

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07566

研究課題名(和文)全雌生産を目指すクルマエビの育種システムの構築

研究課題名(英文)Construction of the breeding system for all females production in kuruma prawn

研究代表者

伏屋 玲子 (FUSEYA, Reiko)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産工学研究所・主任研究員

研究者番号：40373469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：雄よりも雌の方が大きくなるクルマエビの特徴に着目し、性連鎖マーカーの開発を行った。育種を行うためには一対交配が必須であるため、一般に普及可能な簡易人工交配法を確立した。閉鎖循環型飼育によりクルマエビの飼育および簡易人工交配を用いて種苗生産を行った。作成したクルマエビ家系の両親と子供のゲノムDNAを用いてGBS解析を行い、新規で性に連鎖した3つのSNPマーカーを開発した。子供の形態と遺伝子型の検討により、80%以上で一致していた。本研究で開発した性連鎖マーカーは今後のクルマエビ育種に有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The females of kuruma prawn grow faster and larger than the males. In this study, we constructed a single nucleotide polymorphism (SNP)-based genetic linkage map by the genotyping-by-sequencing (GBS) method, and identified the sex-determining locus. We established a simple artificial copulation method for breeding of kuruma prawn. Seed production was carried out using the artificial copulation of male and female with individual label. The SNP markers that were genotyped in at least 80% of the progenies exhibiting polymorphisms in the male or female parent of the mapping population were retained for subsequent genetic linkage map analysis. Three SNPs were linked to the sex determination locus. The sex-linked markers identified in this study should be useful in kuruma prawn breeding programs.

研究分野：水産増養殖学，集団生物学，集団遺伝学

キーワード：クルマエビ 育種システム 人工交配 性連鎖マーカー 閉鎖循環飼育

## 1. 研究開始当初の背景

クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) は西太平洋、インド洋沿岸に広く分布し、内湾、内海の砂泥域に生息する大型のエビである。本種は雌雄で成長速度が異なり、雄よりも雌の方が大型になる。甲殻類の中でもクルマエビは活魚としての利用が高く、高級食材として扱われている。本種は市場価値が高いため、漁業対象種としてだけでなく、養殖対象種としても重要な種である。アジア地域を中心としてクルマエビ類養殖が発展しており、ブラックタイガー(ウシエビ: *Penaeus monodon*) やバナメイエビ (*Litopenaeus vannamei*) など多くのクルマエビ類が養殖生産され、エビカニの嗜好性が高い日本へも輸出されている。発展を続けるエビ養殖にも疾病問題はあり、1990年代には急性ウイルス血症 (penaeid acute viremia: PAV)、現在はホワイトスポット病 (white spot disease: WSD) と呼ばれ、猛威をふるい、日本を含めて世界中で種苗生産および養殖に多大な影響を与えてきた。安定した養殖生産を行うためには、特定の疾病にかかっていない SPF (specific pathogen free) クルマエビの作成が必要となる。近年、環境保護や高い生産性への期待から陸上養殖に対して世界的に需要が高まっている。陸上養殖には、掛け流し型と閉鎖循環型の2種類がある。掛け流し型は海面や河川等に面した土地に養殖池や水槽を設置し、引き込んだ海水等を用い、使用済みの飼育水を自然界に排水する。閉鎖循環型は濾過システムを用いて飼育し、飼育水を大量に排水することはない。閉鎖循環であるため環境に優しく、飼育環境をコントロールすることができるため、引き込んだ海水による病気などの蔓延も防ぐことができる。

クルマエビ類の特徴として、産卵において抱卵を行わず、卵を水中に放出することがあげられる。また、クルマエビ類には雌の受精嚢が閉鎖型か開放型かによって交尾様式が異なる。雌が脱皮直後の甲殻が柔らかい時に交尾を行い、閉鎖型では受精嚢内部に雄の精包を保管するが、開放型では受精嚢の外にそのまま精包を付着させ、産卵の際に受精しながら放卵する。前者にはクルマエビやブラックタイガー、後者ではバナメイエビがその様式に当てはまる。閉鎖型においてもクルマエビは交尾の際に精包に付随した交尾栓によって受精嚢にフタがされるが、ブラックタイガーでは交尾栓はない。クルマエビでは天然および養殖場などの素堀池でほとんどの雌が交尾栓を持っている。しかし、陸上水槽内では交尾率が低く、交尾栓を持つ雌は少ない。交尾の条件として、飼育水槽の環境と雌雄の状態がうまく組み合わせる必要があることが考えられる。しかし、育種を行う際には必要な系統から確実な受精卵を採る必要があるため、ブラックタイガーでは成熟した雄から精包を取り出し、雌の受精嚢に挿入させる人工交配が確立されており、既に現場におい

