

委託プロジェクト研究推進事業

「養殖ブリ類の輸出促進のための低コスト・安定生産技術の開発」

最終年度報告書

中課題番号	14525321
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発

研究実施期間	平成26年度～平成30年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構
研究開発責任者	鈴木 俊哉
研究開発責任者 連絡先	TEL : 099-472-0730
	FAX : 099-472-1544
	E-mail : suzukit@affrc.go.jp
共同研究機関	国立大学法人 東京海洋大学学術研究院
	マルハニチロ株式会社
	株式会社アクアファーム
	株式会社桜島養魚
	有限会社奄美養魚
普及・実用化 支援組織	



I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	水産研究・教育機構		◎薄 浩則 (～2018.3) ◎鈴木俊哉 (2018.4～) ○吉田一範
1. ブリの病害虫耐性品種(家系)の作出と養殖適性の実証  (1) ブリのゲノム解析による新たなSNPの同定とハダムシ抵抗性領域の詳細化	水産研究・教育機構	増養殖研究所育種研究センター	△坂本 崇 中本正俊 名古屋博之 (～2016.3) 岡本裕之 荒木和男 嶋田幸典 山口寿哉 井上誠章 (～2017.3) 石川 卓(2015.2～) 吉田一範 島 康洋(～2015.3) 藤浪祐一郎(2015.4～) 堀田卓朗 野田 勉 秋田一樹 (2017.4～) 水落裕貴(～2016.9) 篠田理仁(2016.10～) 中条太郎 △吉田一範  島 康洋(～2015.3) 野田 勉 秋田一樹 (2017.4～) 堀田卓朗 水落裕貴(～2016.9) 篠田理仁(2016.10～) 中条太郎 藤浪祐一郎(2015.4～) 青野英明(～2016.3) 吉村 拓(2016.4～) 虫明敬一(～2016.3) 薄 浩則 (2018.4～) 小川大樹 吉本 充 (～2017.3) 渡辺 勤 (2015.4～) 小野寺純 (～2017.3) 伊藤 暁
	東京海洋大学	学術研究院	
	水産研究・教育機構	増養殖研究所育種研究センター	
		西海区水産研究所資源生産部	
(2) ハダムシ抵抗性のブリの家系の作出と選抜育種並びに養殖適性試験	水産研究・教育機構	増養殖研究所育種研究センター 西海区水産研究所資源生産部	△吉田一範  島 康洋(～2015.3) 野田 勉 秋田一樹 (2017.4～) 堀田卓朗 水落裕貴(～2016.9) 篠田理仁(2016.10～) 中条太郎 藤浪祐一郎(2015.4～) 青野英明(～2016.3) 吉村 拓(2016.4～) 虫明敬一(～2016.3) 薄 浩則 (2018.4～) 小川大樹 吉本 充 (～2017.3) 渡辺 勤 (2015.4～) 小野寺純 (～2017.3) 伊藤 暁
		西海区水産研究所	
(3) ハダムシ抵抗性に関与する遺伝子座の同定と選抜育種用のマーカーの開発	水産研究・教育機構	増養殖研究所育種研究センター	△尾崎照遵 奥澤公一 荒木和男 田畑淳子 久保貴志子 (～2017.11) 田中麻生 (2017.11～) 薄 浩則 (～2018.3) 鈴木俊哉 (2018.4～)
		増養殖研究所	
(4) 有用家系の不妊化技術の開発(3倍体の作出技術の開発)	水産研究・教育機構	増養殖研究所育種研究センター	△名古屋博之 (～2016.3) △山口寿哉 嶋田幸典



中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
大課題名	養殖ブリ類の輸出促進のための低コスト・安定生産技術の開発		
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 鈴木俊哉		

### I-3. 研究目的

ブリ類は日本の魚類養殖の年間生産量の50%以上を占める重要魚種であるが、天然種苗に依存している。このため、天然種苗を感染源とする疾病による経済的損失が問題となっている。また、もし今後天然種苗の入手が困難になった場合、資源保護の観点からその利用を差し控える必要が生じる。これらの問題を解決して日本のブリ類養殖を安定的に持続させるためには天然種苗から人工種苗に切り換えてゆく必要があり、そのためには天然種苗よりも優れた形質（病虫害耐性や高成長等）を人工種苗に与えて付加価値を高め、漁協や養殖業者による利用を促進する必要がある。

優れた形質を人工種苗に与えるため、我々はこれまで、ブリのマイクロサテライトDNAマーカーや発現遺伝子の中の一塩基多型を高密度にマッピングした連鎖地図や物理地図を作成し、最新技術を用いた連鎖解析を可能にしてきた。

このため、本研究では、

1. ブリの病虫害耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証
2. ブリのゲノム情報を応用したカンパチの病虫害耐性品種（家系）の作出技術の開発により、ブリではこれまでに構築してきた遺伝子地図と連鎖解析技術を活用してハダムシ抵抗性家系を作出すると共に、カンパチではゲノム情報に基づく連鎖地図を構築してハダムシ抵抗性家系を作出するためのDNAマーカーを開発することを目標とする。

その結果、

1. 病虫害対策費などのコストの削減による養殖生産基盤の強化と輸出促進への貢献
2. 人工種苗の利用促進による持続的なブリ類養殖産業の構築への貢献

が期待される。

### I-4. 研究方法

#### 1. ブリの病虫害耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証

ハダムシの寄生に抵抗性を示す種苗生産用のブリの家系を作ることを目的に、0才魚の1万尾のブリからハダムシがつかないブリの一次選抜を行い、海上生簀での継続飼育によりハダムシがつかない個体の二次選抜をして交配を行い、ハダムシ抵抗性のQTL解析により、さらにハダムシ抵抗性を示す個体を選抜するための新規のDNAマーカーの開発を行う。また、育種の効率化を図るため3才の無選抜のブリより家系を作出し、ハダムシの人為寄生試験を行い、得られた情報をもとにQTL解析を行い、DNAマーカーを開発して親魚に使用するブリの選

抜を行い養殖場での実証試験を行うためのF<sub>2</sub>家系を作出する。また、ブリの遺伝子の情報をカンパチに応用するため、これまでの研究で明らかになっているハダムシ抵抗性に連鎖する遺伝子座のうち最も寄与率の高い遺伝子座の詳細解析を行い、ハダムシ抵抗性に関与する遺伝子の推定を行い、ゲノム編集法（TALEN法など）でその遺伝子に変異を起こさせた時の表現型の解析から機能の解明を行い、得られた遺伝子の情報をカンパチのDNAマーカー開発のための研究に提供する。

また、育種されたブリが養殖場から逃亡して天然のブリの遺伝的な多様性に及ぼす影響を低減すると共に、育種されたブリから許可無く種苗生産用の家系が作られることを防止するため、染色体操作による不妊化の技術の開発を行う。

### **(1) ブリのゲノム解析による新たなSNPの同定とハダムシ抵抗性領域の詳細化**

これまでに同定されているハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域において、次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析やRAD-tag解析などにより一塩基多型（SNP）を同定し、候補領域内を詳細化するとともに、候補領域内に存在する遺伝子の発現解析などからハダムシ抵抗性の原因遺伝子候補を推定する（東京海洋大学）。次に、候補遺伝子の人工ヌクレアーゼによって突然変異を誘導することでその機能を明らかにし、他のブリ類に応用できる遺伝子の情報を得る（水産研究・教育機構）。

### **(2) ハダムシ抵抗性のブリの家系の作出と選抜育種並びに養殖適性試験**

ブリ養殖業に利用できるハダムシがつきにくいブリの家系を作出することを目的に、年間40万尾のブリを成魚にまで養殖して販売している株式会社アクアファーム（以下、アクアファーム）の協力を得て、養殖場でハダムシがつきにくい個体から親魚候補を選抜し、ハダムシ抵抗性を解析する家系を作出する。さらに、育種の効率化をはかるため、無選抜のブリから解析家系を作出し、実行課題1-(3)においてハダムシ抵抗性に優位に働く遺伝子座の同定を試みる。実行課題1-(3)の遺伝解析結果から、マーカー選抜育種

（Marker-Assisted Selection：以下、MAS）により親魚選抜を行ってF<sub>2</sub>を作出し、実際の養殖現場におけるハダムシ抵抗性の養殖適性を評価するとともに、ハダムシ抵抗性を有するブリ養殖家系（ハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存されたF<sub>2</sub>）を保有する。

上述の目的を達成するため、本実行課題は、①無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出、②選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出、③養殖適性試験（③は平成29年度より開始）の3項目の取組みを実施する。

### **(3) ハダムシ抵抗性に関与する遺伝子座の同定と選抜育種用のマーカーの開発**

これまでブリについては、単純反復配列多型（SSR）や発現遺伝子の中の一塩基多型（SNP）を高密度にマッピングした遺伝子地図を作成することにより集積流体回路チップを用いたDigital PCR等の遺伝子解析技術を開発し、迅速で精度の高い遺伝解析を可能にしてきた。また、少ない親魚候補集団からではあるがハダムシ抵抗性に関連する遺伝子座の量的形質遺伝子座（QTL）解析を行い、確立した手法の有用性を証明する結果としてハダムシ抵抗性に関連するDNAマーカーの開発に成功している。

本研究では、これまでに構築された技術やブリハダムシ抵抗性の遺伝子座の情報をさらに充実させ、実行課題1-(2)で無選抜天然ブリの交配家系である無選抜人工ブリF<sub>1</sub>家系、及び1万尾の無選抜天然ブリからのハダムシ寄生調査による大規模スクリーニングを行った選抜天然ブリの交配家系である選抜人工ブリF<sub>1</sub>家系を用いて、ハダムシの寄生数情報をもとに無選抜ブリ、及び選抜ブリからのハダムシ抵抗性を示す新たなQTL遺伝子座

の同定と、実行課題1-(2)で行う無選抜ブリからの親魚候補を用いたマーカーアシスト選抜育種 (Marker-Assisted Selection:以下、MAS) に用いるハダムシ抵抗性の親魚選抜用のDNAマーカーの開発を行う。

#### (4) 有用家系の不妊化技術の開発 (3倍体の作出技術の開発)

選抜の結果、遺伝的に均一化が進んだブリが養殖場から逃亡すれば、天然のブリの遺伝的多様性の保全などに好ましくない影響を及ぼす危険性が危惧される。これまでの淡水魚の研究から2倍体性の魚種を3倍体化した場合、不妊化出来ることが知られている。ブリの染色体数は48本であり2倍体性の魚類であると推定されている。そこで、生物多様性への影響を軽減すること、および選抜育種された家系の知財保護を目的に、ブリの3倍体化による不妊化技術の開発を行う。

## 2. ブリのゲノム情報を応用したカンパチの病害虫耐性品種(家系)作出技術の開発

カンパチの養殖では多くの種苗を中国から輸入している。カンパチはブリよりも遊泳速度が遅く、ハダムシが寄生しやすいために、深刻な魚病被害が毎年生じている。養殖場によっては稚魚が全滅することもあり、強いハダムシ抵抗性を有する人工種苗の供給が強く望まれている。カンパチ人工種苗の生産技術開発は加速してきたものの、種苗の生産量はまだ限られている。カンパチの育種に関する研究は全くなされておらず、ブリのような遺伝子地図のデータも得られていない。

そこで、本課題では、カンパチの人工交配の成功率の向上に取り組み、ハダムシが寄生しにくい個体の選抜交配を行い、ハダムシ抵抗性のQTL解析を行うための解析家系を作出する。同時に、カンパチのゲノムの100倍量以上の塩基配列を解析し、リファレンスの配列を構築する。次に、20個体以上のカンパチの次世代シーケンサーによる塩基配列解析を行い、カンパチのリファレンス配列にマッピングすることによって一塩基多型や多型のあるマイクロサテライトDNAの塩基配列を抽出し、ブリの物理地図とシンテニーを応用して連鎖地図を作成する。次に、ハダムシ抵抗性の解析家系とブリの遺伝子の情報を用いて、ハダムシ抵抗性の家系を作出するために親魚を選抜する際に用いるDNAマーカーを開発する。

### (1) カンパチの1対1交配技術の開発とハダムシ抵抗性に関する実態調査

養殖用の種苗を輸入種苗に依存してきたカンパチは、それらからの脱却が求められ、人工種苗の生産技術の開発が近年加速した。種苗生産のスタートである親魚養成においては、本種の通常の産卵期 (5~6月) に大量採卵の技術を確立し、さらには、成熟・産卵を水温と日長条件を人為的に調節することで非産卵期における採卵にも成功している。しかし、量産を目的とした大量採卵であり、採卵に供試する親魚数は多数を要し、育種には必要不可欠である1対1交配技術の確立には至っていない。

そこで、本研究ではカンパチの育種を可能にするため、本種の成熟を人為的に誘導して確実に1対1交配を可能とする種々の条件を把握し、良質卵の安定採卵技術を開発する。開発された技術を活用して、ハダムシ抵抗性の解析家系を作出してハダムシの寄生数調査を行い、ハダムシ抵抗性の連鎖解析に貢献し、同定されたDNAマーカーを用いてハダムシ抵抗性のF<sub>2</sub>家系作出のための親魚の選抜を行い、親魚の養成を行う。

### (2) カンパチのゲノム解析と遺伝子地図の作成

これまでのブリ類のゲノム研究から、ブリとカンパチには共通の遺伝子があり、ブリで多型性を示す単純反復配列多型 (SSR) の約9割がカンパチでも多型を持つこと、逆に一塩基多型 (SNP) のある箇所が違っていることが分かっている。そのため、カンパチの

ゲノム育種を効率的に進めるためには、カンパチで多型を示す一塩基多型を同定し、カンパチ固有の遺伝子地図を作成する必要がある。そこで、本研究では、カンパチのゲノム解析により一塩基多型（SNP）や単純反復配列多型（SSR）の情報を抽出し、ブリの物理地図を利用してこれらの情報がマッピングされた遺伝子地図を作成する。次に、この遺伝子地図の一塩基多型情報と遺伝子地図を利用して、実行課題2-(1)で作出されるハダムシ抵抗性の解析家系のジェノタイプングを行った後にハダムシの寄生数との連鎖解析を行い、ハダムシ抵抗性の家系作出のための親魚選抜に使用するDNAマーカーの開発と親魚選抜を行う。

## I-5. 研究結果

### 1. ブリの病害虫耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証

ブリでは天然魚に比べハダムシ付着数が3割以上少ない抵抗性家系の作出により最終目標を達成した。また抵抗性家系の養殖適性（成長、生残）は天然種苗に劣らないことも実証された。

#### (1) ブリのゲノム解析による新たなSNPの同定とハダムシ抵抗性領域の詳細化

ハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域内を詳細化するため、連続する塩基配列を決定するとともに抵抗性形質に関与するSNPを同定した。また、候補領域内に77個の遺伝子の存在を示唆する結果が得られた。候補領域内に存在する遺伝子の発現解析などから、ハダムシ抵抗性の原因遺伝子は表皮の粘液分泌細胞で発現するC-type レクチンであることが推定された。更に、抵抗性に関与する候補遺伝子の翻訳領域内に存在するアミノ酸残基の繰り返し配列多型が抵抗性に関与することを明らかにするとともに、抵抗性候補遺伝子が免疫系で機能している可能性を示唆する結果を得た。

次に、候補遺伝子に人工ヌクレアーゼによって突然変異を誘導することでその機能を明らかにするため、ブリ卵への顕微注入による遺伝子編集技術の開発に取り組んだ結果、ブリとして初の遺伝子編集魚を作出するとともに、体細胞すべてに変異を与える手法を開発した。遺伝子編集魚を使ったハダムシ人為寄生試験から、候補遺伝子の機能は単純に発現の有無ではなく、遺伝子のコードするタンパクの質的違いによりもたらされていることが推定された。

#### (2) ハダムシ抵抗性のブリの家系の作出と選抜育種並びに養殖適性試験

##### ①無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出と養殖適性試験

西水研五島庁舎の海上生簀において飼育していた3歳のブリ親魚（天然由来）を用いて平成26年度に人工授精・種苗生産を行い10組の遺伝解析家系（無選抜人工ブリF<sub>1</sub>）を作出した。無選抜人工ブリF<sub>1</sub>のハダムシ寄生データとDNAサンプルを課題1-(3)に提供し、解析結果に基づくMASにより3家系をF<sub>2</sub>作出用の親魚候補として選抜、育成した。これら3家系から平成29年度に次世代（以下、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>）を作出し、ハダムシ寄生データとDNAサンプルを課題1-(3)に提供した。平成30年度、解析結果に基づくMASにより、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>からハダムシ抵抗性家系（抵抗性に関する遺伝子座領域が保存された個体）を作出した。更に、これら抵抗性家系の養殖特性を天然種苗と比較した結果、ハダムシ寄生数が約5割少ない家系が存在すること、成長と生残率に差が認められないことを実証した。

##### ②選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出

アクアファームの養殖場で1生簀に養殖している天然由来の養殖ブリ（当歳魚）約1万

尾の中からハダムシ寄生数3個/尾以下の個体961尾を選別して供試魚とした。その後、経時的にハダムシ寄生状況調査を実施し、継続的に寄生数の少ない個体と多い個体をF<sub>1</sub>家系作出用の親魚候補として二次選抜し、平成29年度、人工授精・種苗生産を行い、14家系の次世代（以下、選抜人工ブリF<sub>1</sub>）を作出し、9家系のハダムシ寄生データとDNAサンプルを課題1-(3)に提供した。また、ハダムシ寄生状況調査の結果、寄生数の少ないもの同士を交配した家系は天然魚に比べて寄生数が半分以下となり、天然魚をハダムシ寄生数で選抜して親魚とすることによって、よりハダムシ寄生数の少ない家系作出の可能性が示唆された。

### (3) ハダムシ抵抗性に関与する遺伝子座の同定と選抜育種用のマーカーの開発

無選抜人工ブリと選抜天然ブリの各家系において、実行課題1-(2)から提供されたデータの解析により、ハダムシ抵抗性形質が0.3~0.6ほどの高い遺伝率を有することを解明した。さらに、QTL解析による遺伝解析を行った結果、各家系における表現型分散を10%以上説明できるQTL候補領域を14カ所以上特定することができた。加えて、無選抜人工ブリ家系についてQTL信頼区間を考慮した連鎖不平衡ブロックの保存性を確認し、抵抗性に関する遺伝子座領域が保存された個体をMASするためのDNAマーカー開発を達成した。

### (4) 有用家系の不妊化技術の開発（3倍体の作出技術の開発）

3倍体ブリの作出手法を開発するため、受精卵の第2極体放出阻止による3倍体化の条件検討を行った。その結果、水温0℃で20分間処理することが、実用的かつ安定して高い3倍体化率（約97%）が得られる手法であることを提示した。更に3倍体ブリの養殖特性を2倍体魚と比較検討した結果、3歳の成熟期においても3倍体魚が不妊であることが確認された。一方で、1~3歳の3倍体魚の成長は2倍体魚に及ばないという結果が得られたが、3歳成熟時期については3倍体魚の成長は2倍体を上回る可能性が示唆された。

## 2 ブリのゲノム情報を応用したカンパチの病害虫耐性品種（家系）作出技術の開発

カンパチでは1対1交配技術の開発により遺伝解析用家系が作出され、育種のための形質情報やゲノム情報の取得が可能となった。加えて、ゲノム解析と遺伝子地図の作成により、ハダムシ抵抗性家系作出のためのDNAマーカーを開発し、最終目標を達成した。

### (1) カンパチの1対1交配技術の開発とハダムシ抵抗性に関する実態調査

1対1交配技術の開発に取り組んだ結果、排卵誘導ホルモンの投与タイミングの改善によって小型水槽（1k1）での産卵成績向上に成功し、大量採卵が可能となった。これにより任意交配による遺伝解析家系F<sub>1</sub>の作出が実現し、解析家系内のハダムシ人為寄生試験によって抵抗性に個体差があることが明らかになり、ハダムシのデータとDNAサンプルを併せて実行課題2-(2)に提供した。この結果、実行課題2-(2)でMAS用のマーカー開発に成功し、このマーカーを用いて解析家系F<sub>1</sub>から抵抗性の遺伝型を有するF<sub>2</sub>世代作出用親魚候補を選抜し、育成を開始した。

### (2) カンパチのゲノム解析と遺伝子地図の作成

カンパチのゲノム解析結果とブリ遺伝子地図の構成を利用して、染色体の約92%をカバーする遺伝子地図の作成に成功し、マーカー候補となる一塩基多型（SNP）を特定した。この結果と課題2-(1)から提供されたデータから、ハダムシ寄生数と関連するQTL候補領域が連鎖群19番に存在すること解明し、抵抗性個体だけが共通に持つSNPが存在する領域のジェノタイプングと連鎖不平衡ブロックを特定するSNPの選抜により、ハダムシ抵抗性家系を作出するためのDNAマーカーを開発した。

### 3 アウトカム目標の達成の可能性とその具体的な担拠

ブリ養殖業では、近年の飼料価格の高騰により支出と収入が拮抗する状態が続いており、所得の数%の改善が経営の安定性にとって大きな意義を持つ養殖現場では、養殖ブリ類の突発的な大量死亡を回避するためのハダムシ予防対策として、魚の淡水浴処理を頻繁に行ったり、生け贄の網を定期的に交換したりしている。このため、ハダムシ抵抗性を持つ養殖家系を作出し、その種苗を養殖現場に普及させることにより、ハダムシ付着が要因となるブリ類の死亡を削減するとともに、予防対策の必要頻度を軽減することで、平成32年から養殖ブリ類の所得を5%以上改善させることに取り組むことをアウトカム目標としている。

この目標の達成に向けて、研究コンソーシアムには種苗生産施設を有する養殖民間企業が参画するとともに、人工種苗を生産している県との情報共有も実施していることから、作出されたブリの病害虫耐性家系が生産現場へ普及することが期待される。病害虫耐性品家系はハダムシ付着数が30%軽減することを目標としているが、本研究を通じてハダムシ付着数が約50%少ない家系が作出され、目標達成が可能となった。

そこで、仮にハダムシ付着数が30%軽減した場合漁労支出がどれだけ軽減されるか、研究コンソーシアム内の養殖民間企業に聞き取り調査したところ、ハダムシによる死亡の被害額が30%程度、ハダムシに起因する成長阻害等によるその他疾病による死亡の被害額が3%程度、薬浴等の疾病対策に必要な雇用労賃・油代が1%程度削減される見込みがあるとの回答を得た。

この聞き取り情報と農林水産省の漁業経営調査報告（2006-2017年）、漁業センサス（2013年）および水産防疫委託事業「水産動物疾病のリスク評価」（2016年）に基づき、開発したハダムシ耐性家系の普及が養殖ブリ類経営体全体の所得をどの程度改善することが出来るか試算した結果、ハダムシによる死亡の被害額約9,300万円の30%減少（約2,800万円）、ハダムシを起因とする成長阻害等によるその他疾病による死亡の被害額約60億円の3%減少（約1億8,000万円）、雇用労賃・油代約21億6,000万円の1%削減（約2,100万円）に繋がると推定された。これにより、養殖ブリ類経営体全体の過去10年間における年平均所得約19億円のうち約2億3,000万円が軽減されることになる。これは上記所得の12.2%に相当することから、当初目標の「所得5%以上改善」が達成される見込みが大きいと見込み、アウトカム目標達成は可能である。

#### I-6. 今後の課題

- ・ブリで作出したハダムシ抵抗性家系の養殖適性（成長、生残）は天然種苗に劣らないことを実証したが、その期間は当歳魚の時期に限られた。今後は出荷時期（2歳魚）に至るまでの養殖適性を実証し生産現場の信頼確保に努めることで、一層の普及促進が期待される。
- ・選抜人工ブリF<sub>1</sub>家系にもハダムシ寄生数が天然魚の半分以下という高い抵抗性を示す個体が含まれた。これらを継続して育種することにより、よりハダムシ抵抗性の高い家系の作出が期待される。
- ・作出された家系を3倍体化し、養殖場での利用が可能となるよう、水産庁の「三倍体魚等の利用要領」に沿った特性評価（生殖行動、遺伝的変異性、環境適応性等）の実施が望まれる。
- ・カンパチF<sub>1</sub>家系の育種を継続するとともに、よりハダムシ抵抗性の高い家系の作出が期待される選抜天然カンパチから育種についても検討する必要がある。
- ・作出した家系を将来に渡り効率的かつ安全に維持していくための手法開発が必要。そのためには、赤潮・疾病などの死亡リスクの軽減・分散が可能な育成体制の検討や、生殖細胞等の凍結保存・復元技術の開発等が求められる。

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
実行課題番号	1－(1)	実行課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	1 ブリの病害虫耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証		
実行課題名	(1) ブリのゲノム解析による新たなSNPの同定とハダムシ抵抗性領域の詳細化		
実行課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立大学法人東京海洋大学 大学院 海洋科学技術研究科 坂本崇・中本正俊		
共同研究機関・研究室・研究者名等	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 育種研究センター 岡本裕之・尾崎照遵・ 嶋田幸典・山口寿哉・石川卓・吉田一範 西海区水産研究所 資源生産部 藤浪祐一郎・堀田卓朗・ 野田勉・篠田理仁・中条太郎・秋田一樹		

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

これまでに同定されているハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域において、次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析やRAD-tag解析などにより一塩基多型 (SNP) を同定し、候補領域内を詳細化するとともに、候補領域内に存在する遺伝子の発現解析などからハダムシ抵抗性の原因遺伝子候補を推定する (東京海洋大学)。次に、候補遺伝子の人工ヌクレアーゼによって突然変異を誘導することでその機能を明らかにし、他のブリ類に応用できる遺伝子の情報を得る (水産研究・教育機構)。

### 2) 研究方法

#### 1) ハダムシ抵抗性候補遺伝子探索のためのハダムシ抵抗性領域の詳細化 (東京海洋大学)

##### ①連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム領域の全塩基配列の決定

これまでの研究によりハダムシ (ベネデニア) 症抵抗性形質に関連するゲノム領域は連鎖群2の4.4cMの範囲に位置し (引用文献 (1))、この領域は7クロンのBAC (細菌人工染色体、長い挿入DNA断片を保持できるクローン) でカバーされることが明らかになっていた (図1)。研究開始時点ではブリの全ゲノム配列は公開されておらず利用できなかった。そこでこの連鎖群2ハダムシ抵抗性ゲノム領域の高精度な塩基配列を取得するため、次世代シーケンサーによる7クロンのデータの *de novo* アセンブル解析を行い、大型および小型コンティグからなる全塩基配列情報の分断状況を検討した。各コンティグの配置を明らかにするため、コンティグの両端にPCRプライマーを設計し、各コンティグの配置をPCRおよび

サンガーシーケンスにより解析した。決定した塩基配列を用いて遺伝子予測ソフトウェアによりこの領域に存在する候補遺伝子を探索した。

#### ②次世代シーケンサーを用いたハダムシ抵抗性家系および感受性家系間の塩基配列相違の検討

ハダムシ抵抗性を持つ個体と持たない個体の連鎖群2番のハダムシ抵抗性ゲノム領域の塩基配列を比較し新規SNPマーカを開発することを目的として、次世代シーケンサーを用いたりシーケンス法による新規SNPマーカを開発を行った。ハダムシ抵抗性QTL座のマーカ選抜を行なったハダムシ抵抗性家系：QTL座を持つ個体（R家系）および感受性家系：QTL座を持たない家系（S家系）のそれぞれ2個体の合計4個体からゲノムDNAを抽出し、illumina社Hi-seq4000を用いてpaired-end、150bpの条件で全ゲノムのリシーケンス解析を行なった。決定した連鎖群2番のハダムシ抵抗性に関連するゲノム候補領域（519,869 bp）の塩基配列を参照配列としてリシーケンスデータのマッピングを行ない、この領域内のSNPを探索した。

#### ③次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法によるハダムシ抵抗性家系および感受性家系間で発現量差のある遺伝子の探索

ハダムシ抵抗性QTL座のマーカ選抜を行なったハダムシ抵抗性家系：QTL座を持つ個体（R家系）および感受性家系：QTL座を持たない家系（S家系）のブリ表皮から抽出したRNAを用いて、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法により両家系間で遺伝子発現を網羅的に比較した。サンプルには、ハダムシ人為寄生試験後3日目、6日目の個体を用いて、illumina社Hi-seq2000を用いたRNA-seq解析を行った。連鎖群2番のハダムシ抵抗性形質に関与するゲノム候補領域で発現する遺伝子を探索するために、RNA-seq readsをゲノム候補領域の塩基配列をリファレンスとしてゲノムガイドアセンブルを行った。また、ハダムシ抵抗性家系および感受性家系間で発現量差のある遺伝子の探索を行った。さらに、ハダムシ抵抗性家系と感受性家系間の遺伝子発現の網羅的な比較を行うために、これまでに得られているブリEST情報にマッピングし、発現変動遺伝子を検出した。発現変動遺伝子は、Gene Ontology Enrichment解析を行った。

#### ④ハダムシ抵抗性ゲノム領域に位置することが予測された遺伝子のクローニングおよび表皮での発現解析

これまでの解析により、ハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域内に77個の候補遺伝子の存在が示唆された。このうち、既知の遺伝子との相同性が示された遺伝子は15個であった。これらの遺伝子についてRT-PCRによるハダムシの寄生部位である表皮での発現解析を行った。表皮での発現がみられた遺伝子についてはRACE法によりcDNA全長のクローニングを行った。

#### ⑤連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム候補領域に存在する機能的に抵抗性形質との関連性が予想される遺伝子の詳細解析

ハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域に位置する候補遺伝子の中で、機能的に免疫系に関与することが考えられ抵抗性形質との関連性が予想された新規C-typeレクチン遺伝子について、アミノ酸の変化を伴う塩基配列多型の探索と発現解析を行った。複数個体の塩基配列を解析し、アミノ酸配列の変化を伴う多型を探索した。RT-PCR法により様々な臓器（鱗、鰓、脾臓、心臓、胃、表皮、筋肉、肝臓、体腎、頭腎、脳、腸）でのmRNA発現を調べた。またハダムシが寄生する表皮での発現細胞を *in situ* hybridization法で解析した。

## ⑥天然魚を用いたハダムシ抵抗性原因遺伝子候補内の塩基配列多型とハダムシ寄生数の相関解析

免疫系に関与しハダムシ抵抗性形質との関連性が予想された新規C-typeレクチン遺伝子内に存在するアミノ酸置換を伴うSNPとアミノ酸配列の繰り返し数多型について、遺伝子型とハダムシ寄生数の相関解析を行った。まずブリ天然魚200尾のハダムシ寄生状況調査の結果から寄生数の少なかった上位20尾と寄生数の多かった下位20尾の計40尾のヒレからゲノムDNAを抽出し解析に用いた。

次にブリ天然魚約800尾（増養殖研究所 尾崎氏提供（実行課題1-(3)））について、ハダムシ抵抗性原因遺伝子候補であるC-typeレクチン遺伝子のエクソン内に存在するアミノ酸配列の繰り返し数多型のハプロタイプを判別し、ハダムシ寄生数との相関解析を行った。

⑦ターゲットリシークエンス法による連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム領域内のSNPの探索  
ブリ天然魚40個体について連鎖群2番ハダムシ抵抗性領域520kbをロングPCR法により増幅し、illumina社Miseqシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。各個体の塩基配列を抵抗性ゲノム領域の参照配列にマッピングし、抵抗性領域内に位置するSNPを同定した。

## 2) ブリにおけるハダムシ抵抗性候補遺伝子の改変技術の開発（水産研究・教育機構）

### ①ブリ卵の小規模、ふ化管理法の開発

平成27年度の試験で明らかにした、ふ化前の卵沈降前に飼育水の塩分を35-40PSUに調整することで止水において卵の沈降を防ぐことが可能で顕微注入卵でも高い正常ふ化率を示す事象について再現性を確認した。

### ②顕微注入効率化のための技術開発

人工授精後に蛍光タンパクGFPのmRNAを顕微注入する時間を変えて、GFPの発現シグナル（蛍光）で、RNAの導入効率を調べた。

### ③ハダムシ抵抗性候補遺伝子の人工ヌクレアーゼ活性の解析

東京海洋大学より示されたハダムシ抵抗性に関与すると考えられる候補遺伝子に対して、遺伝子構造の推定とその構造・配列からcrRNAを設計し、その中から効率よく切断するcrRNAを選定した。

### ④ブリ卵への顕微注入試験による人工ヌクレアーゼ切断活性の確認

東京海洋大学より示されたハダムシ抵抗性候補遺伝子に対する4種のcrRNAを、CRISPR/Cas9 mRNAとともにブリ卵に顕微注入し、ふ化仔魚を用いて、HMA（Heteroduplex Mobility Assay）法およびアンプリコン塩基配列解析（各8クローン）により、変異の導入確認を行った。

### ⑤ブリ卵への顕微注入による遺伝子編集魚（F<sub>0</sub>）の作出試験

ハダムシ抵抗性候補遺伝子に対する1種類のcrRNAを、CRISPR/Cas9 mRNAとともにブリ卵約3,000粒に顕微注入し、受精後6週齢まで飼育したところで変異の確認を行った。

### ⑥生存可能なハダムシ人為寄生試験実施条件と画像解析による寄生数計数方法の検討

従来のハダムシ人為寄生試験手法では、寄生数の計数のためにブリ自体も致死に至る条件下で淡水浴を実施するが、編集魚を数多く作出することは困難であることから、試験終了後も生存可能とする実施条件を検討した。また、体表から脱落させ回収したハダムシを画像解析により計数する方法を検討した。

### ⑦遺伝子編集魚（F<sub>0</sub>）を使ったハダムシ人為寄生試験

遺伝子編集魚を用いて、編集個体、非編集個体、対照個体とともにハダムシ人為寄生試験を行い、その寄生数を調べ比較した。

### 3) 研究結果

#### 1) ハダムシ抵抗性候補遺伝子探索のためのハダムシ抵抗性領域の詳細化(東京海洋大学)

##### ①連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム領域の全塩基配列の決定

ハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域をカバーする7個のBACクローンの次世代シーケンサーによるデータについて、アルゴリズムの異なる2種類のアセンブルソフトウェアを用いて *de novo* アセンブル解析を行ったところ、各BACクローンには10-30個のコンティグが存在し、大型コンティグが22個、小型コンティグが100個以上存在することが明らかになった。次世代シーケンサーによる解析データでは、ある程度の連続した塩基配列を得ることができたが、まだ塩基配列情報が分断されているために、大型コンティグと小型コンティグの配置が不明だった。そこで、各BACクローンについて、各コンティグの配置を明らかにするため、コンティグの両端にPCRプライマーを設計し、各コンティグの配置をPCRおよびサンガーシーケンスにより解析した。その結果、ハダムシ抵抗性形質に関与する連鎖群2番のゲノム候補領域の連続する塩基配列 (519,869 bp) を決定した。

ハダムシ抵抗性形質に関与するゲノム候補領域の塩基配列において、ブリEST情報との照合を行うとともに2種類の遺伝子予測ソフトウェアを用いて候補領域に存在する遺伝子の推定を行った。その結果、ゲノム候補領域内には77個の遺伝子の存在が示唆された。

##### ②次世代シーケンサーを用いたハダムシ抵抗性家系および感受性家系間の塩基配列相違の検討

連鎖群2番のハダムシ抵抗性に関連するゲノム候補領域 (約520kb) の塩基配列を参照配列としてリシーケンスデータのマッピングを行ない、各個体のこの領域内のSNPを探索した結果、それぞれ3,500個程度のSNPが検出された。抵抗性家系2個体に共通するSNPは約3,000個、感受性家系で検出された総SNPは約4,000個であり、抵抗性家系特異的なSNPは約1,500個検出された。

##### ③次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法によるハダムシ抵抗性家系および感受性家系間で発現量差のある遺伝子の探索

連鎖群2番のハダムシ抵抗性形質に関与するゲノム候補領域において、RNA-seq法による解析の結果、Blastx (E value <  $10^{-5}$ ) により既知の遺伝子と高い相同性が見られた候補遺伝子には、ハダムシ抵抗性家系と感受性家系間で発現量差が見られる遺伝子は検出されなかった。RNA-seq法によりハダムシ抵抗性家系と感受性家系間で、表皮において発現する全遺伝子の発現量の網羅的な比較を行った結果、ハダムシ寄生3日後に抵抗性家系において発現量が高い (fold-change、(FC) >3) 遺伝子のGene Ontology Enrichment解析では、プリンヌクレオシド3リン酸代謝、Wnt シグナル経路の調節因子、細胞接着等に関わる遺伝子の発現が変化しており、エネルギー代謝や液性免疫応答が活発になるなどの可能性が考えられた。ハダムシ寄生6日後に抵抗性家系において発現量が高い (FC>3) 遺伝子のGene Ontology Enrichment解析では、カルシウムイオン依存エキトサイトーシス等に関わる遺伝子の発現が変化しており、粘液の成分や量が異なっているなどの可能性が考えられた。

##### ④ハダムシ抵抗性ゲノム領域に位置することが予測された遺伝子のクローニングおよび表皮での発現解析

既知の遺伝子との相同性が示された15遺伝子のうち、5遺伝子では表皮における発現が検出された。このうちトランスポゾンを除いた4遺伝子についてcDNA全長のクローニングと塩基配列の取得が完了した。

⑤連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム候補領域に存在する機能的に抵抗性形質との関連性が予想される遺伝子の詳細解析

解析した候補遺伝子C-typeレクチンcDNAは、約1,000bp（アミノ酸繰り返し配列があるためサイズは不確定）であり、7つのエクソンからなっていた（図2）。発現解析の結果、この候補遺伝子は鰓、脾臓、体腎、腸で多く発現し、ハダムシが寄生する表皮でも発現していることが明らかになった（図3）。組織学的解析により表皮の粘液分泌細胞で発現することが明らかになった。候補遺伝子のORF領域は約275アミノ酸残基であり、5アミノ酸残基を1単位とする繰り返し配列と機能ドメイン領域が存在していた。複数個体の塩基配列解析の結果、この繰り返し配列の繰り返し回数には多型性があり、また機能ドメイン領域内にもアミノ酸置換を伴う多型性が存在していることが明らかになった（図4）。

⑥天然魚を用いたハダムシ抵抗性原因遺伝子候補内の塩基配列多型とハダムシ寄生数の相関解析

ブリ天然魚40尾のヒレからゲノムDNAを抽出し、候補遺伝子C-typeレクチンの翻訳領域内に存在するアミノ酸の変化を伴う塩基配列多型と抵抗性形質との関連性を調べた。その結果、機能ドメイン内に存在するSNP C2147Tの遺伝子型とハダムシ寄生数が相関することが明らかとなった。SNP C2147TがCのときアミノ酸はプロリン(P)をコードし、Tのときはロイシン(L)をコードする。遺伝子型がL/PまたはL/Lの個体のハダムシ寄生数はP/Pの個体よりも統計的に有意に少ないことが示された（ $P < 0.05$ , Mann-Whitney U検定、図5）。またSWISS-MODELを用いてタンパク質の立体構造を予測した結果、このSNPによるアミノ酸置換が遺伝子の機能ドメインの構造に影響を与えることが示唆された。このことから、C-typeレクチンがハダムシ抵抗性形質の責任遺伝子であることが強く示唆された（引用文献(2)）。またこのSNPについて抵抗性アリルを特異的に認識する制限酵素を用いたPCR-RFLP（制限酵素断片長多型）法による簡便なジェノタイプング法を開発した。一方、候補遺伝子内には5アミノ酸残基を1単位とする繰り返し配列の多型が存在するが、この多型は非常に多型性が高くより多くのサンプルで解析を行う必要性が考えられた。

⑦ターゲットリシーケンス法による連鎖群2番ハダムシ抵抗性ゲノム領域内のSNPの探索

ハダムシ抵抗性領域520kbを36領域に分割し、ロングPCRにより抵抗性領域全域を増幅するプライマーセットを開発した。98%以上のシーケンスが参照配列にマップされ、連鎖群2番のハダムシ抵抗性ゲノム領域を対象としたターゲットリシーケンス解析系が構築できたことが確認された。解析に用いたブリ天然魚40個体すべてでgenotypeが得られ、かつアレル頻度5%以上の条件でSNPを探索した結果、約1,000個のSNPが検出された。

## 2) ブリにおけるハダムシ抵抗性候補遺伝子の改変技術の開発（水産研究・教育機構）

①ブリ卵の小規模、ふ化管理法の開発

高比重海水（35-40 psu）を用いることでブリ卵を小規模でふ化管理する技術を確認した（図6、引用文献(3)）。これにより遺伝子編集のために必要な顕微注入条件の検討が可能になった。

②顕微注入効率化のための技術開発

初期発生中における発生段階で受精後一時間まではRNAの導入効率に有意な差は認められないことが明らかとなった。この結果から簡便、迅速にブリの受精卵へRNAを顕微注入する方法を確立した。これにより1,000-1,500粒/日/人程度の顕微注入が可能となり、実地的な顕微注入卵数の確保が可能となった。

③ハダムシ抵抗性候補遺伝子の人工ヌクレアーゼ活性の解析

東京海洋大学より示されたハダムシ抵抗性に関与すると考えられる候補遺伝子 (8 exon、1, 092bp) に対して、8箇所CRISPR/Cas9のcrRNAを設計し、その内の4種は試験管内で効率よく作用することを確認した。

#### ④ブリ卵への顕微注入試験による人工ヌクレアーゼ切断活性の確認

実際にブリ卵に顕微注入を行い、候補遺伝子に対する人工ヌクレアーゼが活性(切断活性)を有することを確認した(図7)。

#### ⑤ブリ卵への顕微注入による遺伝子編集魚(F<sub>0</sub>)の作出試験

受精後6週齢の顕微注入魚82尾中56尾(68.3%)で変異の導入が確認された。遺伝子編集が確認された生育可能な幼魚(体長20cm程度)を数十尾作出することに成功した。ブリとして初の遺伝子編集魚の作出に成功し、これらの編集魚を用いてハダムシの人為寄生試験を実施した。

#### ⑥生存可能なハダムシ人為寄生試験実施条件と画像解析による寄生数計数方法の検討

ハダムシ人為寄生試験後に試験に供した編集魚が生存可能となる実施条件を検討した。光刺激により孵化したハダムシ幼生(*Benedenia seriolae*)を30分以内に、ブリ幼魚(体長約20cm)一尾あたり100個体寄生するように濃度を調整して、25°C、止水で4時間寄生させた。10-12日間飼育を続けてハダムシが大きくなった後、数分間の淡水浴によりハダムシを剥離し、さらに体表に残っているハダムシをこすり落とした。計数は、ホルマリン固定されたハダムシを黒のプラスチック製のバットに重ならない様に広げて撮影した画像をImageJで画像解析することにより行った。

#### ⑦遺伝子編集F<sub>0</sub>魚を使ったハダムシ人為寄生試験

ハダムシ抵抗性責任候補遺伝子C-typeレクチンに対する遺伝子編集個体、非編集個体、対照個体各9尾を収容した500Lのパンライト水槽(水量300L)を4水槽設けて、うち1水槽は非寄生区、残り3水槽は寄生区として、ハダムシの人為寄生試験を行った。個体ごとに寄生数を調べたところ、3群間に有意な差は認められなかった(図8)。この結果から、体細胞においてモザイク状態に当該遺伝子の部分的な機能阻害(転写量あるいは翻訳量の低下)が引き起こされた場合、ハダムシの寄生数に影響を与えないことが示された。さらに100%体細胞すべてに変異を与えたF<sub>0</sub>個体を用いた試験においても、ハダムシの寄生数に影響を与えなかった結果から、本責任候補遺伝子において、ハダムシ寄生数の違いをもたらす原因は、単純に候補遺伝子が発現するかしないか、あるいは発現細胞が多いか少ないかという量的変化ではなく、どのような構造のタンパクが発現するか、遺伝子のコードするタンパクの質的な働きの違いによりもたらされていることが示された。このことは、東京海洋大学の試験において、タンパクにコードされたSNPによりアミノ酸置換が遺伝子の機能ドメインの構造に影響を与えることを示唆する結果と矛盾しない結果であった。

## 4) 成果活用における留意点

一般的にQTL解析で同定された遺伝マーカーの効力は解析家系に依存する。ハダムシ抵抗性形質は多くの遺伝子がかかわるポリジーン形質であり、本研究で同定したC-typeレクチンの遺伝子の機能だけで抵抗性を発現するわけではない。C-typeレクチンの遺伝子型のみで天然集団からブリの選抜を行ってもハダムシに対する十分な抵抗性を持つとは限らない点に留意する必要がある。

## 5) 今後の課題

本研究により連鎖群2番のハダムシ抵抗性形質の責任遺伝子がC-typeレクチンであることが強く示唆された。魚類の寄生虫症に対する抵抗性責任遺伝子の同定は世界で初めての成果である。しかし、連鎖群2番以外にもハダムシ抵抗性形質と連鎖するゲノム領域は報告されており、今後は他のハダムシ抵抗性形質と連鎖するゲノム領域の責任遺伝子を明らかにし責任遺伝子の遺伝子型をマーカーとして育種を進めることで、よりハダムシに寄生されにくいブリ系統が確立されることが期待される。

#### <引用文献>

- (1) Ozaki, A., Yoshida, K., Fuji, K., Kubota, S., Kai, W., Aoki, J., Kawabata, Y., Suzuki, J., Akita, K., Koyama, T., Nakagawa, M., Hotta, T., Tsuzaki, T., Okamoto, N., Araki, K., Sakamoto, T., 2013. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a monogenean parasite (*Benedenia seriolae*) in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) through genome wide analysis. PLoS One 8: e64987.
- (2) Nakamoto, M., Takeuchi, Y., Akita, K., Kumagai, R., Suzuki, J., Koyama, K., Noda, T., Yoshida, K., Ozaki, A., Araki, K., Sakamoto, T. 2017. A novel C-type lectin gene is a strong candidate gene for *Benedenia* disease resistance in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Developmental and Comparative Immunology 76: 361-369.
- (3) 嶋田幸典、石川卓（増養殖研）、吉田一範、堀田卓郎、藤浪祐一郎（西水研）、岡本裕之（増養殖研）2016、ブリ卵の小型容器を用いた高塩分孵化管理方法の開発、日本水産学会誌、82(4)、601-607.

