

平成30年6月25日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14972

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた天然魚における優良形質の全ゲノム関連解析

研究課題名(英文) Genome wide association study of the useful traits in wild fish using the next generation sequencer.

研究代表者

坂本 崇 (Sakamoto, Takashi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：40313390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いて、アユゲノム参照配列を作成した。約460Mbpのアセンブルデータが得られ、N50：4.44 Mbp、最長scaffold：17.19 Mbpとなった。冷水病選抜育種された天然魚由来養殖集団において分子遺伝学的解析を実施した結果、選抜育種前と選抜育種後の集団では、冷水病耐病性ゲノム領域が遺伝的に変化している可能性が示唆された。東京都多摩川の天然魚を用いた人為感染実験による冷水病耐病性形質の全ゲノム関連解析の実施した結果、生残魚と死亡魚で冷水病耐病性ゲノム領域で特に大きな差異が見られたことから、耐病性形質に関連する遺伝子座の絞り込みに有効である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The reference genome (approximately, 460 Mbp) of the ayu was produced. Longest scaffold was 17.19 Mbp and the assembly had an N50 value of 4.44 Mbp. In order to detect the genetic impacts for the selective breeding program (SBP) of bacterial coldwater-disease (BCWD) resistant trait, allele distributions of MS markers were compared in two years (2007 and 2016). The allele distributions of several markers were significantly difference between 2007 and 2016, suggesting the genetic diversity was reduced due to SBP. The difference of the allele distribution on MS marker linked to BCDW resistant trait was highly significant, because of the genetic selection on the SBP. Genome wide association study (GWAS) was performed in wild fish after artificial challenge test of BCWD. The genetic difference between survivors and dead fish on the genome region related to BCWD resistant trait was detected. GWAS of disease resistant trait might be useful to detect the disease resistant locus.

研究分野：水族分子遺伝育種学

キーワード：細菌性疾病 耐病性 ゲノム 育種 アユ SNP 次世代シーケンサー 関連解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向および位置づけ

養殖魚類における耐病性形質の分子遺伝学的解析は、申請者らの研究グループにより世界初の成果としてニジマス IPN ウイルス耐病性遺伝子座 (Ozaki et al., 2001) が明らかとなり、ヒラメリンホシスチス耐病性遺伝子座 (Fuji et al., 2006)、ブリの寄生虫抵抗性遺伝子座 (Ozaki et al., 2013) が明らかとなっている。国外においては、ノルウェーおよびイギリスのグループによる太平洋サケ IPN ウイルス耐病性研究 (Houston et al., 2008, Moen et al., 2009) などがある。これらの研究は、主に養殖集団由来の解析家系を用いた連鎖解析であり、本研究課題で提案する天然魚の耐病性形質に対する全ゲノム相関解析は、非常に新規で挑戦的な研究である。

上記の耐病性形質に関する分子遺伝学的解析は、耐病性系統と感受性系統を交配して作出した解析家系を用いた解析であり、解析家系の作出には優良形質 (耐病性形質) を保持する系統を既に作出している必要がある。養殖魚類においては、耐病性系統がほとんど存在せず、新たな耐病性系統作出技術が必要である。トラフグの性決定遺伝子単離 (Kamiya et al., 2012) においては、天然魚を用いた性決定遺伝子座の局所的な相関解析が用いられ、成果を上げている。アユ冷水病耐病性形質の様に 1 つの主導遺伝子で支配されている形質であれば、全ゲノム相関解析により検出できると考えた。また近年、次世代シーケンサーを用いた GBS (Genotype by Sequencing) 法等により、比較的安価に全ゲノム相関解析が可能になったため、本研究課題を着想した。

(2) これまでの研究成果

これまでに 500 座位以上の遺伝マーカーを用いたアユのアユゲノム地図を作成した。それを用いたアユ冷水病耐病性形質の連鎖解析により、冷水病耐病性遺伝子座を明らかにし、アユ冷水病耐病性形質識別マーカーを開発した (特許第 5026771 号および特許第 5026812 号)。さらに、冷水病耐病性遺伝子座のゲノム領域: 約 1,000kb の物理的地図を作成した。また、アユ冷水病耐病性形質識別マーカーを用いたマーカー選抜育種技術を開発し、冷水病に対する耐病性系統と感受性系統の作出に成功した。冷水病耐病性形質の主導遺伝子座を用いた選抜により作出された耐病性系統と感受性系統は、同じ菌濃度で実施した人為感染実験において、それぞれの死亡率は 0% と 100% と大きな差を示した。

