

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12614

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20592

研究課題名（和文）代理親魚を用いた隠れた優良養殖対象魚の発掘

研究課題名（英文）Exploring the novel aquacultured fish using the surrogate broodstock

研究代表者

森田 哲朗（Tetsuro, Morita）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：10833684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、美味でありながら未利用である種が多く存在するアジ科魚において、代理親魚技法を利用して養殖魚種としての開発を試みた。

2021年度、養殖未利用のアジ科魚11種を収集、生殖細胞を凍結した。このうちムロアジの細胞をマアジ宿主に移植した。2022年度まで生残した宿主5尾のうち2尾が精子を生産したため、マイクロサテライト（MS）解析に供した結果、1尾がムロアジドナー由来の精子を生産していた。そこで、この精子を野生型マアジ卵と受精させた結果、約900個体の仔魚が得られ、MS解析によってムロアジの子孫であることが分かった。すなわち、マアジを代理親として未利用魚種の配偶子を生産することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の養殖業において、養殖魚種の多様化が重要な課題である一方、養殖に全く利用されていない美味しい魚種が多数存在する。これまで養殖に用いられてきた魚類は、親魚や種苗の確保が容易な種に限られ、そうでない場合はどんなに美味しい魚種であっても養殖利用することは難しかった。本研究ではこれを解決するため、未利用種の生殖細胞を飼育が容易な近縁宿主魚に移植し、ドナー種の卵や精子を量産するシステムの確立を最終目標とする。これが成功すれば、我が国近海に存在する4,000を超える種全てが潜在的な新規養殖魚候補という、革新的な養殖魚開発手法の確立に繋がる。我が国水産資源の、効率的かつ持続的な利用に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, I have attempted to develop many tasty but underutilized fish species in the family Carangidae as the novel aquacultured fish species using surrogate parentage techniques.

In the first year (2021), I collected 11 species of the Carangid fishes that had been underutilized in aquaculture and froze their germ cells. Of these, the cells from Amberstripe scad were transplanted into Japanese jack mackerel larvae, and of the five recipients that survived until 2022 summer, two adult fish produced sperm, which were subjected to microsatellite (MS) analyses, and one produced sperm derived from the Amberstripe scad donor. The sperm were then fertilized with wild-type Japanese jack mackerel eggs, resulting in approximately 900 larvae, which were found to be the offspring of the Amberstripe scad by MS analyses. In other words, I succeeded in producing the functional gametes of derived from an underutilized fish species using Japanese jack mackerel as the surrogate broodstock.

研究分野：水圏生産科学

キーワード：代理親魚技法 生殖細胞移植 新規養殖魚開発 新規アジ科養殖魚

1. 研究開始当初の背景

我が国の養殖産業発展に向けた重要な打ち手の一つとして、養殖魚種の多様化が挙げられる。日本の養殖生産はブリ類やマダイなど限られた魚種に大きく依存する状況が続いており、これらの養殖魚は全て、受精卵か天然種苗を安定して確保できる魚種である。例えば、ブリが我が国最大の生産量を誇る養殖魚として確立された要因は、市場において評価が高いことよりもむしろ、「もじゃこ」と呼ばれる天然種苗が安定して入手可能であったことが大きい。言い換えれば、真に美味しい魚や養殖適性（成長、生残率、飼料効率など）が優れた魚であっても、受精卵や種苗の入手が困難である場合は養殖対象として検討すらされないのが現状である。養殖を始めるにはまず、野生の親魚や種苗を、釣りや定置網、巻き網などの漁法で捕らえ、活力の高い状態で水槽や生簀に収容する必要がある。しかしこの過程では、十分な尾数が獲れない、採捕の際の傷で死んでしまう、餌付かない、人為管理下では成熟しないなど、実に多くのハードルが存在する。すなわち現在の養殖魚は、これらのハードルを容易に越えることができた、稀有な魚であるといえる。

ここでもし、これらのハードルを取り除ければ、養殖対象として検討できる魚種が劇的に拡大する。これを可能にする、現在考える唯一の手段が「代理親魚技法」である。本技法は、ドナー魚から採取した生殖細胞を近縁の宿主魚に移植することで、ドナー魚に由来する配偶子生産と種苗の作出を可能にする技術である (Yoshizaki and Yazawa, 2019)。この技法を使うことで、養殖候補種をわずかな尾数でも入手できれば、その生殖細胞を移植された宿主によって候補種の配偶子を生産し、種苗供給が可能になると期待される。

