

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書

令和7年 4月21日 提出

関連する持続可能な開発目標（SDGs）

	1 貧困	●	2 飢餓		3 保健		4 教育
	5 ジェンダー		6 水・衛生		7 エネルギー		8 経済成長と雇用
●	9 インフラ，産業化，イノベーション				10 不平等		11 持続可能な都市
●	12 持続可能な消費と生産		●	13 気候変動	●	14 海洋資源	
	15 陸上資源		16 平和		17 実施手段		

1 課題番号:24 独先 10

2 研究者（研究代表者）

①所属部科校：生物資源科学部・（生命科学研究所）

②資格・氏名：准教授・澤山英太郎

3 研究課題

① 和文表記：地球温暖化に抗う海洋生物「シン・品種」の開発

② 英文表記：Development of novel genetic resources of marine bioresources in response to global warming

4 研究期間：令和6年度～令和7年度

5 現在までの達成度

※当初の研究目的に対する達成度について、自己評価を行ってください

①区分 A：当初の計画以上に進展している，B：概ね順調に進展している，C：やや遅れている

③ 達成度 研究期間全体（2年間）を100%とした場合に、現在の進捗状況を〇〇%で評価してください

①区分：B

②達成度：60 %

6 研究組織

①研究代表者

資 格・氏 名 (研究者番号)	所属部科校 実施研究所	役 割 分 担
准教授・澤山英太郎 (70846071)	生物資源科学部 生命科学研究所	研究の統括、ゲノム解析

②研究分担者

准教授・牧口祐也 (00584153)	生物資源科学部 生命科学研究所	代謝解析

7 研究目的

18 世紀の産業革命以降、化石燃料の大量使用と森林伐採により、大気中の二酸化炭素濃度は急速に上昇し、地球温暖化が深刻化している。その影響は猛暑や暖冬、異常気象を引き起こし、人間社会に甚大な影響を及ぼしている。特に、地球が吸収した熱の 9 割以上が海洋に蓄積されており、海水温も着実に上昇している。日本近海では過去 100 年で海面水温が約 1.24℃上昇しており、この水温上昇は世界の他海域と比べて著しい上昇率である。そのため、日本近海に生息する変温動物である魚類にとっては致命的な環境変化となる。海水温や海流の変化は、稚魚の成育不良や産卵場の移動を引き起こし、サンマの不漁に代表されるように水産資源の安定供給が脅かされている。温暖化とそれに伴う海洋環境の変化は、今後すぐに改善されるものではなく、水産業への影響は今後さらに拡大することが予想される。

このような状況下で海洋生物資源を持続的に利用するためには、環境変化に耐性をもつ魚類の選抜と育種が必要である。本研究では、水産上重要な魚種であるマダイ、ヒラメ、シシヤモの 3 種をモデルとし、温暖化の影響に適応した新品種の開発に取り組む。ゲノム情報を活用して高水温や低酸素といった環境ストレスに耐性を持つ遺伝子を探索し、選抜育種や自然選択の模倣によって形質の固定を目指す。具体的には、赤潮による低酸素への耐性、性転換リスクの低減、高水温における代謝負荷の抑制といった課題に対応した育種を行い、水産資源の安定的な利用に資する科学的基盤を確立することを目的とする。

8 研究概要

本研究は、地球温暖化に伴う海水温の上昇が水産業および海洋生物資源に与える影響を軽減するため、マダイ・ヒラメ・シシヤモを対象に、それぞれの環境ストレスに適応可能な新品種（シン・品種）の開発を目的とする。

課題 1 では、赤潮の影響で発生する低酸素環境に耐性をもつマダイの育種を行う。1000 尾程度の種苗を低酸素環境に曝露し、生死に分かれた個体を用いて **genotyping-by-sequencing** による **SNP** 取得とゲノムワイド関連解析（**GWAS**）を実施する。少数の候補遺伝子が判明した場合はマーカー選抜育種（**MAS**）、多数遺伝子に分散する場合はゲノミックセレクション（**GS**）によって選抜育種を行う。

課題 2 では、温暖化による性転換に影響されにくいヒラメ放流品種の育成を目指す。養殖集団において出現する偽オスを対象に、**XX** メスとの比較で **GWAS** を行い、性転換に関与する遺伝的要因を特定する。得られた結果を天然集団にも適用し、環境性決定の攪乱に強い個体を同定する。さらに、**GS** と交配設計手法 **Genomic Mating**（**GM**）を用いて、遺伝的多様性を維持しつつ有用遺伝子を浸透させる放流用集団の構築を図る。

課題 3 では、海水温の上昇による資源減少が著しいシシヤモを対象とし、高水温耐性を有する品種の開発に取り組む。代謝チャンバーを用いて複数水温で代謝量を測定し、環境応答の閾値を明らかにする。また、**GWAS** を実施して高水温耐性と関連する遺伝子領域を特定する。最終的に、**GM** により交配設計を行い、代謝負担が少なく生残性の高い放流品種を作出する。なお、シシヤモについてはゲノム情報が未整備であるため、ロングリードシーケンスにより参照ゲノム配列を新たに構築する。

これら 3 課題の結果を統合し、温暖化への科学的対応と水産資源の持続的利用を両立させる実践的モデルや、新規養殖品種開発の可能性を提示する。

9 研究結果

課題 1：マダイの低酸素耐性育種による抗赤潮耐性養殖品種開発

本年度はマダイ種苗における急性低酸素暴露実験を実施した。研究協力機関である有限会社まる阿水産において、出荷直前の種苗（平均体重 0.961g、平均全長 32.3mm）を用い、500L 水槽にこれら種苗を 200 匹もしくは 100 匹収容して 4 回行った。実験は止水で行い、飼育水に亜硫酸ナトリウム（富士フィルム和光株式会社、試薬特級）を 10g 添加することで溶存酸素を補足させ、低酸素環境を作り出した。予備実験から溶存酸素量が 1mg/L を下回ると斃死が始まることがわかったため、最初に斃死した個体から数えて 25 匹を感受性個体、最後に死んだ 25 匹を耐性個体としてセレクトィブサンプリングを実施した。なお、このようなセレクトィブサンプリングを行うことにより、比較的少数の個体で有意なマーカーを得ることが可能となる。

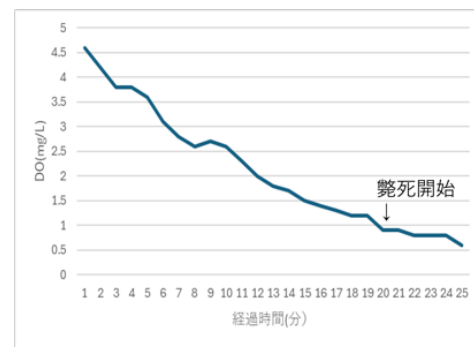
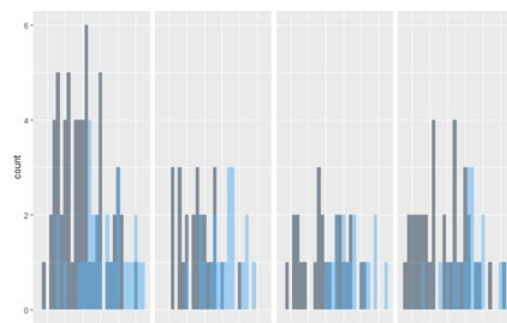


図1. 急性低酸素耐性試験における溶存酸素量

上記の方法で得た 200 個体について、体重と体長を測定し、一般化線形モデルを用いて低酸素耐性形質との関連について検定した。また、一般化線形モデルには各実験区のばらつき（水槽効果）も含め、4 回施行の影響についても評価した。まず、回収した魚の平均体重と平均体長は、耐性個体ではそれぞれ 1.38g と 35.9mm であったのに対し、感受性個体ではそれぞれ 0.961g と 32.3mm であった。一般化線形モデルにより表現型との関係を調べたところ、体長は $P=0.898$ と有意な関係は認められなかったが、体重は $P=0.0008$ となり、低酸素耐性形質との有意な関係が認められた。なお、水槽効果は $P=0.389$ であり、このことから 4 回の実験における結果のばらつきに有意差は認められなかった。

図2. 急性低酸素耐性試験で得られた耐性/感受性個体の体重のヒストグラム
（青が耐性個体、グレーが感受性個体）

現在、これらの 200 個体のサンプルからゲノム DNA を抽出し、genotyping-by-sequencing に用いる準備をしているところである。計画当初は ddRAD-seq を用いてジェノタイピングを行う予定であったが、サンプル数が多いことと、昨年度に開発された dpMIG-seq 法（Nishimura et al., 2024）が魚類においても有用との情報を得たことから、genotyping-by-sequencing については dpMIG-seq 法を用いることを計画している。現在、マダイにおいても本手法の条件を検討しており、良好なゲノム増幅が得られることを確認している。また、予備的な実験であるが、dpMIG-seq 法を用いることで養殖マダイ集団においても、非常に簡便な手法ながら 7 万個程度の SNP を得ることができることを確認済みである。来年度は dpMIG-seq 法をこれらのサンプルで行い、得られた SNP を用いて GWAS を実施する予定である。

なお、本研究の過程で連携研究機関である有限会社まる阿水産との追加での共同研究や特許取得が協議されている。

課題 2：環境性決定の影響を受けにくい放流ヒラメ品種の開発（澤山）

本年度は人工飼育により性転換した個体を探索し、ddRAD-seq 法により gemptying-by-sequencing を実施した。養殖ヒラメの親魚として用いられている個体 130 個体を用い、すべての個体でヒラメの性決定遺伝子である *amh* 遺伝子の遺伝子型を評価した。すなわち、表現型はオスであるが、遺伝子型は XX である個体を探索した。その結果、16 個体が偽オスであることが明らかとなり、この偽オス個体と通常の XX-メス個体を用いて GWAS を行った。GWAS は SNP から求めた集団構造と、同じく SNP 情報から構築した類縁度を含めた混合線形モデルを用いた。

ddRAD-seq を実施したところ、708,146 個の SNP を得ることができた。これらの SNP は欠損値を多く含むものや、ジェノタイピングエラーの可能性を持つものも含まれることから、クオリティコントロールを実施した。その結果、欠損率が少なく高品質な SNP を 163,224 個得ることができ、以降の解析に用いた。

GWAS を行った結果、10 番染色体と 21 番染色体において、表現型との関連が示唆される SNP がそれぞれ 1 つ認められたが、ゲノムワイド有意水準を上回る SNP は認められなかった。これは今回用いた偽オスの個体数が少なく、統計的な有意水準を上回らなかったことと考えられる。現在、偽オスの個体数を増やすために、より多くの親魚で性決定遺伝子の遺伝子型を調べているところである。次年度は示唆的な SNP 領域の周辺の遺伝子を探索し、性転換に関する遺伝子の有無を検証するとともに、Pool-seq など取り入れてより詳細なマッピングを行っていく予定である。

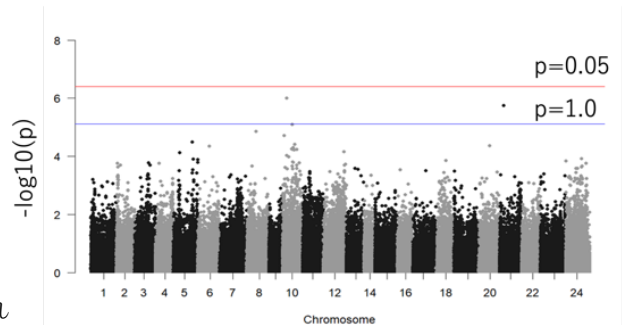


図3. 偽オスとXX-メスを用いたGWAS

課題 3：高水温耐性を持ったシシャモ放流品種の開発

シシャモは上記 2 魚種とは異なり、参照ゲノム配列が開発されていない。そのため、本年度は参照ゲノム配列の構築をメインに研究を進めた。まず、人工授精に用いたシシャモのオス親魚から精巢を得て、NucleoBond HMW DNA キット（タカラバイオ）を用いて DNA を抽出した。この高分子 DNA を用い、ロングリードシーケンサー Revio（PacBio）にて次世代ロングリードシーケンスを実施した。なお、ロングリードシーケンスはまず DNA を PCR 増幅させたものをシーケンスしたが、得られたコンティグ数が予想よりも多く、遺伝子の重複も多く見られた。これは PCR 増幅したことによるバイアスである可能性が考えられたため、PCR 増幅をせずに DNA

を直接シーケンスし直した。これら2回のシーケンスにより得られたコンティグをアセンブルし、2350個のスキファールドを得ることができた（Slan-v1.0）。また、近縁種であるワカサギの参照ゲノム配列にマッピングしてスキファールドイングしたところ、1007個のスキファールドにまで集約することができた（Slan-v1.1）。これら2つの参照ゲノム配列の評価を条鰭類が持つコア遺伝子の有無で評価したところ（BUSCO v5を使用）、Slan-v1.0では97.0%のコア遺伝子が確認され、Slan-v1.1においては97.6%のコア遺伝子が確認された。一般的に、このBUSCO scoreが90%以上であると高品質な参照ゲノム配列とされ、本研究で開発したシシャモの参照ゲノム配列は非常に高い完成度を誇るものと考えられる。しかしながら、シシャモの染色体数は $n=25$ と言われているが、ワカサギは26本であり、染色体数に違いが認められている。そのため、来年度は連鎖地図を作成し、シシャモのゲノム情報の整備を進めていく予定である。

また、本年度は高水温暴露実験についても条件検討を含めて実施した。高水温暴露実験は北海道立栽培水産センターにて実施し、図4にある飼育システムを構築した。すなわち、図4の右側の水槽にヒーターを設置

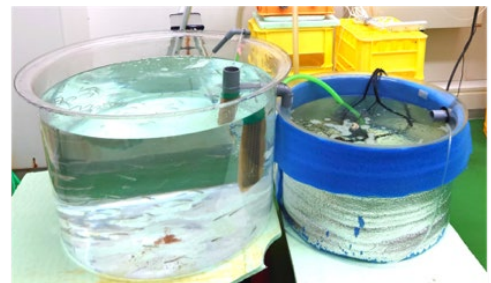


図4. シシャモの高水温暴露実験に用いた飼育システム

し、加温した水を左側の水槽へ水中ポンプで注水し、排水はオーバーフローにより加温水槽へ戻るものである。本実験システムを用いて、実際に種苗放流をするサイズである4cm程度の種苗を用いて高水温暴露実験を行った。高水温暴露実験は一般的な飼育水温である17℃から開始し、2℃/時間のスピードで上昇させた（図5A）。種苗の斃死は26.0℃から認められ、27.5℃でほぼ全ての個体が斃死した（図5B）。

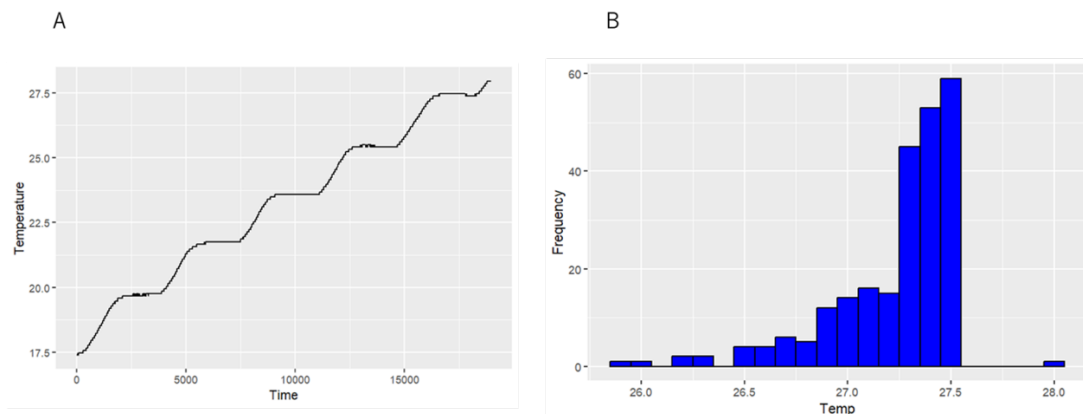


図5. シシヤモの高水温暴露実験における水温変動 (A) と斃死個体数 (B)

現在、これらの個体を用いて GWAS を行うための準備を進めているところである。また、より慢性的な高水温暴露実験も計画しており、次年度には 23℃程度で 1 ヶ月飼育し、斃死した個体と生残した個体をサンプリングし、本年度のサンプルと合わせて GWAS を実施したいと考えている。加えて、シシヤモの分布域と温度耐性についての知見も得られつつある。

本年度、北海道立栽培水産センターや栽培漁業公社の方々との議論を通して、シシヤモ養殖の可能性が見えてきた。栽培漁業公社の方々からは、技術開発が進めばシシヤモの選抜育種にも取り組みたいとのコメントも頂けている。加えて、本研究のテーマとは少し異なるが、シシヤモはメスが特に高価であることから、性決定遺伝子を見つけ、全メス生産に向けた共同研究も協議されている。

このように、本助成研究については多少の研究内容の変更はあるものの、予定の範囲内の研究結果が得られている。また、論文出版に加えて、共同研究や特許に繋がる成果も得られていることから、進行状況は概ね順調であると評価した。

論文発表

Onogi T. and Sawayama E. (2025) Skin mucus DNA with MIG-seq: a valuable combination for genome-wide SNP typing in aquaculture fish. *Aquaculture International* **33**, 227.

知的財産権

現在、2 件について NUBIC や研究連携機関と協議進行中。