

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14525

研究課題名（和文）ゲノム情報を利用した育種手法による形態異常軽減技術の開発

研究課題名（英文）Development of technology to reduce abnormalities by breeding using genomic information

研究代表者

宇治 督（Uji, Susumu）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所（長崎）・グループ長

研究者番号：40372049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝的改良によってヒラメ・カレイ類で問題となっている形態異常を軽減することができるかどうかを明らかにすることを目的として、小型のヒラメ・カレイ類であるササウシノシタを用いて、解析家系の作出、黒化の表現型解析、次世代シーケンサーを用いたゲノム情報の取得およびゲノム情報を用いた交配計画の策定を行った。その結果、ヒラメ・カレイ類で問題となっている黒化については遺伝率が約44%と推定され、遺伝的な改良ができる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚種を問わず魚類の種苗生産や養殖現場において形態異常魚の出現は大きな経済的損失を伴うため大きな問題となっており、この問題を解決する意義は非常に大きい。今回の研究成果は、ゲノム情報を用いた遺伝的な改良によってヒラメ・カレイ類で問題となっている黒化を効率的に軽減することができる可能性を示唆しており、今後の魚類形態異常軽減策の新たな方策を提案している。

研究成果の概要（英文）：To clarify whether genetic improvement can prevent morphological abnormalities of flatfish, using small flatfish, *H. japonicus*, we generated analytical families, analyzed phenotypic analysis of hypermelanosis, which is the most major abnormalities in flatfish, analyzed genomes using next-generation sequencers, and developed breeding plans using the genomic information. As a result, the heritability of hypermelanosis was estimated to be about 44%, suggesting the possibility of genetic improvement through systematic breeding.

研究分野：水産

キーワード：育種 形態異常 ゲノム RAD-seq ヒラメ・カレイ類

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

種苗生産現場において形態異常魚の出現は大きな経済的損失を伴うため、古くから問題として存在し、今日でも変わらず大きな問題であり続けている。ヨーロッパでは2009年の時点で形態異常魚の経済的損失は少なくとも年間約56億円と試算されており、この問題を解決する意義は非常に大きい。

ヒトを含めて脊椎動物において形態異常を引き起こす要因としては遺伝的な要因と餌料を含む環境的な要因があると考えられているが、これまでの魚類の形態異常防除技術開発は、飼育環境や餌の改善の検討がほとんどであり、遺伝的な研究が極僅かにあるだけで、ましてや育種という観点からの研究は全く存在しない。それゆえ、遺伝的改良によって形態異常を大きく軽減することができるかどうかは、形態異常研究の大きな問いである。研究代表者もこれまで様々な魚種で飼育環境を良くすることで形態異常の軽減技術開発を行ってきた(文献1-3)。しかしながら、形態異常の一部は軽減することはできても必ず一定の割合で発生する。また一方で、必ずしもすべての個体が形態異常になるわけではなく、どんな環境でも形態異常にならない個体が一定の割合で存在する。ここに遺伝的要因が関与している可能性がある。実際、近年、タイセイヨウサケ等で前彎症、脊椎骨癒合、鰓蓋骨異常など様々な形態異常が生じる要因として遺伝的な要因が存在することが示されている(文献4-7)。これらの観察・報告は、形態という形質が、一般的な育種目標形質である成長や耐病性などの形質と同様に、育種における選抜と改良の対象となりうることを示唆している。そして、現在の次世代シーケンサー(NGS)技術は、何百万ものDNA分子を短期間で配列決定できる技術であり、大量の一塩基多型情報を利用した育種を可能にする。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた育種手法によって魚類形態異常軽減技術を開発することを目的とする。具体的には、形態異常が特に問題となっているヒラメ・カレイ類のうち、飼育がしやすい小型のササウシノシタを用いて、(1)解析家系の作出および表現型解析、(2)RAD-seq法を用いたゲノム中に分布する大量の一塩基多型情報の取得、(3)一塩基多型情報を用いた優良親魚の選抜を行い、人工飼育環境で形態異常になりにくい魚を産む親魚の交配方法を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析家系の作出および表現型解析

形態異常が多発する飼育条件での解析家系の作出を行った。具体的には天然ササウシノシタ親魚から自然産卵により2018年7月に孵化仔魚を得て、形態異常が多発する高密度試験区2水槽(それぞれ約100匹/Lと200匹/L)と対照区2水槽(それぞれ約2匹/Lおよび約3匹/L)で解析家系の作出を行った。高密度試験区では飼育条件が高密度という試験設定のため成長が遅れた。そのため、高密度試験区の1水槽(100匹/L区)について2019年4月に約200匹まで間引き、飼育温度を上げて継続飼育した。2020年3月に間引いた群の全個体155匹にPITtagを装着し、表現型解析およびDNA採取に供した。稚魚の表現型は全長および形態異常のうち最も頻度の高かった黒化(黒化面積の割合)の表現型データをImageJ ver.2.3.0を用いて取得し解析に用いた。

### (2) RAD-seqによるゲノムワイドマーカーの作出

親魚群 59 匹と解析家系 155 匹から Maxwell RSC Plant DNA Kit (Promega) を用いて DNA を抽出し、常法に従い制限酵素 SbfI を用いた RAD-seq ライブラリーを作成した。ライブラリーは Illumina NextSeq500 でシーケンスを行い、配列を決定した。RAD-seq の取得リード数が 100 万リード数以下の親魚 1 匹と稚魚 4 匹は以下の解析から除外した。得られた配列はササウシノシタの contig 配列へ BWA-MEM version 0.7.17 を用いてマッピングを行い contig 情報にユニークに存在する配列のみを抽出した。Stacks version 2.2 で抽出した配列の遺伝的変異を検出し遺伝子型をコールした。