2. 研究の目的

研究代表者は本テーマにおいて、この方法論を実証するターゲットとしてアジ科魚類に着目した。アジ科はブリ類やコバンアジ類など世界的に養殖実績のある種を含む一方、世界で 150 種、我が国で 60 種以上が知られ、その多くが養殖未利用である。またアジ科には美味とされる種も多く、隠れた優良種がいる可能性が高い。これらアジ科魚の受精卵を生産する宿主として、「小型・入手が容易・人為採卵が可能」などの有用な特徴を備えるマアジが挙げられる。研究代表者は、マアジを宿主とした代理親魚技法により、ブリの機能的精子を生産することに成功している (Morita et al., 2015)。アジ科の中では遺伝的に遠いブリの精子を生産できたことは、マアジが広範なアジ科魚の宿主として適用できる可能性を示唆しているが、実際にマアジ宿主がどこまで汎用性を示せるかは未知数である。ここで、日本のアジ科魚類においてマアジは唯一のマアジ属魚類であり、他のどのアジ科魚類をドナーとして選択した場合もマアジとは異属の魚となる。代理親魚技法においては、ドナーと宿主が異属間である場合、同属間と比較して配偶子生産の難易度が高いことが分かっている。そこで研究代表者は、マアジ宿主が、自らの内分泌系や生殖腺体細胞系を駆使して、異属であるアジ科ドナー魚種の卵や精子を生産することが出来るのかを明らかにし、実際に養殖未利用であるドナー種の配偶子を量産することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 養殖未利用のアジ科魚類およびその生殖細胞の収集を行う。千葉県や鹿児島県の定置網漁業者から候補魚種を調達する。周年を通じて、漁業者から候補魚種を購入する体制が整っており、魚を入手後は速やかに生殖細胞を採取し凍結保存する。

(2) マアジ宿主への生殖細胞移植条件の最適化を実施する。代理親魚技法においては、ドナー種の生殖細胞を移植する際の宿主の発生ステージの違いが、移植効率を大きく左右する。マアジ宿主においてはこの点が未検討のため、移植に最適なマアジ発生ステージの特定を実施する。

(3) 養殖未利用のアジ科魚類の生殖細胞を移植し、これら生殖細胞を保持したマアジ宿主を作出する。

4. 研究成果

(1) 養殖未利用のアジ科魚類 11 種を収集し (表 1)、その生殖細胞の凍結を行った。東京海洋大学の館山ステーション (千葉県館山市) 地先の定置網に入ったものであったが、一部は鹿児島県南さつま市の定置網漁業者より入手した。入手した魚はその日のうちに生殖腺を取り出し、凍結保護剤として DMSO とトレハロースを添加した培養液に浸漬

表1. 生殖腺のサンプリングおよび凍結保存を実施したアジ科魚類のリスト

和名	属名	学名	採取場所
アイブリ	アイブリ属	<i>Seriolina nigrofasciata</i>	千葉県館山市
オキアジ	オキアジ属	<i>Uraspis helvola</i>	千葉県館山市
ツムブリ	ツムブリ属	<i>Elagatis bipinnulata</i>	千葉県館山市
ブリモドキ	ブリモドキ属	<i>Naucrates ductor</i>	千葉県館山市
ヒレナガカンパチ	ブリ属	<i>Seriola rivoliana</i>	千葉県館山市
アカアジ	ムロアジ属	<i>Decapterus akaadsi</i>	千葉県館山市
オアカムロ	ムロアジ属	<i>Decapterus tabl</i>	千葉県館山市
マルアジ	ムロアジ属	<i>Decapterus akaadsi</i>	千葉県館山市
ムロアジ	ムロアジ属	<i>Decapterus muroadsi</i>	千葉県館山市
イトヒキアジ	イトヒキアジ属	<i>Alectis ciliaris</i>	鹿児島県南さつま市
リュウキュウヨロイアジ	クボアジ属	<i>Carangoides hedlandensis</i>	鹿児島県南さつま市

し、液体窒素中で凍結した。これらのうち、ムロアジについては複数の個体が入手できたため、凍結した生殖腺の一部を解凍し、生殖細胞が生きていることを確認した。また、回収したムロアジ生殖細胞を用いたマアジ宿主への移植実験を実施した（下記（3）参照）。

(2) ムロアジ生殖細胞のマアジ宿主への移植に先立ち、最も移植効率の高いマアジ発生ステージを探索した。すなわち、7日齢、10日齢および13日齢のマアジ仔魚の腹腔内に分散した生殖細胞の移植実験を行った。この際、生殖細胞を赤色蛍光色素 PKH26 で染色することにより、蛍光顕微鏡下でドナー細胞のみを赤く光る細胞として検出することが可能である。

移植から20日経過した後に、マアジ宿主の生殖腺を剥離し蛍光顕微鏡下で観察した結果、全ての生殖腺において PKH26 陽性細胞、すなわちドナー由来生殖細胞の生着が確認された（図1）。各日齢の仔魚を宿主とした場合の移植20日後の生残率はそれぞれ、7日齢が5%、10日齢が7%、そして13日齢が18%であった。どの日齢においてもドナー生殖細胞の生着率が100%だったことから、生残率が最も高い13日齢が宿主として優れていると結論した。ただし、13日齢以降に移植した場合はより生残が高いことが予想され、何日齢まで高い生着効率が維持されるのかを検証する必要がある。