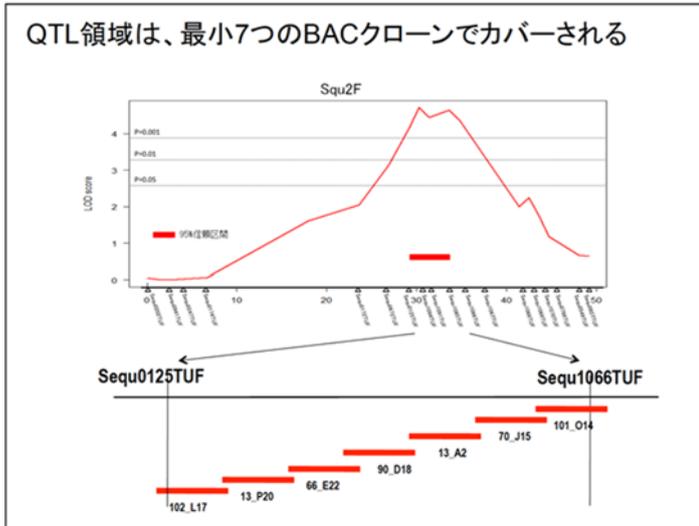


図1. 連鎖群2番のハダムシ抵抗性ゲノム候補領域におけるBACクローン配置図

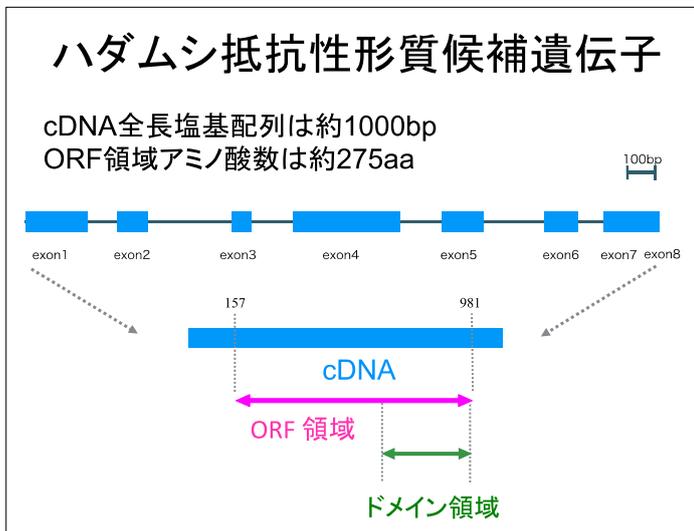


図2. ハダムシ抵抗性形質候補遺伝子の概要

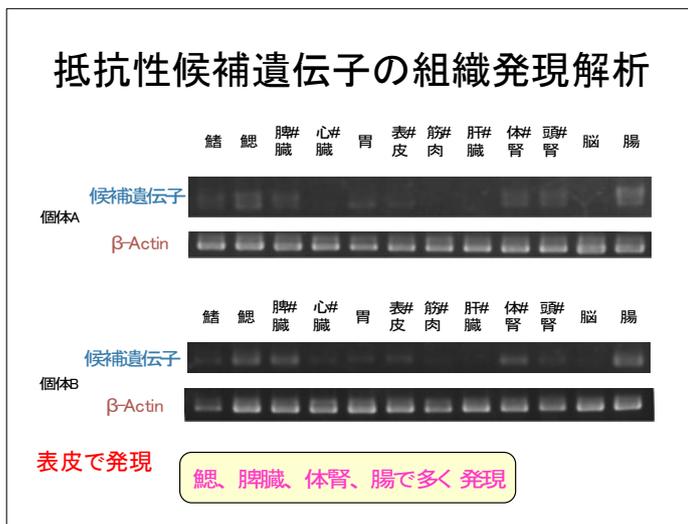


図3. ハダムシ抵抗性形質候補遺伝子の発現解析結果

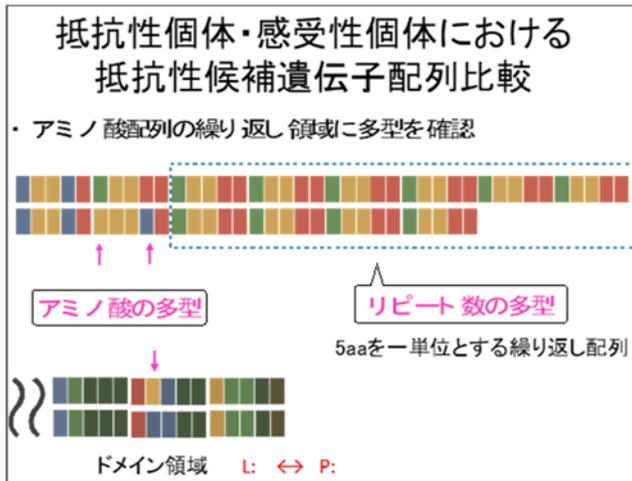


図4. ハダムシ抵抗性形質候補遺伝子に存在するアミノ酸多型性

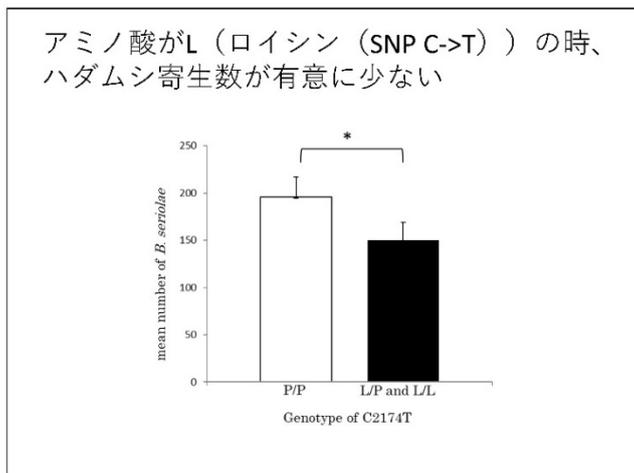


図5. ハダムシ抵抗性形質候補遺伝子の機能ドメイン内SNPと耐病性形質との相関解析結果

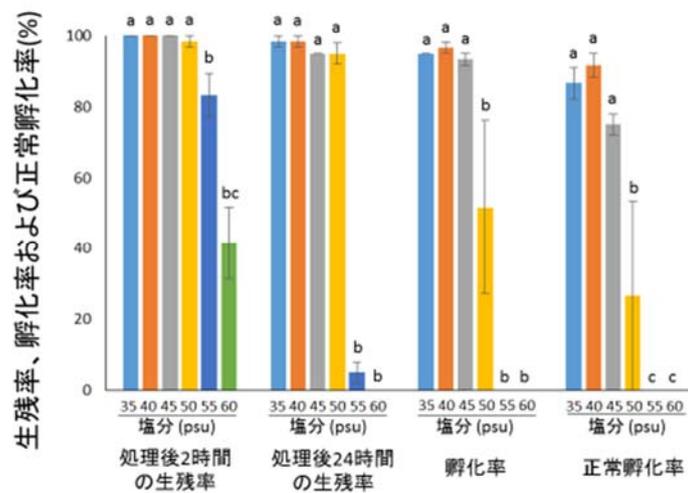


図6. 塩分濃度と生残率、ふ化率および正常ふ化率の関係

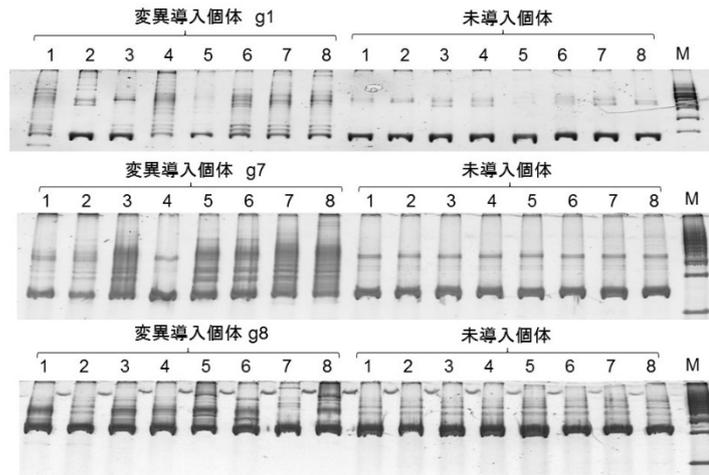


図7. HMA法によるハダムシ抵抗性候補遺伝子的人工ヌクレアーゼ活性の解析

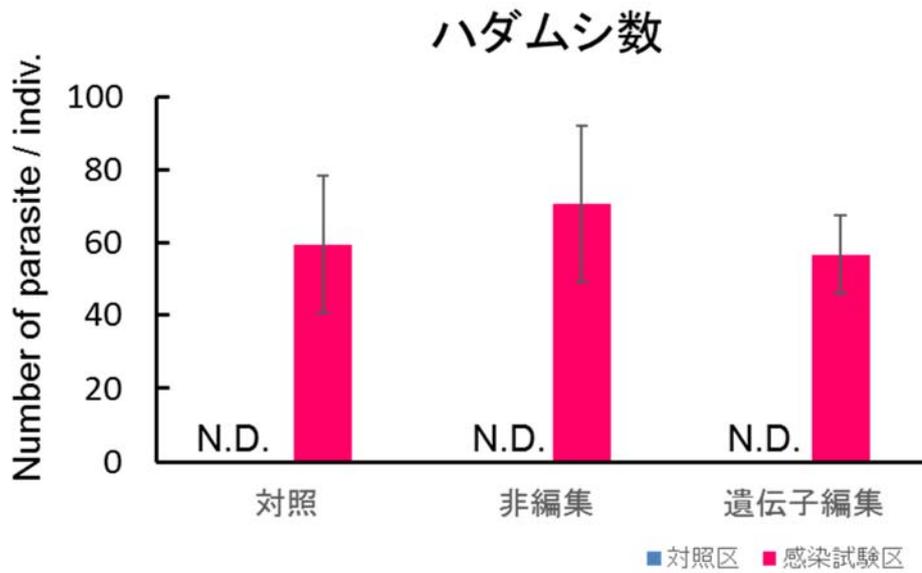


図8. ハダムシ抵抗性候補遺伝子の遺伝子編集F<sub>0</sub>魚のハダムシ人為寄生試験結果

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
実行課題番号	1-(2)	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	1 ブリの病害虫耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証		
実行課題名	(2) ハダムシ抵抗性のブリの家系の作出と選抜育種並びに養殖適性試験		
実行課題 代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所育種研究センター 吉田一範 西海区水産研究所資源生産部 野田勉・秋田一樹・ 堀田卓朗・篠田理仁・中条太郎・藤浪祐一郎・吉村 拓・薄浩則		
共同研究機関・研究室・研究者名等	株式会社アクアフาร์ม 小川大樹・渡辺勤 マルハニチロ株式会社 伊藤暁		

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

ブリ養殖業に利用できるハダムシがつきにくいブリの家系を作出することを目的に、年間40万尾のブリを成魚にまで養殖して販売している株式会社アクアフาร์ม（以下、アクアフาร์ม）の協力を得て、養殖場でハダムシがつきにくい個体から親魚候補を選抜し、ハダムシ抵抗性を解析する家系を作出する。さらに、育種の効率化をはかるため、無選抜のブリから解析家系を作出し、実行課題1-(3)においてハダムシ抵抗性に優位に働く遺伝子座の同定を試みる。実行課題1-(3)の遺伝解析結果から、マーカーアシスト選抜（Marker-Assisted Selection：以下、MAS）により親魚選抜を行ってF<sub>2</sub>を作出し、実際の養殖現場におけるハダムシ抵抗性の養殖適性を評価するとともに、ハダムシ抵抗性を有するブリ養殖家系（ハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存されたF<sub>2</sub>）を保有する。

### 2) 研究方法

上述の目的を達成するため、本実行課題は、①無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出、②選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出、③養殖適性試験（③は平成29年度より開始）の3項目の取組みを実施した。

#### ①無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出

当プロジェクト期間である5年間という短期間で目的形質であるハダムシ抵抗性を有する養殖家系（ハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存されたF<sub>2</sub>）を作出・保有するため、ハダムシ抵抗性の形質情報を取得していない天然由来の養殖ブリを親

魚としてMAS育種を行い、ハダムシ抵抗性を有する養殖家系（ハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存されたF<sub>2</sub>）を保有した。

研究方法は、以下のとおりであった。

まず、水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎（以下、西水研五島）で保有していた天然由来の養殖ブリを親魚として人工交配・種苗生産によって解析家系F<sub>1</sub>（以下、無選抜人工ブリF<sub>1</sub>）を作出し、ハダムシ人為寄生試験における形質情報収集を行った。量的形質遺伝子座（QTL）解析を行うため、収集した形質情報とDNAサンプルを実行課題1-(3)に提供した。

作出した無選抜人工ブリF<sub>1</sub>については採卵が可能となる3歳まで継続飼育し、その間に実行課題1-(3)のDNA分析・解析結果からMASを行うとともに人工飼育下におけるハダムシ寄生状況調査を行った。

3歳になった無選抜人工ブリF<sub>1</sub>を親魚として人工交配・種苗生産を行い、次世代であるF<sub>2</sub>（以下、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>）を作出し、MASを行うためにDNAサンプルを採取して実行課題1-(3)へ提供した。

実行課題1-(3)のDNA分析・解析の結果をもとに、継続飼育している無選抜人工ブリF<sub>2</sub>からハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存された個体を選抜し、ハダムシ抵抗性を有する養殖家系を保有した。

#### ②選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出

無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系よりもさらにハダムシ寄生数の少ない家系を作出するため、天然由来の養殖ブリからハダムシ抵抗性の形質情報を収集して選抜したものを親魚として次世代（F<sub>1</sub>）を作出し、そのF<sub>1</sub>のハダムシ抵抗性に関する形質情報を収集した。

研究方法は、以下のとおりであった。

まず、養殖場（アクアファーム）で飼育している約1万尾のブリ（当歳魚）の中から、淡水浴の際にハダムシ抵抗性を指標として一次選抜したブリ（以下、一次選抜天然ブリ）を西水研五島に輸送して親魚養成を行った。

一次選抜天然ブリを採卵が可能となる3歳まで継続飼育し、その間に人工飼育下におけるハダムシ寄生状況調査を行ってハダムシ抵抗性を指標として親魚を二次選抜した（以下、選抜天然ブリ）。

選抜天然ブリを親魚として人工交配・種苗生産によって解析家系F<sub>1</sub>（以下、選抜人工ブリF<sub>1</sub>）を作出し、ハダムシ人為寄生試験における形質情報収集を行った。QTL解析を行うため、収集した形質情報とDNAサンプルを実行課題1-(3)に提供した。

作出した選抜人工ブリF<sub>1</sub>については継続飼育し、人工飼育下におけるハダムシ寄生状況調査を行った。

#### ③養殖適性試験

①で作出した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>の一部を用い養殖場における養殖適性試験を実施し、作出した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>の養殖適性の評価を行った。

### 3) 研究結果

#### ①無選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出

西水研五島の海上生簀において飼育していた3歳のブリ親魚（天然由来）を用いて人工授精・種苗生産を行い、平均全長100mmの次世代（以下、無選抜人工ブリF<sub>1</sub>）を

10家系作出した。作出した10家系についてハダムシ人為寄生試験を行った結果、家系ごとのハダムシ平均寄生数が41.3～155.6個/尾であった(図1)。なお、収集したハダムシ人為寄生試験のデータ及び供試魚のDNAサンプルについては、QTL解析を行うため実行課題1-(3)へ提供した。

作出した無選抜人工ブリF<sub>1</sub>は、QTL解析の結果から3家系(家系呼称:Rr1、Gr1、Gr3)に絞って継続して飼育を行い、一部の個体(50尾×3家系)を用いて人工飼育下におけるハダムシ寄生状況調査を行った。その結果、Rr1は他の家系と比較して寄生数が少ない傾向が認められ親魚候補として有効な家系ではないかと考えられた(図2)。また、実行課題1-(3)のDNA分析・解析結果をもとにMASを行い、無選抜人工ブリF<sub>1</sub>の193尾(Rr1:125尾、Gr1:32尾、Gr3:36尾)が次世代を作出するための親魚候補として特定できた。

採卵可能である3歳になった無選抜人工ブリF<sub>1</sub>を親魚として用い人工授精・種苗生産を行い、3家系全てにおいて次世代(以下、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>)を作出することができた(Rr1:527尾、Gr1:914尾、Gr3:734尾)。作出した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>を将来の親魚候補として継続して飼育するとともに、MASを行うためのDNA分析用にヒレ組織を採取して実行課題1-(3)へ提供した。

継続飼育した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>は、実行課題1-(3)のDNA分析・解析結果をもとにハダムシ抵抗性に関する遺伝子座領域が保存された個体(Rr1:79尾、Gr1:49尾、Gr3:34尾)を選抜し保有した。

## ②選抜天然ブリからのハダムシ抵抗性家系の作出

アクアファームの養殖場で1生簀に養殖している約1万尾の天然由来の養殖ブリ(当歳魚)の中からハダムシ寄生数3個/尾以下の個体を選別した結果、961尾を一次選抜することができ、それら(以下、一次選抜天然ブリ)を西水研五島の海上施設に輸送して飼育を継続した。

継続飼育していた一次選抜天然ブリのうち、800尾(200尾×4生簀)についてハダムシ寄生状況調査を5回行った結果、1回目の調査で寄生数が少なかった個体はその後の調査でも寄生数は少なく、寄生数の多かった個体はその後も多い傾向であった(図3)。この5回の調査結果を元に、二次選抜として各生簀から寄生数の少ない(以下、上位)40尾と寄生数が多い(以下、下位)10尾を抽出して1生簀に合計200尾を収容し7回のハダムシ寄生状況調査を行った結果、二次選抜前の順位と同様に上位の個体はその後寄生数は少なく、下位の個体はその後も多い傾向であり、ハダムシのつきやすい個体とつきにくい個体が存在することが示唆された(図4)。

二次選抜した選抜天然ブリが採卵可能である3歳になった個体を親魚として用い人工授精・種苗生産を行い、14家系の次世代(以下、選抜人工ブリF<sub>1</sub>)を作出した。そのうち、9家系についてハダムシ人為寄生試験を行った結果、家系ごとのハダムシ平均寄生数が44.0～141.4個/尾であった(図5)。なお、収集したハダムシ人為寄生試験のデータ及び供試魚のDNAサンプルについては、QTL解析を行うため実行課題1-(3)へ提供した。

作出した選抜人工ブリF<sub>1</sub>は将来の親魚候補として継続飼育するとともに、一部の個体(40尾程度×14家系)を用いて人工飼育下におけるハダムシ寄生状況調査を4回行った。その結果、寄生数の少ないもの同士を交配した家系は対照として同一飼育した天然魚に比べて寄生数が半分以下となり(表1及び図6)、天然魚をハダムシ寄生数で

選抜して親魚とすることによってよりハダムシ寄生数の少ない家系を作れる可能性が示唆された。

### ③養殖適性試験

上述①で作出した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>を1.3万尾用いてアクアファームの養殖場において天然モジャコを対照とした飼育試験を2か月間実施した。飼育はアクアファームでの通常養殖手法に準じた方法で行い、試験開始時に体表に寄生するハダムシを薬浴により駆虫し、その後3回のハダムシ寄生状況調査を行った。飼育結果については、飼育終了時に両区とも95%以上の生残率であり、成長も良好な状態であった。ハダムシ寄生状況については、試験に供した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>がハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が固定化されたものとされていないものが混在する状態であり、試験区と対照の間で調査回次により結果に差異が見られた。そこで、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>のハダムシ抵抗性に関する適性を評価するために上述①で継続飼育している3家系を用い、ハダムシ寄生状況調査を実施した。無選抜人工ブリF<sub>2</sub>の中でハダムシ抵抗性に関する遺伝子座領域が保存された個体（抵抗性アリルをホモでもつ個体、以下は「抵抗区分」という）とハダムシ抵抗性に関する遺伝子座領域を持たない個体（抵抗性アリルのない個体、以下は「感受区分」という）とを2試験区とし、天然由来の養殖魚を対照区として調査を行った結果、3家系とも抵抗区分のほうが感受区分と比較してハダムシ寄生数が少ない傾向があり（図7）、本プロジェクトで実施した育種手法であるMASの有効性を証明することができた。また、対照である天然魚と比較してRr1の抵抗区分は半数程度の寄生数であった（図7）。以上のことから、作出し保有しているハダムシ抵抗性に関する遺伝子座の領域が保存された家系は実際のブリ養殖にも利用できる適性を有していることが示唆された。

## 4) 成果活用における留意点

保有した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>はハダムシ抵抗性に関する遺伝子座領域が固定された個体であり、次世代（F<sub>3</sub>）を作出すればハダムシ抵抗性に関する遺伝子座領域を受け継ぐことからハダムシ寄生数を天然由来の養殖魚と比較して半数程度にすることが期待できる。しかしながら、ハダムシ寄生数の減少と養殖場におけるハダムシの駆除作業（淡水浴や薬浴）との関係は精査されていない。また、きょうだい交配を行っていることから世代を重ねると近交弱勢が発現する可能性があることも考慮する必要がある。

選抜人工ブリF<sub>1</sub>については、無選抜人工ブリF<sub>2</sub>よりもハダムシ寄生数が少ない傾向にあり、さらにハダムシのつきにくい抵抗性系統を作出することが可能な育種素材である。しかしながら、系統作出に利用していく際には親子関係やDNA情報を考慮した計画的な交配を行っていく必要がある。

## 5) 今後の課題

当プロジェクトにおいては養殖初期の2か月という短期間での適性評価であったことから、実際のブリ養殖産業にハダムシ抵抗性系統を利用するためには池入れから出荷するまでの養殖全体を通じた養殖適性を実証する必要がある。

また、当プロジェクトで保有した無選抜人工ブリF<sub>2</sub>と選抜人工ブリF<sub>1</sub>が次世代を作出できるのは3歳魚となる2年後であり生体保存が必要なことから、赤潮・疾病などの死亡リスクを軽減した対策を講じていく必要がある。

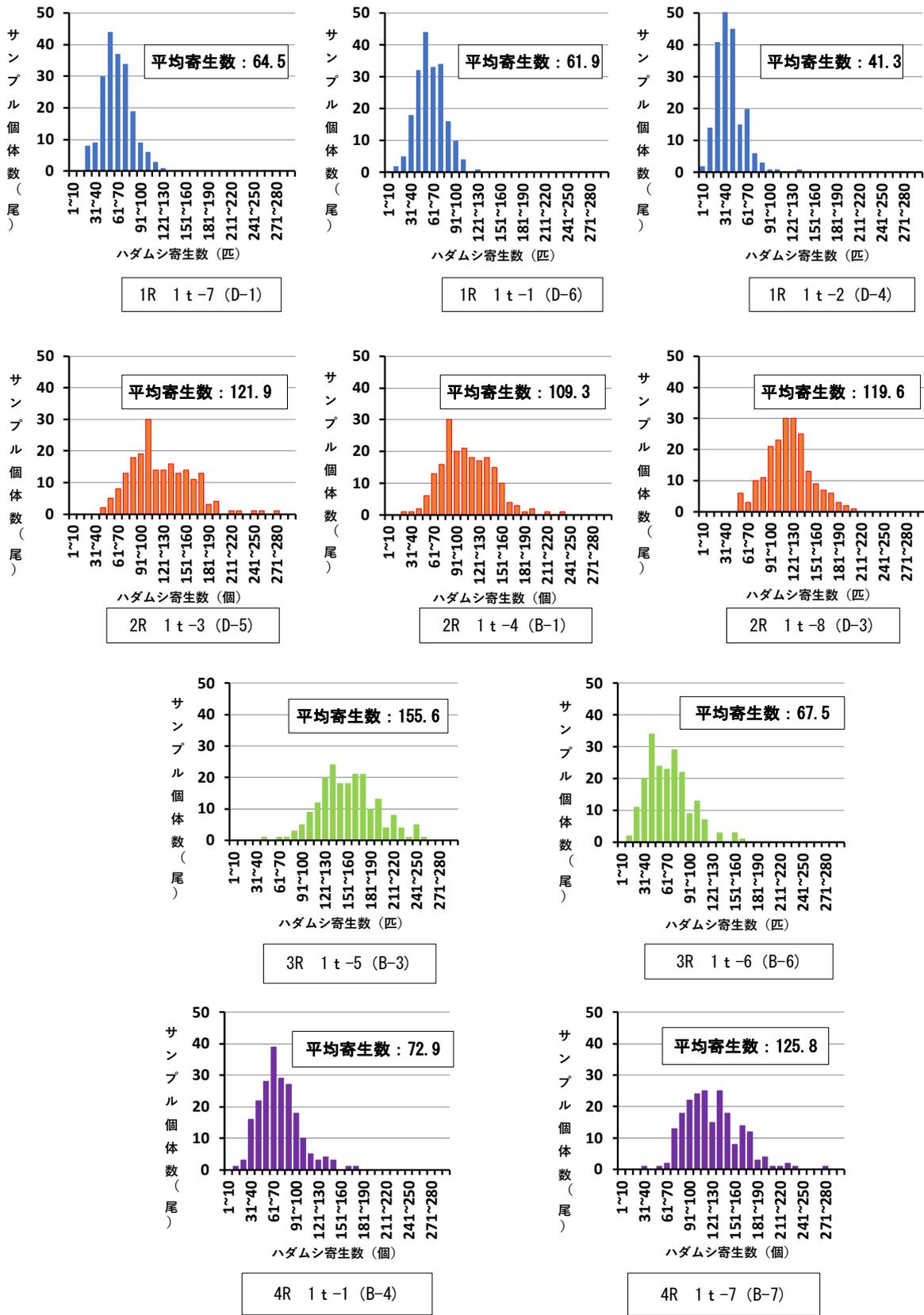


図1 無選抜人工ブリF<sub>1</sub>のハダムシ人為寄生試験の結果

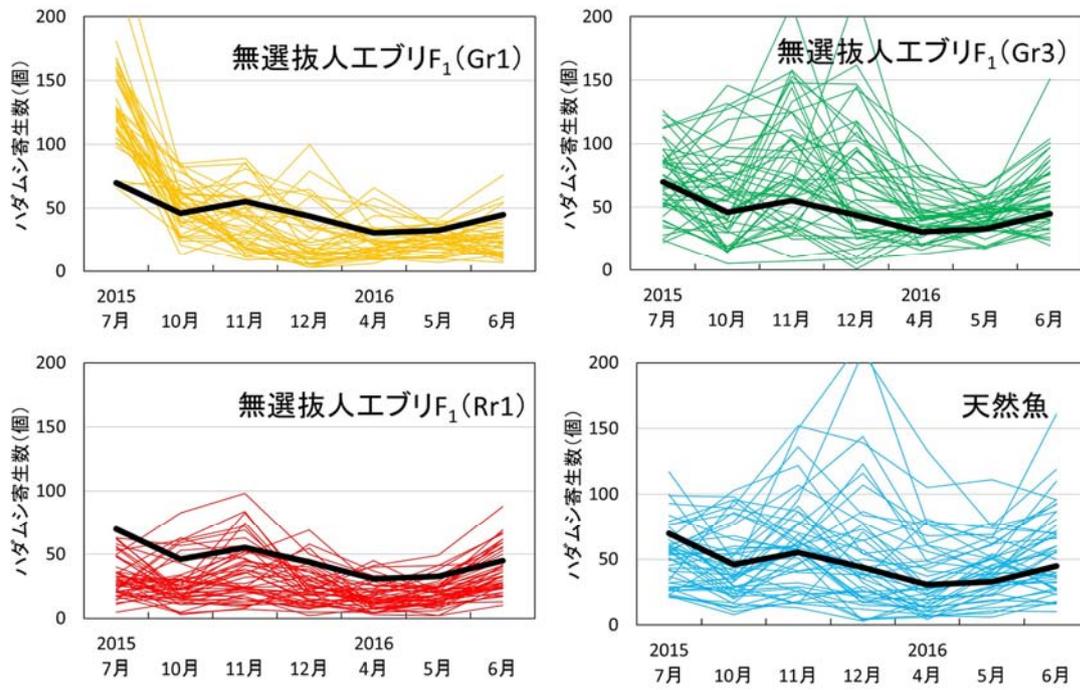


図2 無選抜人工エブリ $F_1$ のハダムシ寄生状況の調査結果

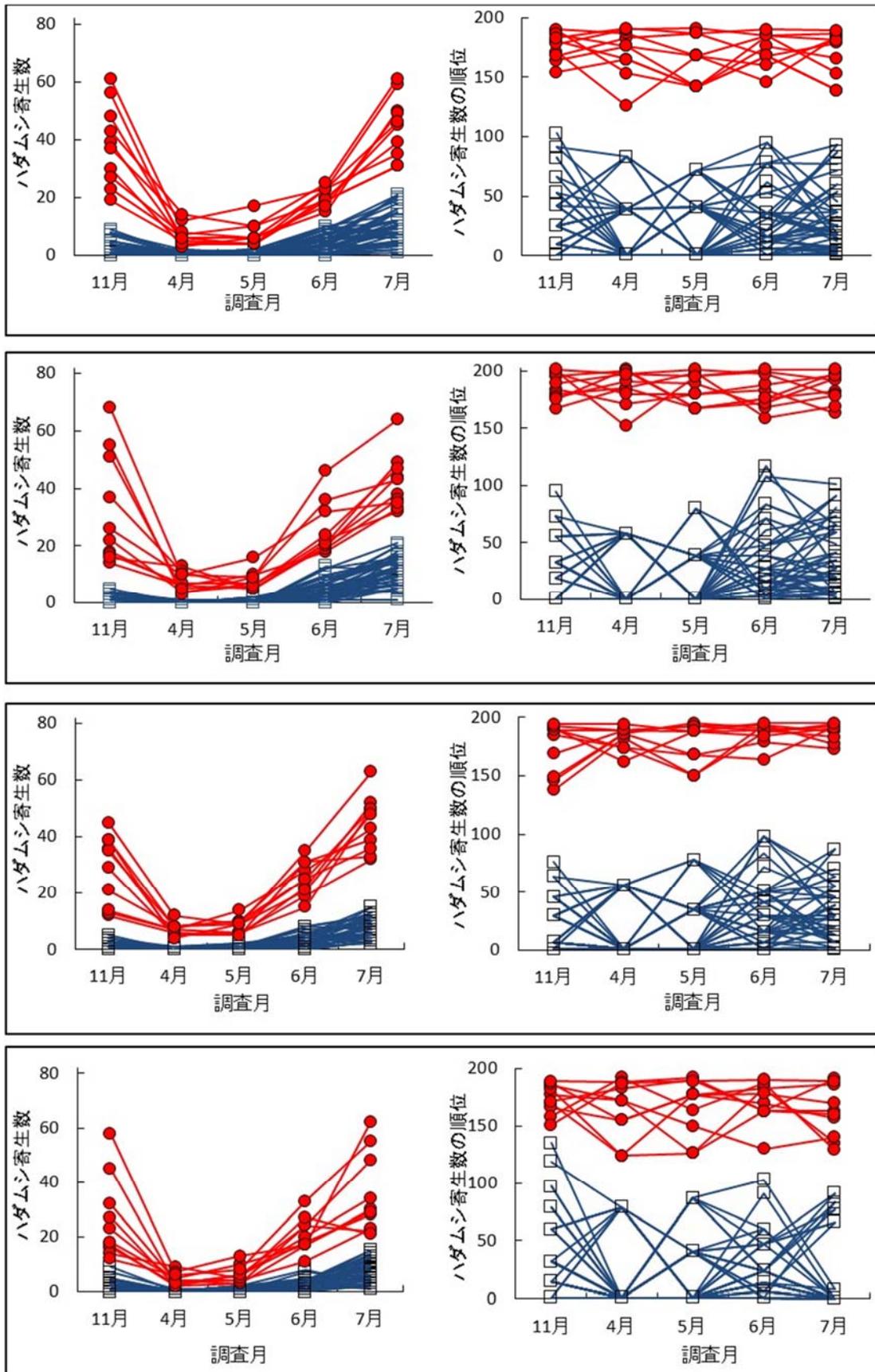
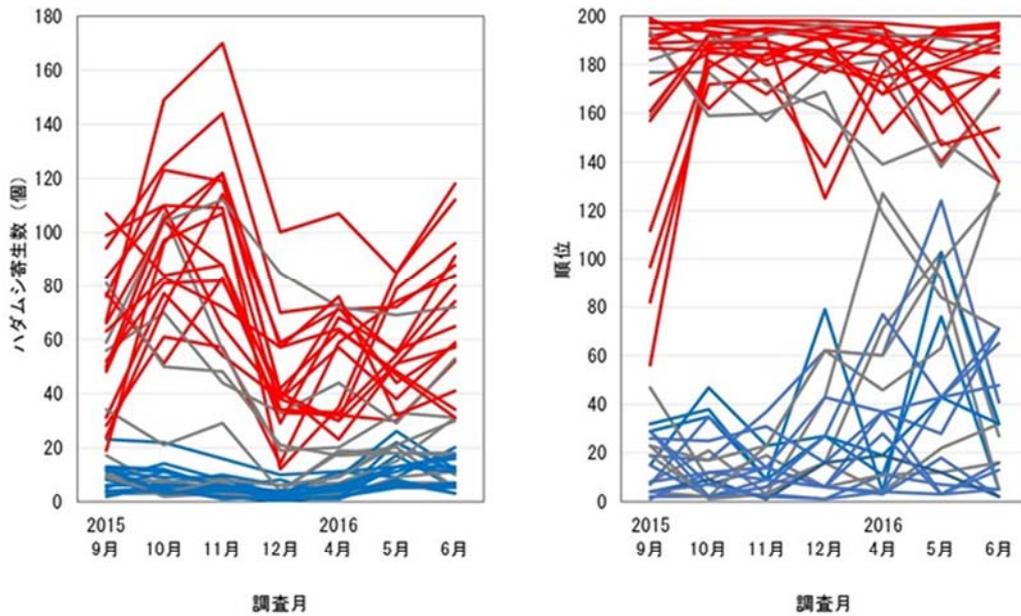


図3 選抜天然ブリの人工飼育下におけるハダムシ寄生状況の調査結果  
(一次選抜魚800尾の調査)



— : 二次選抜前の上位20尾    — : 二次選抜前の中位    — : 二次選別前の下位10尾

図4 選抜天然ブリのハダムシ寄生状況の調査結果  
(左図：ハダムシ寄生数、右図：生簀内順位)

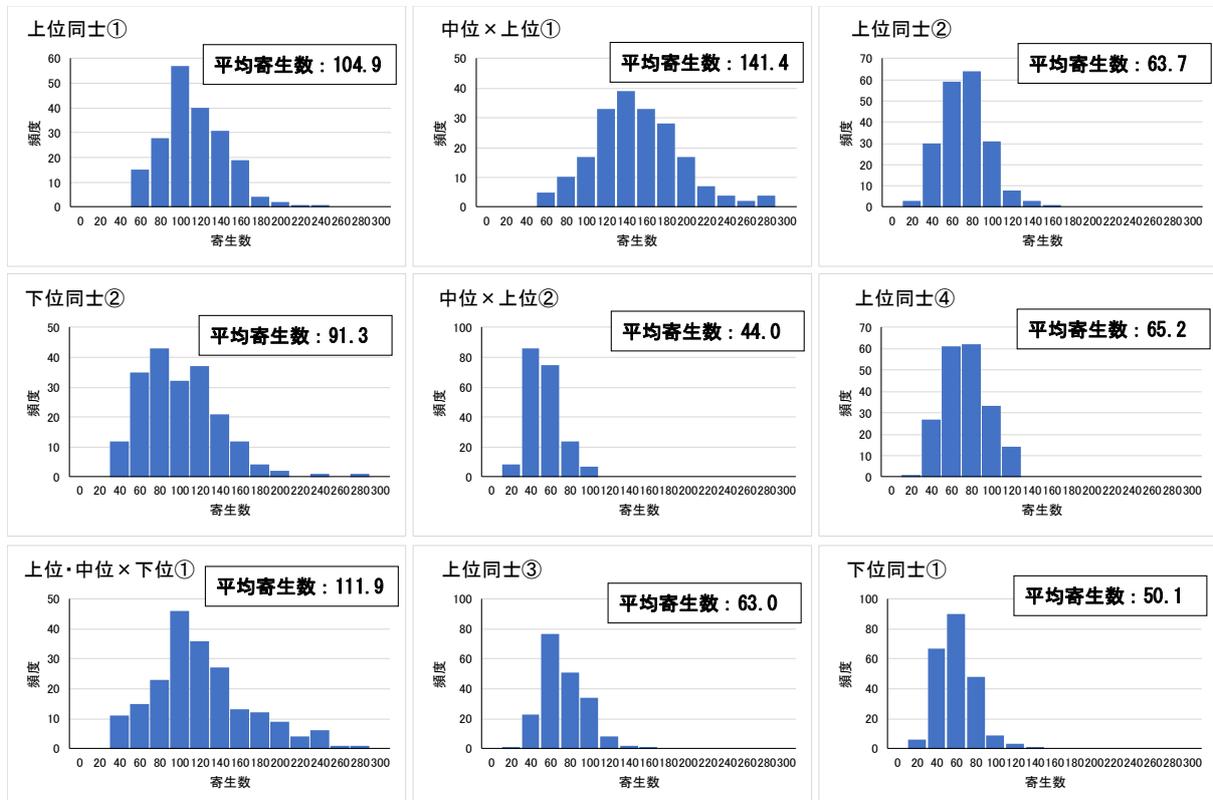


図5 選抜人工ブリF<sub>1</sub>のハダムシ人為寄生試験の結果

表1 選抜人エブリF<sub>1</sub>の交配情報

家系番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
親の抵抗性																
♀順位	1	9	9	15	53	108	7	10	10	8	8	107	107	12	継代	天然
♂順位	2	2	5	7	7	105	105	3	4	4	103	103	102	3	継代	天然

