

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02279

研究課題名(和文) 過度な選抜を可能とする養殖魚の新規選抜育種法の開発

研究課題名(英文) Development of a new breeding strategy which enables intensive selection in aquaculture

研究代表者

細谷 将 (Hosoya, Sho)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60526466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚類のゲノムから遺伝子に対する非同義置換と超保存領域に注目して、魚類ゲノムから有害変異を検出する手法の開発をマサバをモデルに試みた。まず、マサバの染色体レベルのゲノム配列を得て遺伝子注釈を行った。このゲノム配列を用いて野生集団を用いてマサバゲノム中の多型を検出した。これらの多型に対して、SNPeffを用いた有害変異の推定を完了する計画であったが、マサバ類の不漁などにより解析が遅れたため、有害変異の推定を実施中である。また、超保存領域上の変異の有害性推定を試みている。当初の計画に比べ参照配列が利用可能な魚種が大幅に増え、想定以上の配列解析が必要となったため、完了には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選抜育種において過度な選抜は禁忌とされるが、産業的には短期的な収益が得られる過度な選抜を伴う新規選抜法の開発への要望が強い。その実現には、集団中から有害変異を持つ個体を除去する必要がある。本研究では、ゲノミックセレクション法と強有害変異を持つ個体の除去を同時に行う養殖魚の新規近交系選抜育種法の開発に取り組む。この手法が確立すれば、短期間で収益を上げられるような小規模な選抜育種が可能となる。また、企業間で遺伝資源の交換を行うことで継続的な改良も可能になると期待される。さらに、ゲノム中の有害変異の特定は野生集団の遺伝的健全性の評価を可能にすることから、資源動態の将来予測も可能にできると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to develop a method for detecting deleterious mutations in fish genomes using the chub mackerel (*Scomber japonicus*) as a model. To identify nonsynonymous substitutions that are potentially deleterious, we constructed a de novo T2T level genome assembly of chub mackerel with gene functional annotation. Using this genome sequence, we have detected polymorphisms in wild chum mackerel individuals. We are now identifying deleterious non-synonymous mutations using SNPeff. The analysis has been delayed due to low commercial catches of the species and other factors.

We are also attempting to estimate the deleterious effects of mutations in the ultra-conserved region within body fish (i.e., Actinopterygii). The number of fish species for which reference sequences are available has increased significantly compared to the original plan, requiring more sequence analysis than expected, so the project has not been completed.

研究分野：魚類遺伝育種学

キーワード：選抜育種 海産魚 ゲノム比較 超保存領域 ゲノム編集 有害変異 ゲノミックセレクション

### 1. 研究開始当初の背景

選抜育種においては継続的に遺伝的改良を行うために過度な選抜や近親交配を避けることがセオリーである (Hosoya et al, BMC Res. Notes, 2018 など)。特に、近交が進むことによって生じる、選抜対象ではない形質に悪影響を及ぼす有害変異の頻度上昇が問題視される。例えば、現在の最先端技術とされる選抜育種法はゲノミックセレクション法 (Meuwissen et al. Genetics, 2001) であっても、過度な選抜にともなう有害変異の頻度上昇をコントロールすることはできず、近交弱勢の悪影響は避けられない。そのため、選抜育種では世代毎に 50~100 個体以上の親魚を用いて血縁の遠い個体同士を交配して少しずつ改良していくことが望ましいとされてきた。しかし、親魚候補にはさらにその数倍の個体が要求されることになり、親魚の維持管理に多大な労力とコストが要求されるうえに、世代あたりの改良量が小さいため、収益を得るまでに時間がかかる。最近注目を浴びているゲノム編集であっても、有害変異の蓄積による集団の崩壊には注意が必要で、相当数の (遺伝的に多様な) 個体群に対して編集をかける必要がある。

一方で、生産現場からは短期間で効率よく収益を上げるために過度な選抜を可能にする新技術の開発が強く求められている。しかし、今のところそのような技術は無い。それは、過度な選抜で生じる近交弱勢の分子の実体である有害変異がどこにあるか不明だからだ。逆に言えば、養殖対象魚が持つ「有害変異の染色体上の数、位置、影響力」が明らかになれば、少数のエリート個体の中からさらに有害変異の影響がより少ない個体を選抜して利用するような近交系選抜育種法の確立が可能となる。このような手法であれば、ゲノム編集育種にも応用可能で、少数の親魚群で系統を固定できるようになり、作業効率を劇的に改善できる。

### 2. 研究の目的

選抜育種技術は、集団遺伝学を取り入れて近代化して以降のおよそ 100 年間、「過度な選抜を行わない」ことをセオリーとしてきた。そのために多数の親個体を抱えながらも、世代毎に少しずつしか選抜を進められなかった。このことは産業的には大きなデメリットである。一方で、本研究が提案する新規近交系選抜育種法は、「有害変異を多く持つ個体を狙って除去することで過度な選抜を可能にする」という逆転的発想に基づいており、短期間で収益が得られる育種系統を安定的に作り出す画期的な手法と言える。

本研究で中核となる課題は、「養殖対象魚の全染色体配列の中から有害変異を網羅的に検出すること」である。有害変異の検出には主に遺伝子注釈 (アノテーション) 情報が利用されてきた。すなわち、アミノ酸置換や構造変化など異常タンパク質の原因となり得る有害な配列変異をコードベースで推定する方法である。変異の有害性は終止コドンの出現やタンパク質の機能・構造の変化などへの影響力で評価できる。コード領域を正確に特定する遺伝子注釈作業は非モデル生物においては未だに容易ではないものの、この方法は直感的であり利用しやすい。しかし、コード領域以外の変異を取り扱えない。これに対して本研究では、種間で広く保存されている超保存領域上の変異 (van Oosterhout, Nature Ecol. Evol., 2020) にも注目することで、この問題を解消する

生物の染色体配列には種間で広く保存されている領域があり、超保存領域 (ultra-conserved elements/regions) と呼ばれる。この領域はコード領域とは限らないが、進化上の制約を受けている領域で、そこに生じた変異は有害であると考えられており、一部はゲノム編集で有害性が実証されている (Dickel et al. Cell, 2018)。超保存領域にある変異の有害性は配列の保存性の高さ (保存されている種数) によって推定できる。これを利用することで、各親魚候補について有害変異の負荷を評価できる。コード領域を含め、親魚に有害変異の負荷がより少ない個体を用いれば、過度な選抜を伴う近交系選抜育種が可能になる。魚類 (真骨魚) においても多くの種で全染色体の概要塩基配列が登録されており、これから概要配列を決定しようという種でも、現在の塩基配列決定技術があれば、超保存領域を特定できると期待される。これまで、魚類の超保存領域に関する研究は、一部のモデル魚とヒトなどの脊椎動物との比較 (比較ゲノム学) が中心であった。本研究は非モデル魚も対象として超保存領域を解析して魚類の有害変異を全染色体レベルで評価する初めての試みであり、さらに養殖業に応用しようとする点で独自性が強い研究と言える。また、本研究で有害変異の検出方法が確立すれば、野生集団の保全への応用も可能であり、他分野へのインパクトも大きいと期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、マサバをモデルとした「新規近交系選抜育種法」の確立を最終目標とし、まず、真骨魚の全染色体配列の中から有害変異を網羅的に検出する手法の確立を目指す。最初に、マサバについて高品質なゲノム情報 (染色体レベルに整序化された参照配列と遺伝子注釈情報) を整備したうえで、本種の野生集団がもつ種内変異の有害性を評価する。なお、マサバをモデルとするのは、本種が鯖缶ブームなどで需要が高まっている新規養殖対象種であること、本種の養殖研

究のためにゲノム情報の整備が望まれていることが主な理由である。

マサバのゲノム情報整備について、参照配列の構築には長鎖型シーケンサー（REVI0）で得られた正確性の高い長鎖配列情報と Omni-C による近接ライゲーション法で得られた情報を利用した。解析にはまず、HiFiams を用いて Hi-C ガイド有りの条件で 1 対の haploid contig を得た。この contig を 3D-DNA を用いて haploid 毎に superscaffolding した。遺伝子注釈は、複数の器官・組織を RNA-seq に付して得た mRNA を利用して行った。解析には、BREAKER3 を用いた。

超保存領域の探索には、マサバに加えて、条鰭類の中ですでに高品質なゲノム情報が整備されている魚種の参照配列を公共データベース（NCBI）から取得し、van der Valk et al. (bioRxiv, 2019)の方法に倣って魚種間で塩基配列の相同性を比較する。2 種以上で塩基配列が数十塩基に渡って一致する超保存領域をリストアップする。

別途、マサバ野生集団を対象に種内変異を同定する。このとき、有害性の強い変異は頻度が低いと予想されるところから、複数地域に由来する合計 100 個体以上の大量個体を用いる。全塩基配列情報は短鎖型シーケンサーで取得（リシーケンス）する。得られた配列から定法に従って変異を抽出して SNP や 10 bp 以下の短い挿入/欠失（In/Del）をリストアップする。これらの配列変異について遺伝子注釈と超保存領域の位置情報をもとに SNPeff を用いて有害性を評価する。

ここまでの研究で、真骨魚に見られる超保存領域の特性を明らかにするとともに、有害変異の網羅的な解析手法を確立する。次に、ゲノミックセレクション法と強有害変異を持つ個体の除去を同時に行える新規選抜育種法の確立を目指す。具体的には、有害変異の数や位置などの情報を再現するシミュレーションデータを作成して、ゲノミックセレクション法による優良個体の選抜と有害変異を多く保因する個体の除去とを同時に行う近交系選抜育種法を確立する。

#### 4. 研究成果

マサバの遺伝子注釈済み参照配列を構築した。課題期間中に高性能の長鎖型シーケンサー（PacBio REVI0）が利用可能となったことから、当初期待していたよりも完成度が高い参照配列が得られた。例えば、同期中に外国のチームが NCBI 上でマサバの参照配列を公開したが、この参照配列はこれまでに公開された他の魚類ゲノムに対して比較的完成度が高いものではあったが、染色体末端の情報は得られていなかった。それに比べて本課題で構築した参照配列は多くの染色体（24 本中 20 本）において両端にテロメア配列を同定できており、いわゆる T2T（telomere-to-telomere）レベルのもので、極めて完成度の高いものであった。また、これまで一般的に半数体でしか連続性の高い配列情報が得られなかったのに対して、本課題で構築した参照配列は、2 倍体として配列情報が得られた。すなわち、各染色体の相同染色体のそれぞれについて、T2T レベルの配列情報が得られた極めて完成度の高いものであった（図 1 と表 1）。なお、参照配列の構築過程においては 3D-DNA による superscaffolding のパラメーター設定をチューニングして明白なスキヤッフオールディングミスがないことを確認している（図 2）。

