

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450261

研究課題名(和文)機能遺伝子マーカーによるマダイ養殖が天然集団に与える遺伝的影響の評価

研究課題名(英文)Evaluation of the genetic influence of red sea bream culture to the wild population using functional gene markers

研究代表者

高木 基裕 (Takagi, Motohiro)

愛媛大学・南予水産研究センター・准教授

研究者番号：70335892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マダイ養殖は沿岸域に海面網生け簀を設置して行われているため、自然災害による生け簀網の損壊や生け簀内での産卵等により、養殖マダイが自然界に加入していることが、懸念される。本研究では、マダイ養殖が天然集団に及ぼす遺伝的影響を機能性DNAマーカーおよび中立性DNAマーカーにより養殖由来の個体の混入率を推定し、明らかにすることを目的とした。機能性DNAマーカーでは、天然集団におけるマダイ養殖の遺伝的影響について調べる研究には適さなかったが、中立性DNAマーカーでは、養殖が盛んな宇和島海域において多くの養殖マダイの存在が明らかになり、遺伝的攪乱の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Because the red sea bream aquaculture installs a netcage in the coastal zone and is performed, it is concerned about escapee from netcage to the natural environment. In this study, I estimated a mixture rate of the individual escaped from netcage that red sea bream culture gave to the wild population using a functionality DNA marker and a neutrality DNA marker and was intended that I clarified it. With the functional DNA marker, it was not suitable for a study to check genetic influence of the red sea bream culture in the wild population, but the existence of the much cultured red sea bream became clear in the Uwajima sea area where netcage culture using prosperous with the neutrality DNA marker, and possibility of the genetic disturbance was shown.

研究分野：水産一般

キーワード：機能遺伝子マーカー マダイ養殖 天然集団 遺伝的影響

### 1. 研究開始当初の背景

(1) マダイ養殖は、半世紀以上にわたり有用形質の遺伝的改良を目標に選抜育種などの人為的選択が行われてきた。その結果、天然集団と比べて成長が早い、病気に強い (Murata et al., 1996) などの優れた経済形質を持っている。その一方で、天然集団と比べて遺伝的多様性が低下しており、遺伝的均質化が進んでいる (Takagi et al., 1996, 穴道ら 2008, Taniguchi, 2010)。このように遺伝的に改良された個体が大量に生産され実用化するなかで、事故や災害による養殖魚の逃亡および養殖魚や種苗生産用親魚のいけす内での産卵 (Blanco-Gonzalez et al., 2011) による養殖魚の天然集団への加入が懸念されている。人工種苗が天然集団に与える影響を評価するにあたって、天然集団における人工種苗個体の混入率を正確に把握することが重要な課題となる (穴道ら 2008)。

(2) これまでマダイの天然集団における人工種苗個体の判別には、鼻孔隔壁 (後藤ら 1986) の有無、胸鰭軟条数 (丸山 1986) および体高の高さ、眼径の大きさ (横川ら 1988, Taniguchi et al, 1997) などの天然個体と人工種苗の形態形質の違いを利用し行われてきた (穴道ら 2008)。しかし、これらの方法では形態異常個体の出現率が種苗生産施設や生産年度によって大きく変動し、こうした形態的特徴をもたない人工種苗は天然個体と判別されてしまうため、正確なデータを得ることは困難である (穴道ら 2008)。また、天然集団から人工種苗個体を判別できた場合でも、それが放流由来なのか養殖由来なのか判別することはこれまで不可能であった。

### 2. 研究の目的

(1) 近年の高感度 DNA マーカーの開発と数理モデルの発展によって、個体の複数遺伝子座の遺伝子型の情報に基づくアサイメントテストを用いることで、遺伝情報に基づき天然集団から放流魚および養殖魚を判別することが可能となった (Pritchard et al., 2000)。しかし、保全遺伝学の分野では、天然集団について、中立的な DNA マーカーだけではなく、成長や形質形成に関する機能的な DNA マーカーについても調べることが推奨されている (Edward & Potts 1996) が、機能的な DNA マーカーを用いてマダイ養殖が天然集団に与える遺伝的影響の研究例はなく、実態は不明である。

(2) 本研究では、マダイ用に開発された中立性 DNA マーカー、成長形質関連遺伝子マーカーを用いて、養殖が盛んな海域の天然マダイ集団における養殖由来個体の混入率を推測し、マダイ養殖が天然マダイ集団に及ぼす遺伝的影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 供試魚のマダイは、マダイ養殖が盛んな愛媛県宇和島海域でまき網を用いて漁獲した個体 (以下 まき網)、カゴ網を用いて漁獲した個体 (以下 カゴ網)、釣獲した個体 (以下 釣獲)、養殖は盛んではない愛媛県北部の瀬戸内海域で刺網または底引き網を用いて漁獲した個体 (以下 岩城) および愛媛県西条市沿岸でまき網を用いて漁獲した個体 (以下 西条) を用いた。また、由来判別の基準には 3 系統の養殖マダイを用いた。

(2) DNA は胸鰭から抽出した。抽出 DNA は、1.5 ml マイクロチューブに回収、以降の実験に用いるまで 4℃ で保存した。マイクロサテライト DNA 解析には、マダイ用に開発されている中立性 DNA マーカー 7 遺伝子座と新たに開発した成長形質関連遺伝子マーカー 8 遺伝子座を増幅してアレルを検出して使用した。

(3) 各遺伝子座の機能性の判定は、BayeScan 2.01 (Foll & Gaggiotti, 2008) ソフトウェアを用いて行った。また、個体のアレル型に基づく養殖マダイと天然マダイの判定は、STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) ソフトウェアを用いて行なった。解析には機能性マイクロサテライト 3 遺伝子座と中立性 12 遺伝子座の遺伝子型を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 遺伝子座の機能性解析結果を図 1 に示した。False discovery rate (FDR)=0.05 で右側に位置した PmaSL (Somatolactin)、Pma4-32NCL (Hatanaka et al., 2006)、Pma4 (Takagi et al., 1997) の 3 種が機能的な遺伝子座と判定され、残りの 12 種は中立的な遺伝子座と判定した。

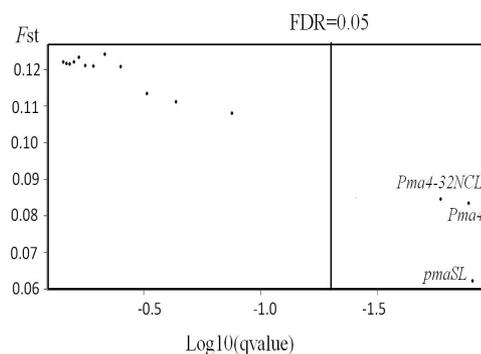


図1 BayeScanを用いた遺伝子座機能性解析

(2) STRUCTURE を用いて、機能的 3 遺伝子座で各個体の遺伝子型に基づき分集団数を推定した結果、 $K = 2$  で最も高い  $K$  が得られたため、最適な分集団数は 2 集団であった (図 2)。岩城で 91 個体が分集団 1、9 個体が分集団 2 に、西条で 38 個体が分集団 1、8 個体が分集団 2 に帰属した。また、放流種苗は全て分集団 2 に、養殖種苗 A で 1 個体が分集団 1、28 個体が分集団 2 に、養殖種苗 B で

1 個体が分集団 1、39 個体が分集団 2 に、養殖種苗 C で 3 個体が分集団 1、26 個体が分集団 2 に帰属した。宇和島海域で漁獲した個体群は 84 個体が分集団 1、51 個体が分集団 2 に帰属した。漁獲方法別にみると、まき網で 20 個体が分集団 1、8 個体が分集団 2 に、カゴで 51 個体が分集団 1、28 個体が分集団 2 に、釣獲で 13 個体が分集団 1、15 個体が分集団 2 にそれぞれ帰属し、漁獲方法によって結果が異なった。

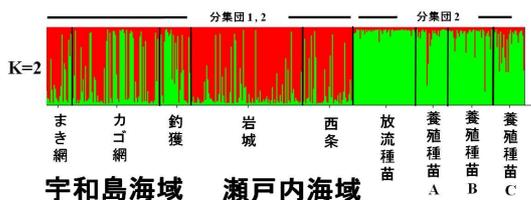


図 2 機能的遺伝子座によるアサインメント

(3) 中立的 12 遺伝子座についても最適な分集団数は 2 集団であった (図 3)。岩城と西条の各個体は全個体が分集団 1 に帰属した。また、養殖種苗 C の 1 個体が分集団 1 に帰属したが、それ以外の個体は分集団 2 に帰属した。これらの結果から、分集団 1 を天然集団から構成される天然クラスター、分集団 2 を放流および養殖種苗から構成される人工種苗クラスターと定義した。宇和島海域で漁獲した個体群は 94 個体が天然集団、41 個体が人工種苗に帰属し、2 集団が混在していることがわかった。漁獲方法別にみると、まき網で 27 個体が天然集団、1 個体が人工種苗に、カゴで 54 個体が天然集団、25 個体が人工種苗に、釣獲で 13 個体が天然集団、15 個体が人工種苗にそれぞれ帰属し、漁獲方法によって結果が異なった。

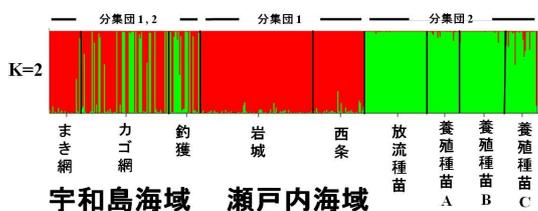


図 3 中立的遺伝子座によるアサインメント

(4) 機能的 3 遺伝子座と中立的 12 遺伝子座の結果が異なる理由として、天然集団において機能的アリルを持つ個体が高頻度に存在するためと考えられ、天然集団におけるマダイ養殖の遺伝的攪乱等を調べる研究には中立的遺伝子座が適しているということが判明した。

(5) 中立的遺伝子座による STRUCTURE 解析の結果 (図 3)、宇和島海域において養殖マダイの逃亡、破棄および生け簀内産卵による

とみられる個体が検出され、天然集団への遺伝的攪乱が示された。また、天然と人工種苗の割合がおおよそ半分ずつの個体が数個体確認されたことから、養殖マダイ由来の個体が再生産に関与していることが示唆された。

<引用文献>

Blanco-Gonzalez E, Aritaki M, Taniguchi N. Genetic interactions between wild and hatchery red sea bream confirmed by microsatellite DNA markers. *The Journal of Animal Genetics* (2011); 39: 16-25.

Hatanaka A, Yamada S. I, Sakamoto T, Mitsuboshi T. Isolation and application of microsatellite DNA markers for pedigree tracing of seedlings of red sea bream (*Pagrus major*). *Journal of the World Aquaculture Society* (2006); 37: 139-143.

Murata O, Harada T, Miyashita S, Izumi K, Maeda S, Kato K, Kumai H. Selective breeding for growth in red sea bream. *Fisheries Science* (1996); 62: 845-849.

Pritchard, J. K, Stephens M, Donnelly P. Inference population structure using multilocus genotype data. *Genetics* (2000); 155: 945-959.

Takagi M, Taniguchi N, Cook D, Doyle R. W. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fisheries Science* (1997); 63: 199-204.

Taniguchi N, Takagi M, Matsumoto S. Genetic evaluation of quantitative and qualitative traits of hatchery stocks for aquaculture in red sea bream. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture. Supplement* (1997); 3: 35-41.

Taniguchi N. Genetic evaluation of hatchery stocks for aquaculture in red sea bream. *Recent Advances in aquaculture Research* (2010); 231-244.

Foll M, Gaggiotti O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* (2008); 180: 977-955.

Edward S. V, potts W. K. Polymorphism of genes in the major histocompatibility complex (MHC): implications for

conservation genetics of vertebrates. In Molecular Genetic Approaches in Conservation T. B. Smith and R. K. Wayne eds. Oxford University Press, New York (1996); 214-237.

宍道 弘敏, 北田 修一, 坂本 崇, 浜崎 活幸. マイクロサテライト DNA による鹿児島湾のマダイ天然魚と放流魚の遺伝的変異性の評価 日本水産学会誌 (2008); 74(2): 183-188.

丸山 敬悟. マダイ稚苗の健全性に関する試験 日裁協年報 (1986); 144-15.

横川 浩治, 谷口 順彦. マダイ養殖用人工種苗と天然種苗の形態的および遺伝的差異 香川県水産試験場研究報告 (1988); 3: 31-41.

#### 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5件)

Eitaro Sawayama, Motohiro Takagi: Evaluation of an RSIVD-resistant trait of red sea bream *Pagrus major* broodstock using DNA-based pedigree tracings: a field study. Fish Pathology, 52, 23-30 (2017) 査読有

Eitaro Sawayama, Motohiro Takagi: Genetic diversity and structure of domesticated strains of red sea bream, *Pagrus major*, inferred from microsatellite DNA markers. Aquaculture research, 47, 379-389 (2016) 査読有

Eitaro Sawayama, Motohiro Takagi: Isolation and characterization of tandem repeat sequences in the growth hormone gene of the red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843). Journal of applied ichthyology, 31, 762-765 (2015) 査読有

Eitaro Sawayama, Motohiro Takagi: Parental contribution and growth hormone gene polymorphism associated with growth phenotypes of red sea bream *Pagrus major* in mass production: a case study. Aquaculture Reports, 2, 144-151 (2015) 査読有

澤山英太郎・高木基裕: マダイ人工種苗で見られた下顎短縮個体の遺伝的解析. 水産増殖, 62, 155-162 (2014) 査読有

[学会発表](計5件)

澤山英太郎・北村真一・仲山 慶・太田耕平・尾崎照遵・高木基裕. マダイの RSIVD 耐性遺伝子座の探索. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 29 日, 東京海洋大学, 東京都港区.

澤山英太郎・野口大毅・高木基裕. AFLP ゲノムスキニングによるマダイの体色透明化個体に特異的な一塩基多型の探索. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月 28 日, 東京海洋大学, 東京都港区.

澤山英太郎・高木基裕. コホート研究によるマダイイリドウイルス耐性親魚の探索. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日, 東京海洋大学, 東京都港区.

中尾浩則・澤山英太郎・南 卓志・高木基裕. 集団遺伝学的手法を用いた養殖産地の天然マダイ集団における遺伝的攪乱の現状評価. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月 30 日, 東京海洋大学, 東京都港区.

澤山英太郎・高木基裕\*. Paired-end ゲノムシーケンスによるマダイのマイクロサテライト DNA マーカー開発, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会 2014 年 9 月 21 日, 九州大学, 福岡県福岡市.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fish-conservation.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高木 基裕 (TAKAGI MOTOHIRO)  
愛媛大学・南予水産研究センター・准教授  
研究者番号: 70335892

##### (2) 連携研究者

南 卓志 (MINIMI TAKASHI)  
福山大学・生命工学部・教授  
研究者番号: 60371887

##### (3) 研究協力者

澤山 英太郎 (SAWAYAMA EITARO)  
(有)まる阿水産・開発課長