サンプルの質による誤判定を防ぐことが可能である。さらに、日本各地で漁獲されたマサバ 208 尾およびゴマサバ 118 尾において本 PCR 法により判定した種は外部形態に基づく種同定と 100%一致した。さらに、人工授精で得られた F1 雑種仔魚より抽出した DNA サンプルを本 PCR 法に供したところ、雑種を 100%の精度で同定可能であった。さらに、マサバおよびゴマサバ両種において、性と強い関連を示す SNVs を 116 個および 571 個それぞれ同定し、これらの性特異的な SNVs から、マサバおよびゴマサバにおいて、それぞれ 2 セットの性別判定 PCR プライマーセットを作成した。生殖腺の形態観察による性別判定の結果と、本 PCR 法の結果を比較したところ、マサバでは、リオス では、98.9%-100%、メスでは 97.2%-100%の精度で正しく性別判定が可能であった。ゴマサバでは、オス では、92.6%-94.4%、メスでは 96.9%の精度で正しく性別判定が可能であった。以上の結果から、日本近海で漁獲されるマサバおよびゴマサバに対して利用可能な高い精度で性別判定が可能な PCR 法を確立した。これらの遺伝的な種および性別判定法を応用することで、サバ養殖に用いる人工種苗を生産するための親魚管理において、親魚群を確実に対象種のみを選抜したうえで、任意の雌雄比となる飼育集団を、より若齢の段階で構築することが可能であり、飼育にかかるスペースやコストの削減が期待できる。このように、本研究で確立した PCR による種および性別判別法は、安定的かつ計画的な人工種苗供給のための実用的な手法として、サバ類養殖の高度化に貢献可能である。

#### 4-3. 複数個体の組み合わせ交配によるゴマサバ×マサバ系統の作出とその解析

これまでの先行研究の結果から、ゴマサバとマサバの雑種 F1 世代はそのほとんどが不妊であるものの、その一部が妊性を有し、さらに F1 交雑魚同士の交配により生じる次世代が生残生であることも明らかとなっている。しかし、サバ類養殖にこの雑種不妊による特性を利用するためには、生産した雑種 F1 世代において全個体不妊であることが必須だが、人工的に作出した大分産マサバと千葉産ゴマサバの交雑魚では妊性を有する個体の混入を排除できない。本課題では、マサバおよびゴマサバにおいて、同所的に種が分離していることを前提に、同時期、同海域で産卵するにも関わらず、生殖隔離が成立している系群間を交雑すれば、全個体が不妊であるサバ雑種集団を作出できると考えた。そこで日本各地のマサバとゴマサバの生殖細胞を集め代理親魚技術により、ドナー細胞を移植した宿主魚が生産する各系群の配偶子を用いる網羅的な交雑を実現し、完全不妊集団となる系群の組み合わせを見出すことを試みている。本課題において、までに、館山産マサバおよびゴマサバ、大分産マサバおよびゴマサバの組み合わせで雑種を作っているものの、必ずしも完全な不妊集団とならないことが示唆された。この結果から、完全不妊集団となるかいなかの組み合わせについては、系群の組み合わせではなく、個体レベルでの組み合わせに依存することが示唆された。また、複数の F1 交雑家系の生殖腺の発達を組織学的に観察したところ、4 ヶ月齢では全個体が生殖細胞欠損型の不妊魚様の生殖腺を有していても、12 ヶ月齢では一部の個体で配偶子を生産している F1 雑種家系が存在した。この結果から、若齢時に生殖細胞欠損型不妊と観察されても、わずかに生殖細胞が残存しており、将来的に配偶子生産に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 W Kawamura, R Tani, H Yahagi, S Kamio, T Morita, Y Takeuchi, R Yazawa, G Yoshizaki	4. 巻 295
2. 論文標題 Suitability of hybrid mackerel ( <i>Scomber australasicus</i> × <i>S. japonicus</i> ) with germ cell-less sterile gonads as a recipient for transplantation of bluefin tuna germ cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol	6. 最初と最後の頁 113525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113525	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 Kawamura, W, Yazawa R, Tani R, Takeuchi Y, Morita T, Yoshikawa H, Yoshizaki G	4. 巻 51
2. 論文標題 Development of a simple method for sperm cryopreservation of Scombridae fishes in outdoor environments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture Res	6. 最初と最後の頁 3376-3383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.14673	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 Tani Reoto, Yazawa Ryosuke, Kamio Shigeharu, Kawamura Wataru, Morita Tetsuro, Takeuchi Yutaka, Yoshizaki Goro	4. 巻 53
2. 論文標題 Establishment of surrogate broodstock technology in Scombridae species by germ cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 2760 ~ 2771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.15791	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 Tani Reoto, Kawamura Wataru, Morita Tetsuro, Klopp Christophe, Milhes Marine, Guiguen Yann, Yoshizaki Goro, Yazawa Ryosuke	4. 巻 87
2. 論文標題 Development of a polymerase chain reaction (PCR)-based genetic sex identification method in the chub mackerel <i>Scomber japonicus</i> and blue mackerel <i>S. australasicus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 785 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01548-z	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 -

〔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 谷怜央人・矢澤良輔・森田哲朗・吉崎悟朗(海洋大)・Yann Guiguen (INRA)
2. 発表標題 マサバおよびゴマサバのPCR法による性判別
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷怜央人, 川村亘, 矢澤良輔, 吉崎悟朗
2. 発表標題 ゴマサバ × マサバ 雑種宿主によるドナー由来マサバの生産
3. 学会等名 日本水産学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------