

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580196

研究課題名（和文） 複数疾病耐病性系統作出のためのゲノム育種技術開発

研究課題名（英文） Development of genetic breeding technology for double disease resistant strains

研究代表者 坂本 崇（SAKAMOTO TAKASHI）

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：40313390

研究成果の概要（和文）：ビブリオ病人為感染実験を行った解析家系のアユ（死亡魚 51 尾・生残魚 43 尾：合計 94 尾）の DNA を用いて、耐病性遺伝子座の遺伝効果ならびに遺伝子座位の推定を行った。その結果、アユ連鎖群 18 上の遺伝マーカーで、ビブリオ病耐病遺伝子座と関連性を明らかにした（LOD スコア：3.12, $p < 0.001$ ）。LOD スコアのピークに近い遺伝マーカーは表現型分散の 14% を説明可能であった。

研究成果の概要（英文）：We performed QTL analysis for disease resistant trait against *Vibrio anguillarum* (PH-0301) in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) using microsatellite DNA markers. We identified the locus associated with the disease resistant trait on linkage group (LG) 18 in this species (LOD score : 3.12, $p < 0.001$). On LG18, a microsatellite marker explained 14 % of the total phenotypic variation in the 94 individuals screened.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：アユ、耐病性、連鎖解析、マッピング、マーカー選抜育種、MAS、育種、魚類、QTL 解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究背景

アユビブリオ病は 1960 年代から 1980 年代にかけて流行し、養殖業に壊滅的な被害を与えた。本病は *Vibrio anguillarum* を原因とする細菌性疾病で、稚アユから成魚までのすべての発育段階で発生する。また伝染性が強く、短期間に甚大な被害を与える。現在、アユ養殖においては魚病被害が問題となって

おり、高い死亡率を伴う疾病の発生は養殖業に致命的な被害を与えることから、その対策が急務となっている。

水産育種において従来の表現型に基づく選抜育種方法では、優良形質の遺伝的固定を近交化により行うため、継代飼育を続ければ近交弱勢が起こり、優良形質を遺伝的に固定した品種を安定維持することが困難となる。従来の選抜育種法では、優良形質の遺伝的固

定と、近交弱勢を避けるための遺伝的多様性維持との相反する困難な課題に直面している。また、ひとたび優良選抜家系を事故で失えば、新たに何世代にもわたって選抜を行わなければならない、多大なコストと年月が必要になる。これらの課題を解決するために、優良形質を識別可能な遺伝マーカーを用いたマーカー選抜育種技術（ゲノム育種法）の研究が行われている。その優良形質識別マーカーを用いて、天然、養殖集団から優良形質を持つ個体を遺伝的マーカーにより選抜でき、さらに、優良家系の遺伝的多様性をモニタリングしながら、優良形質を担う遺伝子座のみを固定することが可能となる。また、従来の淘汰・選抜による方法で水産養殖上重要な複数の疾病に対する抵抗性を保持する系統作出を考えた場合、複数の病原体による人為感染実験を繰り返す必要がある。この場合、選抜個体は病原体の保持個体となってしまうこと、選抜母集団に複数の耐病性形質を同時に保持する個体の出現確率の激減などにより、現実的には不可能であると考えられ、これらの課題を打開する新規技術の開発が望まれている。

(2) 研究成果を踏まえた着想に至った経緯

アユ冷水病耐病性形質の研究成果により、耐病性形質を保持する個体を人為感染実験することなく識別可能な遺伝マーカーを開発した。ビブリオ病などの他の細菌性疾病に対する耐病性形質識別マーカーを開発することにより、従来法では実現不可能と考えられる複数の耐病性形質を同時に保持する系統作出が可能になると着想した。

2. 研究の目的

従来法では人為感染実験による個体の生死でのみ選抜が可能だった耐病性形質について、耐病性形質と遺伝的に連鎖する遺伝マーカー（耐病性形質識別マーカー）を単離することにより、人為感染実験を行うことなく各個体の耐病性形質保有の有無を識別する技術を開発し、水産分野において、世界で初めて実用化新系統を作出した（Fuji et al, 2007）。さらに、アユ冷水病においても、本研究の基盤となる新規耐病性系統を作出している。

本研究は、これまでに開発している耐病性形質識別マーカー（冷水病）を利用した系統において、別の疾病（ビブリオ病）に対する耐病性形質識別マーカーを明らかにし、複数の疾病（冷水病とビブリオ病）に対する耐病性形質を保持する新規系統作出技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビブリオ病耐病性形質識別マーカーの

開発

①冷水病耐病性形質を保持したアユをマーカー選抜することが可能であり、海産交配系統（ビブリオ病感受性）と累代系統（ビブリオ病耐病性）の2系統の雌雄を交配したビブリオ病解析用雑種第2代（F₂）家系（家系A）を用いて、ビブリオ病菌を用いた人為感染実験を行い、各個体の耐病性形質（生存もしくは死亡）を評価した。アユ（90尾）の腹腔にビブリオ病菌（PH-301）を 1.10×10^3 CFU/fishとなるように注射し、水温20℃で7日間の流水飼育を行い、死亡数を日別に計測した。

②人為感染実験に用いた解析家系のゲノムDNAを抽出し、マイクロサテライトマーカーを用いて分子遺伝学的データを収集した。使用するマイクロサテライトマーカーは、全ゲノム領域を網羅するようにゲノム地図を参考にして選択して使用し、合計170マーカー座を解析に用いた。

③各個体の耐病性評価データ（生存・死亡）と分子遺伝学的データとを用いて、F₂モデルの連鎖解析を行い、ビブリオ病耐病性形質と関連性のあるマイクロサテライトマーカーを検討した。雄親由来のマーカー型、雌親由来のマーカー型にわけてMap Manager QTXb20を用いて解析を行った。また、両親が同じ遺伝子型の対立遺伝子をヘテロに持つ場合、そのマーカー座はF₂モデルとして扱った。Map Managerのmarker regression testによって各マーカー座でのP valueおよびLODスコアを求めた。marker regression testは単一マーカー座でのP valueを算出するため、多重検定を考慮した2,000回のpermutation testを行い、genome-wideの閾値を設定した。

(2) 別家系を用いたビブリオ病耐病性形質識別マーカーの開発

①海産交配系統と累代系統を複数回交配した2つの家系の雌雄を交配し、新規解析家系（家系B）を作出した。この解析家系のアユ（94尾）の腹腔にビブリオ病菌（PH-301）を 1.58×10^4 CFU/fishとなるように注射し、水温20℃で6日間の流水飼育を行い、死亡数を日別に計測した。感染実験の結果、死亡魚51尾・生残魚43尾で累積死亡率は54.3%となった。死亡魚および生残魚から尾柄部を保存し、DNA抽出に用いた。

②人為感染実験に用いた解析家系のゲノムDNAを抽出し、マイクロサテライトマーカーを用いて分子遺伝学的データを収集した。アユのゲノムを網羅的に解析するため、1次スクリーニングとして、各連鎖群の両端より2座のMSマーカーを選び合計56座のMSマーカーを使用した。

③それぞれのMSマーカーにおける対立遺伝子と表現型の関連性は、2×2分割表の χ^2 検定によって検討した。有意水準は $\alpha = 0.05$

とした。さらに2次スクリーニングとして、 χ^2 検定で有意差があったMSマーカーが属する連鎖群を複数のMSマーカーで解析した。また、遺伝子座の遺伝効果ならびに遺伝子座位の推定は重回帰分析による interval mapping 法を用いた。解析にはソフトウェア Map Manager QTXb20 を使用した (Manly et al., 2001)。permutation test による 2,000 回の並べ替えを行い、chromosome-wide での閾値を設定した。

4. 研究成果

(1) ビブリオ病耐病性形質識別マーカーの開発

感染実験の結果、死亡魚 54 尾・生残魚 36 尾で累積死亡率は 60.0%となった。死亡魚および生残魚から尾柄部を保存し、DNA 抽出に用いた。解析家系において、170 マーカー座のうち 144 マーカー座で多型性がみられた。各個体の耐病性評価データ (生存・死亡) と分子遺伝学的データとを用いて、 F_2 モデルの連鎖解析を行い、ビブリオ病耐病性形質と関連性のあるマイクロサテライトマーカーを検討した結果、雄親由来マーカー型において 4 連鎖群上のマイクロサテライトマーカーで有意差 ($P < 0.05$) が見られ、雌親由来マーカー型において 5 連鎖群上のマイクロサテライトマーカーで有意差 ($P < 0.05$) が見られた。これらは、雄親由来マーカー型でビブリオ病耐病性形質と関連性のあるマイクロサテライトマーカーが存在する 4 連鎖群とは異なる連鎖群だった。またこれらの結果は、 F_2 モデルでの genome-wide の Significant レベルの閾値を超えなかった。そのため、別家系を用いたビブリオ病耐病性形質識別マーカーの開発に取り組んだ。

(2) 別家系を用いたビブリオ病耐病性形質識別マーカーの開発

56 座の MS マーカーによる網羅的な解析の結果、統計的に有意差が認められたマーカーは連鎖群 4、連鎖群 5、連鎖群 18 上に位置していた ($p < 0.05$)。そこで連鎖群 4 では 5 マーカー座、連鎖群 5 では 9 マーカー座、連鎖群 28 では 4 マーカー座を新たに用いて interval mapping を行った。この結果、連鎖群 28 で chromosome wide の Highly significant を超える LOD スコア (3.12) を検出した ($P < 0.001$)。LOD スコアのピークに近い MS マーカーは、表現型分散の 14%を説明可能であった。

(3) まとめ

本研究により、ビブリオ病耐病性形質に関連する遺伝子座はアユの連鎖群 28 上に存在することが明らかとなった。同連鎖群に属する統計的に有意な MS マーカー (仮称:Vibrio-R)

は、ビブリオ病耐病性種苗を作出するための MAS 育種における有力な選抜マーカー候補であると考えられた。

本研究で用いた 2 つの解析家系では、2 家系に共通する耐病性形質と関連する遺伝マーカーは明らかにならなかった。これは、解析家系作出に用いた海産交配系統 (ビブリオ病感受性) と累代系統 (ビブリオ病耐病性) の 2 系統にまだ遺伝的な多様性があったこと、また、ビブリオ病耐病性形質が遺伝的な影響があまり大きくない複数の遺伝子座に支配される量的形質であるために、解析家系にビブリオ病耐病性形質関連遺伝子座が伝達されない親魚が含まれた可能性が考えられた。

今後、他家系での Vibrio-R マーカーの有効性ならびにその MAS 選抜系統の耐病性形質についての検証を行い、さらに、これまでに明らかにしている冷水病耐病性形質識別マーカーと併用することで、複数疾病耐病性系統作出が可能であると考えられた。

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 13 件)

- ① T. Sakamoto, Y. Pan, E. Koshimizu, N. Okamoto, T. Nagai and R. Fuseya: Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in the devil stinger, *Inimicus japonicus*. *Molecular Ecology Resources*. 査読有. 13 (1), 158-159. (2013)
DOI: 10.1111/1755-0998.12035.
- ② R. S. Hattori, Y. Murai, M. Oura, S. Masuda, S. K. Majhi, T. Sakamoto, J. I. Fernandez, G. M. Somoza, M. Yokota and C. A. Strüssmann: A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*. 査読有. 109 (8), 2955-2959. (2012)
DOI: 10.1073/pnas.1018392109.
- ③ R. Fuseya, T. Sakamoto and S. Watanabe: Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from the mud crab (*Scylla serrata*). *Molecular Ecology Resources*. 査読有. 11 (6), 1124-1126. (2012) DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03068.x.
- ④ J. J. Nagler, T. Cavileer, S. Hunter, R. Drew, T. Okutsu, T. Sakamoto and G. Yoshizaki: Non-sex specific genes associated with the secondary mitotic

- period of primordial germ cell proliferation in the gonads of embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*. 査読有. 78(3), 181-187. (2011) DOI: 10.1002/mrd.21277.
- ⑤ S. D. Hwang, K. Fuji, T. Takano, T. Sakamoto, H. Kondo, I. Hirono and T. Aoki: Linkage mapping of Toll-like receptors (TLRs) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology*. 査読有. 13 (6), 1086-1091. (2011) DOI: 10.1007/s10126-011-9371-x.
- ⑥ E. Koshimizu, C. A. Strüssmann, N. Okamoto, H. Fukuda and T. Sakamoto: Construction of a genetic map and development of DNA Markers linked to the sex determining locus in the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Marine Biotechnology*. 査読有. 12 (1), 8-13. (2010) DOI: 10.1007/s10126-009-9194-1.
- ⑦ R. S. Hattori, M. Oura, T. Sakamoto, M. Yokota, S. Watanabe and C. A. Strüssmann: Establishment of a strain inheriting a sex-linked SNP marker in Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*), a species with both genotypic and temperature-dependent sex determination. *Animal Genetics*. 査読有. 41 (1), 81-84. (2010) DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.01948.x.
- ⑧ T. Koyama, S. Asakawa, T. Katagiri, A. Shimizu, F. F. Fagutao, R. Mavichakl, M. D. Santos, K. Fuji, T. Sakamoto, T. Kitakado, H. Kondo, N. Shimizu, T. Aoki and I. Hirono: Hyper-expansion of large DNA segments in the genome of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *BMC Genomics*. 査読有. 11, 141. (2010) DOI: 10.1186/1471-2164-11-141.
- ⑨ K. Niwa, A. Kobiyama and T. Sakamoto: Interspecific hybridization in the haploid blade-forming marine crop *Porphyra* (Bangiales Rhodophyta): occurrence of allopolyploid in the survival F₁ gametophytic blades. *Journal of Phycology*. 査読有. 46, 693-702. (2010) DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00853.x.
- ⑩ K. Niwa and T. Sakamoto: Allopolyploidy in natural and cultivated populations of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 査読有. 46, 1097-1105. (2010) DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00897.x.
- ⑪ A. Ozaki, H. Okamoto, T. Yamada, T. Matuyama, T. Sakai, K. Fuji, T. Sakamoto, N. Okamoto, K. Yoshida, K. Hattori, K. Araki and M. Okauchi: Linkage analysis of resistance to *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 査読有. 308, Supplement 1. S62-S67. (2010) DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.07.039.
- ⑫ K. Fuji, K. Yoshida, K. Hattori, A. Ozaki, K. Araki, M. Okauchi, S. Kubota, N. Okamoto and T. Sakamoto: Identification of the sex-linked locus in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*. 査読有. 308, Supplement 1. S51-S55. (2010) DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.06.035.
- ⑬ C. C. Sanchez, K. Fuji, A. Ozaki, O. Hasegawa, T. Sakamoto, K. Morishima, I. Nakayama, A. Fujiwara, T. Masaoka, H. Okamoto, K. Hayashida, M. Tagami, J. Kawai, Y. Hayashizaki and N. Okamoto: A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *BMC Genomics*. 査読有. 11, 554. (2010) DOI: 10.1186/1471-2164-11-554.
- [学会発表] (計5件)
- ① Takashi Sakamoto: Marker-Assisted Selection in Aquaculture: Strategies and Applications. In “Genetic Improvement of Livestock and Aquatic Animals in the Tropics: Challenge and Reward” (GILAAAT 2012) (招待講演) 2012年09月24日～2012年09月26日 Bangkok, Thailand
- ② 坂本 崇: 養殖魚類における耐病性形質のマーカーアシスト選抜 平成23年度日本水産学会秋季大会 シンポジウム (招待講演) 2012年9月28日 長崎大学 (長崎市)
- ③ 大島晴高・森本昌平・永井崇裕・川口修・飯田悦左・村上啓士・坂本 崇: マーカーアシスト選抜育種法によるアユ冷水病耐性および感受性系統の作出 平成23年度日本水産学会春季大会 2011年3月27日～31日 東京海洋大学 (東京都)
- ④ 中島哲郎・森本昌平・大島晴高・永井崇裕・川口修・飯田悦左・村上啓士・坂本 崇: HiCEP法によるアユ冷水病耐性形質関連遺伝子の単離 平成23年度日本水産学会春季大会 2011年3月27日～31日 東京海洋大学 (東京都)

- ⑤ 松平彩花・輿水江里子・坂本 崇：アユ
MHC クラス I・クラス II 遺伝子のマッピ
ング 第 11 回日本動物遺伝育種学会
2010 年 10 月 6 日 白河市（福島県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 崇 (SAKAMOTO TAKASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：40313390