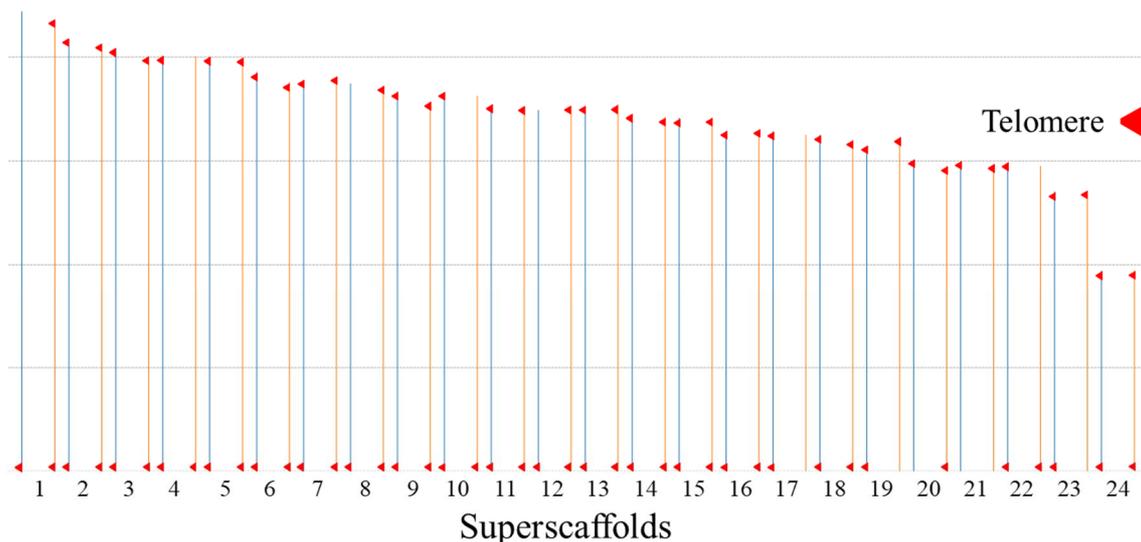


図 1 マサバのゲノム参照配列において染色体末端に特定できたテロメア配列の位置。この図では、既報の核型との対応が取れていないため「染色体」ではなく「Superscaffolds」とした。

表1 マサバ参照配列の完成度

Genomes	Hap1	Hap2
Length (Mb)	838	832
Total scaffolds	29	27
Superscaffolds	24	24
N50 (Mb)	35	35.5
Max size (Mb)	47	43
BUSCO completeness	98.2%	98.2%

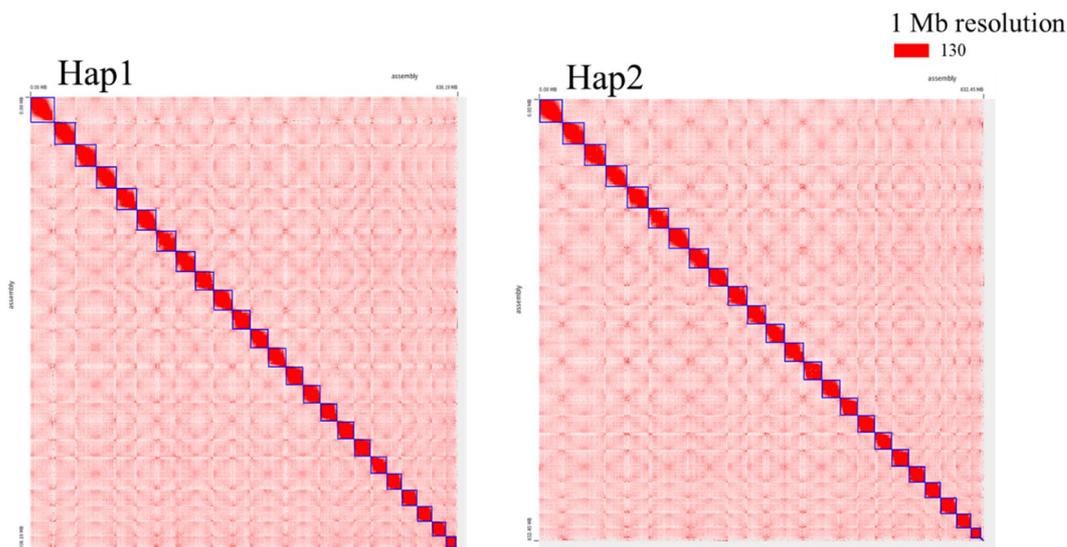


図2. 3D-DNA を用いたスキャフォールディングの結果

野性マサバ集団を用いた多型解析については、マサバ類の不漁などにより全体として計画が遅れたものの、日本海側と太平洋側を含む4集団からそれぞれ60~120個体のサンプルを収集した。これらのサンプルから定法に従ってゲノムDNAを取得し、TWIST BioScience社の96-plex library kitを用いてシーケンスライブラリーを作製して低被覆深度ゲノムワイドリシーケンスデータを取得した。シーケンスにはIllumina NovaSeq6000を用いた。得られたシーケンスリードを先述のマサバ参照配列にマッピングしてゲノムワイドな多型情報を得た。研究期間中には終わらなかったが、現在、SNPeffを用いた有害変異の推定を進めている。

また、条鰭類ゲノム中の超保存領域の特定については、計画当初ではゲノム情報が高度に整備されている魚種は8種程度であったのに対し、近年のゲノム解析技術の向上や複数国で進められている全ゲノム解析プロジェクトの成果により100種以上の参照配列が利用可能になっている。この想定以上に大量の配列解析を行う必要が生じたため、完了には至っていない。これらの参照配列の質を見極めつつ、魚種を選定し直して、超保存領域の特定にあたる。保存領域上の変異の有害性についての推定が完了次第、マサバの集団データをもとに本種の有害変異の蓄積状況を解析する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hosoya Sho, Yoshikawa Sota, Sato Mana, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic prediction for testes weight of the tiger pufferfish, Takifugu rubripes, using medium to low density SNPs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99829-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lin Zijie, Yoshikawa Sota, Hamasaki Masaomi, Kikuchi Kiyoshi, Hosoya Sho	4. 巻 588
2. 論文標題 Heritability and predictive ability for the heterobothriosis resistance and growth performance in the tiger pufferfish Takifugu rubripes fed standard or low fishmeal diets	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 740909 ~ 740909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2024.740909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 細谷将	4. 巻 90
2. 論文標題 養殖魚のゲノム選抜育種に関する研究	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本水産学会誌	6. 最初と最後の頁 208 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2331/suisan.WA3126	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 細谷将	4. 巻 26
2. 論文標題 養殖魚におけるゲノム選抜育種法：その理論と実践	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アクアネット	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 細谷将	4. 巻 臨時増刊号
2. 論文標題 選抜育種の発展とゲノム情報を利用した水産育種の世界的動向	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 養殖ビジネス. 「イチから学ぶ種苗生産と遺伝的改良」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 菊池潔, 細谷将	4. 巻 臨時増刊号
2. 論文標題 選抜育種における基礎集団の作り方 アトランとティラピアに学ぶ	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 養殖ビジネス. 臨時増刊号. 「イチから学ぶ種苗生産と遺伝的改良」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 菊池潔, 細谷将, Khanam Taslima	4. 巻 臨時増刊号
2. 論文標題 養殖における性決定遺伝子情報の利用 全雌、全雄、そして選抜育種	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 養殖ビジネス. 臨時増刊号. 「イチから学ぶ種苗生産と遺伝的改良」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kabir, A., Kikuchi, K. Hosoya, A.
2. 発表標題 Stepwise expansion of the nonrecombining region on sex chromosomes through accumulation of chromosomal inversions in <i>Scomber japonicus</i>
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kabir, A., Kikuchi, K. Hosoya, A.
2. 発表標題 Toward the construction of T2T representative haplotype-resolved reference assemblies of <i>Scomber japonicus</i>
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 細谷将・矢澤良輔・金子智美・菊池潔
2. 発表標題 低深度ゲノムワイドリシーケンスによるGBS 解析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇治督・佐野 菜採・安池元重・中村洋路・關野正志・細谷将
2. 発表標題 スジアラ <i>Plectropomus leopardus</i> 連鎖地図の作製
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kabir A., Ieda R., Hosoya S., Fujikawa D., Atsumi K., Tajima S., Nozawa A., Hirase S., Koyama T., Nakamura O., Kadota M., Nishimura O., Kuraku S., Nakamura Y., Kobayashi H., Toyoda A., Tasumi S., Kikuchi K.
2. 発表標題 Repeated translocation of a supergene underlying rapid sex chromosome turnover.
3. 学会等名 Evolution meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細谷将・谷怜央人・矢澤良輔・吉崎悟朗・菊池潔.
2. 発表標題 マサバのドラフトゲノムと連鎖地図.
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kabir A., Kikuchi K., Hosoya S.
2. 発表標題 2.Kabir A., Kikuchi K., Hosoya S. 2022. A jumping sex-determining locus drove rapid turnover of sex chromosomes in Takifugu pufferfish.
3. 学会等名 XIV International Symposium on Genetics in Aquaculture (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	矢澤 良輔  (Yazawa Ryosuke)  (70625863)	東京海洋大学・学術研究院・准教授    (12614)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	K a b i r A h a m m a d  (Kabir Ahammad)	東京大学・農学生命科学研究科附属水産実験所・特任研究員          (12601)	

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