

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23687

研究課題名（和文）マダイをモデルとした養殖魚の育種-管理-保全に利用可能な高感度個体識別システム

研究課題名（英文）Development of a novel SNP genotyping system for genetic management of farmed red sea bream

研究代表者

澤山 英太郎（SAWAYAMA, Eitaro）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：70846071

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）：本研究では、養殖マダイ5系統からGRAS-Di解析により一塩基多型（SNP）を取得した。各集団98,047から187,568個のSNPが得られ、欠損率やマイナーアレル頻度、ハーディー-ワインベルグの法則からの逸脱などを指標としたフィルタリングを行い、各集団に共通したSNPを選択したところ、全集団に共通した2,536個のSNPを得ることができた。また、これらの中から、1Mbp以上の間隔をとっているSNPのみを選び、連鎖不平衡の影響が少ない255個のSNPを選び出した。それらSNPについてプライマーを設計し、マルチプレックスPCR系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりマダイの個体識別に用いるSNPパネルを開発することができたが、これにより、従来のマイクロサテライトDNA解析よりも安価かつ迅速に多数のマーカーによる遺伝子型判別が可能になると考えられる。本技術は、親子鑑定や系統識別に用いることが期待される。そのため、養殖現場では有用形質を持った親魚の選抜に威力を発揮することが期待されるとともに、養殖場から逸出した養殖マダイ個体の識別にも利用可能である。

研究成果の概要（英文）：In this study, genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) were obtained from five cultured red sea bream populations by GRAS-Di analysis. We obtained 187,568 to 98,047 SNPs from analysed populations, and selected 2,536 SNPs common to all populations by filtering based on missing rate, minor allele frequency, and deviation from Hardy-Weinberg law. In addition, we selected only SNPs that were more than 1 Mbp apart to avoid linkage disequilibrium, and finally 255 SNPs were selected. We designed primers for amplify these SNPs and developed a multiplex PCR system

研究分野：水産遺伝育種

キーワード：一塩基多型 マダイ 個体識別 次世代シーケンス マルチプレックス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マダイはその美しい姿形から魚の王様とも称され、日本を代表とする海産魚の地位を確立している。また近年では、その味わいの良さから、養殖生産が盛んに行われており、全ての生活史が人工的に完結する完全養殖がなされている。わが国におけるマダイの養殖生産量・額はぶり類に続く第二位であり、養殖魚として無くてはならない存在である。マダイの養殖系統は実に半世紀以上にわたる成長選抜育種 (>10 世代) を経て家魚化され、高成長形質を獲得してきた。また、有用経済形質を有した親魚の探索も試みられ、近年では耐病性形質を付与するための育種も積極的に行われている。このように、先達の知恵と努力により、マダイは海産魚として世界で最も長い育種史を持つ魚種となり、また、その入手のし易さと飼いやすさから、海産魚の実用的モデル魚として利用価値が高い。

その一方で、養殖マダイの系統内交配が進むことにより遺伝的近交化が進み、潜性有害遺伝子が集団内に蓄積・顕在化することで、遺伝的形態異常が生じることが報告されている。また、このような遺伝的改良を受け家魚化された個体が、養殖が盛んに行われている海域で逸出し、天然個体との交雑が起こっていることが示唆されており、養殖個体による遺伝子汚染が実際のものとなっている。これらの先行研究から、マダイの養殖生産を持続的に行い、且つ、天然資源を永続的に利用するためにも、個体識別を正確に行う必要性があり、ゲノムワイド DNA 多型マーカーの開発と多検体を同時かつ簡便に解析できるシステムの構築が求められている。

### 2. 研究の目的

これまで DNA 多型解析には、その多型性の高さや手軽さからマイクロサテライト DNA (MS DNA) が多く用いられてきた。マイクロサテライト DNA は高いヘテロ接合性を示す DNA マーカーであるが、解析機器の性能上、一度に複数の遺伝子座を解析するマルチプレックス化には制限があった。また、解析に使用する機器のモデルによって泳動パターンが僅かに異なることが知られており、バンドサイズの違いを生ずることから、研究者間で得られたデータを比較することが難しく、アリルデータを研究者間で共有することは困難であった。加えて、アリルサイズを決定するためには経験的な知識を必要とすることも多く、技術的な修練が求められる。一方で、一塩基多型 (SNP) は 4 種の塩基 (ATCG) をアリルとするため MS DNA と比べて変異率こそ少ないが、アリルの識別性やジェノタイピングの正確性という点では非常に優れたマーカーである。また、塩基置換を直接的に解析するため、得られた結果はどのような解析機器を用いても同一であり、データの共有が容易である。従来はマルチプレックス化に課題があったが、近年の次世代シーケンズ技術の発展により解決された。そこで本研究では、ベンチトップ小型次世代シーケンサーを用いて一度に数百個体から数百 SNP を同時検出できるハイスループット遺伝子型解析システム (図 1) を開発し、マダイの高感度かつ安価な個体識別を可能にすることで、マダイの育種研究や保全研究に利用可能な解析基盤を整備することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、申請者が作成、改良を続けている高密度 SNP 連鎖地図をベースに構築した染色体情報 (図 2) を用い、複数の養殖マダイ系統を用いたリシーケンズ解析を実施し、養殖マダイで保存されている SNP 多型を検出し、多型性が高く連鎖平衡関係にある SNP 座 (約 200 個) を選定する。また、マーカー座の中には、申請者が特定した形態異常の原因 SNP や成長に関係する SNP 等を組み入れ、包括的かつ直接的な遺伝変異を検出可能にし、有用/有害遺伝子変異を直接的に評価することで社会実装性を高める。

次に、選定した SNP 座を用い、高感度個体識別システムを稼働させる。申請者が今までに収集してきた養殖マダイ DNA サンプルを用い、親子鑑定や遺伝的多様性解析を実施することで、過去の MS DNA を使った研究データと比較し、新規開発した高感度個体識別システムの有効性を評価する。

これらの研究において、今後のマダイの育種、資源管理、そして保全に利用可能な遺伝ツールを整備し、以降の研究を効率よく遂行するための準備をする。同時に、民間種苗業者や養殖業者、そして都道府県とのより親密なパイプを構築し、本システムを利用した以降の研究を円滑に進めるためのネットワーク構築に務める。

### 4. 研究成果

まず、養殖マダイの個体識別や系統識別に利用可能な一塩基多型 (SNP) を得ることを目的として実験を行なった。まず、国内で流通している主要な養殖系統を 5 系統 (各 48 個体) 入手した。この 5 系統、計 240 個体からゲノム DNA を抽出し、GRAS-Di 解析を実施した。GRAS-Di 解析で得られた SNP はフィルタリングを行い、申請者が開発しているマダイリファレンスゲノム配列にマッピングすることで SNP を得た。各集団 98,047 から 187,568 個の SNP が得られ、欠損率やマイナーアリル頻度、ハーディー・ワインベルグの法則への適合性などを指標としたフィルタリングを行い、最終的に各系統で 17,216 から 27,001 個の SNP を得ることができた。これら SNP

から各集団に共通した SNP を選択したところ、全集団に共通した 2,536 個の SNP を得ることが出来た。この 2,536 個の SNP マーカーを母集団として、マイナーアレル頻度が 0.3 以上で 1Mbp 以上距離が離れている SNP を選定することで、255 個にまで絞りこむことに成功した。なお、本 255 個の SNP を用いて養殖集団 5 系統と天然集団の集団遺伝解析を実施したところ、2,536 個の SNP マーカーを用いた場合とほぼ同等の結果を得ることができた (図 1)。

また、GRAS-Di 解析により得られた SNP 情報を用い、養殖マダイ系統の遺伝的多様性評価も実

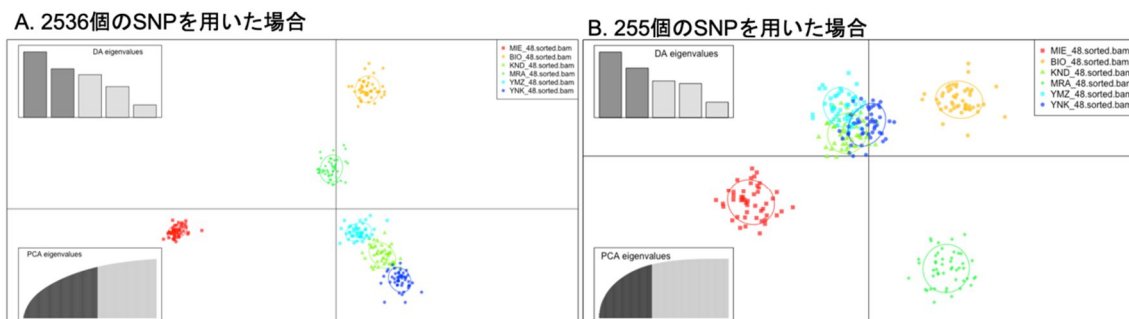


図1. 本研究で得られたSNPを用いたマダイの集団遺伝解析

施した。遺伝的集団構造解析から、5 集団は 4 つのクラスターに帰属することが明らかとなった。同様に連鎖不平衡の崩壊を評価したところ、4 系統は類似した結果となったが、1 系統で連鎖不平衡の崩壊が非常に緩やかであり、有効集団数が特別に少ないことが示唆された。