アユゲノム地図は、全ゲノム相関解析で明らかになる生残魚群特異的な SNP を含む DNA 断片の位置を明らかにする際に利用する。また、冷水病耐病性遺伝子座のゲノム領域: 約 1,000kb の物理的地図についても、全ゲノム相関解析で明らかになる生残魚群特

異的な SNP を含む DNA 断片の位置との関連性を解析する際に利用する。

2. 研究の目的

クロマグロやウナギでは、養殖業のほとんどに天然種苗を用いており、養殖業の安定化と資源保護の観点から、天然魚から短期間で優良形質を保持する人工種苗を作出する育種技術開発が必要とされている。すなわち、未選抜な天然魚の解析により、優良形質を保持する個体を選抜可能なマーカーを開発する技術が必要とされている。本研究課題では、アユ冷水病をモデルとして、次世代シーケンサーを用いた天然集団における耐病性形質の全ゲノム相関解析により、ゲノム上の冷水病耐病性マーカーを探索する。本研究課題の全ゲノム相関解析により得られる成果が、これまでに申請者らが解析家系を用いた連鎖解析で検出している冷水病耐病性識別マーカーと同一の遺伝子座を検出できるかどうかを検討し、全ゲノム相関解析の有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるアユゲノム参照配列の作成

次世代シーケンサーによる用いた GBS (Genotype by Sequencing) 解析やリシーケンス解析を実施する際に、対象生物の参照配列を利用することで得られるデータ精度およびデータ量が高まることがわかっている。そこで、次世代シーケンサー (illumina 社: HiSeq2000、PacBio 社: PacBio RS II) を用いて、ゲノム参照配列を作成する。(アユゲノムは、事前の全ゲノム量解析で約 450Mb ということが明らかになっており、非常に小さいゲノムである (参考: メダカ: 1000Mb、ニジマス: 2400Mb)、illumina 社のシーケンサーでは、Shotgun, 3kb, 8kb, 20kb, 40kb の各種ライブラリーを用いて入手したショートリードデータを解析した。これらのショートリードデータは Platanus を用いてアセンブルを行った。さらにそのアセンブルデータのギャップ補完のために、PacBio 社のロングリードデータを PBJelly で解析した。これらの解析により、アユゲノム参照配列を作成した。

(2) 人為的な冷水病淘汰による天然由来養殖集団の遺伝的変遷の解析

マイクロサテライト (MS) マーカーによる解析

これまでの冷水病耐病性解析では、共同研究先である広島県のサンプルを用いて多くの解析が進められており、他県種苗における冷水病耐病性形質と冷水病耐病性ゲノム領域との関係性は明らかになっていない。そのため、岐阜県で行われてきた冷水病選抜育種によるサンプルを用いて、遺伝的変遷を解析した。解析には、岐阜県水産研究所で継代飼育された海産系統と新規系統を用いた。供試

魚は、海産系統の2007年(生残率:約50%)と2016年(生残率:約80%)の集団各48尾と、新規系統の2007年(生残率:約35%)と2016年(生残率:約80%)の集団各48尾を用いた。この2系統は、人為感染試験による選抜育種の結果、世代間で冷水病耐病性形質の頻度に差が見られる。また、継代の影響によって近交度が上昇し、遺伝的多様性が全染色体規模で減少している可能性がある。そこで、上記の2系統について冷水病耐病性識別マーカーを含む複数連鎖群のMSマーカーにより解析し、遺伝的多様性の度合いと冷水病耐病性形質との関連性について調べた。MSマーカーは、冷水病耐病性識別マーカー1座および耐病性形質とは無関係な8座の合計9座を用いた。MSマーカーを用いてPCRを行い、キャピラリー電気泳動法によるPCR産物のサイズ分離後、アレル頻度を算出した。各系統について、2007年と2016年のアレル分布をカイ2乗検定により解析した。

SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) マーカーによる解析

さらに、これらのサンプルについて冷水病耐病性ゲノム領域に配置した69座のSNPマーカーを用いて詳細に解析した。69座のアンプリコンシーケンス法では、標的変異を含む約1kbpの領域をPCRで増幅し、次世代シーケンサーIllumina社Miseqによってシーケンスを行なった。データトリミング後にリードをアユ全ゲノム参照配列にマッピングし、69座について特異的にSNP callingを行い、その後アレル頻度の算出や主成分分析を行った。