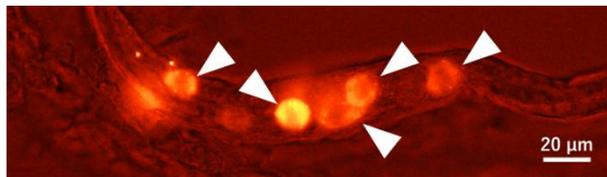


図1. マアジ宿主生殖腺に取り込まれたPKH26陽性細胞（白い矢じり）。

(3) 2021年5月に、凍結解凍後に生残が求められたムロアジ生殖細胞をマアジ宿主13日齢に移植した。この際、マアジ宿主としては不妊となることが予想される3倍体を用いた。240尾のマアジ宿主に移植を実施したが、移植20日後に生残した稚魚は12尾のみであった（生残率5%）。これは、用いたマアジ卵の質が低かったことが影響したと考えているが、生残尾数が少なかったために（2）で実施した移植細胞の生着確認は実施せず、全ての生残個体の飼育を継続した。



図2. 宿主精子とマアジ卵の交配で作出された仔魚。

2022年6月までに5尾の宿主が生残したため、成熟状況を確認したところ2尾のオスが排精していることが確認された。このため、この2尾の宿主のヒレ、および精子からゲノムDNAを抽出し、3座のマイクロサテライト（MS）についてDNA多型を確認した。その結果、1尾の宿主については精子とヒレより抽出されたDNAにおけるMS配列の分子量が完全に異なっており、精子とヒレの細胞が別個体由来である、つまり精子がムロアジドナー由来であることが強く示唆された。

さらに、この精子を用いて野生型のマアジ卵との受精実験に供した結果、4%と低い孵化率であったものの約900個体の仔魚が孵化した（図2）。その多くが形態的に異常であり、孵化後3日までに大部分が斃死した。この際にサンプリングした仔魚100個体のうち14個体について、ゲノムDNAを抽出し、上述のMS解析に供した。その結果、全ての仔魚がマアジ宿主ではなく、ムロアジ特異的なアリルを有しており（図3）、ドナー由来の仔魚が誕生したこと、またマアジ宿主がドナー由来の機能的な精子を生産したことが強く示唆された。

一方、得られた仔魚の多くが形態的に異常であり、マアジ宿主が生産した精子が正常であるのかを検証する必要がある。今後、残りの宿主の成熟を待ち、ドナー由来の卵を作ることが出来れば、宿主の精子と卵から、完全にドナー由来のムロアジが誕生すると期待される。この次世代が正常か否かを検証する。また、（1）において凍結保存した他のアジ科魚類の生殖細胞についてもマアジ宿主への移植を行い、機能的な配偶子の生産、および個体の復元を試みる。

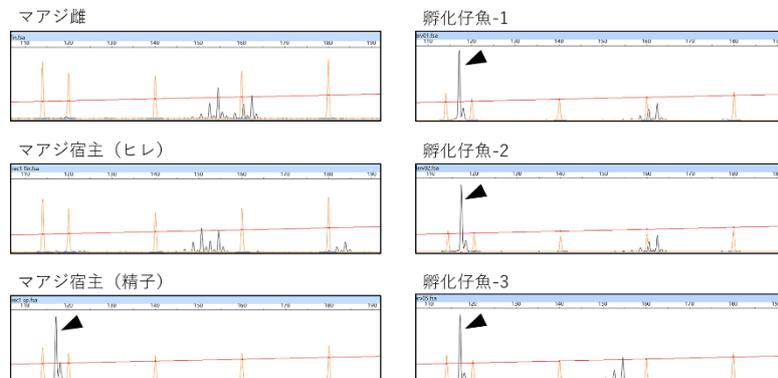


図3. マアジ宿主が生産した精子を用いた交配実験：仔魚のマイクロサテライト解析。黒い矢じりはムロアジ特異的なアリルを示す。

引用文献

Morita T. et al., 2015, Marine Biotechnology, 17, 644-654.
Yoshizaki G. and Yazawa R., 2019, Fisheries Science, 85, 429-437.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

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 -

〔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 川村亘、神尾茂治、市田健介、矢澤良輔、森田哲朗、吉崎悟朗
2. 発表標題 小型代理親魚が生産したドナー由来クロマグロ精子の濃縮法
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢萩はな、川村亘、矢澤良輔、森田哲朗、吉崎悟朗
2. 発表標題 マサバにおけるゼロ歳魚成熟誘導法の開発 ~ 受精期の環境維持による早熟誘導 ~
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢萩はな、川村亘、矢澤良輔、森田哲朗、吉崎悟朗
2. 発表標題 アンドロゲンの徐放的投与による ゼロ歳魚成熟マサバ精子生産の高効率化
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村亘、天野雄一、矢澤良輔、森田哲朗、吉崎悟朗
2. 発表標題 スマ雑種宿主が生産したドナー由来クロマグロ精子は生殖幹細胞に由来するか？
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022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