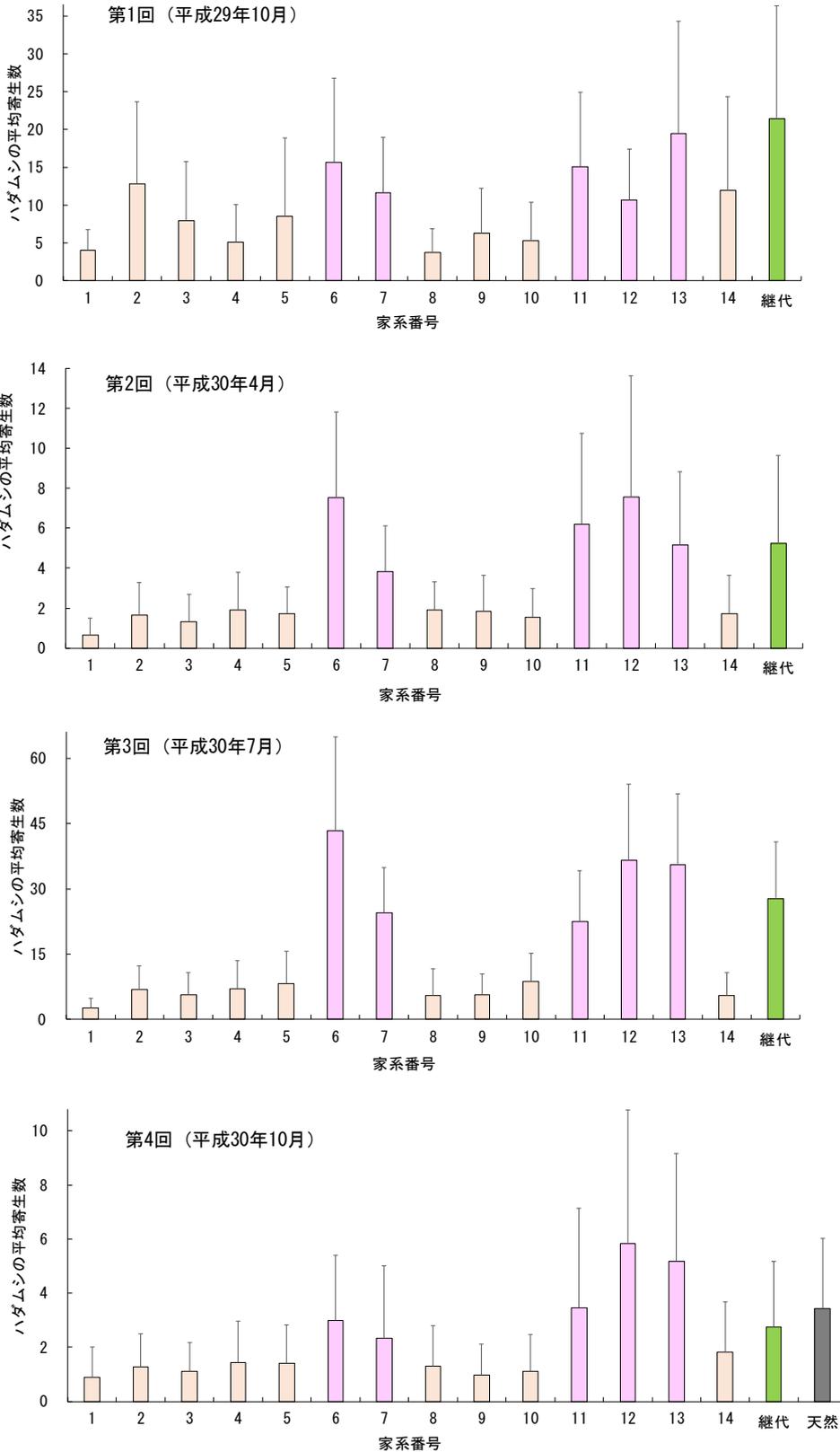


図6 選抜人エブリF<sub>1</sub>のハダムシ寄生状況調査の結果

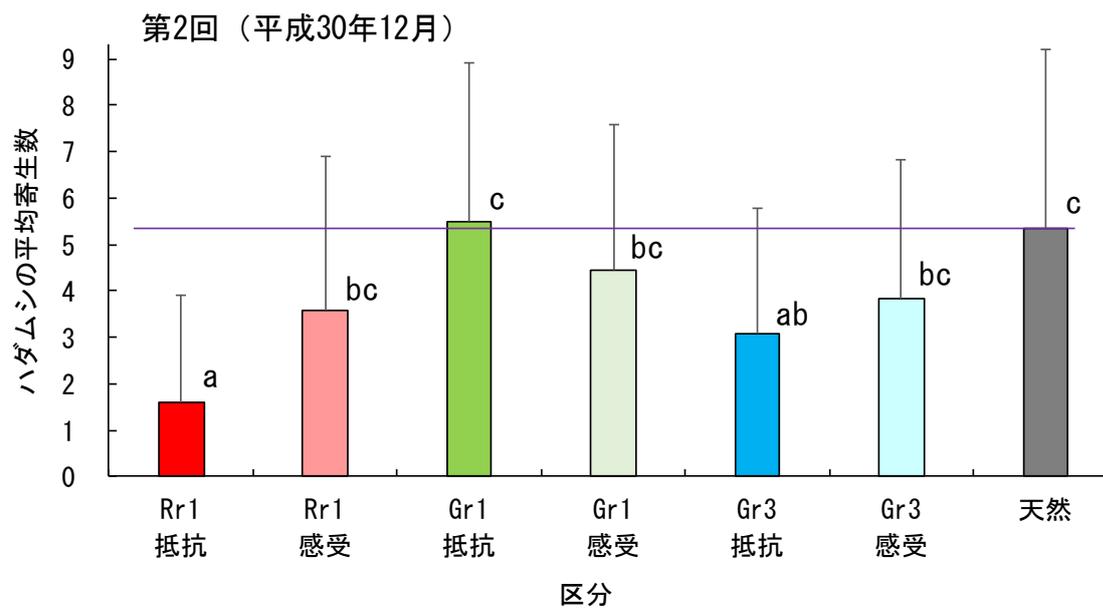
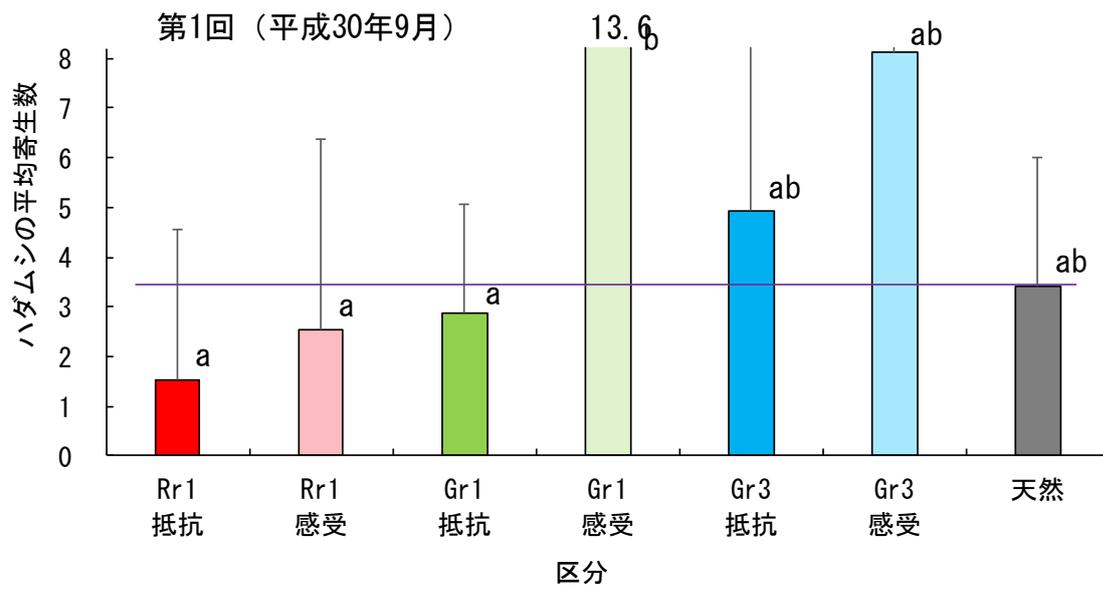


図7 無選抜人工ブリF<sub>2</sub>のハダムシ寄生状況調査の結果

Tukeyの多重比較検定 (P < 0.05)

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
実行課題番号	1－(3)	実行課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	1 ブリの病害虫耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証		
実行課題名	(3) ハダムシ抵抗性に関与する遺伝子座の同定と選抜育種用のマーカーの開発		
実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所育種研究センター 尾崎照遵・奥澤公一・荒木和男		

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

これまでブリについては、単純反復配列多型（SSR）や発現遺伝子の中の一塩基多型（SNP）を高密度にマッピングした遺伝子地図を作成することにより、リアルタイムPCR等による遺伝子解析技術を開発し、迅速で精度の高いジェノタイプング解析を可能にしてきた。また少ない親魚候補からではあるが、ハダムシ抵抗性に関連する遺伝子座の量的形質遺伝子座（QTL）解析を行い、確立した解析手法の有用性を証明する結果としてハダムシ抵抗性と関連するDNAマーカーの開発に成功している。

本研究では、これまでに構築されたSNPによるQTL解析技術、連鎖不平衡ブロックの同定法、及びブリハダムシ抵抗性形質の遺伝子座の情報を充実させ、実行課題1-(2)で作出する無選抜ブリ（以下、無選抜ブリ系統）の後代家系である無選抜人工ブリF<sub>2</sub>家系において、マーカーアシスト選抜育種（Marker-Assisted Selection: MAS）に用いる親魚選抜用のSNPマーカーの開発と、QTL候補領域の連鎖不平衡ブロックの判別によるハダムシ抵抗性を示す親魚選抜を行う。さらに1万尾の天然ブリからのハダムシ寄生調査による大規模スクリーニングを行った後の選抜天然ブリ（以下選抜ブリ系統）の交配家系である選抜人工ブリF<sub>1</sub>家系を用いて、さらなるハダムシ抵抗性を示すQTL解析と遺伝子座の同定を行う。

### 2) 研究方法

#### ① ブリハダムシ抵抗性形質の遺伝性の確認

無選抜ブリ、選抜ブリの2つの年級群におけるハダムシ人為寄生試験、及び寄生状況調査など条件の違う環境による寄生数データを用いて、制限最尤法（REML法）を中心としたブリハダムシ抵抗性形質の遺伝率の推定を行った。

#### ② ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の特定

無選抜ブリ、選抜ブリの年級群においてSNPチップアレイを用いたインターバルマッピン

グを主体としたQTL解析による遺伝解析を行った。

③ ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックの確認

無選抜ブリ系統について、QTL解析によって特定されたブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域におけるSNPジェノタイプから家系内でマーカーアシスト選抜（linkage disequilibrium marker-assisted selection :LD-MAS）を行うためにQTL信頼区間を考慮して連鎖不平衡ブロックの確認を行った。

④ ブリハダムシ抵抗性形質を持つ親魚候補の選抜

無選抜ブリ系統について、ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックを保存している個体をF<sub>1</sub>選抜、F<sub>2</sub>選抜を行い、最終的にブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックのみを持つ系統を選抜・確立した。

### 3) 研究結果

① ブリハダムシ抵抗性形質の遺伝性の確認

無選抜ブリ系統、選抜ブリ系統の2つの年級群ともにハダムシ人為寄生試験による寄生数データを用いた場合には0.3~0.6ほどの高い遺伝率を示した。また選抜ブリにおいては野外での寄生状況調査による寄生数データを用いた反復計測による寄生数データを用いる条件での遺伝率の推定においても0.18ほどの実現性のある遺伝率を示した。

② ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の特定

無選抜ブリ、選抜ブリの年級群においてSNPチップアレイを用いたインターバルマッピングを主体としたQTL解析による遺伝解析を行った結果、各家系における表現型分散を10%以上説明できるQTL候補領域を14カ所以上見つけることができた。

③ ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックの確認

無選抜ブリ系統について、QTL解析によって特定されたブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域におけるSNPジェノタイプから家系内でマーカーアシスト選抜を行うために、QTL信頼区間を考慮して連鎖不平衡ブロックの保存性の確認を行った。5カ所において、QTL候補領域内のSNP多型（SNP 272座位）を確認し、連鎖不平衡ブロックが広い領域で保存されていることを確認した。

④ ブリハダムシ抵抗性形質を持つ親魚候補の選抜

無選抜ブリ系統について、3系統（Rr1, Gr1, Gr3系統）においてブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックを保存している個体についてF<sub>1</sub>選抜、F<sub>2</sub>選抜を行い、最終的にブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロック（5つのQTL領域）のみを安定的に保存する3系統を選抜・確立した。

### 4) 成果活用における留意点

今回確立した無選抜ブリ3系統については、ブリハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックを保持していることを確認しているためドナー系統としての利用は可能ではある。今後これらを一般の人工種苗と交配してマーカーアシスト浸透交雑（Marker-Assisted integration: MAI）や、3系統間交雑からすべてのQTL候補領域において望ましい遺伝子座がホモ接合の個体を作成する遺伝子（マーカー）ピラミッド構築が可能であるが、選抜親魚とそのQTL候補領域の利用の際には、SNPマーカーによる連鎖不平衡ブロックの保存性を確認しながら交配が必要なことを利用者に十分に説明する必要がある。

すなわちマーカーの位置情報と遺伝型の情報がないまま、親魚をランダム交配してもブ

リハダムシ抵抗性の表現形質は再現できないことを十分に説明する必要がある。また逆にQTL領域の連鎖不平衡ブロックにあるSNPの遺伝型の情報についての詳細を論文など成果として公表するまでは、SNPマーカー情報の公開はできるだけさける。このような対応をすることで、利用者が知財に関して適正な利用に同意ができない場合は、コピー防止、独自の系統の確立を防いで、知財を保護する対策が可能となる。

#### 5) 今後の課題

確立したブリハダムシ抵抗性系統の維持管理と、開発したブリハダムシ抵抗性系統を実際の養殖現場で社会実装する際には、必要な知見等の追加調査をすることも検討する必要性もある。また、参画機関の民間企業には優先的に今回の開発系統利用を可能にする必要があるが、水産研究・教育機構の公益性という立場からも、他自治体、他機関、他民間企業への譲渡・販売を可能とする制度の整備も必要である。

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
実行課題番号	1－(4)	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	1 ブリの病害虫耐性品種（家系）の作出と養殖適性の実証		
実行課題名	(4) 有用家系の不妊化技術の開発（3倍体の作出技術の開発）		
実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 育種研究センター 山口寿哉・嶋田幸典・吉田一範・風藤行紀・奥澤公一・岡本裕之・尾崎雄一・石川卓 西海区水産研究所 資源生産部 野田勉・堀田卓朗・篠田理仁・中条太郎・秋田一樹・藤浪祐一郎		

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

選抜の結果、遺伝的に均一化が進んだブリが養殖場から逃亡すれば、天然のブリの遺伝的多様性の保全などに好ましくない影響を及ぼす危険性が危惧される。これまでの淡水魚の研究から2倍体性の魚種を3倍体化した場合、不妊化出来ることが知られている。ブリの染色体数は48本であり2倍体性の魚類であると推定されている。そこで、生物多様性影響を軽減すること、および選抜育種された家系の知財保護を目的に、ブリの3倍体化による不妊化技術の開発を行う。

### 2) 研究方法

#### 3倍体ブリ作出手法条件の検討

第2極体放出阻止による3倍体作出のために、まずは受精直後の第2極体放出時期を組織学的な手法を用いて調べ、低温及び高温処理による3倍体の作出条件の検討を行った。温度処理は人工授精直後の受精卵を一定温度に保った水槽でインキュベートすることで処理を行った。3倍体かどうかの判別手法としてフローサイトメーター（CyFlow SL, Partec等）を用いた。

#### 3倍体ブリの飼育と測定

通常の2倍体ブリが精子や卵をつくる成熟時期（4月頃）においても3倍体は不妊であることを確認するために、3歳の成熟時期まで2倍体群と3倍体群を分けて陸上水槽で飼育した。また、養殖特性として2倍体との成長の比較を行うために、無作為に抽出した10～30

尾前後の尾叉長及び体重の測定を定期的に行った。

#### サンプリング

主に組織学的な解析のために受精卵や生殖腺をブアン固定液または10%中性ホルマリン液を用いた組織固定サンプリングを行った。固定処理したサンプルは、翌日に70%エタノールに溶液を交換し冷蔵保存した。また、生殖腺重量指数(GSI: Gonadal somatic index)を調べるために個体ごとの体重と生殖腺重量を測定した。

#### 組織学的解析

固定サンプルから組織切片を作製するために、パラフィンまたは水溶性樹脂 (JB-4 Embedding kit®, Polysciences) による包埋を行った。ミクロトームを用いて薄切した組織切片はヘマトキシリン・エオシン染色、TUNELアッセイ、免疫化学染色、テロメア蛍光in situ hybridization (テロメアFISH)を行った。

### 3) 研究結果

#### 3倍体ブリ作出手法の開発

通常の魚類の卵の場合、受精により再開した第2減数分裂時に二つに分かれた染色体のうち片方の染色体が第2極体として卵外へ放出される。しかし、極体が形成または放出される時期に温度や圧力などの処理を行うことで第2極体の放出を阻止可能とされている。さらに、2倍体魚の第2極体放出を阻止した場合は極体として放出される予定だった染色体が追加され3倍体となる (Piferrer et al., 2009)。本実行課題では第2極体放出阻止によるブリ3倍体化の条件検討を行った。第2極体の放出を阻止するためには極体が放出される時期の把握が重要であることから、パラフィン包埋による組織切片を作製して極体放出時期を調べた。その結果、第2極体は遅くとも受精後8分以内に卵外へ放出されることが分かった。次に、温度処理による3倍体化条件の検討を行った。平成27年度に低温処理による条件検討を行った結果、正常ふ化率は低温処理を行わなかった対照区で $33.1 \pm 10.0\%$ であった。これに対し、 $0^\circ\text{C}$ 、 $3^\circ\text{C}$ および $5^\circ\text{C}$ で5分間処理した区ではそれぞれ $22.9 \pm 11.0\%$ 、 $12.5 \pm 10.0\%$ および $18.9 \pm 9.0\%$ であった。10分間処理した区ではそれぞれ $13.4 \pm 10.8\%$ 、 $11.0 \pm 10.5\%$ および $14.8 \pm 13.8\%$ 、20分間処理した区ではそれぞれ $10.7 \pm 9.6\%$ 、 $4.5 \pm 2.7\%$ および $2.9 \pm 0.6\%$ であった。正常ふ化率は対照区で33%と低かったものの、低温処理区ではいずれも対照区より低かった。特に、 $3^\circ\text{C}$ および $5^\circ\text{C}$ 、20分間処理が低い正常ふ化率を示した。また、3倍体化率は未処理の対照区で $5.6 \pm 5.6\%$ 、 $0^\circ\text{C}$ 、 $3^\circ\text{C}$ および $5^\circ\text{C}$ で5分間処理した区ではそれぞれ $94.1 \pm 3.2\%$ 、 $63.9 \pm 32.0\%$ および $66.2 \pm 25.9\%$ 、10分間処理した区ではそれぞれ $93.5 \pm 3.3\%$ 、 $100 \pm 0\%$ および $77.5 \pm 14.7\%$ 、20分間処理した区では $97.2 \pm 2.8\%$ 、 $97.2 \pm 2.8\%$ および $97.2 \pm 2.8\%$ であった。 $3^\circ\text{C}$ および $5^\circ\text{C}$ 、5分間の低温処理では3倍体化率が低い値を示したが、他の処理と有意差はなかった (図1)。高温処理条件の検討も行ったが、低温処理ほどの3倍体出現率は得られなかった。

低温処理条件の検討結果について、最も高い3倍体出現率かつ高い生残率を示した条件は受精後3分の受精卵を $3^\circ\text{C}$ 、10分間処理した条件で、その次は $0^\circ\text{C}$ 、20分処理だった。しかしながら、その差は僅差だった。3倍体化処理の実用化にあたっては水温を管理しやすい海水で作った氷の使用が検討された。海水氷を使用することにより受精卵を低

温処理するための海水の温度を0°Cに保つことが可能で、水温を管理しやすいことから海水氷を使用した低温処理手法が用いられた。処理条件については上記のように0°C20分処理で高い3倍体化率が得られており、さらに他の課題でもこの低温処理条件（0°C20分）を用いて3倍体ブリを作出したところ、高い3倍体出現率が示された。このように、再現性が得られたことから量産規模での3倍体ブリ作出には海水氷を用いた海水冷却手法及び処理条件（受精直後の卵を0°C20分処理）の検討が推奨される。

### 3倍体ブリの不妊化の検証

ブリはZZ(オス)/ZW(メス)の性決定様式を持つことが既に明らかとなっている (Fuji et al., 2010)。そのため、第2極体放出阻止により作出された3倍体の遺伝型はZZWとなることから、3倍体ブリ (ZZW) は基本的には全て遺伝的にメスとなる。当歳ブリの3倍体生殖腺の分化・発達過程を組織学的に調べたところ、日齢約100日前後の3倍体生殖腺は卵巣に特徴的な構造である卵巣腔を形成し、2倍体卵巣と比較して形態的な違いは見つからなかった。しかしながら、日齢170日前後では2倍体卵巣では卵母細胞の形成が確認されたが、3倍体では卵母細胞は見つからなかった (図2)。卵巣腔を形成することから3倍体ブリの生殖腺は卵巣型であることが組織学的にも確認され、さらに卵母細胞を作らないことが確認された。この卵母細胞を作らない不妊が2歳以降の生殖腺が成熟する時期においても継続して不妊であることを確認するために、2歳と出荷サイズ (体重約4kg) に達する3歳まで飼育を行い、成熟時期 (4月) の生殖腺についての組織学的な観察と比較を行った。その結果、2歳と3歳共に2倍体の卵巣では卵母細胞が成熟するが、3倍体生殖腺では卵母細胞は見つからなかった (図3)。また、成熟時期の3倍体ブリの生殖腺重量指数 (GSI: Gonadal somatic index) は2倍体の卵巣や精巣と比較して有意に低い値を示した (図4)。これらの結果から3倍体ブリは3歳の成熟時期または体重約4kgに達しても不妊であると考えられる。

### 3倍体ブリの養殖特性

本実行課題では、染色体操作により作出された3倍体であることから2倍体群と共に3倍体群は陸上水槽での飼育を行った。そのため、高水温となる夏場に測定を行うことができなかったが、当歳魚及び1歳から3歳における尾叉長と体重の測定を行った。また、得られた測定結果 (図5-1、5-2) についての分散分析を行なった。その結果、2倍体群と3倍体群の体重および尾叉長には有意な差が見られた (二元配置の分散分析、体重、尾叉長ともに $P < 0.01$ )。このことから2倍体群の体重および尾叉長は3倍体群より大きいと考えられた。一方、測定数が少ないので統計的比較はできなかったが、個体識別を行い、3歳成熟時期の4月を基準とした相対的な体重の変化を調べたところ、2倍体個体では体重が減少するのに対して3倍体個体では体重が増加する傾向が示された (図6)。

海産養殖魚であるヒラメやヨーロッパシーバス等では3倍体成魚の体重、尾叉長及びコンディションファクターについては2倍体よりも劣るという研究結果が報告されている (Felip et al., 2001a, 2001b, Tabata et al., 1989)。しかしながら、通常、2倍体の成長は成熟 (産卵) 時期に低下するが、この傾向は3倍体においては顕著ではないことが主にサケ科魚類で報告されている (Piferrer et al., 2009)。予備的な試験ではあるが、3倍体ブリも同様の傾向がみられたため、生殖腺成熟が及ぼす成長への影

響は3倍体ブリも他魚種と同様に成熟時期前後の一定期間は2倍体と同等か上回る成長を示す可能性が考えられる。

#### 3倍体ブリが不妊となる理由について

一般的に魚類の卵巢では第1減数分裂を開始した卵原細胞が1次卵母細胞へと分化するが、3倍体ブリでは卵母細胞が見あたらないことから卵原細胞または第1減数分裂に不妊の原因があると考えられた。そこで、まずは卵母細胞形成開始時期(日齢100~200)の生殖細胞(卵原細胞)について2倍体と3倍体に違いがあるかどうかをヘマトキシリン・エオシン染色、卵原細胞マーカー(Sox2)または細胞増殖マーカー(ヒストンH3)の抗体を用いた免疫化学染色及び、アポトーシス細胞検出手法(TUNELアッセイ)を用いて2倍体と3倍体の比較を行った。しかしながら、それらの陽性を示す卵原細胞の数や形態的な特徴について2倍体と3倍体に大きな差異は無かった。このことから卵原細胞については2倍体と3倍体に大きな違いは無いと考えられた。次に、第1減数分裂の進行について2倍体卵巢と3倍体生殖腺に違いがあるかどうかを調べた。第1減数分裂進行の指標となる組織切片上の生殖細胞核内の染色体及びテロメアの分布の比較を行ったところ、2倍体と3倍体共に核内の染色体が凝集し、テロメアが偏って分布している生殖細胞が確認された(図7)。この特徴的な構造はブーケ構造とされ、第1減数分裂前期のザイゴテン期に形成される。このことから3倍体ブリの生殖細胞は第1減数分裂開始後にザイゴテン期まで減数分裂が進行していることが分かった。しかしながら、ザイゴテン期の次のパキテン期については、パキテン期の特徴とされる核内の凝集した染色体とテロメアが拡散した構造を示す生殖細胞が2倍体の卵巢で確認されたが、3倍体生殖腺ではそのような構造を示す生殖細胞は見つからなかった。このことから、3倍体ブリの生殖細胞(卵原細胞)は2倍体の卵巢と同様に卵母細胞形成に向けた第1減数分裂を開始するが、分裂の進行は分裂前期のザイゴテン期で停止していることが確認された。

3倍体ブリ生殖細胞の第1減数分裂はザイゴテン期で停止していた。他魚種においても3倍体卵巢の第1減数分裂はザイゴテン期で停止することが報告されている(Piferrer et al., 2009)。一般的に魚類の卵巢では卵原細胞は第1減数分裂前期のザイゴテン期に父親(精子)由来の染色体と母親(卵)由来の2組の染色体が接合する。しかしながら、3倍体魚では染色体が3組存在することでザイゴテン期の染色体の接合に不具合が生じるとされている(Carrasco et al., 1998, Cuñado et al., 2002)。このことから、3倍体ブリについても他魚種と同様に第1減数分裂時に3組の染色体が正常に接合できないことが原因で減数分裂が進まずに不妊になると考えられる。

#### 4) 成果活用における留意点

厳密な比較は行っていないが、極体放出阻止処理は受精卵に強い負荷をかけることから、ロット毎の受精卵の質の差に依存して特に生残率が変化する傾向がみられた。そのため、本実行課題で示した3倍体出現率及び生残率は状況により異なる場合が考えられる。

本実行課題で行った調査では、3歳の体重約4kgに達した個体も含めた全ての3倍体ブリの生殖腺で卵母細胞は見つからなかった。しかしながら、他魚種の雌では高齢になると成熟した卵母細胞を部分的に形成することが報告されている(Piferrer et al., 2009)。このことから3倍体ブリにおいても加齢と共に卵母細胞が形成される可能性が考えられる。

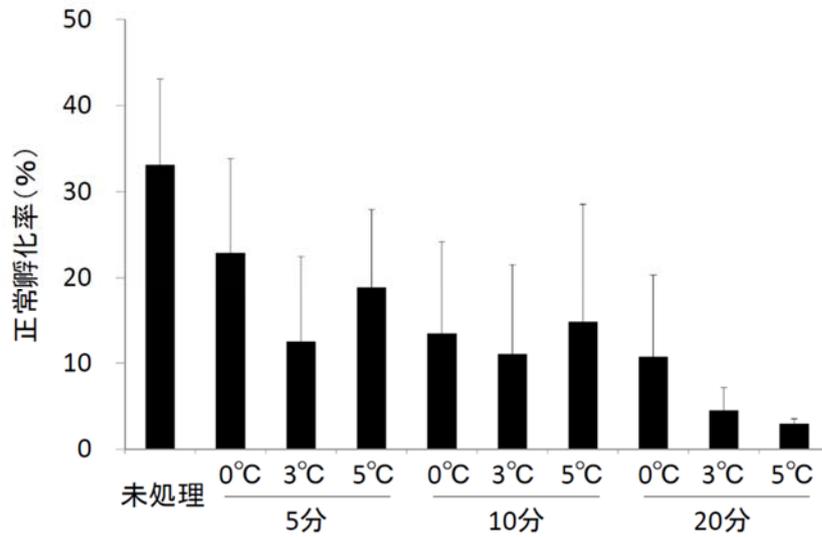
## 5) 今後の課題

3倍体化による不妊は養殖魚にとっていくつかの利点を持つことから、様々な養殖魚の3倍体魚が作出されてきた。さらに、2倍体と比較した3倍体の成長及び生残の調査、血液学的な解析、酸素消費量、免疫応答、ストレス応答などの養殖に係る様々な特性の調査研究もなされている (Benfey, 1999)。本実行課題では3倍体ブリが持つ特性の一端を示すことができたが、さらなる3倍体ブリが持つ特性が明らかとなることにより3倍体ブリに適した飼育手法開発などの実用化に向けた応用技術の開発が期待される。

## <引用文献>

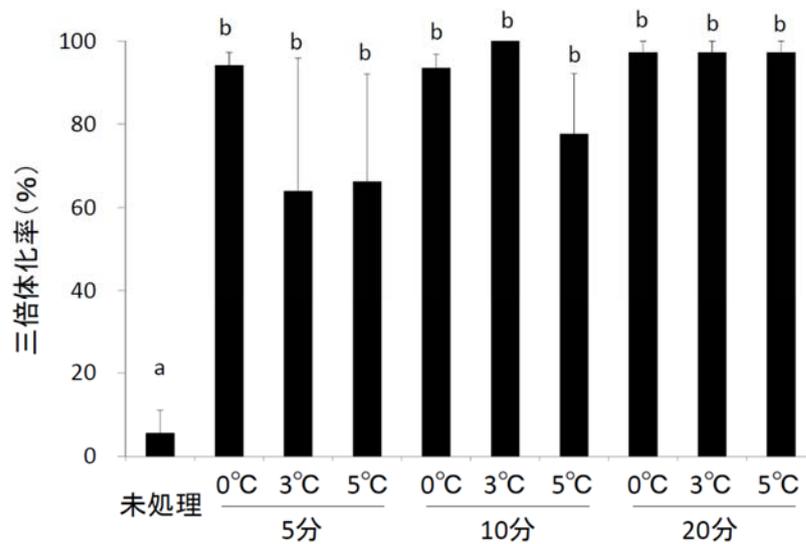
- Benfey, T.J. (1999) The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev Fish Sci* 7(1): 39-67
- Carrasco L., Doroshov S., Penman D.J., Bromage N. (1998) Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Reprod. Fertil* 113: 197-210
- Cuñado N., Terrones J., Sánchez L., Martínez P., Santos J.L. (2002) Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, (*Scophthalmus maximus*) (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity* 89: 460-464
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Pifferrer F. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*. 2001a; 111: 175-195
- Felip A, Pifferrer F, Zanuy S, Carrillo M. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. *Journal of Fish Biology*. 2001b; 58: 76-88
- Fuji K., Yoshida K., Hattori K., Ozaki A., Araki K., Okauchi M., Kubota S., Okamoto N., Sakamoto T. (2010) Identification of the sex-linked locus in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 308: 51-55
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. (2009) Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125-156
- Tabata K, Gorie S, Kawamura Y. Growth, survival and maturation in the induced triploid hirame *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzosyoku*. 1989; 36 (4): 267-276 (in Japanese with English abstract)

ブリ3倍体処理条件（処理温度と時間）と正常ふ化率



One-way ANOVA;  $F_{9,20}=0.848$ ,  $P=0.5830$

ブリ3倍体処理条件（処理温度と時間）と3倍体化率の関係



One-way ANOVA;  $F_{9,20}=4.286$ ,  $P=0.0032$ , Fisher's PLSD;  $P<0.05$

図 1. 低温処理による3倍体ブリ作出条件の検討

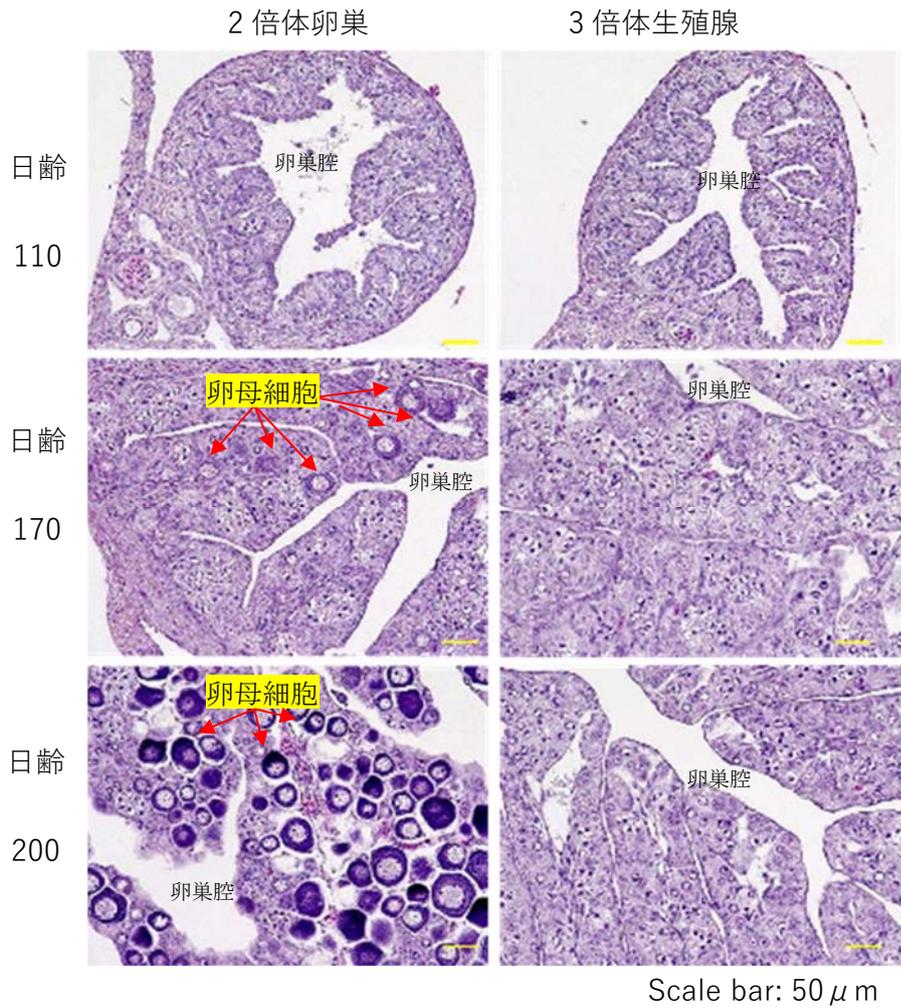


図2. 卵母細胞形成開始時期の2倍体と3倍体の生殖腺の比較

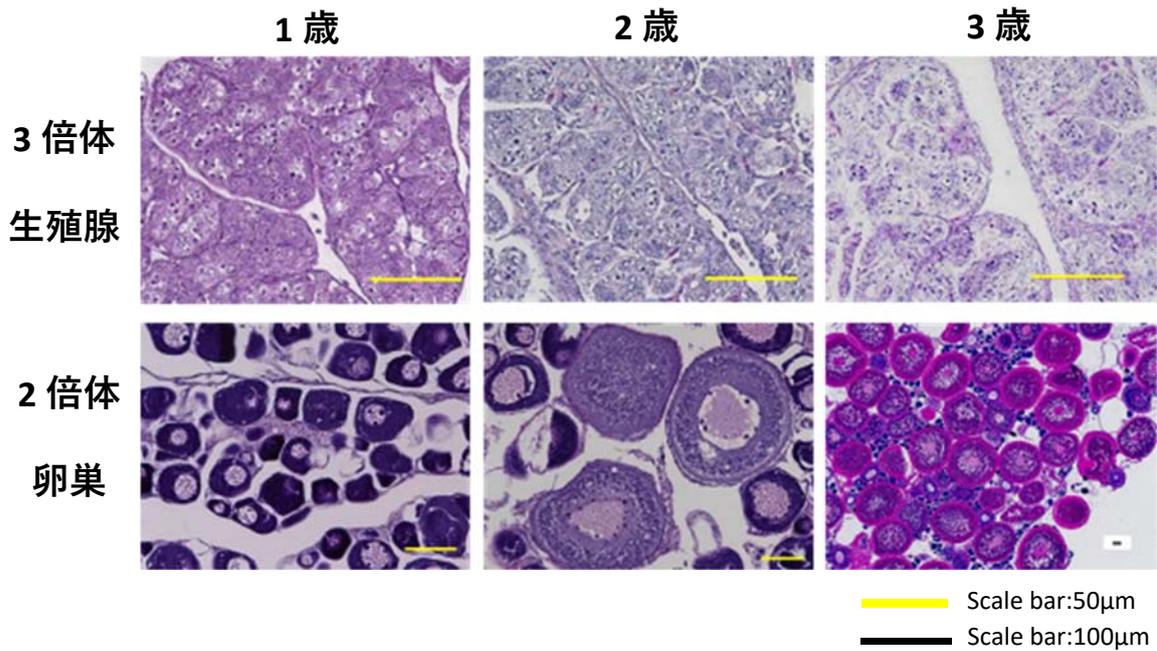


図3. 1~3歳成熟時期（4月）の2倍体卵巣と3倍体生殖腺の比較

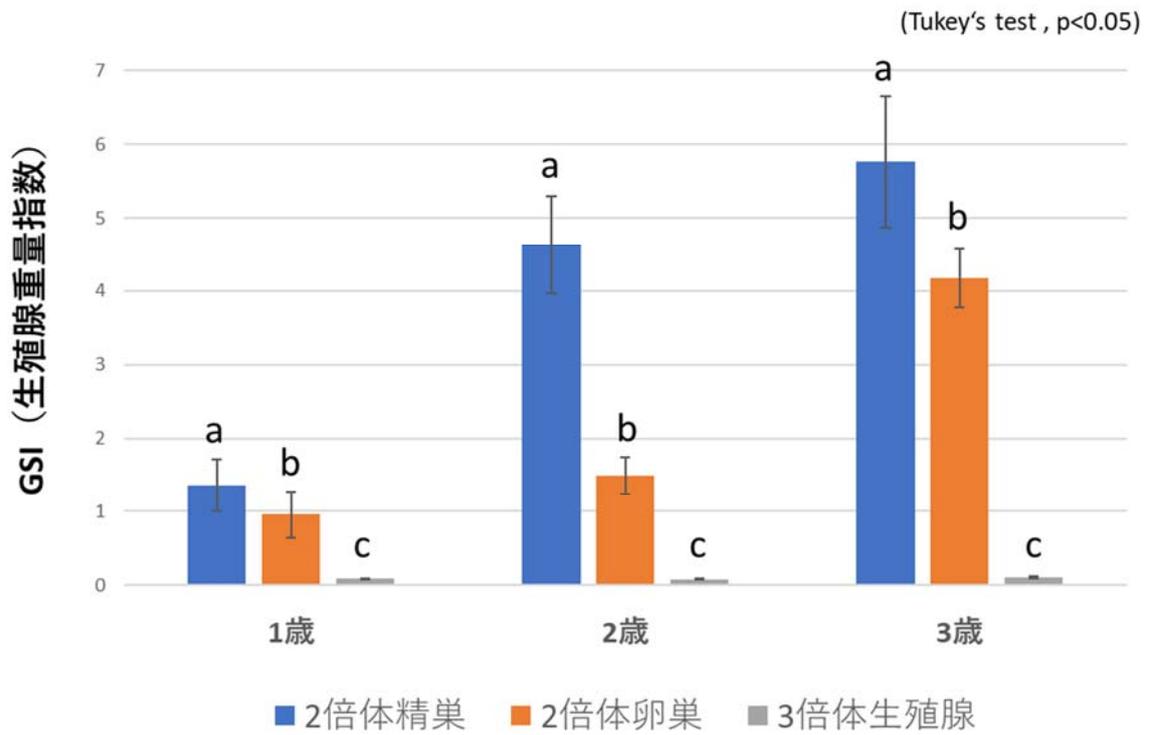


図4. 1～3歳成熟時期（4月）の2倍体精巣、卵巢及び3倍体生殖腺のGSIの比較

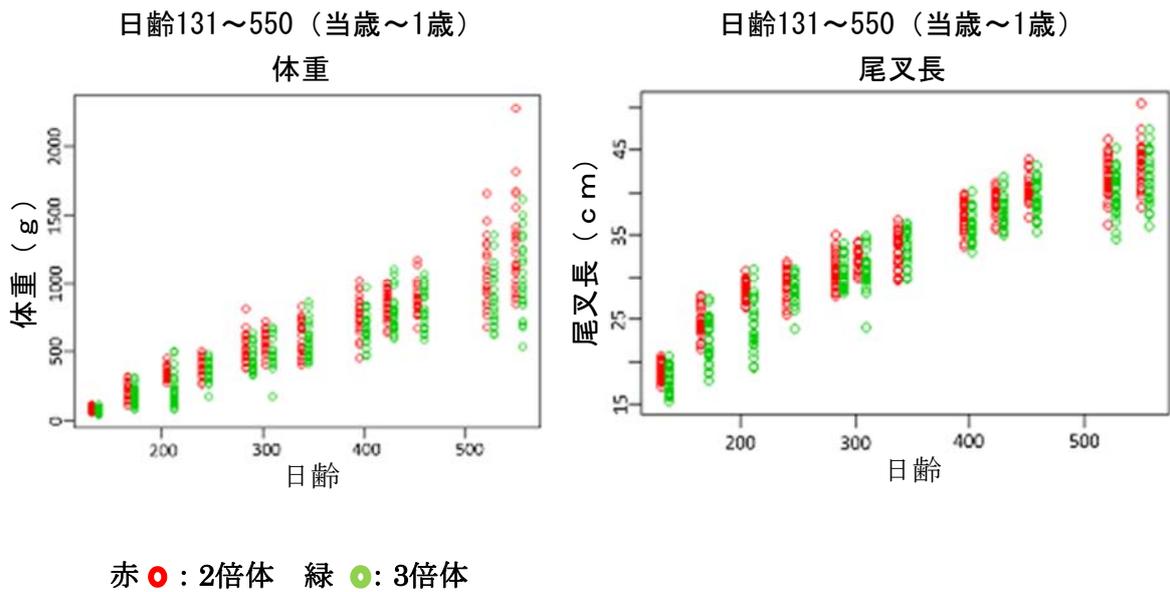
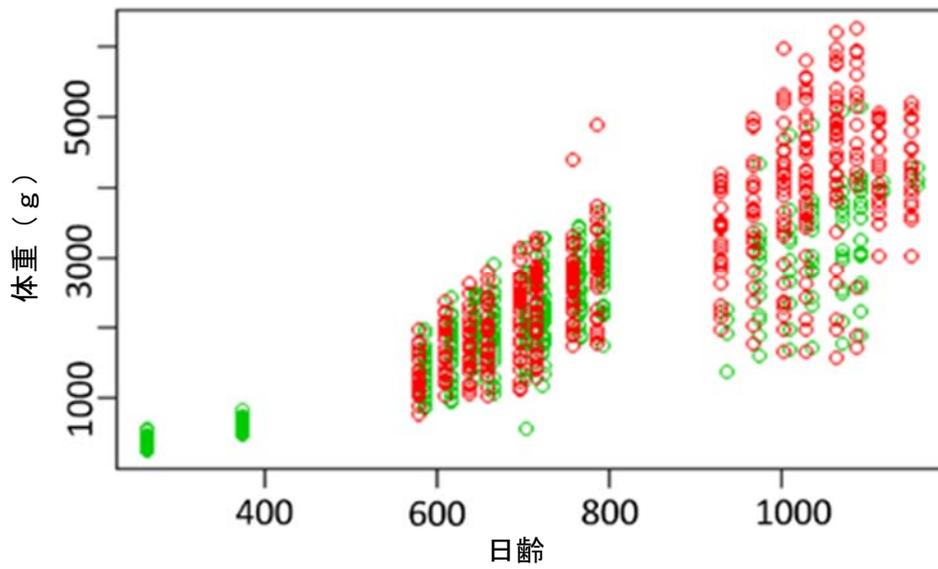


図5-1. 当歳の2倍体群と3倍体群の体重と尾叉長の測定結果

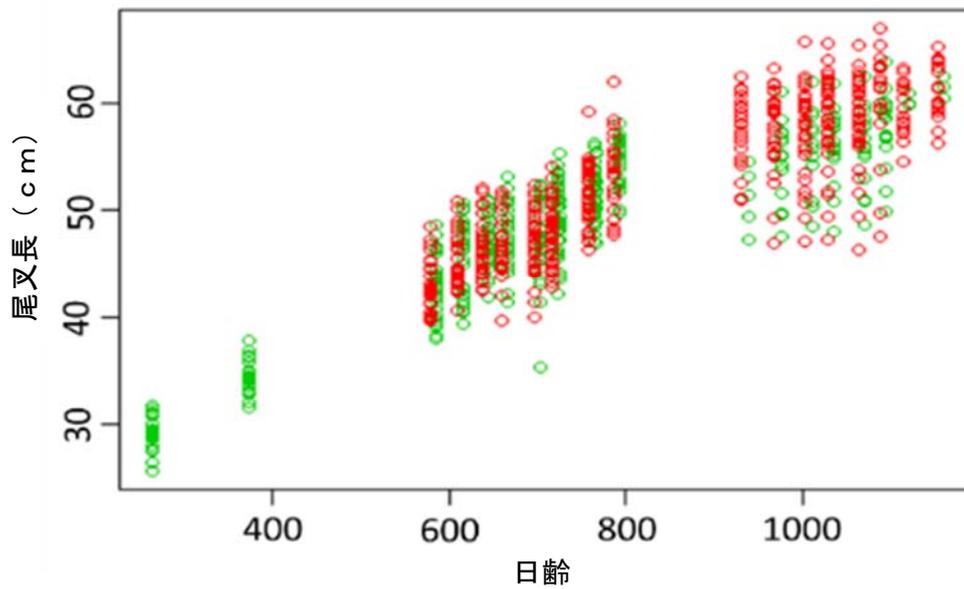
日齢580～1154 (1歳～3歳)

体重



日齢580～1154 (1歳～3歳)

尾叉長



赤 ● : 2倍体 緑 ● : 3倍体

図5-2. 1～3歳の2倍体群及び3倍体群の体重と尾叉長の測定結果

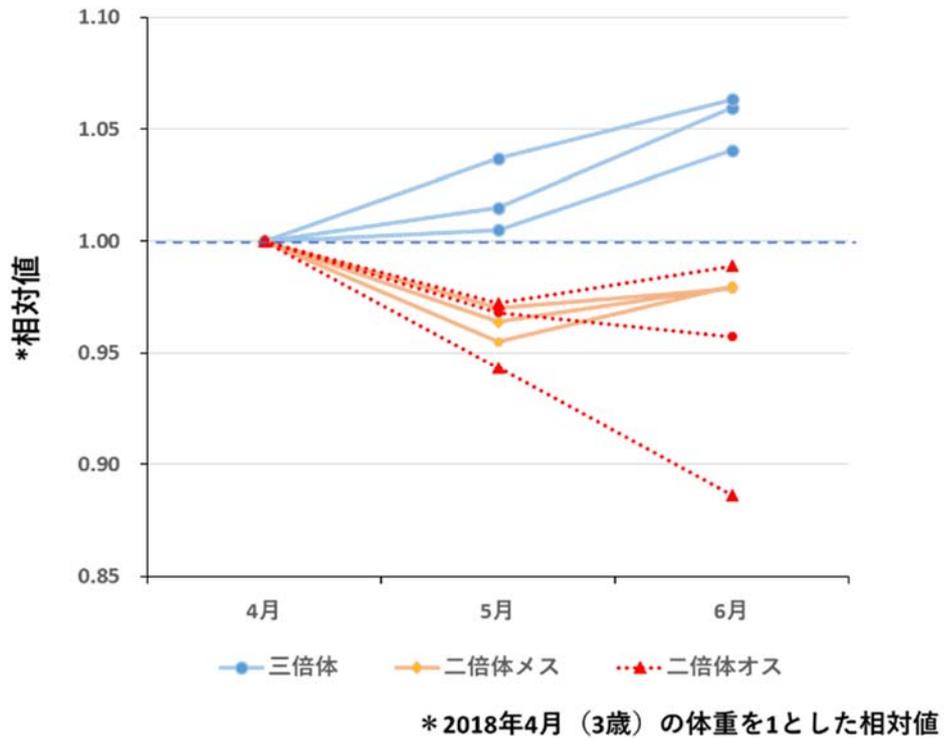


図6. 3歳成熟時期の2倍体と3倍体の個体ごとの体重の変化

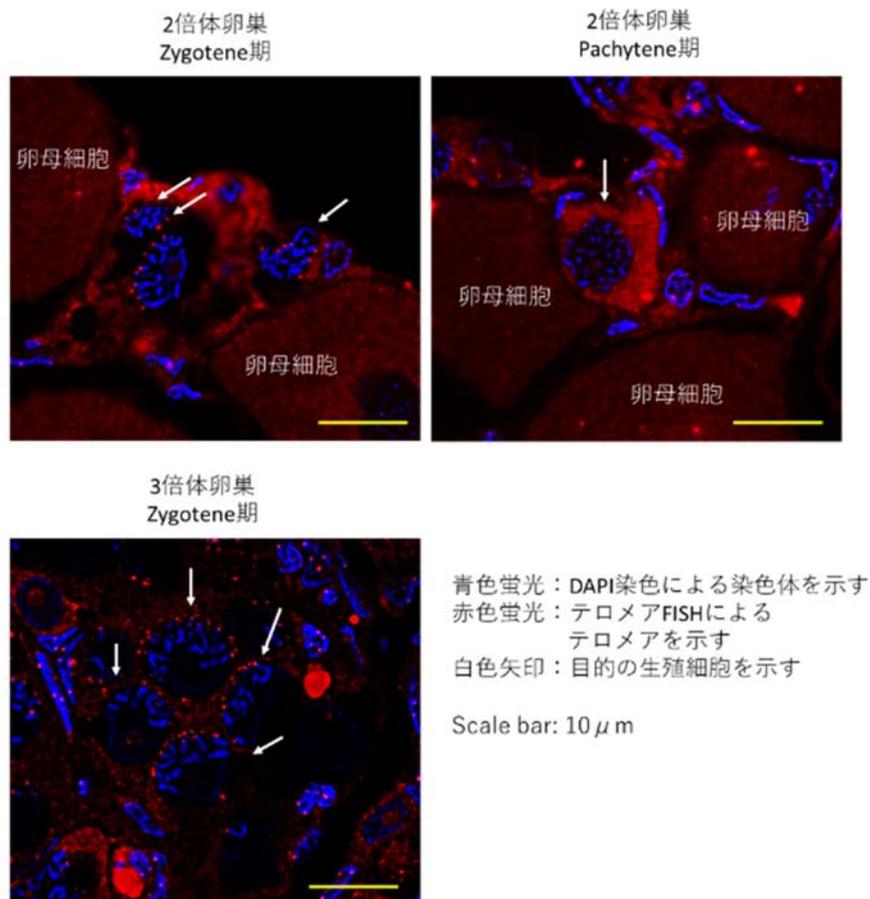


図7. 2倍体と3倍体の第1減数分裂前期生殖細胞の比較

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
実行課題番号	2－（1）	実行課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	2 ブリのゲノム情報を応用したカンパチの病害虫耐性品種（家系）作出技術の開発		
実行課題名	（1）カンパチの1対1交配技術の開発とハダムシ抵抗性に関する実態調査		
実行課題 代表研究機関・研究室・研究者 名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 育種研究センター 山本一毅・吉田一 範・佐藤光・荒木和男・尾崎照遵 増養殖研究所 鈴木俊哉		
共同研究機関・研究室・研究者 名等	マルハニチロ株式会社 椎名康彦・川瀬純也・森脇俊尚・ 藤田耕太郎 株式会社桜島養魚 山本孝・内藤信二 有限会社奄美養魚 小野寺純・荒木誉之・天野文雄・関昭 生		

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

養殖用の種苗を輸入種苗に依存してきたカンパチは、それらからの脱却が求められ、人工種苗の生産技術の開発が近年加速した。種苗生産のスタートである親魚養成においては、本種の通常の産卵期（5～6月）に大量採卵の技術を確立し、さらには、成熟・産卵を水温と日長条件を人為的に調節することで非産卵期における採卵にも成功している。しかし、量産を目的とした大量採卵であり、採卵に供試する親魚数は多数を要し、育種には必要不可欠である1対1交配するには至っていない。

そこで、本研究ではカンパチの育種を可能にするため、本種の成熟を人為的に誘導して確実に1対1交配を可能とする種々の条件を把握し、良質卵の安定採卵技術を開発する。開発された技術を活用して、ハダムシ抵抗性の解析家系を作出してハダムシの寄生数調査を行い、ハダムシ抵抗性の連鎖解析に貢献し、同定されたDNAマーカーを用いてハダムシ抵抗性のF<sub>2</sub>家系作出のための親魚の選抜を行い、親魚の養成を行う。

### 2) 研究方法

#### 【1対1交配技術の開発】

- ① 1対1交配の基盤となる情報を得て必要な条件の探索と課題の抽出を行うため、hCGを投与して i)人工授精と ii)水槽内交配の2つの手法で交配を行った。供試魚には天然由来の養成親魚（3歳魚）のうち、成熟期（平成26年6月）に雄親魚は腹部を圧迫して採精可能な個体、雌親魚は平均卵母細胞径が600μm以上を有する個体を用いた。そ

れぞれ hCG（投与量:600IU/kg・BW）を投与した後、人工授精は乾導法、水槽内交配は陸上コンクリート 65k1 水槽に雄 1 尾、雌 1 尾を収容して実施した。

- ② 産卵成績を向上させるため、hCG 投与後から人工授精を行うまでの時間について検討した。供試魚には天然由来の養成親魚（4歳魚）および人工生産養成魚（3歳魚）のうち、成熟期（平成 27 年 5～6 月）に雄親魚は腹部を圧迫して採精可能な個体、雌親魚は平均卵母細胞径が  $600\mu\text{m}$  以上を有する個体を用いた。排卵までの時間を考慮して、hCG（投与量:600IU/kg・BW）を投与した約 42 時間後と 48 時間後にそれぞれ人工授精を行い比較した。
- ③ 水槽規模が水槽内交配の成績に与える影響について検討した。供試魚には天然由来の養成親魚（4歳魚）を用い、雌親魚は平均卵母細胞径が  $600\mu\text{m}$  以上を有する個体を用いた。水槽には 65 k1 角型コンクリート水槽、2.5 k1 円型ビニール水槽、1k1 円型ポリエチレン水槽を用い、hCG 投与（投与量:600 IU/kg・BW）を行った後雌雄 1 尾ずつを収容した。試験は各水槽について 6 回行った。また、1k1 水槽の産卵成績をさらに向上させるための手法として、雌親魚の平均卵母細胞径に注目し、これまでのホルモン投与の目安であった平均卵母細胞径  $650\mu\text{m}$  以上とさらに大型の  $700\mu\text{m}$  以上で産卵成績の比較試験を各 5 回行った。

#### 【ハダムシ抵抗性に関する実態調査】

- ④ 解析家系 F<sub>1</sub>の親魚候補として天然由来のカンパチ 120 尾（平成 27 年度で 3 歳）を増養殖研究所古満目庁舎（以下、古満目庁舎）の海面小割生簀で飼育した。飼育中は個体毎のハダムシ寄生状況調査を平成 26 年 9 月から平成 27 年 5 月にかけて 5 回行った。カンパチにはベネデニア・セリオレ (*Benedenia seriola*) とネオベネデニア・ギレレ (*Neobenedenia girella*) の 2 種が寄生するため、寄生したハダムシ種についても同時に調査を行った。
- ⑤ 古満目庁舎地先の海面小割生簀で飼育中であった親魚候補を同庁舎の陸上水槽へ移し平成 28 年 5 月からこれらの親魚を用いて 1 対 1 交配を開始した。得られた受精卵は増養殖研究所志布志庁舎（以下、志布志庁舎）へ搬送して種苗生産を開始した。
- ⑥ 平成 28 年 12 月に増養殖研究所上浦庁舎（以下、上浦庁舎）に家系 3 と家系 5 の種苗を各 200 尾ずつ搬出し、12 月に *Benedenia seriola* を用いた人為寄生試験を実施した。試験では 1 尾ごとに寄生したハダムシの採取、全身像の写真撮影、魚体測定、鰭サンプルの採取を行った。
- ⑦ 奄美養魚久志漁場（以下、久志漁場）で飼育中の家系 3 について、発見された QTL を基にハダムシ抵抗性についての親魚候補の選抜を行った。

### 3) 研究結果

#### 【1 対 1 交配技術の開発】

- ① 受精卵の獲得率（採卵できた個体数/供試個体数×100）は人工授精で 100%、水槽内交配で 77.8%であった。しかし、1 尾当たりの採卵数は、人工授精が 7.1 万粒に対して水槽内交配では 22.8 万粒と約 3 倍量を示した。さらに、受精率やふ化率等の産卵成績においても有意に水槽内交配の成績が良好であった（表 1）。一方、受精卵の確保に hCG 投与時の平均卵母細胞径の大きさが関与していることが示され、平均卵母細胞  $650\mu\text{m}$  以上であれば人工授精では 100%、水槽内交配では 88.9%の割合で受精卵を確保できることが分かった。

- ② hCG 投与後 42 時間では受精率が平均 87.8%に対して、48 時間後では 15.0%、ふ化率も同様に 42 時間が平均 85.3%に対して、48 時間後では 20.8%といずれも有意に低かった。1 尾当たりの採卵数では 42 時間後が平均 14.9 万粒、48 時間後では 19.1 万粒であった（表 2）。人工生産養成魚でも同様の結果が得られており（表 3）、hCG 投与後約 42 時間後に人工授精を実施することが産卵成績の向上に寄与することが示唆された。
- ③ 平均総採卵数及び平均ふ化率とも 1kl 水槽 > 65kl 水槽 > 2.5kl 水槽の順を示し、小型水槽による水槽内交配でも良好な受精卵が得られることがわかった（表 4）。1kl 水槽の比較試験では、平均総受精卵数、平均ふ化率とも平均卵母細胞径で 700  $\mu$ m 以上が優った（表 5）ことから、ホルモン投与時の成熟状況を考慮することで 1kl 水槽での産卵成績を向上させることが可能であることが分かった。

#### 【ハダムシ抵抗性に関する実態調査】

- ④ ハダムシの寄生種については 5 月から 11 月までの比較的水温の高い時期はネオベネデニア・ギレレ (*Neobenedeniagirella*) が出現、優占種となり、1 月から 5 月までの比較的水温の低い時期はベネデニア・セリオレ (*Benedenia seriolae*) が優占種となることがわかった（図 1）。実際の養殖現場では、夏期のネオベネデニア症の被害は甚大であることが言われており、本研究の対象種はネオベネデニア・ギレレが有力と考えられるが、解析家系の作出のための親魚候補群で選別した個体は、いずれの 2 種のハダムシでも寄生数の多い個体は多く、少ない個体は少ないという結果が得られており、2 種に対応した解析家系の作出が可能であると考えられた（図 1, 2）。
- ⑤ 5 月中旬までに届いた 6 家系分の受精卵は志布志庁舎に到着した時点で受精卵の発生がほとんど停止していた。morula（桑実胚）期になる前に受精卵をハンドリングしたことが要因と考えられたため、その後はホルモン投与時刻を早めて受精卵が morula 期以降の安定期に入った段階でハンドリングを行うこととした。その後、志布志庁舎に到着時の卵発生の停止はほとんど見られず、生産可能な受精卵を得ることができた。結果として 3 家系の種苗生産に成功した（家系 3：約 2000 尾、家系 5：約 3500 尾、家系 7：約 700 尾）。各家系の掛け合わせは表 6 の通りであった。その後、家系 3 と家系 5 の各 300 尾を次世代の親魚候補として久志漁場において養成を行った。
- ⑥ ハダムシ人為寄生試験では、2 家系とも 40~130 個体のハダムシが寄生し、1 尾あたり平均ハダムシ寄生数は家系 3 が 79.7 個体、家系 5 は 77.5 個体であった（表 7）。この結果を実行課題 2-(2)へ供与し、QTL 解析を実施した結果、家系 3 の連鎖群 19 番において♂3947 雄親由来の QTL が検出された。
- ⑦ 実行課題 2-(2)において、発見された QTL マーカーを用いたマーカーアシスト選抜により家系 3 からハダムシ抵抗性由来のアリルを持つ個体 87 尾と持たない個体 88 尾の計 175 尾が特定された。家系 5 については家系 3 で特定されたアリルを保持していなかった。久志で飼育中の 300 尾の家系 3 から、特定された親魚候補 175 尾を選抜した。

#### 4) 成果活用における留意点

今回家系3において発見されたQTLはベネデニア・セリオレ (*Benedenia seriolae*) を用いたハダムシ人為寄生試験によるものである。海上小割生簀でのハダムシ寄生状況調査において、ハダムシの寄生のしやすさはハダムシ種によらないことが示唆されているものの、詳細な検討はなされていない点に留意する必要がある。

## 5) 今後の課題

今回のプロジェクトにおいて、ハダムシ抵抗性の形質が遺伝することが確認されたこと、並びに育種の一連の流れを実践したことは大きな成果であると考えます。一方で、今後育種を最大限活用していくことを考えると、より多くの親魚から、より多くの家系を作出することが求められる。今回のプロジェクトで最終的に残った家系は3家系のみであったが、家系の維持管理にはかなりの労力を要した。このことから、今後育種が社会実装されていく中で、技術的な側面だけではなくコストや労力についても慎重に検討する必要がある。

表1 平成26年度カンパチ1対1交配試験における採卵試験結果

採卵区分	由来	卵母細胞径 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	総採卵数 (万粒)	受精卵		採卵 成功率(%)	孵化率 (%)
				数(万粒)	率(%)		
人工授精	養成3+	676.8 $\pm$ 17.7	3.5	1.7	17	100 (6/6)	41.2
		713.4 $\pm$ 18.7	7.1	1.8	37.7		53.8
		728.3 $\pm$ 13.8	10.6	3.5	40.7		50.5
		632.5 $\pm$ 20.5	微量	0	-		-
		640.0 $\pm$ 24.8	微量	0	-		-
平均		726.9 $\pm$ 15.4	7	1.7	19		34.5
水槽内交配	養成3+	714.5 $\pm$ 12.7	39.4	30.5	100	77.8 (7/9)	90.2
		653.1 $\pm$ 26.0	36.3	21.2	69.9		78.6
		719.4 $\pm$ 19.5	28.8	14.6	55.4		58.9
		710.8 $\pm$ 15.5	30.5	26.8	94.4		92.2
		728.2 $\pm$ 17.7	0	-	-		-
		724.7 $\pm$ 21.7	21.2	18.2	90.3		90.8
		726.9 $\pm$ 15.4	15	6.8	62.2		62.3
		689.4 $\pm$ 19.8	34.5	30.2	96.4		92.4
		635.8 $\pm$ 22.0	0	-	-		-
		平均		22.8	21.2		81.2

表2 平成27年度カンパチ1対1交配試験における排卵時間別の人工授精結果

試験区分	由来	産卵誘発	供試魚 (平均)	総採卵数 (万粒)	受精卵		孵化率 (%)
					数(万粒)	率(%)	
hCG Inj 42h after	養成4+	hCG 600 IU/kg Wt:22.0 °C	FL:79.6 cm BW:8.1 kg	10.6	9.3	95.2	82.6
				19.5	14.6	82.8	89
				17.7	16.1	90.8	91.2
				11.9	8.8	82.5	88.4
平均値				14.9		87.8	85.3
hCG Inj 48h after	養成4+	hCG 600 IU/kg Wt:22.0 °C	FL:80.0 cm BW:8.4 kg	21.2	0.1	9.2	2.2
				16.8	0.6	21.8	10.9
				16.4	0.8	15.7	43.6
				22.1	0.8	13.4	24.8
平均値				19.1		15	20.8

表3 平成27年度カンパチ1対1交配試験における排卵時間別の人工授精結果(人工生産魚)

試験区分	由来	産卵誘発	供試魚 (平均)	総採卵数 (万粒)	受精卵		孵化率 (%)
					数(万粒)	率(%)	
hCG Inj 42h after	人工3	hCG 600 IU/kg Wt:24.0 °C	FL:58.6 cm BW:4.4 kg	3.1	2.6	98.1	82.9
				11.9	8.8	82.5	90.7
				微量	-	86	62.6
				0.9	0.5	61.3	92.8
				10.6	10.4	97.5	92
平均値				8.5	7.9	92.8	55.1
hCG Inj 48h after	人工3	hCG 600 IU/kg Wt:24.0 °C	FL:79.6 cm BW:8.1 kg	5.8		86.4	79.4
				1.3	0.7	83.6	78.8
				4.4	0.4	10.9	13.1
				0.9	0.8	93.9	86.7
				1.8	0.1	7.2	16.4
				0.9	0.2	35.6	65.2
				1.3	1	82.8	91.1
平均値				1.8		52.3	58.6

表4 平成28年度水槽規模の違いによる水槽内交配試験結果

水槽規模 (kl)	由来	産卵誘発	総採卵数 (万粒)	受精卵		孵化率 (%)
				数(万粒)	率(%)	
65	養成4+	hCG 600 IU/kg	0	-	-	-
			49.6	45	90.8	92.2
			17.5	14	80.1	86.8
			41.8	33.8	80.9	68.4
			48	44.3	92.2	94.6
			19.4	17.8	91.8	95.2
平均			29.4	31.0	87.2	87.4
2.5	養成4+	hCG 600 IU/kg	1.1	0.9	80.4	55.2
			37.3	34.2	91.8	94
			40.4	30.9	76.4	48.1
			31.2	28.2	90.3	92.2
			0	-	-	-
			10.6	8.2	77.6	25.8
平均			20.1	20.5	83.3	63.1
1.0	養成4+	hCG 600 IU/kg	22.2	19.6	88.4	85.2
			0	-	-	-
			11.8	10.8	91.8	90.1
			59.1	42.8	72.4	85.1
			22.2	20.5	92.4	94.6
			96.5	88.4	91.6	94.4
平均			35.3	36.4	87.3	89.9

表5 平成28年度1kl水槽における平均卵母細胞径の違いによる水槽内交配試験結果

水槽規模 (kl)	hCG投与時の 平均卵母細胞径 ( $\mu$ m)	産卵の有無	総採卵数 (万粒)	受精卵		孵化率 (%)
				数(万粒)	率(%)	
1.0	> 700 $\mu$ m	翌日産卵	21.3	18.8	88.4	89.8
			59.1	42.8	72.4	85.1
			22.2	20.5	92.4	94.6
			96.5	88.4	91.6	94.4
			97.6	90.6	92.8	98.2
平均			59.3	52.2	87.5	92.4
1.0	> 650 $\mu$ m	hCG投与後 30~40時間 (推定)	0	-	-	-
			11.8	10.8	91.8	90.1
			31.8	28.8	90.6	92.2
			37.8	30.4	80.4	88
平均			45.9	32.5	70.8	42.8
1.0	< 600 $\mu$ m	産卵無し	0	-	-	-
			0	-	-	-
			0	-	-	-

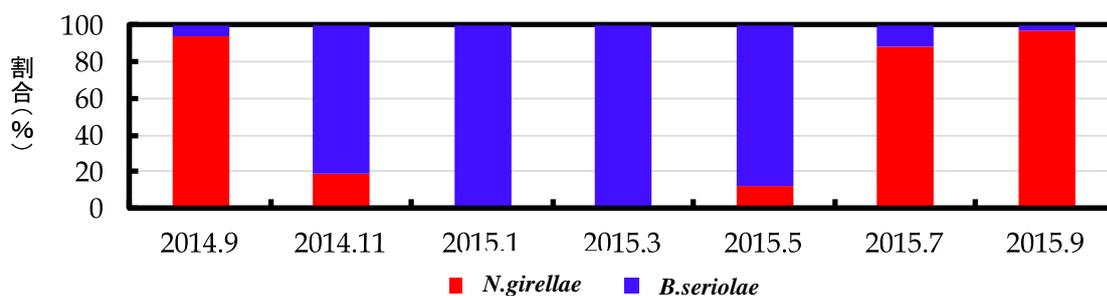


図 1 古満目庁舎地先海域におけるハダムシ2種の遷移状況

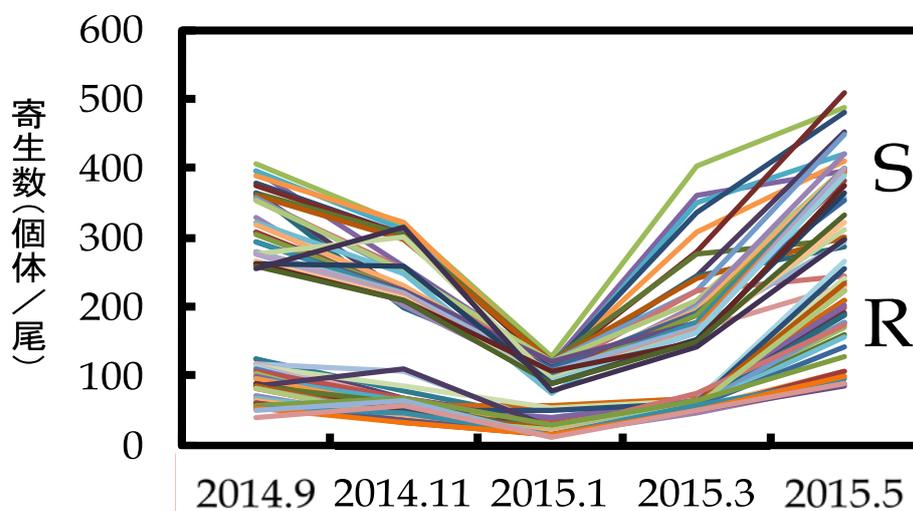


図 2 遺伝解析家系作出用の親魚候補120尾中の上位 (S)・下位 (R) 各30尾のハダムシ寄生数経時変化

表6 平成28年度各家系の掛け合わせ

家系	掛け合わせ	
	雌	雄
家系3	♀4170	♂3947
家系5	♀4170	♂4131
家系7	♀3936	♂4109

表7 平成28年度上浦庁舎における人為寄生試験結果(当歳魚)

家系	平均全長 (cm)	平均体重 (g)	体表面積 (cm <sup>2</sup> )	ハダムシ寄生数 (個体)	体表1 cm <sup>2</sup> あたりの寄生数 (個体/cm <sup>2</sup> )
3	20.6	130.7	176.5	79.7	0.45
5	20.3	115.0	170.2	77.5	0.45

中課題番号	14525321	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	2-(2)	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発		
小課題名	2 ブリのゲノム情報を応用したカンパチの病害虫耐性品種(家系)作出技術の開発 (2)カンパチのゲノム解析と遺伝子地図の作成		
実行題名	(2)カンパチのゲノム解析と遺伝子地図の作成		
実行課題代表研究機関・研究室・研究者名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所 育種研究センター 尾崎照遵・荒木和男・藤本宏・山本一毅・佐藤光		
共同表研究機関・研究室・研究者名			

## II. 実行課題ごとの研究目的等

### 1) 研究目的

これまでのブリ類のゲノム研究から、ブリとカンパチには共通の遺伝子があり、ブリで多型性を示す単純反復配列多型(SSR)の約9割がカンパチでも多型を持つこと、逆に一塩基多型(SNP)のある箇所が違っていることが分かっている。そのためカンパチのゲノム育種を効率的に進めるためには、カンパチにおいても多型を示すSNPを同定し、カンパチ・レファレンス遺伝子地図を作成する必要がある。

本研究では、カンパチのゲノム解析によりSNP多型やSSR多型の情報を抽出し、ブリ遺伝子地図の構成を利用して、カンパチのSNP多型の情報がマッピングされたカンパチ・レファレンス遺伝子地図を作成する。次にこのカンパチ・レファレンス遺伝子地図上のSNP多型情報と遺伝子地図を利用して、SNP多型に関するゲノム情報の構築し、実行課題2-(1)で作出されるカンパチハダムシ抵抗性解析家系のジェノタイピングを行った後に、ハダムシの寄生数を表現型としたQTL解析を行い、カンパチにおけるハダムシ抵抗性家系作出のための親魚候補選抜を行うDNAマーカーの開発とハダムシ抵抗性カンパチのQTLアリルについてSNPマーカーを指標とする親魚選抜を行った。

### 2) 研究方法

- ① カンパチ・レファレンス配列構築に必要となる基礎配列を得るため、カンパチのゲノムDNAの抽出とライブラリーを作成し、次世代シーケンサー(Illumina HiSeq2000)による塩基配列の解析を行った。さらに、SOAP等のゲノム解析プログラムによるシーケンスデータの連結と解析を行った。
- ② ロングリード次世代シーケンサー(PacBio RSII)により得られる塩基配列を整列化プロ

グラムによって解析を行い、さらに長く整列化したカンパチ・レファレンス配列を構築した。

- ③ カンパチ24尾のRAD-Tag解析によるSNP情報の収集とカンパチ20尾のリシークエンスによるSNPの位置情報を収集し、それらを解析することにより20%の頻度で多型のあるSNPの同定を行った。
- ④ QTL-seqによるQTL解析については、ハダムシの人為寄生試験でハダムシがつきにくい上位15尾（以下、抵抗性15尾）とハダムシがつきやすい下位15尾（以下、感受性15尾）のカンパチ個体を選択してDNAの抽出を行い、各15尾のDNAが等量になるように混合し、上位15尾と下位15尾の混合DNAそれぞれをIllumina HiSeq Xで50Gbpずつのペアエンドの解析を行った。得られた配列情報をもとにQTL-seq用の解析パイプラインを使って、ハダムシ抵抗性の家系の個体のみが共通に持つSNPの同定を行った。さらにそれらQTL-seqにより得られた結果から、カンパチ連鎖群19番上のQTL候補領域が特定され、QTL解析候補領域から局所的にQTL解析を行うために、カンパチハダムシ抵抗性QTL解析家系の作出に使用した両親とすべてのF<sub>1</sub>個体からDNA抽出を行い、解析家系特異的なSNPの96座位を抽出し、さらにSNP間インターバルを考慮してSNPsを選択し、全個体200尾でQTL解析を行った。連鎖群19番上のSNPマーカーのそれぞれの位置におけるインターバルマッピングによる結果から、ハダムシ抵抗性QTL候補領域の有意性を確認した。
- ⑤ カンパチにおけるハダムシ抵抗性QTL候補領域の連鎖不平衡ブロックのハダムシ抵抗性由来のアリル判別を行い、ハダムシ抵抗性を示す親魚候補の特定を行った。

### 3) 研究結果

- ① 精子由来で作成したDNAライブラリーを用いて次世代高速シーケンサー（Illumina HiSeq2000）による解析を行った結果、186.51Gbpの塩基配列が得られた。その塩基配列についてフィルターによるジャンク配列の除去を行ったところ、133.16Gbpの塩基配列が得られた。その塩基配列をもとにクラスタリング、アセンブルを行ったところ、33,412個のコンティグと1,412個のスキャットホルドが得られ、カンパチ・リファレンスDNA配列作成のための基礎配列とした。
- ② 精子由来のDNAから作成したSMRTbell（特殊な環状構造のライブラリー）を用いてロングリード次世代シーケンサー（PacBio RSII）による解析を行ったところ、平均長が約10Kbpの約7.27Gbpの塩基配列（カンパチゲノムの10倍量）のデータを得ることができた。そこで、Illumina HiSeq2000により得られたカンパチのゲノム基礎配列をもとに、整列化プログラムを用いてメイトペア解析によるスキャットホルド間配列を埋める作業を行った。その結果、最長のスキャットホルド配列の全長が22Mbpから24Mbpに伸長し、かつN50（50番目に長いスキャットホルドの長さ）が約5Mbpから5.8Mbpまで伸長し、カンパチのゲノムサイズも670Mbpとさらに正確に推測された。本解析で得られた2Kbp以上のスキャットホルド配列をカンパチ・リファレンス配列として用いることにした。
- ③ 24個体のカンパチのゲノムDNAを制限酵素EcoRIで処理して断片化し、その両側の配列をIllumina HiSeq2500によるペアエンド法で末端から150bpの解析（RAD-Tag解析）を行い、得られた配列をリファレンス配列の上にマッピングし、24個体の間で多型を示すSNPの検出を行った。その結果約7万個のSNPを同定することができたが、得られたSNPの内、DNAチップや流体集積回路チップで解析に使用するプローブの設計ができるものは約9,000個までに減少した。そのため、SNP情報の極端な減少の問題を解決すべく、20尾の

カンパチのゲノムDNAからそれぞれにライブラリーを作成してIllumina HiSeq2500によるペアエンド解析を行い、得られたシーケンス情報をカンパチ・レファレンス配列にマッピングし、ミスマッチが密集している領域周辺を中心に再アライメントを行ってマッピング精度を向上させた。さらに、その20個体のリシーケンス配列についてBWAプログラムを用いてマッピングを行い、合計7,691,359個のカンパチ・レファレンスゲノム配列上のSNP変異配列を同定した。得られた変異配列とその前後100bpの配列を抽出し、EXELに展開し、EXEL関数によりSNP多型以外の変異の配列の排除を行った。また、20個体の中で20%以上の頻度で多型を示す約64万座のSNP多型を同定した。さらに、この内マッピングされた配列のリード数が多く、かつ多型性をしめす信頼度の高い186,283座のSNP多型をカンパチ・レファレンス遺伝子地図の各連鎖群上の配列にマッピングすることができた。

- ④ QTL-seqによるQTL解析では、雌親のゲノムのリシーケンス解析で得られた配列情報をカンパチのレファレンス配列にマッピングすることによって雌親由来の542,612座のSNPを同定した。さらに、抵抗性15尾と感受性15尾のリシーケンスデータおよび雌親由来のSNP情報を用いて雌親由来で抵抗性に関与する可能性が考えられる抵抗性15尾が共通にホモ接合で持つSNPの同定をQTL-seq用の解析パイプラインを用いて行ったところ、抵抗性15尾、及び感受性15尾の各個体同士の間でSNP多型が多く存在することもあり、全ての連鎖群で有用と思われるSNPが同定された。抵抗性15尾と感受性15尾の間で抵抗性15尾の個体のみが共通に持つ候補SNPで該当箇所を指定した閾値以上の質の高いSNPが特に連鎖群19番に同定された。そこで連鎖群19番から染色体ワイドな96SNPsを選び、カンパチハダムシ人為寄生試験区のすべての個体 (n=200尾) を用いて、QTL解析を行った結果、♂3947 雄親由来のアリルでLOD値2.3-2.45 表現型分散説明 5.5~5.2%でQTLが検出された。
- ⑤ カンパチにおけるハダムシ抵抗性QTL候補領域の連鎖不平衡ブロックのハダムシ抵抗性由来のアリル判別では、家系3：♀4170×♂3947 (n=294) と家系5：♀4170×♂4131 (n=263) の連鎖群19番上においてSNPマーカーによる♂3947 雄親と同一のSNPジェノタイプ保有状況を確認した。家系3についてハダムシ抵抗性由来のアリルを持つ個体と持たない個体を特定した。(アリルあり：87尾,アリルなし：88尾)  
家系5の♂4131については、QTL解析で有意な結果を得た家系3の♂3947と同祖アリル (IBD)ではなかったため、親魚候補についてのマーカーアシスト選抜は不可能だった。

#### 4) 成果活用における留意点

今回カンパチにおけるハダムシ抵抗性由来のアリル判別では、家系3における連鎖群19番の連鎖不平衡ブロックのみが確認できた。確立したカンパチ系統については、ハダムシ抵抗性形質のQTL候補領域の連鎖不平衡ブロックを保持していることを確認しているため、ドナー系統としての利用は可能であり、今後これらを一般の人工種苗と交配してマーカーアシスト浸透交雑 (Marker-Assisted integration: MAI) が可能であるが、親魚選抜とその利用の際には、SNPマーカーによる連鎖不平衡ブロックの保存性を確認しながらの交配が必要なことを十分に説明する必要がある。またカンパチのリシーケンス個体数も20尾と少なめのため、本格的なマーカーアシスト選抜やゲノミックセレクションを行うためにはさらなるリシーケンス個体の追加が必要である。

## 5) 今後の課題

確立したカンパチハダムシ抵抗性系統の維持管理と、系統開発したカンパチのハダムシ抵抗性系統を実際の養殖現場で社会実装する際には、必要な知見等の追加調査をすることも検討する必要性もある。また参画機関の民間企業には優先的に今回の開発系統利用を可能にする必要があるが、水産研究・教育機構の公益性という立場からも、他自治体、他機関、他民間企業への譲渡・販売を可能とする制度の整備も必要である。



## (2)学会等発表(口頭またはポスター)

中村

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行日
1	ブリ卵のゲノム編集における顕微注入に有効な時間の延長について(APPLICATION FOR MICROINJECTION OF YELLOWTAIL <i>Seriola quinqueradiata</i> PROLONGED ONE-CELL STAGE IN YELLOWTAIL EGGS TO APPLY MICROINJECTION.)	岡本裕之ら	水産機構増養殖研究所	The International Symposium on Genetics in Aquaculture XII	2015	6
2	ブリにおけるベネデニア症抵抗性形質のトランスクリプトーム解析(Transcriptome of the <i>Benedenia</i> disease resistance in the Yellowtail)	中本正俊ら	東京海洋大学	日本動物学会 第86回大会	2015	9
3	ブリ三倍体作出に向けた低温処理条件の検討	嶋田幸典ら	水産機構増養殖研究所	平成27年度日本水産学会秋季大会	2015	9
4	A high density genetic linkage map for yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) containing 6,275 ESTbased SNPs.(EST解析に基づく6,275個のSNPからなるブリの高密度遺伝子連鎖地図)	尾崎照遵ら	水産機構増養殖研究所	第43回UJNR水産増養殖専門部会日米合同会議シンポジウム	2015	11
5	Preliminary study on triploid of yellowtail (ブリ三倍体の予備的研究)	嶋田幸典ら	水産機構増養殖研究所	第43回UJNR水産増養殖専門部会日米合同会議シンポジウム	2015	11
6	Production of <i>Benedenia</i> -resistant Yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) Families : A Preliminary Approach to the Broodstock Candidates (ハダムシ耐性ブリ家系の作出:親魚候補についての予備的研究)	野田 勉ら	水産機構西海区水産研究所	第43回UJNR水産増養殖専門部会日米合同会議シンポジウム	2015	11
7	A high density genetic linkage map for yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) containing EST-based SNPs (EST解析に基づくSNPからなるブリの高密度遺伝子連鎖地図)	尾崎照遵ら	水産機構増養殖研究所	International Plant & Animal Genome XXIVおよび <i>Seriola Genomics</i> ワークショップ	2016	1
8	ハダムシ抵抗性を有するブリの家系作出	吉田一範ら	水産機構西海区水産研究所	平成28年度水産育種研究会シンポジウム	2016	3
9	ブリ卵の小型容器を用いた高塩分孵化管理法の開発	嶋田幸典ら	水産機構増養殖研究所	平成28年度日本水産学会春季大会	2016	3
10	ブリにおける不妊化の試み	中条太郎ら	水産機構西海区水産研究所	平成28年度日本水産学会秋季大会	2016	9
11	全ゲノムリシーケンス解析によるブリ <i>Seriola quinqueradiata</i> におけるベネデニア症抵抗性形質QTL領域内の塩基配列多型の探索	中本正俊ら	東京海洋大学	平成28年度日本水産学会秋季大会	2016	9
12	ブリ <i>Seriola quinqueradiata</i> におけるベネデニア症抵抗性形質QTL領域内に存在する遺伝子単離	武内祐輔ら	東京海洋大学	Plant and Animal Genome XXV	2017	1

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行日
13	ブリ( <i>Seriola quinqueradiata</i> )におけるベネデニア症抵抗性形質に関する新規QTLの報告	尾崎照遵ら	水産機構増養殖研究所	平成29年度日本水産学会春季大会	2017	3
14	人工制限酵素によるブリMyostatin遺伝子のゲノム編集	嶋田幸典ら	水産機構増養殖研究所	平成29年度日本水産学会春季大会	2017	3
15	ハダムシ抵抗性ブリの分子遺伝学的解析	坂本崇	東京海洋大学	平成29年度日本水産学会春季大会ミニシンポジウム	2017	3
16	カンパチの高密度遺伝子地図の作成とゲノムの構造多型	荒木和男ら	水産機構増養殖研究所	日本動物遺伝育種学会第18回大会	2017	11
17	Physical mapping of genome in yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) and population structure in the Pacific Ocean	尾崎照遵ら	水産機構増養殖研究所	2nd <i>Seriola</i> Workshop	2018	1
18	ブリ卵の顕微注入手法の確立とハダムシ症抵抗性候補遺伝子の遺伝子編集魚の作出	岡本裕之ら	水産機構増養殖研究所	平成30年度日本水産学会春季大会	2018	3
19	ハダムシ症抵抗性候補遺伝子の遺伝子編集ブリの作出とハダムシ感染試験	岡本裕之ら	水産機構増養殖研究所	The International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII	2018	7
20	ブリ( <i>Seriola quinqueradiata</i> )におけるゲノム編集のための効率的なマイクロインジェクション技術の開発	石川 卓ら	水産機構増養殖研究所	The International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII	2018	7
21	ブリ <i>Seriola quinqueradiata</i> におけるCRISPR / Cas9システムによるミオスタチン遺伝子のゲノム編集	嶋田幸典ら	水産機構増養殖研究所	The International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII	2018	7
22	高温処理による第2極体放出阻止による3倍体ブリ作出条件の検討	山口寿哉ら	水産機構増養殖研究所	平成30年度日本水産学会秋季大会	2018	9
23	組織学的観察による2倍体および3倍体ブリ当歳魚の生殖腺発達の比較	山口寿哉ら	水産機構増養殖研究所	平成30年度日本水産学会秋季大会	2018	9
24	カンパチの性と相関するSNPの同定とブリ類の性決定領域の比較	荒木和男ら	水産機構増養殖研究所	日本動物遺伝育種学会	2018	9

## (3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行日
1	⑤	機関誌「かん水」(人工種苗を活用したブリ養殖の生産戦略)	藤浪祐一郎	水研機構西海区水産研究所	(一社)全国海水養魚協会	2018	7

## (4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
1	魚卵の顕微注入法	岡本裕之、石川卓、米加田徹、嶋田幸典	水産機構	水産機構	特許権	特願2016-57619	平成28年3月22日	
2	ブリ類のハダムシ抵抗性検査方法	坂本 崇、中本正俊、荒木 和男、尾崎 照遵、吉田 一範、野田 勉	東京海洋大学水産機構	東京海洋大学水産機構	特許権	特願2017-42793	平成29年3月7日	

## (5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	該当無し								

## (6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
	該当無し						

## (7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)年月	主な利用場面	普及状況
	該当無し				

## (8)発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
	該当無し							

## (9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分； ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、 ②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	③	「知」の集積と活動の場にかかる講演「水産における育種研究の現状と課題」	2016	2	10	ホテルメルパルク大阪	30	会社員、学生、行政等	水産機構	
2	②	総合生命科学部シンポジウムでの講演「養殖魚類における遺伝情報を活用した分子育種研究の現状と展望」	2016	3	2	京都産業大学	35	学生、他	東京海洋大学	
3	①	第14回因島種苗生産技術交流会での講演「養殖魚類における遺伝情報を活用した育種研究の現状と展望」	2016	8	9	グリーンヒルホテル尾道	100	研究者、会社員、行政等	東京海洋大学	
4	①	セミナー「養殖魚におけるゲノム情報を利用した育種の取り組み」	2016	11	10	名古屋大学理学部102教室	30	学生	水産機構	
5	①	第42回全国養鱒技術協議会大会での講演「国内外の水産養殖における育種の現状と将来展望について」	2017	7	7	東京海洋大学	50	研究者、会社員、行政等	東京海洋大学	
6	②	増養殖研究所一般公開でのポスター掲示	2017	7	29	増養殖研究所南勢庁舎	240	会社員、学生、一般等	水産機構	
7	①	第5回ブリ類養殖振興勉強会での講演「技会委託プロ研「ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発」の概要」	2019	1	30	アクロス福岡	150	漁業者、会社員、研究者、行政等	水産機構	