

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850134

研究課題名(和文)天然魚からの直接選抜育種

研究課題名(英文)Direct selective breeding from wild fish

研究代表者

細谷 将 (Hosoya, Sho)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60526466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：天然親魚を利用した直接選抜育種の可能性を検討するために、トラフグを用いて、初期の生残率と成長速度、およびヘテロボツリウム症耐性について遺伝の影響を検出した。また、野生集団の連鎖不平衡(LD)ブロックが1kb以内で急速に崩壊することを明らかにした。これらの結果から、本種は選抜育種による養殖集団の飛躍的な遺伝的改善が期待できるが、天然親魚を利用した直接選抜育種を行うには300KSNPが必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To test the possibility of direct selective breeding using wild parents for aquaculture, I have investigated and detected genetic effects of fugu *Takifugu rubripes* in the early mortality and growth rate and the resistance against monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi*. Additionally, I have revealed that linkage disequilibrium rapidly collapse within 1kb. These results suggest large genetic improvement by means of selective breeding can be expected for fugu and direct selection on wild fugu requires SNP chip as large as 300k.

研究分野：水産増養殖学

キーワード：トラフグ 選抜育種 生残 成長 寄生虫耐性

### 1. 研究開始当初の背景

海面養殖業の生産量の増加率が他の畜産物に比べて高いと言う事実は、海面養殖の重要性を明示している。しかし、海産魚養殖の歴史は浅く、育種も進んでいない。革新的な育種法の導入により生産効率を上げることが出来れば、さらなる生産量の増加が見込める。育種は選抜などによって成長が良い、病気に強いなど有用形質が固定された系統を作出することであるが、これまで系統の作出には何十世代にも渡る選抜を繰り返す必要があった。一方、近年では遺伝子の情報を利用する「マーカーアシスト選抜(MAS)」が開発されたことで、最短3世代で系統を固定できるようになった。この方法は注目する形質に対して影響力のある領域(マーカー座)を全ゲノム中から連鎖解析で同定し、そのマーカー座を選抜の対象とする。MASは、常に「ばらつき」を伴う有用形質の値そのものではなく、その形質に影響を持つ遺伝子配列の多型を選抜の対象とするため非常に効率が良い。しかし、連鎖解析では影響力を持つマーカー座の全てを検出することは出来ないという問題点もある。

申請者はこれまでに、体長が70cmに達するトラフグと20cm程度にしか成長しないクサフグについて、連鎖解析で見つけた体長の種間差を生み出すマーカー座を報告した。具体的には、両種の雑種第2世代を作出し、全ゲノムを網羅するマイクロサテライトマーカーを使って量的遺伝子座解析を行った。しかし、中程度の影響力を持つ遺伝子座を1つ見つけたに過ぎなかった。これほど体長に著しい差のある両種でも、その差の大部分は連鎖解析で検出できないほど効果が小さい無数の遺伝子群の影響下にあるということである。これらの検出されない遺伝子群はMASでは選抜の対象とならない。すなわち、体サイズのように多くの遺伝子が関係する形質では、せつかく系統を作出しても、MASで得られる効果は限定的になる。

以上のように、世代を重ねた系統作出を行って育種するには時間がかかり、MASですら効率が良いとは限らない。そこで、申請者は、「ゲノミックセレクション(GS)」を応用することで、従来のように数世代に渡る系統作出を経ずに、野生個体からいきなり親魚を得る方法を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究はトラフグを材料として、GSを応用した天然魚から親魚を直接選抜するための基礎データ、すなわち、形質予測モデルの構築と予測精度を高めるための条件検討に必要なデータを得ることを目的とする。対象形質は初期の成長速度および寄生虫(ヘテロボツリウム)症耐性とする。

### 3. 研究の方法

従来のように数世代に渡る系統作出を経

ずに、野生個体からいきなり親魚を得る方法として、ゲノミックセレクションの可能性を飼育実験とゲノム解析から検討した。

#### (1) 飼育実験

これまで魚類の遺伝学は主に淡水魚が扱われてきた。淡水魚は地域的な分集団が存在するため集団間で遺伝的多様性に富み、質的な差が大きいことが知られている。一方で、トラフグを含む海産魚はランダム交配が続いており遺伝的に均一であると考えられており、また同じような選択圧が掛かっていることから、野生個体の中で質的な差が見つかるのかは不明であった。そこで、以下の2つの飼育実験を行った。

実験1: 初年度に、オス4個体とメス5個体を交配して得た集団を利用して、まず、初期の生残率と成長に対する、親魚に由来する遺伝の実効的影響の評価方法の確立と評価を行った。ただし、これらの形質については、卵質の影響が大きいことから、メス親由来の母性効果を排除する必要がある。そこで、メス親の遺伝的影響の評価は行わず、同一メス由来の半同胞4家系のみを同数ずつプールした集団を用いて、オス親の遺伝的影響のみを評価することとした。各半同胞家系につき、3回の実験を行った(図1)。

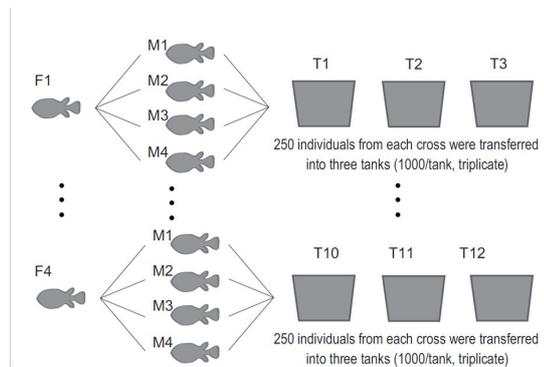


図1. 飼育方法。メス親1に対してオス親4個体を交配した半同胞4家系を同数ずつプールした水槽を3水槽ずつ用意し、初期の生残と成長に関するオス親の遺伝的影響力を評価した。

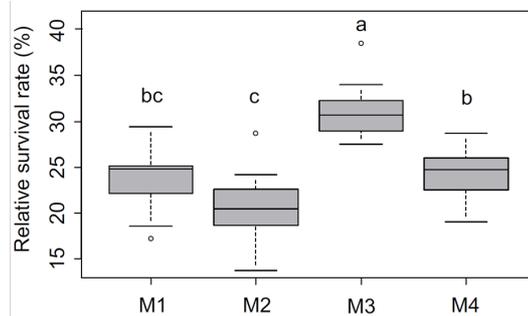


図2. オス親間における相対的生残率の比較。箱の下辺と上辺はそれぞれ第1四分位と第3四分位を、箱の中の横線は中央値を、○は外れ値を表す。また、英文字は文字を共有しない群間に有意差( $P > 0.05$ )があることを示す。

その結果、水槽間で生残率の差が大きく、遺伝的要因を検出することが出来なかった。そこで、タンク内で相対値を取ってみると、4 個体のオス個体の間に子の生残率と成長に対する遺伝的な差が検出された(図2)。このことは、海産魚でも野生個体は表現型の多様性に富んでいることが示しており、トラフグでも高い選抜効率が得られることが示唆された。ただし、水槽間のばらつきも大きく、遺伝率の推定はできなかった。また、体長は生残率と強い相関関係にあり、同様の結果が得られた(図表無し)。

実験 2: 次に、寄生虫耐性に関する遺伝の影響を評価するため、*Heterobothrium okamotoi* を用いた感染実験を行った。本実験では、オス 10 個体とメス 1 個体を交配して得た半同胞 10 家系からなる集団を用いた。各家系を個別に飼育し、体長がおよそ 8cm に達したところに 2 つの水槽で全家系を混ぜた。飼育尾数はそれぞれ 25 尾/家系(250 尾/水槽) 15 尾/家系(150 尾/水槽)であった。混養開始翌日に各水槽に 50 虫体/尾となるように、*H. okamotoi* の onchomiracidium 幼生に曝露した。曝露 3 時間後に別水槽に移し替え、3 週間後に全個体から鰓を採取してホルマリン固定し、定法に従って着底虫体数を計数した。2 水槽の実験は別実に行ったため *H. okamotoi* のロットが異なる。そこで、オス親による遺伝的要因に加えて水槽による環境要因も変量効果とした変量モデルを用いてオス親の影響力を評価した。

その結果、オス親間で子の鰓弁上の着底虫体数に大きな差が認められた(図3)。集団全体における着底数の平均値の推定値は 22 虫体で、着底虫体数が最も多かった 1 と最も少なかった 10 の育種価はそれぞれ 8 と -7 で虫体であった。寄生虫耐性の遺伝率の推定値は 0.22 と中程度の値を示し、選抜育種の効果は小さくないことが予想された。

