

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580288

研究課題名(和文) クルマエビの性決定機構の解明

研究課題名(英文) Sex determination mechanism in kuruma prawn

研究代表者

伏屋 玲子 (Fuseya, Reiko)

独立行政法人水産総合研究センター・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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：閉鎖循環型飼育下で、クルマエビの雌1×雄1交配を行い、採卵した受精卵を3等分し、18、24、30の異なる水温で種苗生産を行った。各水温区で性比を調べたところ、高水温では雌が多くなる傾向がみられた。高水温区について、既存のRFLPマーカーで解析を行ったが、本研究で作成した家系では当てはまらなかった。引き続き家系を維持し、検定交雑による確認とマーカー開発を行うこととなった。

副次的成果として、小型(500L)水槽の閉鎖循環型飼育においても交尾が確認されたことは珍しく、また、両親を生かしたまま行う人工交配についても成功した。今後の育種用家系飼育に貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Female 1 x male 1 mating of kuruma prawn has been carried out in a closed circulation breeding. Seed production was performed at three water temperature, 18, 24, 30. The results of the examination of the sex ratio at each water temperature, prawn that has been reared in high water temperature, the tendency that the proportion of females is high is observed. It has been analyzed in existing RFLP markers for prawns of high water temperature rearing, however, it was not the case in strain of this study. Continue to maintain the strain, it is checked by test crossing and the development of new marker. As a secondary outcome, mating was also observed in a small aquarium tank (500L). In addition, we have succeeded in artificial breeding to be carried out while taking advantage of the parents. It was suggested that it can contribute to the strain breeding for future breeding.

研究分野：水産増殖学，集団生物学，集団遺伝学

キーワード：クルマエビ 閉鎖循環型飼育 1×1交配 飼育水温 性比

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。日本において発達したクルマエビの種苗生産技術が現在のアジア地域を中心としたクルマエビ類養殖の発展へと結びついているが、天然での生態の解明や飼育下での採卵コントロールの技術開発はまだ途中の段階である。

クルマエビは雌が脱皮直後の甲殻が柔らかい時に交尾を行い、雄が雌に交尾栓をつけることが繁殖戦略の特徴である。繁殖期間中に雌は脱皮後、交尾、産卵を繰り返し、天然エビでは卵巣内の卵を全部産卵する完全産卵が行われる。一方、養成エビでは天然エビに比べて卵巣の発達が低く、一回の脱皮周期の間に数日間隔で複数回の産卵を行う(伏屋ら, 2006)。また、クルマエビ類などが属する根鰓亜目(クルマエビ亜目)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。

水産生物における性決定には、遺伝的要因により性分化を行う遺伝型性決定 Genetic sex determination (GSD)、環境の影響により性分化を行う環境型性決定 Environmental sex determination (ESD)、その両方の競合により性決定が行われる3つのパターンが存在する。また、社会構造の変化により性転換を行う種も存在する。ESDでは特に温度依存型性決定 Temperature-dependent sex determination (TSD) は有名であり、両生類や爬虫類で孵化期の環境温度によって性が転換することが知られている。魚類でもペヘレイ、ヒラメなどでTSD現象が報告されている。TSDには、低温で高率で雄、高温で高率で雌になる、低温で高率で雌、高温で高率で雄になる、低温と高温で高率で雌、その中間で雄になるものの3種類があり、そのうちについてはTSDを行うワニ、カメ、トカゲなどの爬虫類でみられる。

甲殻類の性決定に関する研究は一部のクルマエビ類において行われている。ウシエビ(ブラックタイガー)ではフィンガープリントタイプの Amplified fragment length polymorphism (AFLP) マーカーによって性決定遺伝子座に完全連鎖した性連鎖マーカーが開発されている(Staelens et al., 2008)。クルマエビでは AFLP マーカーを用いて性決定遺伝子座に連鎖したマーカーが調べられているが、ウシエビほど明確なものではない(Li et al., 2003)。クルマエビの性に完全連鎖する AFLP マーカーが開発されていない理由として、解析サンプル中に ESD 機構