(3) 天然アユ稚魚を用いた冷水病人為感染実験の実施

平成28年度は宮崎県に2月に海で採捕され(沖取り)、飼育された天然アユ(約20g)を用いて、冷水病人為感染実験を行った(協力機関:広島県立水産海洋技術センター)。まず供試魚において、冷水病菌の保菌検査を実施し、陰性であることを確認した。感染実験には、PH-1034株(7.4 logCFU/fish)を用いた。

平成28年度に実施した宮崎県で採捕される天然魚を用いた実験では、使用できる魚体サイズが大きいため、その後の相関解析に十分なサンプル数が得られないと判断し、平成29年度は、東京都から分与された多摩川河口域で採捕されたアユ(約400尾)を用いて実験を行なった。多摩川にて4月下旬に採取した天然集団のアユは、平均6.26cm、魚体重は1.91g(8尾平均)であった。アユを約5gになるまで飼育し、感染実験に用いた。(多摩川で採捕されたアユでは、これまでに冷水病菌の保菌は確認されていない。)

(4) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム相関解析

冷水病人為感染試験に供した多摩川で採捕した天然魚のうち、生残魚2尾と死亡魚2

尾からDNAを抽出した。生残魚、死亡魚それぞれのDNAを混合しpooled-seq法による冷水病耐病性形質に相関するSNPの検出を試みた。Illumina社Hiseq X tenによるペアエンド150bpのシーケンスを行なった(外部委託)。シーケンスデータは、bwaソフトウェアを用いてすでに構築したアユ参照ゲノム配列にマッピングした。次にこれまでの解析から、冷水病耐病性形質との連鎖関係が検出されている連鎖群14上の約770kbの領域に位置するSNPを検出した。SNP検出にはsamtoolsを用いた。全ゲノムおよび冷水病耐病性関連領域のそれぞれで生残魚と死亡魚でジェノタイプが異なるSNP数等を解析した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるアユゲノム参照配列の作成

Illumina社のシーケンサーによる各ショートリードデータは、それぞれのライブラリーごとに、Shotgun(約6.6億reads)、3kb(約4900万reads)、8kb(約4975万reads)、20kb(約2957万reads)、40kb(約2396万reads)を用いた。これらのショートリードデータはPlatanusを用いてアセンブルを行った。さらにそのアセンブルデータのギャップ補完のために、PacBio社のロングリードデータとして、約102.5万reads:平均6965bpを入手し、PBjellyで解析した。その結果、約460Mbpのアセンブルデータが得られ、N50が4.44Mbp、最長scaffoldは17.19Mbpとなった。これまでに作成しているアユマイクロサテライトおよびGBS解析法による連鎖地図上には、85.2%のscaffoldsがマッピングされた。これにより、今後のGBS解析やリシーケンス解析に有効なアユゲノム参照配列を作成することができた。

(2) 人為的な冷水病淘汰による天然由来養殖集団の遺伝的変遷の解析

MSマーカーによる解析

各系統について、MSマーカーによる解析データを用いて2007年と2016年のアレル分布をカイ2乗検定により解析した結果、どちらの系統でも複数のMSマーカーにおいてアレル頻度の偏りに有意差が見られた。この複数MSマーカーにおけるアレル頻度の偏りは、継代飼育による遺伝的多様性の減少によるものと考えられた。なかでも、冷水病耐病性識別マーカーでは、最も大きなアレル頻度の偏りを検出した。冷水病耐病性識別マーカーのアレル頻度の大きな偏りは、継代飼育による遺伝的多様性の減少に加えて、冷水病人為感染試験による選抜が影響した結果によるものと考えられた。これらのことから、冷水病選抜育種前と冷水病選抜育種が繰り返行われた後の集団では、冷水病耐病性ゲノム領域が遺伝的に特に変化していることが明らかになった。

SNP マーカーによる解析

これらのサンプルについて冷水病耐病性ゲノム領域に配置した 69 座の SNP マーカーを用いて標的変異箇所における耐病性系統特異的なアレルの頻度を算出した結果、耐病性形質向上に伴うように 2007 年から 2016 年にそのアレル頻度が有意に上昇している 11 SNPs が検出された。これらの 11SNPs は、耐病性形質向上に関連性している可能性が考えられた。

(3) 天然アユ稚魚を用いた冷水病人為感染実験の実施

平成 28 年度は宮崎県に 2 月に海で採捕され（沖取り）飼育された天然アユ（約 20g）を用いた人為感染実験に用いる菌量は、予備実験結果から、上記の 1 尾当たり 2.4×10^7 の 7 乗 cfu（ $n=50$ ）とした。感染実験の結果、死亡率は、60%（生残魚 20 尾、死亡魚 30 尾）となった。