### (3) 家系判別と交配計画の策定

SNPs のフィルタリングには Stacks version 2.2、vcftools version 0.1.5 および plink version 0.67 を用いた。親子判別、遺伝率の推定、交配計画の策定はそれぞれ R パッケージ Sequoia version 2.3.3、rrBLUP Version 4.6.1 および OptiSel Version 2.0.5 を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 解析家系の作出および表現型解析

飼育開始約 10 ヶ月後の 2019 年 4 月時点において高密度試験区はそれぞれ 432 匹 (約 100 匹/L 区) および 677 匹 (約 200 匹/L 区) 生存しており、平均全長はそれぞれ  $41.0 \pm 7.8$  mm (平均全長  $\pm$  標準偏差、 $n=50$ ) および  $40.7 \pm 7.7$  mm (平均全長  $\pm$  標準偏差、 $n=50$ ) であった。飼育条件が高密度という試験設定のため成長が遅れた。対照区は 2 水槽とも仔魚数が少なかったため 2019 年 4 月までに両区とも全滅した。2019 年 4 月に間引いた高密度試験区の稚魚は 2020 年 3 月には PITtag 装着可能なサイズまで成長したため、表現型として生存している全個体 155 個体の全長および 154 個体の形態異常のうち最も頻度の高かった黒化の情報 (腹側の黒化面積の割合) を取得した。平均全長は  $88.0 \pm 14$  mm (平均全長  $\pm$  標準偏差)、黒化は  $8.12 \pm 5.2\%$  (平均全長  $\pm$  標準偏差) であった。

### (2) RAD-seq によるゲノムワイドマーカーの作出

親魚群 59 匹と解析家系 155 匹から平均約 409 万リードを取得できた。ゲノムにユニークな配列のみを抽出し、stacks で遺伝子型を決定し、約 48 万の遺伝的変異を検出した。このうち全個体での欠損率が 20% 以下で、MAF (マイナーアレル頻度) が 0.05 以上、ヘテロ接合度観察値が 0.7 以下である SNPs は 23,036 座あり、RAD-seq によりスジアラにおいて万単位のゲノムワイドマーカーを作出することができた。ここからさらにシーケンス深度、連鎖不平衡度、HWE (ハーディーワインベルグ平衡) 等の条件で目的に合わせてフィルタリングし、家系判別には 399 SNPs、遺伝率推定には 11,418 SNPs を用いて行った。

### (3) 家系判別と交配計画の策定

339 SNPs の情報を用いて稚魚 151 匹の親子判別を実施したところ、親魚が完全に特定された割合は 93.4% (141/151) で、142 個体の母親と 150 個体の父親を同定することができた。集団は 8 家系から構成され、雌親は 5 個体、雄親は 10 個体が家系形成に関与していることが推測された。一方で、集団のうち、ある 1 家系が全体の 70.2% を占めていることがわかった。全長と黒化の表現型ともに家系間で大きな差が見られた。11,418 SNPs の情報を用いて rrBLUP で遺伝率を求めたところ、全長と黒化の遺伝率はそれぞれ約 57% と約 44% と推定された。対照区が全滅したため対照区と比較することはできなかったが、黒化について近交度の上昇を 1% 以内した上で遺伝的獲

得を最大化する交配計画を検討したところ、育種価の集団平均が 0.010 から次世代では-1.579 に改善することが期待された（黒化の割合なのでマイナスの値で改善している）。

以上のように、一般的な育種目標形質である成長に関わる全長などの形質とともに、ヒラメ・カレイ類において生産コストを削減するために必要な高密度という高ストレス飼育環境下にさらされ出現する形態異常である黒化についても選抜育種で改善できる可能性が示唆された。今後、交配計画で同定された特定の親魚候補同士を掛け合わせ、実際に狙った個体から子孫を作出し、実際に形態異常が軽減することを確認する必要がある。

#### <引用文献>

Tsuji, M. et al. (2013) Effect of temperature on survival, growth and malformation of cultured larvae and juveniles of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Sci*, 80, 69-81

Uji, S. et al. (2015). Effect of temperature, hypoxia and disinfection with ozonated seawater during somitogenesis on muscular development of the trunk in larval seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquac Res*, 46(11), 2698-2706. doi:10.1111/are.12425

Tsuji, M. et al. (2016). Promotion of initial swim bladder inflation and effect of initial inflation failure on skeletal malformation in cultured seven-band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquac Res*, 47(6), 1954-1971. doi:10.1111/are.12652,

Nguyen N.H. et al. (2016) Quantitative genetic properties of four measures of deformity in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833, *Journal of Fish Diseases*, 39: 217-228

Kolstad K. et al. (2006) Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway, *Aquaculture*, 259: 66-73

Gjerde B. et al. (2005) Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, 244: 77-87

Karahan B. et al. (2013) Heritabilities and correlations of deformities and growth-related traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) in four different sites, *Aquaculture Research*, 44: 289-299

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤雄大、横井勇人、宇治督、鈴木徹
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析により明らかになったササウシノシタの変態に伴う遺伝子発現プロファイルの変化
3. 学会等名 令和元年日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤航大、宇治督、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 ササウシノシタ仔魚におけるSox10陽性-色素前駆細胞の分布とWntアンタゴニストの影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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