による性転換個体が存在する可能性がある。甲殻類においてこれまでの研究では飼育実験等を用いた ESD 機構の解明は試験されておらず、GSD 現象に関する検証しか行われていない。クルマエビの性決定機構における水温の影響を検討し、ESD および GSD の両側面からクルマエビの性決定機構について解明を行う本研究は、養殖業の効率化に対応した新規の研究展開と言える。

2. 研究の目的

クルマエビは雌雄で成熟サイズが異なり、雌の方が大きくなる。他の甲殻類では産卵時に抱卵するが、クルマエビは受精卵を水中に放出する生態をもつ。これまで申請者が行った成熟・採卵の飼育実験研究により、受精直後の卵を水温コントロールによって、TSD 機構があるかどうかを解明することができると着想した。近年、地球温暖化による影響が危惧されており、水産生物においても気温・水温の上昇によって生物相の変化や変化した環境により生残が低くなっている種類も増えている。クルマエビ養殖は国内でも盛んに行われている。最近では年によって亜熱帯域の沖縄地方と温帯域の西日本産の養殖クルマエビの出荷時期が重なることがあり、温暖化による影響ではないかと考えられている。もし、クルマエビの性を人為的にコントロールすることができれば、種苗生産の初期に温度処理をすることによって、成長が早く出荷サイズの大きな雌を増やすことが期待できるため、効率的な生産向上が見込まれる。

クルマエビ類では性決定機構について GSD 現象からのアプローチは行われているが、飼育試験による ESD の可能性について検証されていない。クルマエビでは性決定遺伝子座に完全連鎖した性連鎖マーカーが開発されていないため、ESD の可能性の可能性もある。そこで、本研究では新しく家系を作出し、異なる水温で飼育すると性に偏りがあるかどうかを調べる。その家系をサンプルとして、既報の性連鎖 AFLP マーカーによる解析を行うと同時に、性決定に関する遺伝マーカーを新たに開発する。以上について検討し、クルマエビの性決定機構について明らかにする。

3. 研究の方法

解析家系を作出するため閉鎖循環飼育下で1×1交配を行い、同じ親の受精卵から異なる水温実験区で種苗生産を行う。親用クルマエビを入手し、陸上水槽で、オス1に対してメス複数個体の組み合わせで1×1交配をおこなう(図1)。

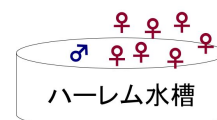


図1 1×1水槽のイメージ

各水温実験区において、外部形態の観察により性が判別できる3～6ヶ月まで飼育を行い、それぞれの性比を調べる。

作成した家系からゲノムDNAを抽出し、既存のAFLPマーカーを用いて解析を行う。作成した家系で性比に偏りのない水温区の個体を用いて、新たにMSマーカーおよびAFLPマーカーを開発する。開発した性連鎖遺伝マーカーを用いて、性比に偏りがみられた実験区の個体のDNAと外部形態の性について検証する。また、作出した解析家系は親とともに飼育を継続し、家系内で交配し、検定交雑を行う。

4. 研究成果

(1) クルマエビの解析家系を作出するため飼育下で1×1交配を行い、同じ親の受精卵から低温～高温の異なる水温実験区で種苗生産を行った。また外部形態から雌雄判別を行い、性比について検討した。家系作成のため、養殖場より体長150～160mmのクルマエビを購入した。当所では掛け流しによる飼育は不可能であるため、閉鎖循環系による飼育環境を整備した。FRP水槽に外部フィルターまたは泡沫分離装置を取り付け、水温は常温とし、エアレーションにより通気を行い、1日おきまたは毎日1/4～1/5の換水を行った。1×1交配家系を作成するためにオス1個体に対し、メスを複数個体入れ、餌として配合飼料(ヒガシマル、ゴールドブロン)を毎日投与した。交尾栓が確認されたメスについてはポリエチレンタンクに隔離し、産卵誘発のために片眼柄処理を施して採卵を行った。同じ1×1交配家系から生まれた受精卵を30、24、18試験区用に3分割し、珪藻およびアルテミア給餌により飼育を行った。飼育水温による成長差が大きく、また18区は成長だけでなく生残が悪かったため、約1ヶ月後に死滅した。30と24試験区を約4ヶ月後に取り上げたところ、30区で144個体、平均体長108.2mm、24区では230個体、平均体長78.1mmであった。形態観察により雌雄判別を行ったところ、オス：メスは30区で0.54：0.46、24区で0.49：0.51となり、どちらも性比は1：1であった。初年度に18区の結果が得られなかったため、新たに家系作成試験を行ったが、水槽内交尾がほとんど確認されず、受精卵をとるまでに時間がかかった。新たに2家系から採卵したところ、18区の幼生は変態が遅れ、エビに変態するために全滅することが明らかになった。そのため、低温区を18から20に変更し、新たな2家系について種苗生産を行った。試験区によって生存個体数が異なり、24区では性比はあまり変わらないが、30区では雌が多い傾向がみられた。家系および水温区ごとに性比が均一(1：1)であるかどうかを調べた結果、すべての試験区において差はみられなかった(χ^2 , n.s.)。

また、各家系の水温区間で、性比が異なるかどうかを調べた結果、すべての試験区において差はみられなかった(χ^2 , n.s.)。

水温が高いとメスが多くなる傾向があったため、両親およびサンプリングした30、24°C区の稚エビからゲノムDNAを抽出し、既存のAFLPマーカーを用いて解析を行った。しかし、一部うまくいかなかったため、原因究明を行ったところ、制限酵素の切断の不十分さであることが判明した。クルマエビDNAは制限酵素による切断が困難であり、並行して予定していた新たなマーカー作成も難航した。研究期間の終わりになったが、本研究で作成した家系をもとに新規マーカーの作成を開始し、将来解析できる可能性が高くなった。水温区試験の家系により、性比の偏りについて傾向があるため、引き続き家系維持を試み、その検定交雑による確認とマーカー開発が期待されることとなった。

本研究の副次的効果として、家系作成の飼育中に小型水槽では難しかった交尾が確認された。また、水槽での自然交配に時間がかかったため、人工交配を試みたところ、掛け合わせたい雌雄の親をどちらも生かしたまま行うことに成功した。クルマエビにおける育種に向け、1×1家系作成ができるようになった。人工交配に関しては、今後のクルマエビ育種試験に貢献できると思われる。

<引用文献>

橋高二郎, 幼生飼育, エビ・カニ類の増養殖-基礎科学と生産技術-(橋高二郎, 隆島史夫, 金澤昭夫編), 恒星社厚生閣, 1996, 136-187.

伏屋玲子, 佐野元彦, 清水弘文, 玉城泉也, 林原毅, 加藤雅也, 人工催熟によるクルマエビの再生産形質について-安定採卵のための催熟条件の検討-, 水産総合研究センター研究報告, 別冊5号, 2006, p.15-20.

Li, Y., K. Byrne, E. Miggiano, V. Whan, S. Moore et al., Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture*, 2003, 219: 143-156.

Staelens J., Rombaut D., Vercauteren I., Argue B., Benzie J. and Vuylsteke M., High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics*, 2008, 179: 917-925.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

[学会発表](計 4件)

伏屋 玲子・坂本 崇, 人工交配によるクルマエビの育種技術開発の試み, 日本水

産学会，2015年03月28日，東京海洋大学
(東京都港区)

伏屋 玲子・安井 理奈・坂本 崇，クルマエビの初期環境水温と性比，日本水産増殖学会，2015年03月18日，広島大学(広島県東広島市)

伏屋 玲子・安井 理奈・坂本 崇，飼育水温によるクルマエビの初期環境水温と性比，日本甲殻類学会，2013年11月30日，かでる27道立道民活動センター(北海道札幌市)

〔図書〕(計 1件)

伏屋 玲子 他，株式会社 T.P.O，クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術，2014，145

6. 研究組織

(1)研究代表者

伏屋 玲子 (FUSEYA, Reiko)

独立行政法人 水産総合研究センター 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)研究分担者

なし

(3)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