

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05730

研究課題名（和文）全国主要漁場における養殖マダイ逸出の分子遺伝学的調査

研究課題名（英文）Genetic survey of escaped farmed red sea bream in major aquaculture area

研究代表者

澤山 英太郎（SAWAYAMA, Eitaro）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70846071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：養殖技術の開発や育種が進んでいるマダイをモデルとし、主要な養殖漁場周辺で逸出養殖魚のモニタリングを実施した。まず、養殖魚と天然魚を区別するために、一塩基多型（SNP）マーカーを開発し、これを用いて逸出個体を特定する分子遺伝学的方法を開発した。全ゲノムから均等に選ばれた249個のSNPマーカーを使い、SNPパネルを作成した。このSNPパネルの有効性を評価した結果、約200個のSNPが十分な解析精度で増幅され、これらを利用して養殖魚と天然魚を遺伝的に識別することができた。このSNPパネルを使用して逸出魚の調査を行ったところ、閉鎖性の高い漁場では高頻度で逸出が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
一連の研究により、マダイの個体識別を可能にする高感度DNAマーカーの開発に成功し、日本沿岸域のマダイの遺伝的多様性の現状や、逸出による遺伝的攪乱を明らかにできた。このことは、水産重要魚種の遺伝資源を保全する上での重要な基礎情報となるとともに、他魚種においても同様の技術を転用することが可能となるため、学術的意義は大きいと言える。また、逸出の現状を明らかにしたことで、今後の養殖管理についてのあり方を検討する知見としての意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Red sea bream is a species for which intensive aquaculture and breeding have been extensively developed. In this study, we used this fish species as a model to monitor escapee around major aquaculture areas. Initially, to differentiate between farmed and wild fish, a single nucleotide polymorphism (SNP) marker was developed, and a molecular genetic method was established using this to identify escapee. An SNP panel was created using 249 SNP markers evenly selected from across the genome. Upon evaluating the efficacy of this SNP panel, approximately 200 SNPs were amplified with sufficient accuracy for analysis, allowing for the genetic discrimination between farmed and wild fish. Investigations using this SNP panel on escaped fish showed that escapes were frequently observed in aquaculture areas located inner bay.

研究分野：水産増殖

キーワード：養殖魚 逸出 遺伝的攪乱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マダイ養殖は網生簀を用いて営まれているが、災害等により生簀が損壊し、養殖個体が逸出することがある。養殖マダイは半世紀以上にわたる選抜育種を経ており、高成長系統や耐病性系統が作出されてきた。これら遺伝改良された系統は表現型に寄与する遺伝子のアレルが固定され、選抜育種の過程で遺伝的多様性が減衰してきた。さらには、同種の天然集団とは遺伝的距離が大きく離れており、天然魚とは異なった遺伝組成を持つことが知られている。

我々の研究から、養殖産地である愛媛県宇和島市では非常に多くの養殖逸出個体が存在することが明らかとなっており、一部では天然個体との交雑も確認されている (Sawayama et al. 2019)。逸出個体が天然集団に加入し交雑すると、逸出個体が持つ“養殖環境のみで有利な遺伝子変異”が天然集団へ浸透し、天然集団の環境適応度に影響を及ぼす恐れがある。故に、天然集団における逸出/交雑個体の割合を全国規模で調査し、さらには、養殖集団由来の遺伝子変異が天然集団へどの程度浸透しているのかを把握する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず、新規に開発した個体識別一塩基多型パネルを用い、わが国の主要な養殖産地周辺に生息するマダイの由来判別を行い、逸出や交雑の現状を調査する。また、我々がこれまでに集積してきたマダイのゲノム情報を活用し、養殖集団に特徴的な遺伝子変異を特定し、さらには、天然集団におけるそれら変異の頻度を調べることで、養殖個体に由来する遺伝子浸透を評価する。これらの実験結果をもとに、マダイ養殖がこれまでに各地の天然資源に与えてきた遺伝的影響を定量的かつ直接的に評価し、今後の養殖管理や資源保全についての基礎的なデータを得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、令和元年度に採択された科研費「研究活動スタート支援」により開発した高感度個体識別一塩基多型 (SNP) 検出システムを用い、主要な養殖産地におけるマダイの逸出/交雑の現状を明らかにする。本 SNP 検出システムはゲノムワイドに配置された約 250 個の SNP を同時増幅し、次世代シーケンサーにより多検体の配列取得を行うものである。従来用いられてきた MS DNA マーカーよりも短期間かつ安価、そして高精度に個体を識別することができる。我々はこれまでに養殖マダイ 5 系統の DNA サンプルを入手しているが、養殖マダイの約 9 割がこれら系統に由来することから、養殖集団の全遺伝情報を保有している。そのため、各地で採集された天然個体の遺伝子型を本 SNP 検出システムにより取得し、各養殖系統の遺伝子型と照らし合わせ、逸出個体を系統レベルで識別する。

また、個体レベルでの逸出の影響を調べることに加えて、逸出個体との交雑により生じる天然集団への選抜遺伝子の浸透の現状も明らかにする。そのためには、まず、養殖集団においてゲノムワイド SNP 多型解析を実施し、各種集団遺伝学的指標を基に選抜遺伝子やその周辺領域を特定する。逸出が高頻度で起こっている海域の天然集団については、選抜遺伝子 (領域) や、申請者が既に単離した劣勢有害遺伝子における集団遺伝学的指標を調べる。これにより、養殖集団由来の遺伝子変異が天然集団にどの程度浸透しているのかを直接的に検出することが可能になる。

### 4. 研究成果

本研究では養殖が行われていない日本海側（青森、兵庫）と、養殖が盛んに行われている海域（三重、和歌山、高知、長崎、熊本）のサンプルを入手し（図1） SNP パネルから得られた SNP 情報を用いて遺伝的背景を調べた。また、養殖集団として韓国に由来する1集団と、国内で主要な養殖集団として4集団を用いた。天然集団の個体数は各集団48個体程度とし、養殖集団は各24個体程度を用いた。

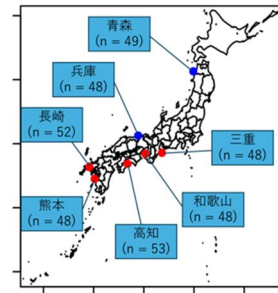


図1. 逸出調査を行ったサンプリング地点

まず、遺伝的多様性指数を用いて各集団を評価したところ、ヘテロ接合体率と近交係数においては天然集団では顕著な違いは見られなかった。一方、養殖集団においては近交係数が大きくマイナスに傾いていた。これはマイナーアレルが消失し、アレルの固定が起こっていることに起因するものと予想された。また、Analysis of Molecular Variance (AMOVA) 解析を行ったところ、天然集団間の遺伝分散は4%であったが、養殖集団間においては14%と高い値を示した。一方、同一集団内での個体間の遺伝分散は、天然集団では24%と高い値を示したが、養殖集団では8%と天然集団の1/3の値に減少した。このことは、異なる地点で漁獲されたマダイの遺伝的集団構造の均一性と、遺伝的多様性の高さを表していると考えられた一方で、養殖集団においては同一集団の遺伝的均一性と集団間の遺伝的異質性を表すものであった。ペアワイズ  $F_{st}$  解析を行ったところ、天然集団間の  $F_{st}$  値は0.009~0.068と小~中程度の遺伝的分化が認められたが、養殖集団間の  $F_{st}$  値は0.056~0.258と中~高程度の遺伝的分化が認められた。天然集団では長崎県と高知県の2集団で高い  $F_{st}$  値を示した。

次に、STRUCTURE と DAPC 法 (adegenet package) を用いて集団遺伝構造解析を実施した。STRUCTURE 解析により  $K$  を求めたところ  $K=2$  が最大値となった。また、 $\ln P(K)$  の値を指標とすると  $K=3$  で同値は頭打ちとなり、 $K=4$  が最大値となった。この結果を踏まえ、集団数は  $K=2\sim 4$  の間にあると考えて集団構造を示した（図2）。 $K=2$  とした場合、天然と養殖を分けることができたが、韓国に由来するとされる養殖集団は天然集団に含まれた。

$K=3$  の場合は韓国集団が異なるクラスターとされ、 $K=4$  でも同様の結果となった。DAPC 解析においては  $K=5$  で最も低い BIC 値を取り、天然集団、韓国、養殖1、養殖2&4、養殖3の5集団が異なる集団であると仮定された。

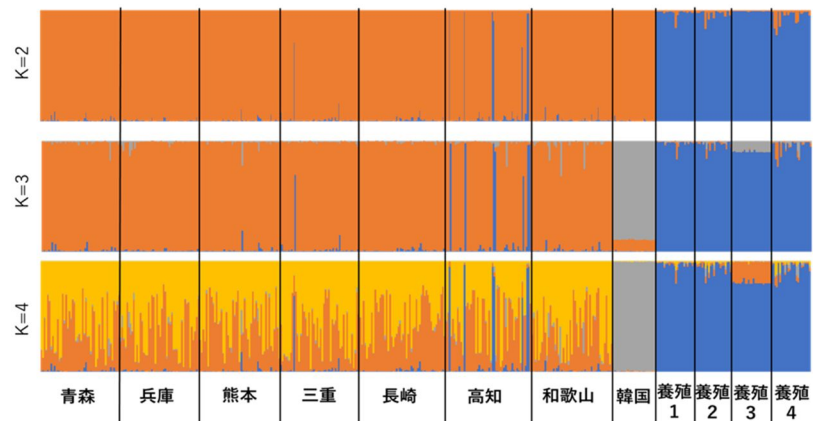


図2. STRUCTUREによる集団遺伝構造解析の結果

DAPC 解析では養殖集団を大まかに分離することができたので、DAPC の結果を用いてアサイメント解析を実施した。その結果、三重集団で1個体、高知集団で7個体が養殖魚と判別され、さらにこれらは養殖2&4の集団に由来することが明らかとなった（表1）。また、交雑個体と思われる個体も散見された。

表1. 本研究で解析した天然集団と養殖集団のアサメントテストの結果

クラスター	青森	兵庫	熊本	三重	長崎	高知	和歌山	韓国	養殖1	養殖2	養殖3	養殖4
A	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0
B	49	48	48	47	52	46	48	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	22	3	0	0
E	0	0	0	1	0	7	0	0	1	20	0	24

以上の結果から、国内の一部養殖産地では養殖個体が逸出していることが確認され、特に閉鎖性の高い海域においては高頻度で逸出が見られることが確認された。今回は劣性有害遺伝子のアレル頻度については予算の都合上求めることはできなかったが、今後は、養殖個体が天然個体と交雑することによってどのような影響を受けるのか劣性有害遺伝子マーカーやメタゲノム解析等を通して研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sawayama Eitaro, Tanizawa Shiho, Nakayama Kei, Ito Risa, Akase Yuri, Kitamura Shin-Ichi	4. 巻 552
2. 論文標題 Major histocompatibility II diversity and peptide-binding groove properties associated with red sea bream iridovirus resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 738038 ~ 738038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2022.738038	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 Sawayama Eitaro, Handa Yoshihiro, Nakano Koichiro, Noguchi Daiki, Takagi Motohiro, Akiba Yosuke, Sanada Shuwa, Yoshizaki Goro, Usui Hayato, Kawamoto Kenta, Suzuki Miwa, Asahina Kiyoshi	4. 巻 127
2. 論文標題 Identification of the causative gene of a transparent phenotype of juvenile red sea bream <i>Pagrus major</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 167 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41437-021-00448-3	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 Sawayama Eitaro, Kobayashi Wataru, Nakao Hironori, Yamada Yuuki, Takagi Motohiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Polymorphisms of growth and immune related genes in cultured red sea bream <i>Pagrus major</i> identified by gene related DNA markers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Ichthyology	6. 最初と最後の頁 410 ~ 416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jai.14184	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤山英太郎・田内哲平・山崎藤子・藤原成晴・高木基裕
2. 発表標題 マダイの系統識別を目的とした一塩基多型パネルの開発
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原成晴・田内哲平・山崎藤子・高木基裕・澤山英太郎
2. 発表標題 日本近海に生息するマダイの集団遺伝構造
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤山英太郎・半田佳宏・勝又啓史・中野江一郎
2. 発表標題 ゲノムワイド塩基多型を用いた養殖マダイの集団遺伝学的評価
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小柳 雅・村岡 和・高木基裕・澤山英太郎
2. 発表標題 瀬戸内しまなみ地域に生息するメダカの遺伝的評価と管理単位の特典
3. 学会等名 日本魚類学会大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	高木 基裕  (TAKAGI Motohiro)  (70335892)	愛媛大学・南予水産研究センター・教授    (16301)	

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
---------	---------