冷水病によって死亡したアユを水槽内に吊るし、感染させる同居感染法にて行った。水量を 45L に設定した 60L 水槽に毎分約 0.24L の注水を行い、水温が 16-17 の流水飼育で行った。20 尾を用いた複数の予備実験の結果、死亡率が約 80-100%になる条件を明らかにした。最終試験として、ストック飼育水槽で約 300 尾を用いた感染実験を行なったが、期待通りの死亡率が得られなかった。期待通りの死亡率は得られなかったが、感染実験サンプル（生残魚/死亡魚）を GBS 解析より詳細な解析が可能な全ゲノムリシーケンス解析に供試し、表現型（生残/死亡）と SNPs との全ゲノム相関解析を行うこととした。

(4) 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム相関解析

Illumina 社 HiSeq X ten によるペアエンドシーケンスの結果、生残魚では約 3100 万リード（4.62 Gbp）死亡魚では約 3200 万リード（4.78 Gbp）のシーケンスデータが得られた。アユのゲノムサイズ 450Mbp の約 10 倍量のシーケンスデータが取得された。bwa ソフトウェアを用いてシーケンスデータをすでに構築したアユ参照ゲノム配列にマッピングした結果、99%以上のリードがマップされた。冷水病耐病性形質との連鎖関係が検出されている連鎖群 14 上の約 770 kb の領域に位置する SNP を検出した結果、合計で 5529 個の SNP がこの領域内で検出された。このうち、冷水病人為感染実験における生残魚と死亡魚でジェノタイプが異なる SNP は、3359 個であった。冷水病耐病性形質の主導遺伝子座を用いたマーカー選抜育種技術により作出された耐病性系統個体における全ゲノムリシーケンス解析では検出されなかった新規の SNP は 1567 個であった。さらに、新規 SNP のうち感染試験の生残魚特異的な SNP は 300 個であった。

次に冷水病耐病性形質の主導遺伝子座を

用いた選抜により作出されたマーカー選抜育種耐病性系統個体を参照ゲノム配列として、冷水病人為感染実験における生残魚および死亡魚で、全ゲノム領域、連鎖群 1 領域、連鎖群 14 領域、冷水病耐病性関連ゲノム領域（770kb）における SNP のホモ接合体率を比較した。全ゲノム領域では、SNP のホモ接合体率は生残魚が 0.547、死亡魚が 0.423 となり、生残魚が死亡魚よりもマーカー選抜育種耐病性系統個体に遺伝的に近い可能性が示唆された。連鎖群 1 領域では、SNP のホモ接合体率は生残魚が 0.623、死亡魚が 0.410 となり、連鎖群 14 領域では、SNP のホモ接合体率は生残魚が 0.646、死亡魚が 0.398 となり、同様な結果が得られた。さらに、冷水病耐病性ゲノム領域（770kb）では、SNP のホモ接合体率は生残魚が 0.677、死亡魚が 0.402 となり、生残魚が死亡魚よりもマーカー選抜育種耐病性系統個体に遺伝的に近い可能性が示唆された。

天然魚を用いた人為感染実験による耐病性遺伝子座に関する全ゲノム相関解析は、生残魚と死亡魚で耐病性遺伝子座のゲノム領域で差異が見られたことから、耐病性に関連する遺伝子座の絞り込みに有効である可能性が考えられた。今後は人為感染試験の生残魚特異的な SNP について、近傍に位置する遺伝子座への変異の影響を解析することで冷水病耐病性形質の責任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 坂本 崇 (招待講演)

国内外の水産養殖における育種の現状と将来展望について

第 42 回 全国養鱒技術協議会大会

2017 年 7 月 7 日

(2) Miho Hirano, Aya Kondo, Tsubasa Uchino, Masatoshi Nakamoto, Tomonori Kuwada, and Takashi Sakamoto.

Detection of impact for selective breeding program of Bacterial Coldwater-Disease resistance using DNA marker linked to the resistance trait in ayu *Plecoglossus altivelis*.

The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" (国際学会)

2017 年 9 月 22-24 日

(3) Masatoshi Nakamoto, Tsubasa Uchino, Eriko Koshimizu, and Takashi Sakamoto.

Whole genome sequencing for ayu *Plecoglossus*

altivelis.

The JSFS 85th Anniversary-Commemorative
International Symposium "Fisheries Science for
Future Generations" (国際学会)
2017年9月22-24日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 崇 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京海洋大学・学術研究院・海洋生物資源学
部門・教授

研究者番号：40313390