ても行われている。同じ閉鎖型でもクルマエビは受精嚢の構造が異なるため、精包の挿入技術の精度が必要となり、まだ一般には普及・利用されていない。

日本においてクルマエビ類における遺伝育種研究は、集団遺伝学的研究を除いてほとんど手付かずの状態にある。クルマエビにおいて人工交配を基盤とした育種システムを構築することができれば、遺伝情報を用いた親エビの選抜(マーカー選抜育種法)によるクルマエビ類の遺伝育種研究をリードすることが可能になる。

## 2. 研究の目的

閉鎖循環型飼育は、飼育環境を人為的にコントロールでき、疾病対策に非常に有効である。WSDなどの特定疾病は垂直(親子)感染およびキャリアの甲殻類(共食い、池内にいる生物)を摂食することにより感染すると言われていることから、SPFの親エビを閉鎖循環型で飼育することにより、SPF種苗の作成が可能となる。しかし、陸上水槽で飼育したクルマエビは、天然や養殖池のエビと比べると交尾栓保有率(交尾率)が低く、交尾率が100%となるようなデータは皆無である。本研究では、確実な育種を推進するために人工交配に着目した。海外ではブラックタイガーやバナメイで育種が始まっており、人工交配が利用され始めている。クルマエビについても今後育種を進める上で、目的の親エビ同士の確実な交配ができないことは致命的である。そこで、クルマエビで優良系統作成を行うためには、安定的で効率的な人工交配技術の確立が重要である。また、既報の性連鎖 AFLP マーカーが使用できないこと、そしてこれまでの研究で制限酵素反応の検討が必要であることから新たに AFLP マーカーの開発は難しいため、他の解析方法を用いたマーカー開発を検討する。性連鎖マーカーを開発することにより、クルマエビの成長速度の性差(雌>雄)を利用した全雌生産が可能となり、クルマエビ養殖産業において効率化が期待できる。

## 3. 研究の方法

クルマエビの継代飼育を行うため、健康な状態で長期飼育が可能な閉鎖循環型水槽を設置した。飼育するクルマエビはすべて個体識別し、各個体の情報を管理する。人工交配を確立させるため、雌雄の状態を検討し、選別した。人工交配法を一般化し、簡便に行えるよう使用する道具や方法について検討し、クルマエビの育種システムの構築を図る。前課題より保存している水温家系について F<sub>2</sub> を作成し、性転換個体の検証を行う。また、新たな家系を作成し、新しい性連鎖マーカーを開発した。マーカー開発は、次世代シーケンサーを用いた GBS (Genotyping by sequencing) 解析を行い、性に連鎖した SNP

(single nucleotide polymorphism) を探索した。

#### 4. 研究成果

人工交配の方法を確立するために雄の観察と道具の改良を行った。生きたままの雄から精包を摘出した後、精包・交尾栓の再生は2日後から目視で徐々に観察され、3日後以降は大きくなるため簡単に確認できた。実際に摘出して使用できるまでには約1週間を要した。この観察により、人工交配に連続して同じ雄から精包を摘出する場合は1週間程度かかることがわかった。また、人工交配の際に用いる道具として、ステンレス製のピンセットを使用していたが、樹脂製のものに変更した。さらに先端が尖ったものから丸い形状のものに改良したことによって、挿入時の受精嚢への損傷を防ぐことができた。クルマエビでの人工交配が可能となったことから希望の形質・遺伝子を持つ個体での再生産(育種)が可能となった。育種だけでなく、種苗生産現場全般で産卵がなく脱皮した(交尾栓がない状態)雌の再利用にも役立つよう、現場普及用に「クルマエビの簡易人工交配法」をビデオで録画し、公開した。

前課題から継代飼育を行っている温度家系F<sub>1</sub>を親として人工交配・自然産卵を試みていたが、途中でフサリウムが蔓延し、F<sub>2</sub>を作成することができなかった。しかし、そのフサリウム発症個体を用いて、電解水を用いた微弱塩素曝露による除去試験を行うことができた。フサリウムは脱皮によって症状が軽減されるが、塩素曝露の有無とは関係なく、次の脱皮までの間に症状は悪化することが明らかになった。また、フサリウムの影響により、脱皮ができても完全に抜けきれず殻が残ったり、甲殻の一部に形態異常が起きてしまう脱皮不全がみられた。新規に親エビを飼育し、確立させた簡易人工交配法を用いて、個体識別をした雌雄複数の組み合わせで、約20家系から自然産卵により採卵した。採卵した受精卵を三等分し、20、24、30の水温区に分けて飼育しF<sub>1</sub>を作成することができた。

GBS解析を行うために人工交配により採卵し、受精卵を自然水温により飼育した。形態による雌雄判別可能なサイズ(50mm・4ヵ月以上)の稚エビ56個体(雄30、雌26)と両親よりゲノムDNAを抽出し、GBSライブラリーを作成後、GBS解析を行った。シーケンシングには、HiSeq4000で1レーン分(100 bp Paired end)で実施し、得られたデータをマッピングした。次にSNPの抽出には、Stacks(ref\_map.plパイプライン)で解析後、以下の条件を満たすSNPを抽出した。抽出条件:稚エビ全個体中の80%以上でデータ取得され、親個体で多型性があり、メンデルの法則(分離比1:1)に当てはまること。GBS解析で得られたSNPと性決定と連鎖解析には、R-QTLを用いた。親からは、平均1,656万リード(1.622MB)、稚エビからは平均893万リード

(864MB)が得られた。雌雄でそれぞれ900座程度のSNPが得られ、そのうちの3つのSNPで性決定(雌ヘテロ)と連鎖した。この性と連鎖した各SNPを含むDNA配列から、クルマエビゲノムデータベース(東京海洋大学内)からDNA断片を検索し、それぞれ3,712bp, 1,396bp, 223bpのDNA配列を入手した。223bpのDNA断片が得られた1つのSNPは、SNPの位置がDNA配列の末端部に存在したためPCRプライマーを設計できなかったが、他2つのSNPからはPCRプライマーを設計することができた。このPCRプライマーを用いて、性連鎖SNPが他家系でも利用可能かどうかを検討した。

閉鎖循環飼育下で、新規で購入したクルマエビおよび昨年度種苗生産したF<sub>1</sub>個体を用いて、雌雄・両親の組み合わせを変えて人工交配を行い、眼柄処理を施さない自然産卵で採卵した。受精卵を3等分し、異なる3つの水温区に振り分けて種苗生産を行った。形態により雌雄が容易に判別でき、また個体識別用の標識がつけられる5ヶ月齢の稚エビ歩脚の一部を採取し、個体識別を施し、生かしたまま飼育を継続した。摘出した歩脚筋肉からDNA抽出キットを用いて、クルマエビゲノムDNAを抽出した。この新たな家系サンプルでPCRおよびダイレクトシーケンス解析を行ったところ、該当の2つSNPにおいては両親では多型がみられなかった。しかしながら、PCR産物中のSNP近傍のDNA配列において、雌親で新たなSNPを発見した。さらにこの新たなSNPはこの新たな家系サンプルで、80%以上の子孫で性決定と連鎖していた。この新たな性決定SNPマーカーにより性形質と遺伝子型で異なる結果が出た個体は、遺伝的組み換え個体もしくは性転換を起こした個体である可能性がある。そのため、今後はこれらを親エビとして育成後、検定交雑を行うことで、実際に性統御ができるかどうかを検証することが可能となる成果が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Zuachen Zhang, 遠藤 雅人, 坂本 崇, 伏屋 玲子, 吉崎 悟朗, 竹内 俊郎, Studies on kuruma shrimp culture in recirculating aquaculture system with artificial ecosystem, Aquaculture, 査読有, Vol. 484, 2017, pp.191-196.

〔学会発表〕(計 8件)

伏屋 玲子, 坂本 崇, クルマエビの育種システムの構築, 平成30年度日本水産学会春季大会, 2018.

遠藤 雅人, Zuachen Zhang, 坂本 崇, 伏屋 玲子, 吉崎 悟朗, 竹内 俊郎, Effect of manganese supplementation to aquacultural wastewater discharged

from the recirculating aquaculture system with kuruma shrimp as the culture media of *Chaetceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* and their values for initial feeds of kuruma shrimp larvae ,The JSPS 85<sup>th</sup> Anniversary - Commemorative International Symposium “ Fisheries Science for Future Generations ” ,2017.

伏屋 玲子, クルマエビの育種に向けた試み, 第2回「農水産業支援技術展」沖縄, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

FRA チャンネル「クルマエビの簡易人工交配法」配信

<https://www.youtube.com/watch?v=eE1XD9kZ4cg>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伏屋 玲子 (FUSEYA, Reiko)

国立研究開発法人 水産研究・教育機構

水産工学研究所・水産業システム研究センター・主任研究員

研究者番号：40373469

### (2) 連携研究者

坂本 崇 (SAKAMOTO, Takashi)

国立大学法人 東京海洋大学 海洋科学部・教授

研究者番号：40313390