次に、バイオインフォマティクス解析により絞り込んだ 255 個の SNP を増幅するプライマーを設計した。プライマーの設計は DNA 解析ソフトである GeneiousPrime に実装されている Primer3 を用い、 $T_m$  が 60 になるように設計し、ゲノム配列中に off-target 配列が認められたプライマーは以降の解析から除外した。また、表現型を評価するためのプライマーとして、代表者が単離した形態異常原因遺伝子の一塩基多型を追加し、最終的に、合計 249 対のプライマーセットを設計することができた (図 2)。また、各プライマーの 3' 末端には次世代シーケンスに用いるための Nextera アダプター配列を付与した。

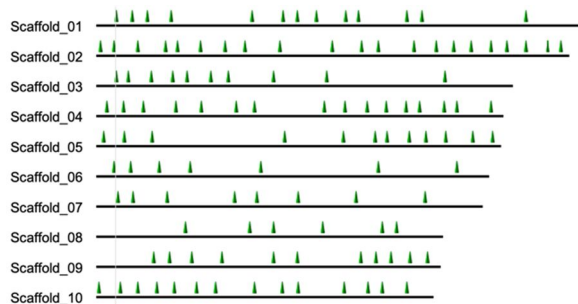


図2. ゲノムワイドに配置されたSNPプライマーの位置 (▲)

設計したプライマーをプライマー合成受託会社へ発注し、50nM の濃度に調整されたプライマーを得た。それぞれのプライマーはフォワードとリバースに分け、等量の容量を混合した。そのため、各プライマーの濃度は 0.2nM/uL となった。このプライマー混合物を用い、PCR 条件の検討を行った。PCR にはマルチプレックス PCR に最適化された DNA ポリメラーゼ (Takara Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2) を用いた。プライマー数が多いため、通常よりも 2 倍量のポリメラーゼを加え、60 の伸長反応を 4 分間に設定した 2 step PCR を実施した。天然採集個体を用いて本マルチプレックス PCR を実施したところ良好な増幅が見られ、マルチプレックス PCR が適切に行われていることが確認された。各遺伝子座のデプスについては今後、明らかにしていく必要がある。また、本研究では、MiSeq による多検体解析系の立ち上げを実施した。ミトコンドリア DNA の調節領域を対象としたプライマーで多検体を同時にシーケンスを行ったところ、今回設計したインデックスプライマーにより最大 384 個体を解析できることが実証された。今後、同システムを用い、上記 SNP の解析を行う予定である。

本研究期間において、天然海域に生息するマダイの入手経路の構築をおこなった。2 年間の期間中に、島根県、三重県、和歌山県、高知県からマダイを入手するルートを構築した。今後、これらのルートからマダイを入手し、今後の研究に活用していきたいと考えている。

## 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<br>Sawayama Eitaro  | 4. 巻<br>51                |
| 2. 論文標題<br>Polymorphisms and haplotypes of the myostatin gene associated with growth in juvenile red sea bream <i>Pagrus major</i> | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Aquaculture Research   | 6. 最初と最後の頁<br>4238 ~ 4244 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/are.14766   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sawayama Eitaro, Kitamura Shin-Ichi, Nakayama Kei, Ohta Kohei, Okamoto Hiroyuki, Ozaki Akiyuki, Takagi Motohiro   | 4. 巻<br>506             |
| 2. 論文標題<br>Development of a novel RSIVD-resistant strain of red sea bream ( <i>Pagrus major</i> ) by marker-assisted selection combined with DNA-based family selection | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Aquaculture   | 6. 最初と最後の頁<br>188 ~ 192 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.aquaculture.2019.03.039  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Sawayama Eitaro, Nakao Hironori, Kobayashi Wataru, Minami Takashi, Takagi Motohiro  | 4. 巻<br>32            |
| 2. 論文標題<br>Identification and quantification of farmed red sea bream escapees from a large aquaculture area in Japan using microsatellite DNA markers | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Aquatic Living Resources  | 6. 最初と最後の頁<br>26 ~ 26 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1051/alr/2019024  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Eitaro Sawayama, Yoshinori Handa, Koichiro Nakano  |
| 2. 発表標題<br>Identification of an SNP marker associated with abnormal eye location in Japanese flounder based on genome-wide analysis |
| 3. 学会等名<br>Marine Biotechnology Conference 2019（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>潭山英太郎、半田佳宏、勝又啓史、中野江一郎          |
| 2. 発表標題<br>Pool-seq法によるヒラメ眼位異常因子のゲノムワイド解析 |
| 3. 学会等名<br>令和2年度日本水産学会春季大会                |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |