

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580251

研究課題名(和文) 脊椎動物唯一の自家受精魚を利用した新しい水産育種モデルの開発

研究課題名(英文) A new aquaculture model based on the self-fertilizing fish

研究代表者

金森 章 (Kanamori, Akira)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40324389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マングローブ・キリフィッシュ *Kryptolebias marmoratus* (以下Km) を魚類育種の新規モデルとして提唱した。Km は自家受精で殖える唯一の脊椎動物であり、各系統は自然の近交系である。そこでKm 雑種より迅速な複数系統の樹立をおこなった。これらを用い次世代シーケンサーによるRAD sequencingの結果の解析を進め、高密度マーカーを持つ遺伝連鎖地図が完成した。総計9,214マーカーが24の連鎖群にマップされ、遺伝距離の総計は1,249cMであった。今後の育種におけるRAD sequencingの有用性が明らかになったと言える。

研究成果の概要(英文)：We proposed a mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*, Km) as a new model for aquaculture. Km is the only vertebrate species known to reproduce by self-fertilization and therefore, each strain is a natural inbred strain. We established hybrid inbred lines between two genetically distant Km strains. A genetic map was constructed by RAD sequencing of the F2 individuals. 9,224 polymorphic RAD-tags (DNA markers) were mapped to 24 linkage groups. The total length of the map was 1,249 cM. The results demonstrate utilities of RAD sequencing on aquaculture.

研究分野：生殖生物学

キーワード：自家受精魚 水産育種 RAD-tag 連鎖地図 人工受精

## 1. 研究開始当初の背景

我が国で海産魚類の種苗生産技術開発が始まって約50年が経過し、マダイ、ヒラメ、トラフグをはじめとする水産重要種の完全養殖が達成され、これらの技術はクロマグロなどへと展開されている。海産魚の養殖はこれまで大量・安定生産に主眼が置かれてきたが、近年の食の安全・安心に対する意識の高まりとともに、海産養殖魚でも由来が明らかで、かつ高成長や耐病性といった経済形質の確立された形質改良への要求が高まっている。その一方で、全国で養殖魚のブランド化の推進がなされているが、これらのブランド魚は必ずしも形質の固定されていない魚に地域ごとに名称を与えているために、ブランド乱発の状況に陥っているといえる。したがって、農業や畜産の分野に後れをとってきた海産魚の育種研究は急務となっている。海産魚の育種は、選抜育種を通して有用形質の固定を近交化することで行われてきたが、最近になって優良形質を識別する遺伝マーカーにより量的形質遺伝子座(QTL)解析による分子育種技術開発が興った。ところが、一般的な海産魚は世代時間が2年以上あるために優良選抜家系が確立された事例はごく少ない上、さらに優良形質の固定と維持には大規模な飼育設備とコストを要するといった問題点がある。また、マイクロサテライトマーカーによるQTL解析が進められているが、有用形質に関わる機能性遺伝子の塩基配列に基づく解析といったより汎用性の高い簡便な技法開発は海産魚ではまだ着手されていないのが現状である。

このような背景を受けて、我々はモデル魚種としてマングローブ・キリフィッシュ

(*Kryptolebias marmoratus*, 以下Km)に注目した。本種は機能的雌雄同体性の小型海産魚で、脊椎動物中で唯一自家受精する生物である。体内受精によって周年産卵し、世代時間が4ヶ月程度であるため、年間3世代に亘る飼育履歴の把握が出来る。既に分担者は、成

長・産卵数等の形質の異なるクローン系統を2株確立するとともに(Grageda et al.2005 Env. Biol. Fish.)、これらのクローンの交雑株を1個体作出し、交雑第二世代以降の遺伝様式と形質の推移を詳らかにしてきた(Nakamura et al. 2008 Can. J. Zool.)。本種の家系を用いて特に成長に注目した育種モデル系を確立し、CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)マーカーを用いた簡便でより汎用性の高い遺伝子マーカーの開発を第一の目的とする。このような汎用性マーカーを、最終的には長崎県において養殖技術開発の進んだトラフグ、新規養殖種として開発の進んでいるクロマグロ、中国などの東南アジア向けの市場開拓も視野に入ったハタ類(マハタ、クエなど)といった有用養殖魚種の現場で、有用形質を持つ個体のサンプリングと、それらにCAPSマーカー解析を実施することで、選抜育種マーカーとして世界に先駆けた解析に供することを目標とする。

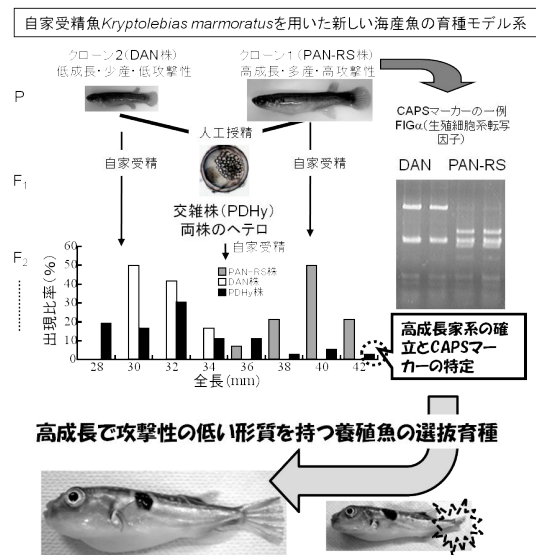
## 2. 研究の目的

まず Km で新たな海産魚育種モデル系を確立し、新たな汎用性QTLマーカーを開発するために、次の2項目について実験・調査を進める。1) 既に確立されている形質の異なる2系統と、その雑種ヘテロ個体由来の個体を10世代以上個別飼育し、全個体の形質の遺伝様式を明らかにし、高成長かつ攻撃性の低い家系、すなわち養殖に適した形質を持つ家系を確立する。2) 両親と交雑株由来の家系から、成長および攻撃行動に関わる遺伝子マーカーを検索するために機能遺伝子由来のCAPSマーカーを開発し、QTL解析を実施する。得られた結果を総合し、海産魚の新たな育種実験系と汎用性QTLマーカーを確立する。次に、上記の成果をもとに、長崎県においてブリ、マダイに続く養殖魚種として飼育技術の開発の進められているトラフグ、クロマグロ、ハタ類について、CAPSマーカーセットがどの程度汎用

性を示すか検討し、さらに選抜育種に供する基礎知見とする。

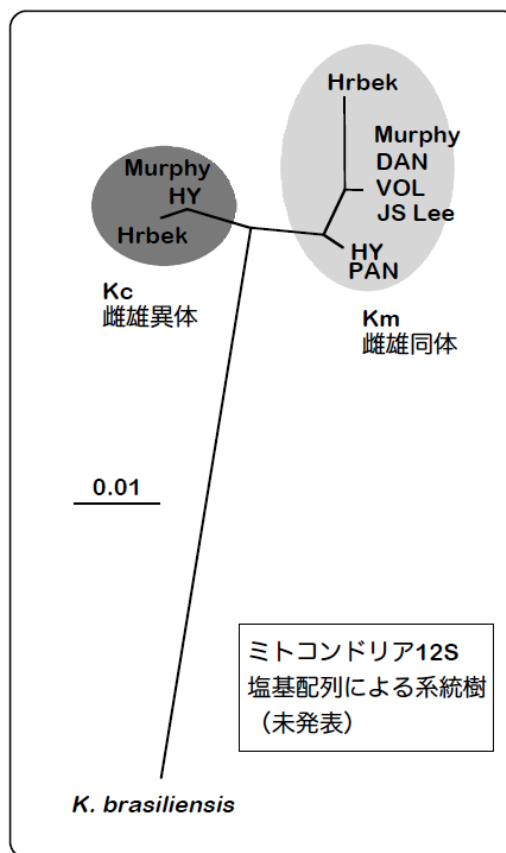
### 3. 研究の方法

(1) Km 系統内で離れた2つより(下図参照)、体外受精によりF1を作成した。両親株は孵化



時の体サイズは同等であるが、その後成魚に至るまでの成長はPAN-RSの方がDANより常に高い。現在得られている交雑株(PDHy)由来のF2世代は、両親株に対して遺伝的にヘテロであり、上図に示したとおり両親株の体調組成双方を網羅するとともに、一部には両親株より大きい又は逆に小さい個体が出現している。これらの交雑株から自家受精によって得られる次世代の生活史特性値(成魚までの成長, 外部形態, 基礎代謝量, 成熟日齢, 生涯産卵数, 攻撃行動)を個体別に追跡し、第5世代までの情報を蓄積し、高成長などの経済形質に特化した家系及びピランダムに選んだ家系の作出を行う。

(2) 遺伝地図の作成 - すでに4つのKm 系統のDNA 解析よりイントロン300bp につきおよそ1個のSNP が予想される(次ページ図参照)。卵精巢のEST を次世代シーケンシングによりすでに構築した。生殖巣での発現が知られている遺伝子は網羅されていることは確認した。これより、メダカの24本の染色体それぞれ



れの全体をカバーするよう総数で200程度、メダカで単一の1.5kbほどのイントロンを増幅するようにプライマー対を設計した。このとき、さらにメダカ、トゲウオ、二種のフグのゲノム配列も参考にして、なるべく多くの魚種で汎用性が高くなるように設計した。2つのKm親系統のDNAより増幅を試みる。増幅産物の塩基配列を決定し一塩基多型を同定する。得られた一塩基多型よりCAPS(cleaved amplified polymorphic sequences) もしくはdCAPS(derived cleaved amplified polymorphic sequences) マーカーを設計し、総計100 程度の使用できるマーカーを確立する。つぎに(1)で得られる家系(主にF2)を用いて、実際の遺伝地図作製をおこなう。魚類の染色体の保存のよさ、およびメダカ(Belontiiformes) とKm (Cyprinodontiformes) の近縁性より、おそらくおおまかな地図はメダカのも的一致することが期待される。以下これまでのマーカー間に新しく同様なイントロンマーカーを作成し、メダカとの比較マ

マップを作成する。次に、成長に連鎖するマーカー群を同定する。さらにこれらのDNAマーカーを、ヒラメやマダイ等の現在育種がある程度進んでいる養殖魚家系に対して適用し、その汎用性を判別する。

#### 4. 研究成果

(1) 順調に系統の樹立及び各世代の生活史特性値の取得が続いている。現在F10を越え、これらのデータ及び各個体のDNAは近い将来、容易には得難い材料となることはまちがいない。

(2) プライマー対の設計と各Km親系統のPCR増幅が終了し、CAPS設計を行なう段階で、新規技術RAD-seqに切り替えることを決断した。

(1)のF2 DNAを用い高密度マーカーを持つ遺伝連鎖地図が完成した。総計9214マーカーが24の連鎖群にマップされ、遺伝距離の総計は1249cMであった。(右図参照)。今後の水産育種におけるRAD-seqの有用性が明らかになったと言える。今後は有用魚種それぞれでのRAD-seqにより養殖家系の選抜が簡便に行なわれるようになるだろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kanamori, A., and Toyama, K. (2013)  
A transgenic medaka line with visible markers for genotypic and phenotypic sex. Environmental Science and Technology 47: 6640-5 (10.1021/es400264q). (査読有)

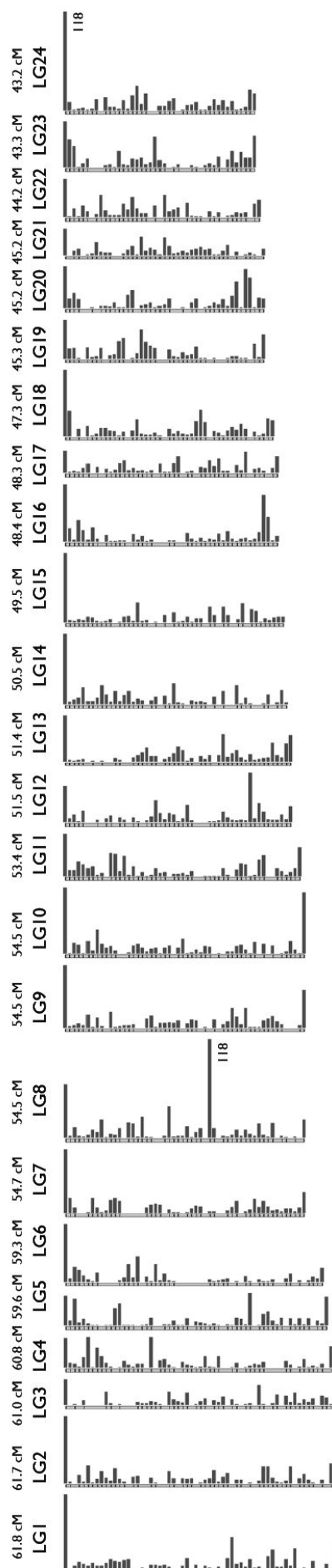
[学会発表](計9件)

金森 章・湯浅恭史

雌雄同体魚 *Kryptolebias marmoratus* の卵精巢形成機構をどうやって理解するか?

シンポジウム「沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用」(招待講演)

Kmの連鎖地図: 横棒は同じ遺伝子座にマップされたマーカー数



2011年12月9日

海洋博覧会記念公園管理財団 総合研究センター

堀恭子・倉掛敦子・菅向志郎・金森章・萩原篤志・阪倉良孝

マングローブ・キリフィッシュの交雑株の世代間比較

平成23年度日本水産学会秋季大会

2011年9月29日

長崎大学

湯浅 恭史・金森 章

雌雄同体魚 (*Kryptolebias marmoratus*) の

ゴナドトロピン受容体の発現

日本動物学会 第82回大会

2011年9月22日

旭川クリスタルホール

Yasufumi Yuasa and Akira Kanamori

EXPRESSION OF GONADOTROPIN RECEPTOR GENES IN THE SELF-FERTILIZING

HERMAPHRODITE FISH, *Kryptolebias marmoratus*.

SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF VERTEBRATE SEX DIFFERENTIATION

2012年04月23日 ~ 2012年04月27日

Kona Beach Hotel, Hawaii, USA

Hori, K., Kurakake, A., Suga, K., Kanamori, A., Hagiwara, A. & Sakakura Y.

Comparison of characteristics between generations of hybrid strain in the self-fertilizing mangrove killifish.

10th Japan-Korea, Korea- Japan Joint Symposium on Aquaculture

2012年12月08日 ~ 2012年12月09日

長崎大学

Sakakura, Y., Suga, K., Kanamori, A.,

Hagiwara, A. The self-fertilizing mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* as a model fish for aquacultural study. Larvi 2013 symposium, September 2-5, 2013, Gent, Belgium.

金森 章・湯浅恭史・杉田洋輔

自家受精魚 *Kryptolebias marmoratus* ゴナドトロピン受容体の発現解析

第38回日本比較内分泌学会大会

2013年10月24日 ~ 2013年10月26日

宮崎市民プラザ

金森 章

雌雄同体魚の卵精巣ができるしくみ(難しい)に どうアプローチするか?

水産増殖シンポジウム2014函館 水産増殖を支える基礎生物学(招待講演)

2014年07月04日

函館市国際水産・海洋総合研究センター

Akira Kanamori, Yosuke Sugita, Yasufumi Yuasa, Takamasa Suzuki, Kouichi Kawamura, Yoshinobu Uno, Katsuyasu Kamimura, Yoichi Matsuda, Catherine A. Wilson, Angel Amores, John H. Postlethwait, Koushirou Suga, and Yoshitaka Sakakura

CONSTRUCTION OF A GENETIC MAP FROM SELF-FERTILIZING HERMAPHRODITE FISH, *Kryptolebias marmoratus*, BY ARTIFICIAL FERTILIZATION AND RAD SEQUENCING

Seventh International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination 2015年04月13日 ~ 2015年04月17日

King Kamehameha Hotel, Kona, Hawaii, USA

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金森 章 (AKIRA KANAMORI)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：40324389

### (2)研究分担者

阪倉 良孝 (YOSHITAKA SAKAKURA)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：20325682

### (3)連携研究者

菅 向志郎 (KOUSHIROU SUGA)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：60569185