以上の通り、天然親魚を用いた飼育実験により、初期の生残率と成長速度、およびヘテ

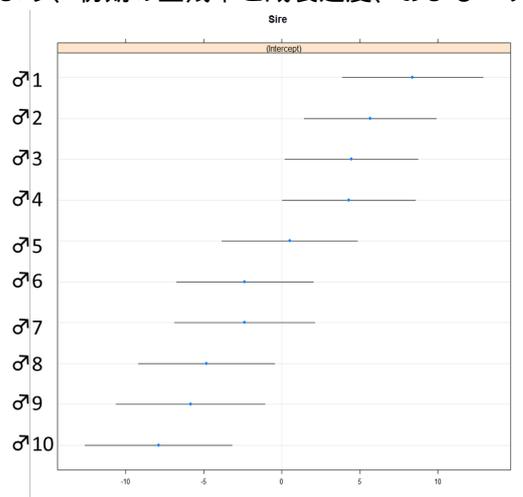


図3. オス親間における着底虫体数の育種価とその分布の予測結果。プロットは各親の育種価、バーは分散を示す。

ロポリウム症耐性について野生個体の間で質的な差が認められること、また、これらの形質がある程度遺伝することが明らかになった。

## (2) ゲノム解析

本課題の実施中に、トラフグの性決定領域周辺で連鎖不平衡(LD)ブロックが極めて小さいことが明らかとなってきた。ゲノミックセレクションによる選抜を行うには、より多くの LD ブロックをカバーできるような数の SNP が必要になる。そこで、別途、全ゲノムリシーケンスを行い、全ゲノムレベルで連鎖不平衡状態を調べた。解析には、日本海集団(福井県産)と太平洋集団(愛知県産)それぞれ 10 個体を用いた。また、シーケンスは 100bp の Paired-end、被覆率が 10 倍程度になる条件で HiSeq2000 を用いて行った。得られたリードをトラフグゲノム概要配列にマッピングして、SAMtools/GATK パイプラインで変異解析を行った。

その結果、1 個体あたり平均 42.6M リード、被覆率は平均 11.4 倍のシーケンスデータが得られた。変異解析の結果、1 個体あたりの SNP は平均 67 万サイト、SNP 頻度は 485bp/SNP であった。また、LD 解析の結果、強い LD 状態を形成している領域は全染色体上で 3000 ヶ所程度が見つかったが、その 9 割が 1kb 未満であり、50kb を超えるサイズの LD は福井では 4 ヶ所、愛知では 12 ヶ所しかなく、両集団ともゲノム全体渡って極めて小さい LD ブロックしかないことが明らかとなった。また、LD ブロックは急速に崩壊し、1kb 程度で  $r^2$  値が 0.2 程度まで低下することも明らかになった(図4)。ゲノミックセレクションには  $r^2=0.2$  程度の LD をカバーしている必要があると言われている。本結果をもとにすると、本種で天然魚から GS による直接選抜を行うには、1kb に 1 つ程度の SNP が必要となり、そのゲノムサイズが 400Mbp 程度であることを考慮すると、400k サイズの SNP が必要であると言えた。

## 4. 研究成果

本研究の結果から、トラフグの野生個体は遺伝的多様性に富み、選抜育種による養殖集

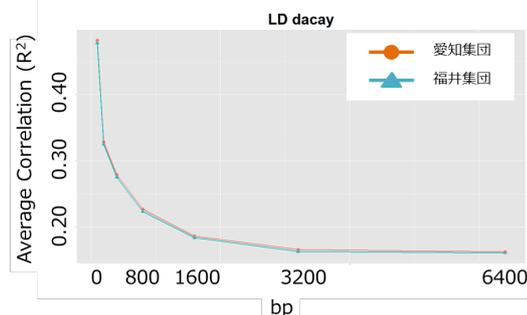


図4. 野生トラフグの全ゲノムレベルにおけるLD崩壊の様子。横軸と縦軸はそれぞれ、同一染色体上の2SNP間の距離、LDの強さの平均を示す。1kb程度でLDが急速に崩壊しているのが分かる。

団の飛躍的な遺伝的改善が期待された。しかしながら、野生魚の LD ブロックが極めて小さいことから、天然親魚を利用した直接選抜育種は困難であることも明らかとなった。したがって、選抜育種を行うには、最初に数世代の任意交配、あるいは家系ベースの育種価を利用した緩い選抜を行って、LD ブロックをある程度拡大したうえで GS を行うことが有効であると言えた。

#### 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 2 件)

1. Hosoya, S., Mizono, N., Kikuchi, K., Kurokura, H. (2014) Rearing Takifugu rubripes larvae in communal tanks: paternal genetic contribution to survivability. Fish. Sci. 80, 1037-1043.
2. 細谷将, 水野直樹, 城夕香, 藤田真志, 鈴木謙, 菊池潔 (2015) トラフグ凍結精子の家庭用冷蔵庫での二次保存. 水産技術 7, 85-88.

[学会発表](計 5 件)

1. Hosoya S., Kobayashi H, Kikuchi K. GENOMIC SIMILARITY AMONG Takifugu SPECIES. The International Symposium on Genetics in Aquaculture XII. June 2015. Santiago de Compostela (Spain).
2. 松永亮平・細谷将・菊池潔・田角聡志. Heterobothrium okamotoi の宿主特異性に寄与する因子の同定へ向けた研究 ~クサフグとトラフグへの感染成立機序の精査~. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 2016 年 3 月. 東京海洋大学(品川).
3. 細谷将・田角聡志・菊池潔. 全ゲノムリシークエンスによるトラフグの集団間比較-日本海 vs. 太平洋-. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会. 東北大学(仙台).
4. 細谷将・水野直樹・菊池潔・黒倉壽. 養殖トラフグの生残率に対する遺伝の実効的影響. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学(品川).
5. 水野直樹・細谷将・城夕香・藤田真志・菊池潔. トラフグ凍結精子における家庭用冷蔵庫での二次保存. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学(品川).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)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・助教

研究者番号: 60526466

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: