

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による
外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発
(4-1408)

平成26年度～平成28年度

Development of a New Method for Exterminating Invasive Foreign Fish
Based on Infertility Using Gene Editing Technology

国立研究開発法人水産研究・教育機構
三重大学

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による

外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発

(4-1408)

I. 成果の概要		i
1. はじめに (研究背景等)		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発		1
(国立研究開発法人水産研究・教育機構)		
要旨		1
1. はじめに		2
2. 研究開発目的		2
3. 研究開発方法		3
4. 結果及び考察		9
5. 本研究により得られた成果		2 3
6. 国際共同研究等の状況		2 5
7. 研究成果の発表状況		2 5
8. 引用文献		2 7
(2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発		2 9
(国立研究開発法人水産研究・教育機構)		
要旨		2 9
1. はじめに		3 0
2. 研究開発目的		3 1
3. 研究開発方法		3 4
4. 結果及び考察		3 6
5. 本研究により得られた成果		6 0
6. 国際共同研究等の状況		6 0
7. 研究成果の発表状況		6 0
8. 引用文献		6 1
(3) 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発		6 3
(三重大学)		
要旨		6 3
1. はじめに		6 3
2. 研究開発目的		6 4
3. 研究開発方法		6 4
4. 結果及び考察		7 0
5. 本研究により得られた成果		9 3
6. 国際共同研究等の状況		9 3
7. 研究成果の発表状況		9 3
8. 引用文献		9 4
III. 英文Abstract		9 9

課題名 4-1408 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発

課題代表者名 岡本 裕之（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ゲノム育種グループ長）

研究実施期間 平成26～28年度

累計予算額 平成26年度～28年度累計予算額88,959千円（うち平成28年度：26,159千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 侵略的外来魚、ブルーギル、根絶、遺伝子制圧、不妊化遺伝子搭載魚、遺伝子編集、全ゲノム解析、性転換、三倍体、生殖細胞移植、有効集団サイズ、生命表

研究体制

- (1)不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発(国立研究開発法人水産研究・教育機構)
- (2)不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発(国立研究開発法人水産研究・教育機構)
- (3)外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発(三重大学)

研究協力機関

三重大学

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

琵琶湖等の大型湖沼において、ブルーギル、オオクチバス等の侵略的魚食性外来魚の大繁殖による固有生態系の破壊、希少種の絶滅危機、内水面漁業の壊滅的衰退が大きな社会的問題となっている。これまでに莫大な予算と精力的な駆除努力により一定の減少傾向は見られるものの、未だホンモロコ、エビ類等主要漁獲対象魚種に資源回復の兆候はなく、また絶滅危機種は依然絶滅の危機に直面している。物理的駆除（捕獲等）努力だけでは、やがて生息密度が低下すると駆除率が低下し、資源量はあるレベルで平衡状態になると予想される。生息密度が低下しても駆除率の維持が可能な方法として、ウリミバエの不妊化雄の大量放出による根絶例（Knipling, 1955）が知られている。しかし、この方法は極めて大量の不妊化雄の放出が必要なためかえって固有種を絶滅に追いやる危険が懸念される。一方、YY♀の放流により通常雌を減らす方法が考案されたが（Gutierrez and Teem 2006）、性転換魚の大量生産が困難なことや、一時的にせよ雌の放流による大幅な資源量の増加が問題とされ実用化に至っていない。またどちらの方法も、予期せぬ資源量の増加（リバウンド）があればそれまでの駆除・放流努力が全く無駄となる（図1）。そのため、根絶には新たな革新的な駆除手法が必要と考えられる。

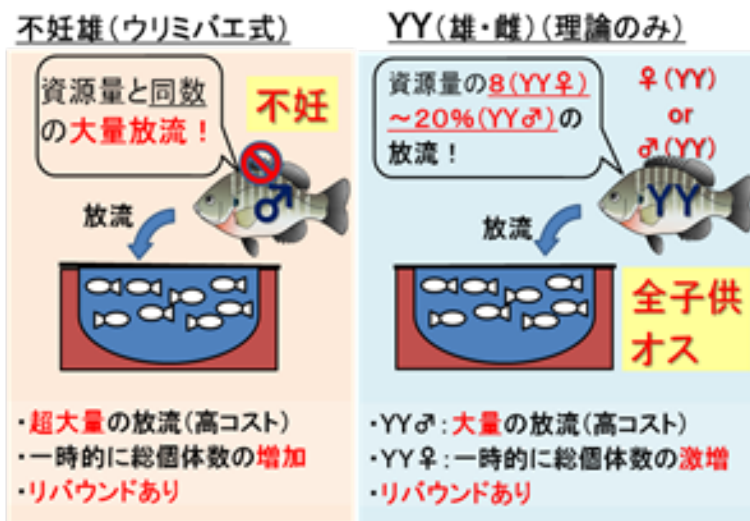


図1 従来の外来魚の駆除手法と問題点

2. 研究開発目的

近年メダカにおいて成熟に関わる遺伝子の機能阻害による雌特異的不妊化魚が作出された(Murozumi et al. 2014)。この魚では雌の成熟に関連する遺伝子だけが機能阻害されているため、その遺伝子を持つ子孫の雄の子供は次世代を残すことができるが、雌の子供は子孫を残すことができない(図2)。このような性特異的な不妊化魚を作出、放流し、標的外来魚集団中で自然交配が繰り返されることによって、集団内の妊性に関わる遺伝子を不妊化(不活化)したものに徐々に置き換えることによって、妊性のある雌を減らしていくことができると考えられる(図3)。本研究は、このような性特異的に不妊化した遺伝子を用いた新たな根絶手法として考案した“遺伝子制圧”手法の基盤技術の開発を目的としている。“遺伝子制圧”手法は、集団中の不妊化遺伝子の占有率を上げることに一次目的があり(図4)、資源量が増加しても過去の放流努力が無駄になることがなく、少量ずつでの放流でも確実に効果が上がる点が革新的である。また遺伝子編集(ゲノム編集)技術を用いて、これまで極めて困難であった不妊化遺伝子の多重化によって駆除力の強化が可能である。“雌特異的不妊化遺伝子搭載魚”の増産については、ニジマス等において確立された借り腹技術を利用することにより、その大量生産が可能となる。本研究は、不妊化遺伝子搭載魚を用いた革新的な外来魚の根絶技術の基盤開発を世界に先駆けて推進し、極めて困難な侵略的外来種の根絶に貢献することを目的としている。

遺伝子制圧は、性特異的不妊化遺伝子搭載魚を毎年継続的に放流して、集団内の不妊化遺伝子の占有率を上げることによって、根絶を導く方法である。放流をやめれば生息量は徐々に回復するため、継続放流が必要である点は、一見煩雑でコスト的には不利であると考えられる。しかしながら野外で用いることを考慮すると一種の安全装置を有してしていると考えられ、一概にマイナスな面とはいえない。例えば海外の原産地に、意図的・非意図的にかかわらず(おそらく人為的に)、不妊化遺伝子搭載魚が持ち込まれ、ある生息水域においてその生息量の10%量が放流されたとしても、一度(数度程度)だけでは何らその集団の存在を脅かすものではないことがシミュレーションされている(図5)。一方、根絶を目的とした場合は、継続放流実施中に不妊化遺伝子の占有率をモニタリングすることによって、駆除効果がどのくらい進んでいるかを把握できる。もし仮に何らかの理由で駆除を中止することが必要になった場合でも、根絶の最終局面まで進んでいなければ、放出をやめれば根絶を中止することができ、一定の人為的制御性を有している。

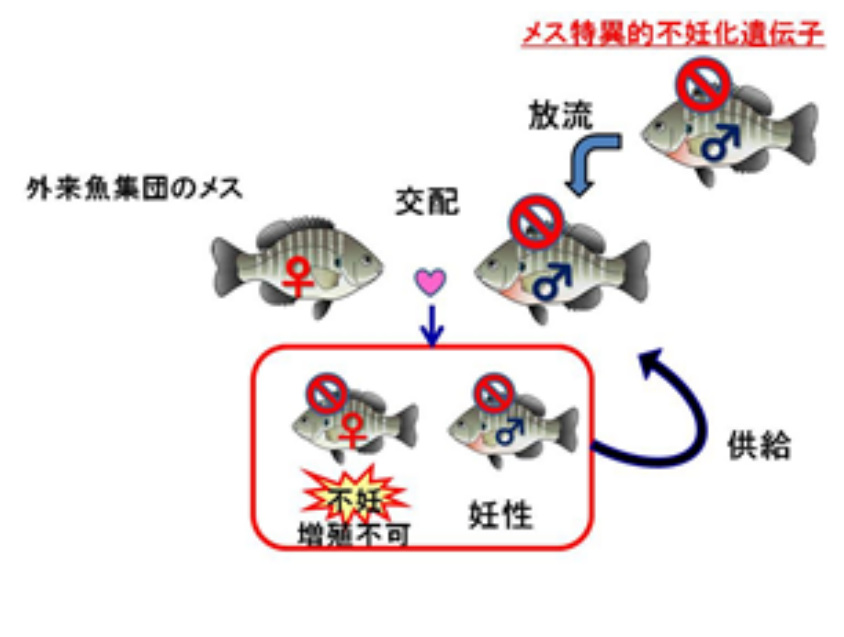


図2 雌を特異的に不妊化し雌を駆除する模式図

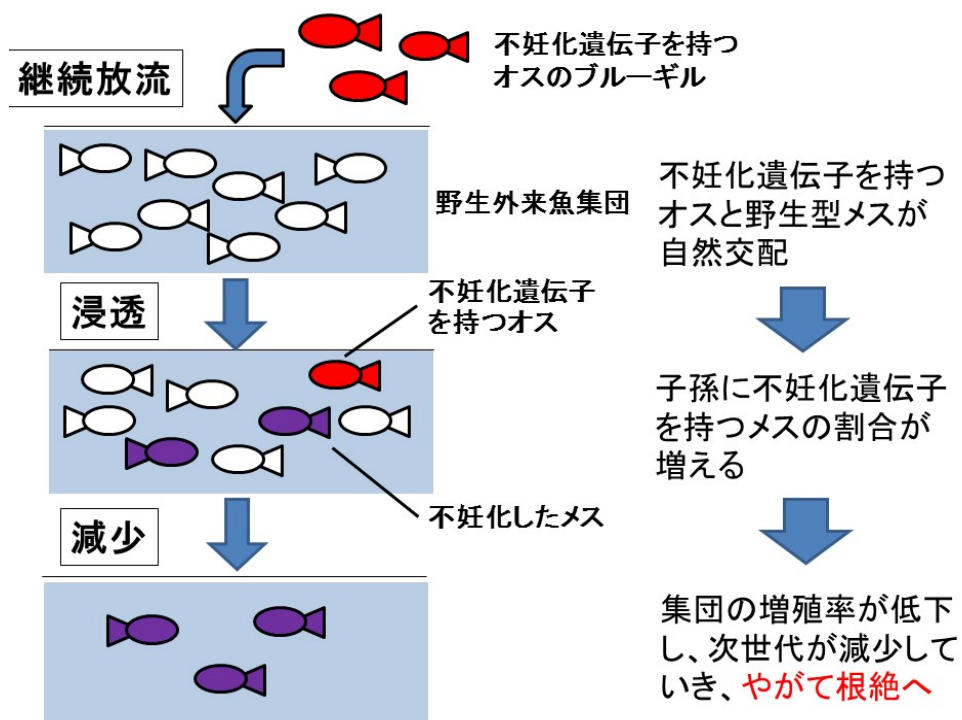


図3 “遺伝子制圧”による集団の根絶

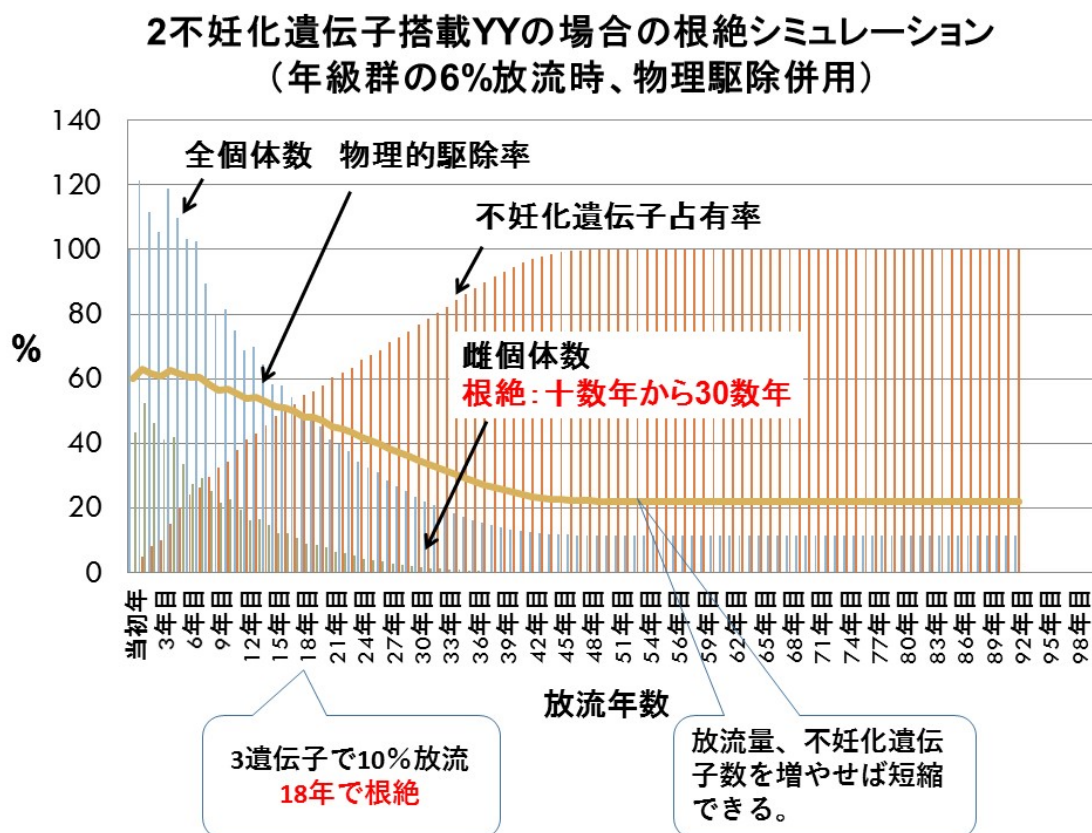
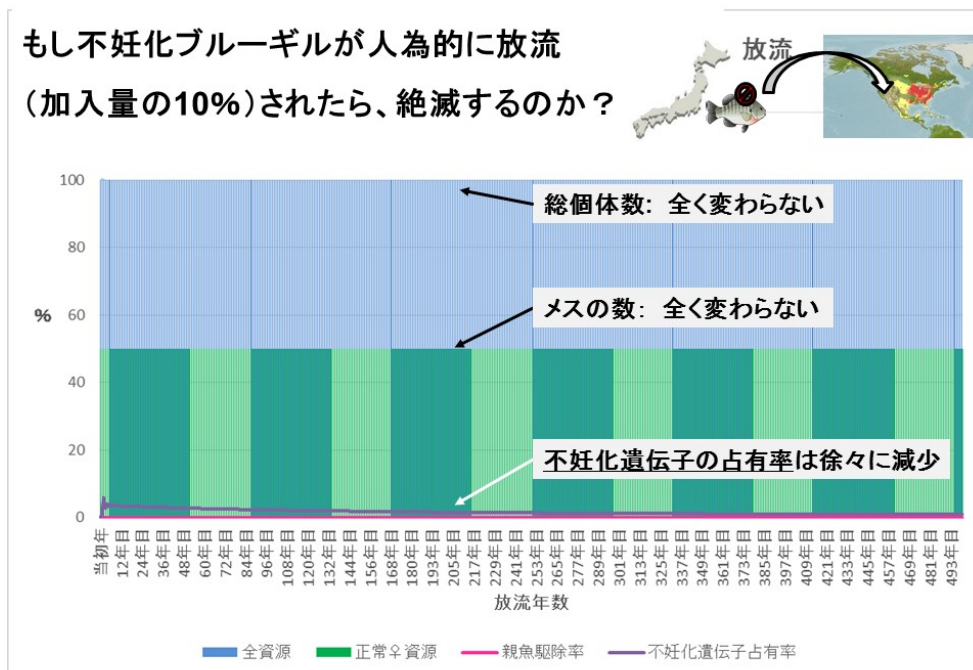


図4 根絶シミュレーションの一例



数は変わらず、絶滅しない。不妊化遺伝子は徐々に減少。

図5 遺伝子制圧技術の安全性（簡易シミュレーションの一例）

3. 研究開発の方法

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発

ブルーギルにおいて、雌の成熟に必要で雄の成熟に影響しない遺伝子を破壊した雌特異的不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤技術開発を行った。具体的には、まず成熟関連遺伝子の塩基配列情報を網羅的に獲得するため全ゲノム解析並びに発現遺伝子解析から遺伝子予測を行った。次に全ゲノム情報を用いて、遺伝子編集により雌の成熟関連遺伝子の機能を抑制するために遺伝子破壊を行った。

1) 全ゲノム解析と発現遺伝子解析からの遺伝子予測

ブルーギルの筋肉よりゲノムDNAを抽出した。また精巣、卵巣、肝臓、下垂体よりRNAを抽出し、均一化cDNAを得た。ゲノムDNAはIon Proton及び、NextSeq500でシーケンシングを行い、得られたNGSリードはPlatanusによるドラフトゲノム作成に用いた。均一化cDNAは、Ion PGM、Ion Proton、NextSeq500でシーケンシングを行い、Augustusによる遺伝子予測に用いた。また、Blast検索により得られた遺伝子領域について機能予測を行った。

2) 遺伝子編集による不妊化遺伝子搭載魚の作出

魚類の成熟に関する遺伝子の生物学的情報に基づいて、標的とする雌特異的成熟関連遺伝子を探索した。次に当該遺伝子の塩基配列解析を行い、ゲノムDNA配列を明らかにした。当該遺伝子特異的に遺伝子機能を破壊・抑制するためCRISPR/Cas9の系を用いて、DNA分解酵素のRNAならびに塩基配列情報を元に特異的にDNAに結合するRNAを設計し、それらのRNAをブルーギル受精卵に顕微注入を行った。得られたふ化仔魚を用いて、標的遺伝子に変異が入っていることを確認した。雌特異的成熟関連遺伝子 *foxl2* または *fshr* 遺伝子に変異導入されたF0およびF1個体を作成した。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発

ブルーギルの増殖技術は本研究課題における不妊化遺伝子搭載遺伝子ブルーギルの増産に必要不可欠な技術であるため、別個体の生殖細胞を移植して卵を形成させる技術（借り腹技術）の基盤技術開発を行った。具体的には、以下の条件検討を行った。

1) 人工授精

人工授精可能な精子および卵を入手するために飼育水温の検討を行った。また、排精と排卵を促進させるhCG（ヒト絨毛性ゴナトロピン）の投与条件の検討を行った。

2) 精子凍結

凍結による精子への影響を抑えるための凍結防御剤の検討を行った。凍結防御剤としてはメタノールとDMSOを用いた。また、最適な精子の凍結速度を調べるために熱電対を用いて精子の凍結速度を計測した。

3) 性ステロイドホルモン投与による性転換

遺伝的メスからオスへの性転換については、オス化を誘導するメチルテストステロンとメス化を抑制するフィンドロゾールをエタノールに溶解し、配合飼料に浸透させることで経口投与を行った。同様に、遺伝的オスからメスへの性転換手法として、Wangらの報告 (Wang et al., 2008) を参考にエストロゲンを経口投与した。

4) 近縁種間雑種作出もしくは染色体操作による三倍体作出

ブルーギルとその近縁種であるパンプキンシード (*Lepomis gibbosus*) 及び、ロングイヤーサンフィッシュ (*Lepomis megalotis*) の3種を交配させる雑種作出試験を行った。染色体操作による三倍体作出については、受精卵を通常の飼育水温よりも低温および高温処理することで、極体放出阻止による染色体の倍化操作についての条件の検討を行った。

5) 生殖細胞の他個体への移植

蛍光染色したオスの精原細胞を孵化仔魚に移植を行い、蛍光色素の有無を確認することで、生殖細胞移植を行った。また、移植を行った孵化仔魚から精原細胞の有無を確認するために、ドナー由来の遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて確認した。

(3) 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発

ブルーギルにおいて、野外集団の不妊化遺伝子浸透度のモニタリング手法の開発と効果的な放流法や標識法の検討のため、分子マーカーを用いた資源量や有効集団サイズの調査や繁殖・行動等のデータの集積により、適切な放流手法の検討に必要な生物要因および環境要因の推定を行った。具体的には、琵琶湖のブルーギルの生物特性の把握を行うため、琵琶湖において3年間継続して調査採集を行うと共に、採集個体について以下の分析を行った。

1) 形態解析

デジタルカメラで撮影した採集個体の写真をモルフォメトリ解析の一つであるRelative warp analysisを行い、生息地間での体型の違いについて調べた。また、遺伝子分析の結果との対応についても調べた。

2) 遺伝子解析

分子情報を用いた集団構造の推定を行うため、次世代シーケンサーによるRad-seq分析を行い、a) 各集団の遺伝的特徴、b) 集団間の遺伝的類縁関係、c) 琵琶湖における繁殖集団数、d) 形態的特徴との対応の4点について調べた。また、新たにマイクロサテライトマーカーの開発を行い、e) 各集団の遺伝的多様性の変化、f) 個体移動ならびに分布拡大の中心の推定、g) 有効集団サイズを用いた個体数変動の解明ならびに生命表の作成を行った。

4. 結果及び考察

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発

1) 全ゲノム解析と発現遺伝子解析からの遺伝子予測

次世代シーケンサーにより合計164GbのゲノムDNA及び、46GbのcDNA配列情報を取得した。得られたゲノムDNAのリード配列をアセンブリした結果、2kb以上の配列が3,169本得られ、N50配列長は7.3Mbであった。これらの配列に対して行った遺伝子予測では、54,810遺伝子が予測された。そのうち、49,895遺伝子 (91%) は開始コドンから終始コドンまでを含んで予測された。全予測遺伝子の機能予測を実施したところ、45,581遺伝子 (83.2%) が、Swiss-Prot及び、NRデータベースに登録されている遺伝子との相同性が検出された。今後、ブルーギルを対象とした遺伝子編集技術への応用が期待できる。

2) 遺伝子編集による不妊化遺伝子搭載魚の作出

魚類の成熟に関する標的とする雌特異的成熟関連遺伝子として、*foxl2*、*fshr*、ビテロジェニン等の遺伝子を選定した。その内、*foxl2*、*fshr*遺伝子のゲノムDNA配列を明らかにした。CRISPR/Cas9 の系を用いて両遺伝子ともに特異的に変異が入った個体F0、並びに一部の雄については天然の雌と交配を行い、F1個体群を得た。これらのF0ならびにF1には、標的遺伝子に対して変異がヘテロ体細胞モザイク、あるいは完全ヘテロで導入されており、将来、遺伝子制圧の実証魚として必要となる親魚として飼育を開始した。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発

1) 人工授精

繁殖水温で飼育することでオスから人工授精可能な精子を得られた。一方、メスの卵については繁殖水温で飼育することで卵形成を促進させたメスにhCG (ヒト絨毛性ゴナトロピン) を注射することで排卵を誘発することができた。このように人工飼育中のブルーギルについて、任意のタイミングで人工授精を行うことが可能になった。

2) 精子凍結

凍結防御剤の検討を行った結果、メタノールを用いることで運動性を維持したまま精子を凍結保存することが可能になった。さらに、精子の冷却速度は1分あたりマイナス25℃の冷却速度が精子の冷却に適した冷却速度ということが分かった。この結果により、不妊化遺伝子搭載ブルーギルの精子凍結保存に向けた基礎的な知見が得られた。

3) 性ステロイドホルモン投与による性転換

遺伝的メスからオスへの性転換については、性分化時期の仔魚にオス化を誘導するメチルテストステロンとメス化を抑制するファドロゾールを経口投与することで試験群の全てのブルーギルがオスになることが分かった。一方、遺伝的オスからメスへの性転換については、Wangらの報告(Wang et al., 2008)を参考にエストロゲンを投与することで試験群の全ての個体が100%メスになることが判明した。これにより、不妊化遺伝子の集団内への浸透効率を高める可能性がある超オス(YY)や全メス三倍体(XXX)の作出に向けた性転換手法が確立された。

4) 近縁種間雑種作出もしくは染色体操作による三倍体作出

近縁種間雑種化による異質三倍体作出については、ブルーギルとその近縁種であるパンプキンシード(*Lepomis gibbosus*)及び、ロングイヤーサンフィッシュ(*Lepomis megalotis*)の3種を交配させる雑種作出試験を行ったところ、ロングイヤーサンフィッシュのオスとブルーギルのメスあるいはパンプキンシードのメスと人工授精することで雑種が作出可能なことが分かった。一方、染色体操作による三倍体作出については、受精卵を低温(7℃)で20分間処理することで、孵化仔魚がほぼ完全に三倍体化することが分かった。これらの手法を用いることで、最終的には不妊化遺伝子を搭載したブルーギルのメス親魚の作出が可能になる。

5) 生殖細胞の他個体への移植

蛍光染色したオスの精原細胞を孵化仔魚に移植したところ、移植を行った孵化仔魚内で蛍光を発する細胞が確認された。また、移植を行った孵化仔魚から精原細胞由来の遺伝子の発現を調べたところ、本来は孵化仔魚では発現していないはずの遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて確認することができた。このことは移植した細胞が孵化仔魚内に存在することを示していた。このことにより、三倍体への生殖細胞の移植が可能となり、本来は不妊になるはずのメス特異的不妊化遺伝子を持つ卵を作出するメス親魚作出の可能性が高まった。

(3) 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発

形態解析において琵琶湖のブルーギルは尾柄高において地域差が認められ、またRad-seq分析においても微妙ではあるが遺伝子レベルで同様の違いが見られた。分子マーカーを用いた集団解析において、琵琶湖のブルーギルは複数の繁殖集団から構成され、余呉湖、北湖、南湖の3つに大きく別れた。しかしながら、琵琶湖のブルーギルは長距離移動を行わないものの、近隣の集団間での遺伝的交流は高かった。分散の中心は北湖の安曇川と南湖の守山であることが示唆され、有効集団サイズは何れの生息地においても減少傾向であるが、南湖は北湖の約3倍であった。生命表において3-4歳魚における死亡率が高い事が判ったが、個体レベルでの繁殖貢献度は加齢と共に増加した。以上の事から、琵琶湖のブルーギル駆除においては、余呉湖、安曇川、守山の3点で重点的に行き、遺伝子編集魚の放流は3歳魚の使用が望ましいことが考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発

ブルーギルにおいて精度の高い遺伝子データを得たことは、成熟関連遺伝子の検索に役立つだけでなく、生物多様性、進化などのあらゆる分子生物学的解析を行う際、例えば魚種間での遺伝子の相同性解析など、基本となる重要な情報を提供するものとして科学的価値は非常に大きい。

次に、ブルーギルにおいて、2つの雌特異的成熟関連遺伝子を同時に遺伝子破壊できることを実証したことは、その受精卵への顕微注入により非常に効率良く遺伝子編集を行う事ができることを示した。

2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発

外来魚の繁殖は国内では大きな問題となっているにもかかわらず、ブルーギルやブラックバスの繁殖制御機構に関わる基礎的な繁殖生理学的研究はほとんど行われておらず、人工繁殖技術に関する情報が少ない。成熟ホルモン投与による排卵誘導技術の開発により、計画的な人工授精・繁殖が可能になった。

3) 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発

琵琶湖におけるブルーギルの生息密度は、今回の分析結果から何れの生息地においても南湖は北湖の約3倍であり、更に分散の中心が北湖においては安曇川、南湖においては守山である可能性が示唆された。また、有効集団サイズのモニタリングにおいて琵琶湖のブルーギルの個体数は何れの生息地においても減少しており、駆除効果の検証において有効集団サイズのモニタリングは効果的であると言える。また、生命表と繁殖貢献度の推定結果から不妊化遺伝子搭載魚の放流において3歳魚の使用が最も効果的であることが明らかとなった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省、文科省、農林水産省の関係省庁担当者が参加した水産庁主催の「ゲノム編集技術を用いた水産物に関わる情報交換会」において、本研究成果である遺伝子編集魚を用いた外来魚根絶モデルのシミュレーション結果とゲノム編集技術を使った外来魚根絶技術の開発状況について説明を行い、ゲノム編集魚の取扱制度の議論、意見交換に貢献した（平成28年11月18日）。

<行政が活用することが見込まれる成果>

1) 日本発の新たな侵略的外来種の駆除・根絶技術の研究技術開発の推進

従来の駆除技術では対応が困難であった外来魚の根絶に対して、遺伝子を用いた新技術である遺伝子制圧技術の実証技術の開発に必要な基盤技術（ブルーギルの全ゲノム情報、ブルーギルにおけるゲノム編集技術、不妊化遺伝子搭載魚の増産のための借り腹技術に必要な基盤技術（ホルモンによる人工催熟技術、精子凍結技術、3倍体作出技術、生殖細胞移植技術）が整備された。愛知目標（G0P10）の2020年までの短期目標「生物の多様性の損失を止めるために効果的かつ緊急な行動を実施する」の達成に向けた具体的な取組の一つである。

2) ブルーギル駆除の効率化への提言

琵琶湖のブルーギルの分布拡大の中心は、北湖は安曇川河口、南湖は守山周辺である可能性が高いことから、これら2地点を中心とした駆除事業の実施が効率的かつ有効であるとの予測を提示した。特に守山周辺は琵琶湖のブルーギルの分散の一大中心地であることから、当地を重点駆除地域とするべきである。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Kawamura K, Fujiwara A, Yamada M, Kurita J & Okamoto H Development and characterization of 24 polymorphic microsatellite markers for bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Genes & Genomics* (DOI: 10.1007/s13258-017-0531-x) 受理済.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 岡本裕之、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、藤原篤志、河村功一：第10回外来魚情報交換会講演要旨集p16(2015)「遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の開発について」
- 2) Okamoto H, Kurita J, Nishiki I, Iwasaki Y, Fujiwara A, Yamaguchi T, Oku H, Masaoka T, Ishikawa T and Kawamura K, International Symposium on Genetics in Aquaculture XII, Santiago de Compostela, Spain, (2015) p196. “Methodology for eradication of invasive alien species. A new method of gene-induced suppression for alien population (GISAP), and the first whole-genome analysis of bluegill (*Lepomis macrochirus*)”
- 2) 岡本裕之、山口寿哉、藤原篤志、奥宏海、正岡哲治、石川卓、河村功一、栗田潤：平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p81(2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開

発－1：遺伝子制圧手法と基盤技術開発」

- 3) 石川卓、岩崎裕貴、西木一生、藤原篤志、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p82(2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－2：ブルーギルの不妊化技術の基盤開発」
- 4) 山口寿哉、栗田潤、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p82(2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－3：ブルーギルの増殖技術の基盤開発」
- 5) 栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、石川卓、藤原篤志、岡本裕之：平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p83(2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－4：米国湖沼におけるブルーギル個体群モデル上での遺伝子制圧シミュレーション」
- 6) 奥宏海、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、栗田潤、岡本裕之：平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p82(2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－5：ゲノム情報を利用したリパーゼ遺伝子族の特性解析」
- 7) 山口寿哉、石川卓、栗田潤、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：第11回外来魚情報交換会講演要旨集p22(2016)「ブルーギルの根絶に向けた繁殖技術の開発」
- 8) 古川 航、河村功一、岩崎裕樹、西木一生、藤原篤志、山田充哉、岡本裕之、栗田 潤(2016)：平成28年度日本水産学会秋季大会口頭発表「琵琶湖産ブルーギルの遺伝的特徴と移動様式」
- 9) 石川卓、岩崎裕貴、西木一生、藤原篤志、河村功一、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：第12回外来魚情報交換会講演要旨集p25(2017)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発」(H29.1.28-29)
- 10) 岡本裕之、奥宏海、栗田潤、藤原篤志、石川卓、山口寿哉、正岡哲治、古澤昭人、河村佳正、横山雅仁、河村功一：第12回外来魚情報交換会講演要旨集p26(2016)「遺伝子制圧技術による外来魚の根絶のための実証魚の開発に向けて」(H29.1.28-29)
- 11) 岩崎裕貴、西木一生、松浦愛子、藤原篤志、山口寿哉、奥宏海、石川卓、正岡哲治、栗田潤、岡本裕之：平成29年度日本水産学会春季大会講演要旨集(2017)「ブルーギルのドラフトゲノム作成と遺伝子予測」(H29.3.26-30)

7. 研究者略歴

課題代表者：岡本 裕之

東京理科大学理工学部卒業、東京水産大学大学院水産学研究科修了、博士(水産学)、現在、水産研究・教育機構増養殖研究所グループ長

研究分担者

1) 岡本 裕之

同 上

2) 山口 寿哉

静岡大学理学部卒業、熊本大学自然科学研究科修了、博士(理)、現在、水産研究・教育機構増養殖研究所研究員

3) 河村 功一

京都大学農学部卒業、農学博士、現在、三重大学生物資源学部教授

4-1408 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発

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	ゲノム育種グループ	岡本 裕之
中央水産研究所	水産生命情報研究センター		藤原 篤志
増養殖研究所	魚病研究センター	免疫グループ	栗田 潤

研究協力者 石川 卓、岩崎 裕貴、西木 一生（平成26～27年度）

平成26(開始年度)～28年度累計予算額：47,053千円（うち平成28年度：14,319千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

ブルーギルにおいて、雌の成熟に必要で雄の成熟に影響しない遺伝子を破壊した雌特異的不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤技術開発を行った。成熟関連遺伝子の塩基配列情報を網羅的に獲得するため全ゲノム解析並びに発現遺伝子解析から遺伝子予測を行った。次世代シーケンサーにより合計164GbのゲノムDNA及び、46GbのcDNA配列情報を取得した。得られたゲノムDNAのリード配列をアセンブリした結果、2kb以上の配列が3,169本得られ、N50配列長は7.3Mbであった。これらの配列に対して行った遺伝子予測では、54,810遺伝子が予測された。そのうち、49,895遺伝子（91%）は開始コドンから終始コドンまでを含んで予測された。全予測遺伝子の機能予測を実施したところ、45,581遺伝子（83.2%）が、Swiss-Prot及び、NRデータベースに登録されている遺伝子との相同性が検出された。今後、ブルーギルを対象とした遺伝子編集技術への応用が期待できる。

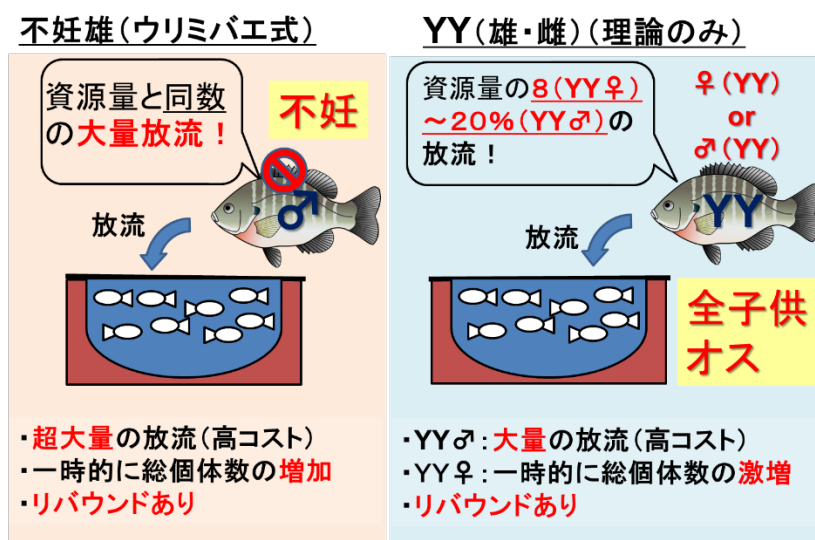
全ゲノム情報を用いて、遺伝子編集により雌の成熟関連遺伝子の機能を抑制するために遺伝子破壊を行った。魚類の成熟に関する標的とする雌特異的成熟関連遺伝子として、*foxl2*、*fshr*、ビテロジェニン等の遺伝子を選定した。その内、*foxl2*、*fshr*遺伝子のゲノムDNA配列を明らかにした。CRISPR/Cas9の系を用いて両遺伝子ともに特異的に変異が入った個体F0、並びに一部の雄については天然の雌と交配によりF1個体群を得た。これらのF0ならびにF1には、標的遺伝子に対して変異がヘテロ体細胞モザイク、あるいは完全ヘテロで導入されており、将来、遺伝子制圧の実証魚として必要となる親魚として利用が期待される。

[キーワード]

ブルーギル、全ゲノム解析、遺伝子予測、雌特異的成熟関連遺伝子、遺伝子編集

1. はじめに

琵琶湖等の大型湖沼において、ブルーギル、オオクチバス等の侵略的魚食性外来魚の大繁殖による固有生態系の破壊、希少種の絶滅危惧、内水面漁業の壊滅的衰退が大きな社会的問題となっている。これまでに莫大な予算と精力的な駆除努力により一定の減少傾向は見られるものの、未だホンモロコ、エビ類等主要漁獲対象魚種に資源回復の兆候はなく、また絶滅危惧種は依然絶滅の危機に直面している。物理的駆除（捕獲等）努力だけでは、やがて生息密度が低下すると駆除率が低下し、資源量はあるレベルで平衡状態になると予想される。生息密度が低下しても駆除率の維持が可能な方法として、ウリミバエの不妊化雄の大量放出による根絶例¹⁾が知られている。しかし、この方法は極めて大量の不妊化雄の放出が必要なためかえって固有種を絶滅に追いやる危険が懸念される。一方、YY♀の放流により通常雌を減らす方法が考案されたが²⁾、性転換魚の大量生産が困難なことや、一時的にせよ雌の放流による大幅な資源量の増加が問題とされ実用化に至っていない。またどちらの方法も、予期せぬ資源量の増加（リバウンド）があればそれまでの駆除・放流努力が全く無駄となる（図(1)-1）。そのため、根絶には新たな革新的な駆除手法が必要と考えられる。

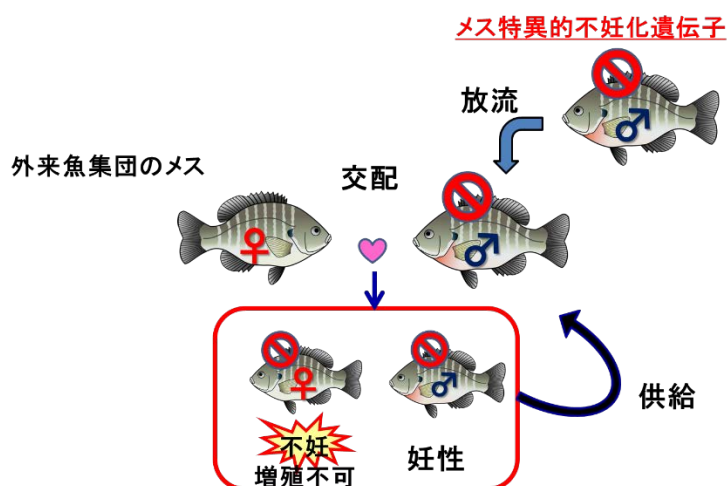


図(1)-1 従来の外来魚の駆除手法と問題点

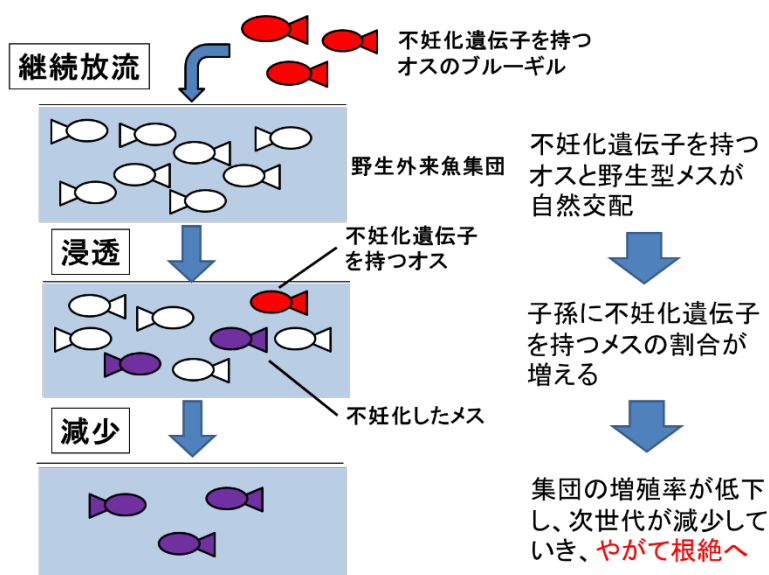
2. 研究開発目的

近年メダカにおいて成熟に関わる遺伝子の機能阻害による雌特異的不妊化魚が作出された³⁾。この魚では雌の成熟に関連する遺伝子だけが機能阻害されているため、その遺伝子を持つ子孫の雄の子供は次世代を残すことができるが、雌の子供は子孫を残すことができない（図(1)-2）。このような性特異的不妊化魚を作出、放流し、標的外来魚集団中で自然交配が繰り返されることによって、集団内の妊性に関わる遺伝子を不妊化（不活化）したものに徐々に置き換えることによって、妊性のある雌を減らしていくことができると考えられる（図(1)-3）。本研究は、このような性特異的に不妊化した遺伝子を用いた新たな根絶手法として考案した“遺伝子制圧”手法の基盤技術の開発を目的としている。“遺伝子制圧”手法は、集団中の不妊化遺伝子の占有率を上げ

ることに一次目的があり、資源量が増加しても過去の放流努力が無駄になることがなく、少量ずつでの放流でも確実に効果が上がる点が革新的である。また遺伝子編集（ゲノム編集）技術を用いて、これまで極めて困難であった不妊化遺伝子の多重化によって駆除力の強化可能である。“雌特異的不妊化遺伝子搭載魚”の増産については、ニジマス等において確立された借り腹技術を利用することにより、その大量生産が可能となる。本研究は、不妊化遺伝子搭載魚を用いた革新的な外来魚の根絶技術の基盤開発を世界に先駆けて推進し、極めて困難な侵略的外来種の根絶に貢献することを目的としている。



図(1)-2 雌を特異的に不妊化し雌を駆除する模式図



図(1)-3 “遺伝子制圧”による集団の根絶

集団内の雌の成熟に関する遺伝子を制圧し、それによって集団を駆除する（制圧する）

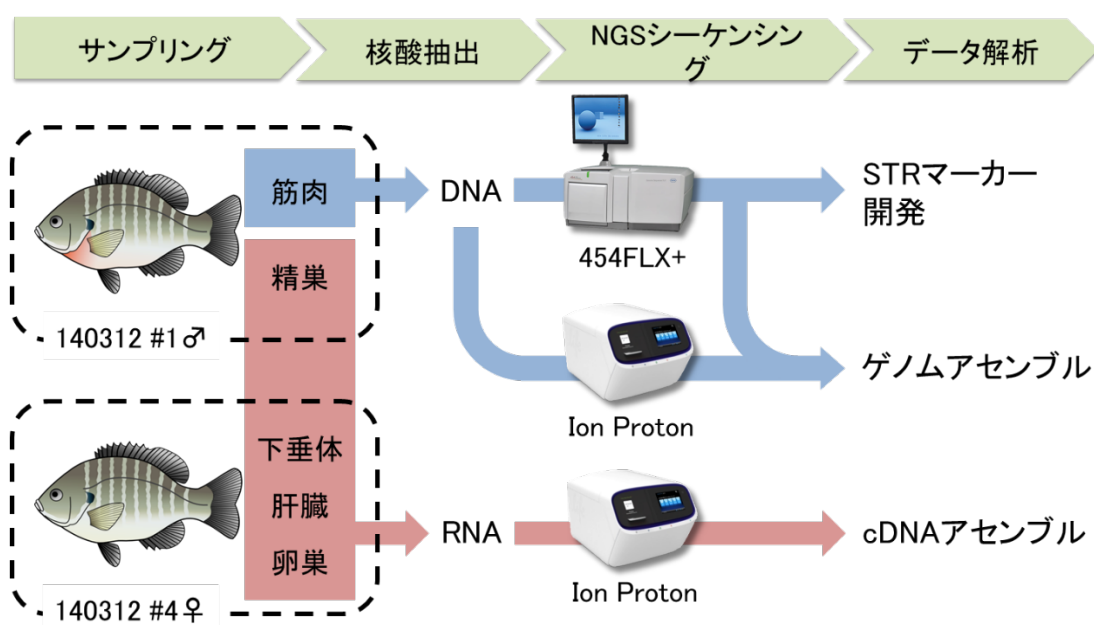
3. 研究開発方法

(1) ブルーギルの全ゲノム解析

i) ブルーギルの発現遺伝子および全ゲノム塩基配列解析

ブルーギル雄成魚の筋肉よりゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサー454FLX+とIon Proton™の2機種を用いて、全ゲノムDNAの塩基配列解析（シーケンシング）を実施した（図(1)-4）。この配列データを用いて、Newbler2.9及び3.0による*de novo*アセンブルを実施し、第一段階のドラフトゲノムを構築した。また、転写された遺伝子（cDNA）の塩基配列を調べるために、先と同一の雄成魚の精巢、別の雌成魚から下垂体、肝臓、卵巣それぞれの組織よりRNAを抽出し、標準化cDNAライブラリーを作成した後、Ion Proton™を用いてシーケンシングを実施した。この配列データを用いて、Newbler2.9によるIsotig解析を実施し、遺伝子カタログ（転写産物情報）を作成した。

次世代シーケンサー454FLX+のDNA配列データについては、サブテーマ(3)での系群判別にも用いるマイクロサテライトマーカーを開発するための追加解析を行い、ブルーギルのマイクロサテライト領域の探索と、その配列を増幅するためのプライマー設計を行った。

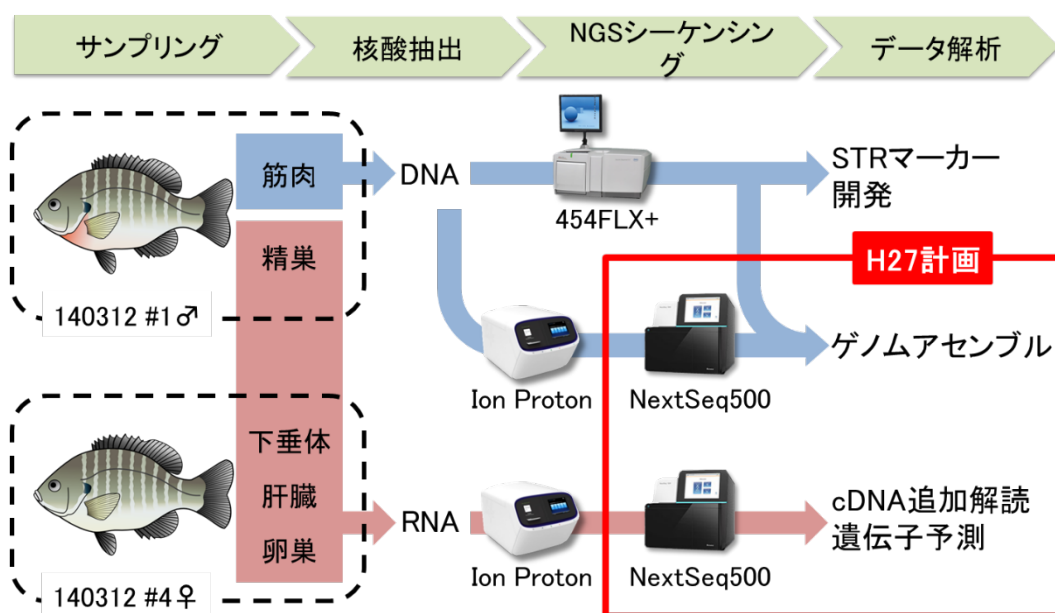


図(1)-4 ブルーギルゲノム解析の概要

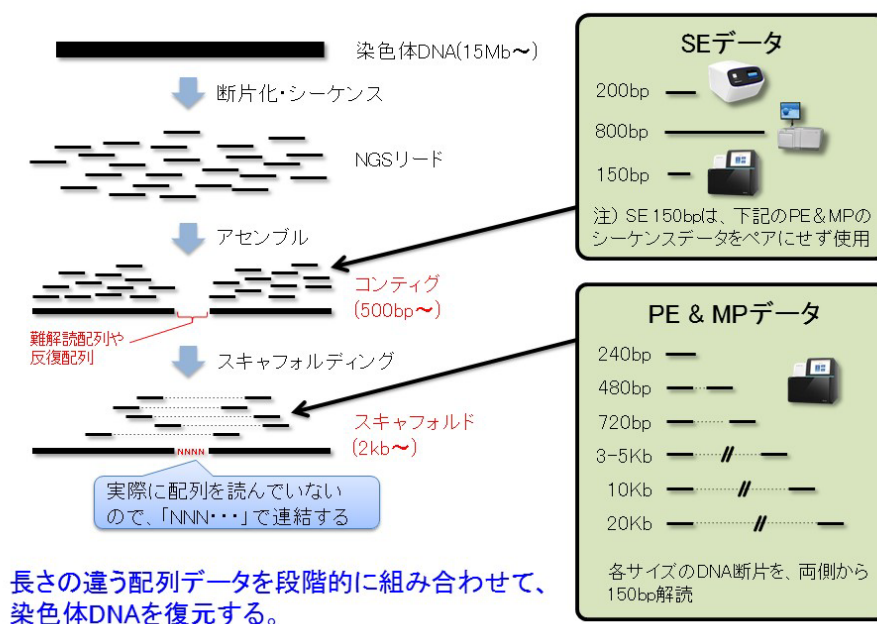
ii) ブルーギルの発現遺伝子および全ゲノム塩基配列解析の高度化

26年度に次世代シーケンサー454FLX+とIon Proton™の2機種を用いて実施した第一段階のドラフトゲノムの精度を高めるために、新たな次世代シーケンサーNextSeq500を用いて、インサート配列長が240bp、480bp、720bpのペアエンドシーケンスと、3-5kb、10kb、20kbのメイトペアシーケンスを実施した。これらの配列データと、これまでに取得した配列データと合わせて、Platanus⁴⁾による*de novo*アセンブルを実施し、第二段階のドラフトゲノム（最終バージョン）を構築した。

また、26年度にIon Proton™を用いてcDNAのシーケンシングを実施した、精巢、下垂体、肝臓、卵巣組織の標準化cDNAライブラリーについて、新たにIonPGM及びNextSeq500を用いて追加シーケンシングを行った。



図(1)-5 ブルーギル全ゲノムの追加解析の概要

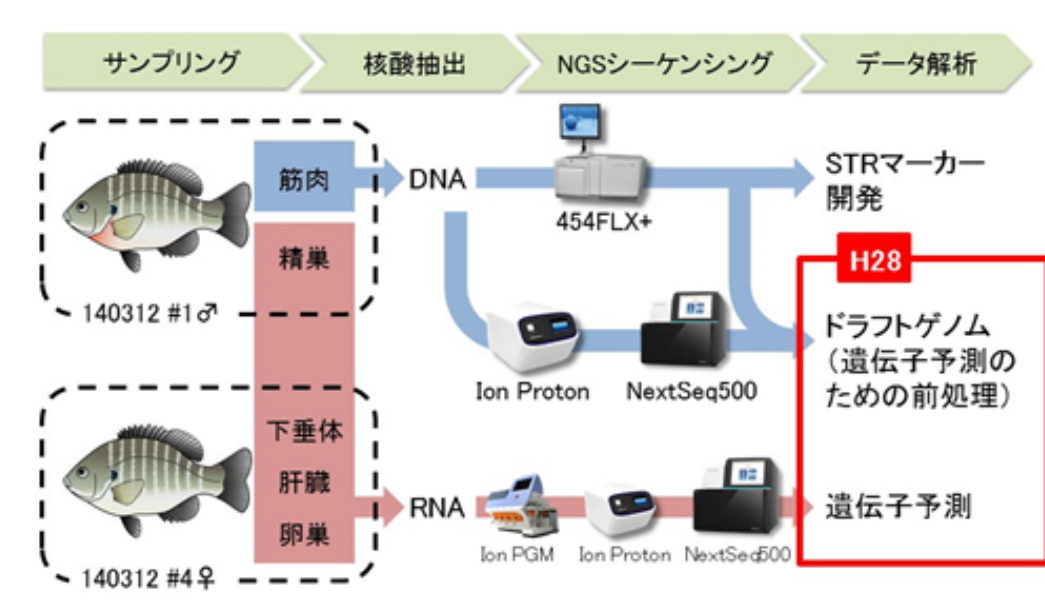


図(1)-6 ゲノムアッセンブルの手順

iii) ブルーギルの遺伝子予測と遺伝子カタログデータの整備

27年度までに取得した、精巣、下垂体、肝臓、卵巢組織の標準化cDNAライブラリーのシーケンスデータを第二段階のドラフトゲノムへマッピングし、エクソン情報の取得やAugustus⁵⁾

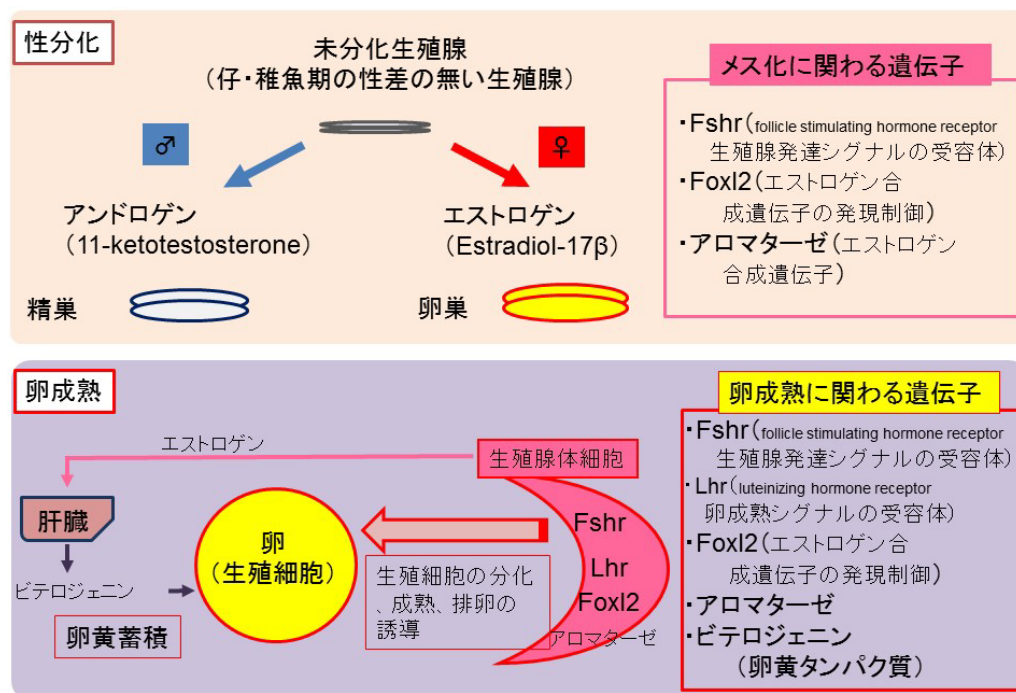
による遺伝子予測、公共データベースを用いた遺伝子アノテーションや機能分類を実施し、第二段階の遺伝子カタログ（最終バージョン）を整備した（図(1)-7）。



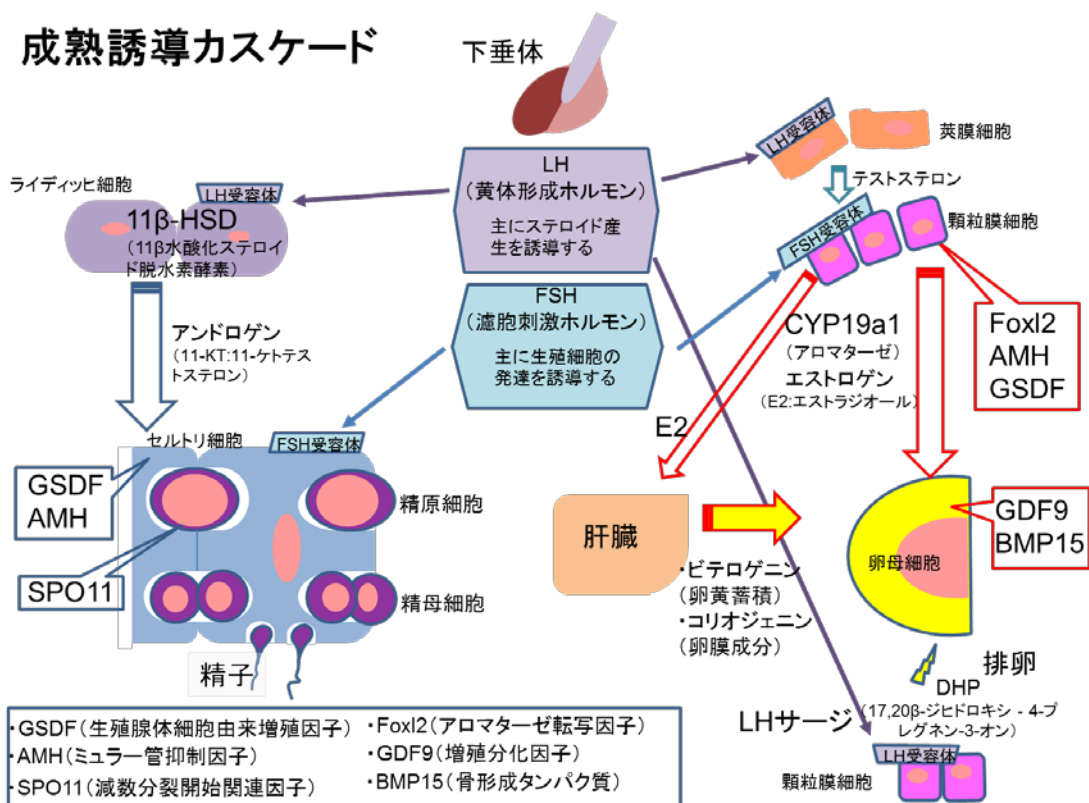
図(1)-7 ブルーギル遺伝子予測解析の概要

iv) 雌特異的成熟関連遺伝子の選定

文献からの生物学的、分子生物学的情報等から、雌特異的な成熟に関連する遺伝子の選定を行った（図(1)-8, 9）。



図(1)-8 魚類の雌の生殖生理機構の概要



図(1)-9 成熟誘導カスケードの概要

v) 雌の成熟に関与する遺伝子のゲノムDNA配列の決定

ゲノム解析ソフトウェアCLC Genomics Workbenchを用いて、公開ゲノムデータベースであるNCBIより、雌の性成熟に関与するとされる転写因子*foxl2*のcDNA配列について、他魚種（ティラピア、メダカ）の塩基配列を入手した。同じくCLC Genomics Workbenchを用いて、ブルーギルと最も進化的に近いと思われるティラピアの*foxl2*のcDNA配列を使って、まずブルーギルのcDNA解析データから、ブルーギルの*foxl2*のcDNA配列を取得した。次に取得したブルーギルのcDNAの塩基配列をブルーギルの全ゲノムDNA配列に対して相同性検索を行い、そのゲノム構造を解析した。

vi) 雌の成熟に関与する新たな遺伝子のゲノムDNA配列の決定

前年度の全ゲノム情報で遺伝子構造を完全に決定することができなかった雌の性成熟に関与する*fshr*遺伝子について、以下の解析を行った。公開ゲノムデータベースであるNCBIよりメダカのcDNA配列を入手し、ゲノム解析ソフトウェアCLC Genomics Workbenchを用いて、27年度に高度化した全ゲノム情報を用いてblast検索を行った。得られた配列から、遺伝子予測ソフトGENESH:tonguefishモデルにより構造を予測した。NCBIのblastpを用いて、アミノ酸配列で相同性検索を行った。さらにブルーギルとメダカ間で*fshr*の遺伝子構造を比較し、解析した。

vii) 標的遺伝子特異的DNA分解酵素の発現ベクターの合成

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を試験するため、*foxl2*ならびに*fshr*に対するcrRNAの設計を、Blue Heron BiotechのWEB上のガイドRNA設計プログラムGuide RNA Target Design Tool (<https://www.blueheronbio.com/external/tools/gRNASrc.jsp>)を用いて行った。各crRNAは、外注により合成した（サーモフィッシャー）。DNA分解酵素Cas9については、市販のGeneArt（登録商標）CRISPR nuclease mRNA（サーモフィッシャー）、あるいはAddgeneより入手したpCS2+hSpCas9 プラスミドベクター（#51815）を制限酵素NotIで消化し、それを鋳型として、mMESSAGEmMACHINE SP6 Kit（Life technologies）を用いてCas9 mRNAを合成し、それぞれ顕微注入試験に使用した。BG_*foxl2*_g1-g3、BG_*fshr*_g1 & g2の各crRNA（sgRNAの一部）について、試験管内での切断活性を、Guide-it sgRNA Screening Kit（タカラバイオ）を用いて調べた。各crRNAの配列（各20bp）を以下に示す。

```

BG_foxl2_g1 : ggagaaagag cgacccaaag
BG_foxl2_g2 : ugaacggccg cuucauccug
BG_foxl2_g3 : ugggacggau ccggcuucuc
BG_fshr_g1 : gcaucugaga cagugaugag
BG_fshr_g2 : cagugaugag agggagcuug

```

viii) DNA分解酵素による成熟関連遺伝子の破壊

始めに、GFP mRNA（addgeneより入手した pCS2 mt-GFP (BamHI minus)プラスミド（#15681）を制限酵素NotIで消化したものを鋳型に、mMESSAGEmMACHINE SP6 Kit（Life technologies）を用いて合成したRNA）を用いて、人工授精によって得た受精卵（サブテーマ②(2)-i参照）に顕微注入を行い、GFPの緑色蛍光を指標に顕微注入条件を検討した。具体的には、授精直後の付活卵、1細胞期（胚盤形成期）、2細胞期、4細胞期でそれぞれの時期に顕微注入を行い、胚軸形成率、GFP 発現率等を測定し比較した。付活期は胚盤が形成されていないため、打つ場所は特に定めなかったが（ランダム法）、1-4細胞期については、胚盤あるいは割球を狙って顕微注入を行った（従来法）。

次に実際にゲノム中の*foxl2*遺伝子に対して、CRISPR/Cas9システムを使って、ブルーギル受精卵の顕微注入によって、塩基配列の欠損（遺伝子破壊）を実施できるか検討を行った。具体的には、vii) で試験管内での切断活性の確認ができたBG_*foxl2*_g1に対して、ブルーギル受精卵に顕微注入を行い、HMA（Heteroduplex mobility assay）により、当該遺伝子に変異導入された個体を探索し、選抜した。その後、変異個体から当該遺伝子の標的配列を含むDNA配列の一部を増幅したアンプリコン（増副産物）を用いて、塩基配列の解析により、変異の有無とその配列を同定した。さらに変異が導入された配列から演繹されるアミノ酸配列を調べた。

ix) 成熟関連遺伝子の破壊個体の作出

雌の成熟関連遺伝子*foxl2*、*fshr*、及び両遺伝子に対するCRIPR/Casの系を用いて、変異導入が体細胞（および生殖細胞）にモザイクにヘテロに変異導入が期待されるF0個体と、*fshr*

遺伝子についてはそのF0個体の数尾の雄と野生の雌個体との人工授精を行い、全細胞にヘテロに変異が入るF1個体の作出を行った。

4. 結果及び考察

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発

i) 雌特異的成熟関連遺伝子の選定

雌特異的成熟遺伝子としては、卵の支持細胞などの体細胞側で発現し、卵の成熟誘導等の雌の生殖生理に寄与し、卵原細胞や卵細胞など生殖細胞側で発現しない遺伝子が好ましい(図(1)-8)。そこで候補遺伝子として、濾胞刺激ホルモン (FSH) の β サブユニット遺伝子、黄体形成ホルモン (LH) の β サブユニット遺伝子、濾胞刺激ホルモンレセプター (*FSH-R*) 遺伝子、*foxl2* 遺伝子、卵黄タンパク前駆体ビテロジェニン遺伝子 (*Vg*)、卵膜を構成するタンパク質として知られる、卵膜前駆タンパク質コリオジェニン遺伝子 (*Chg*) や ZP タンパク質遺伝子を選定した(図(1)-9)。

ii) ブルーギルの発現遺伝子および全ゲノム塩基配列解析

全ゲノムDNAのシーケンシングの結果、総リード数2億8千900万本、総塩基配列数62 Gb の塩基配列データを取得できた。Newbler2.9及び3.0による *de novo* アセンブルの結果、コンテイング数約18万、N50コンテイング長は9kbp、予想ゲノムサイズは約800Mbの第一段階のドラフトゲノムが構築された(表(1)-1)。

標準化cDNAライブラリーのシーケンシングの結果、総リード数1億1千300万本、総塩基数22 Gbの塩基配列データを取得できた。Newbler 2.9によるIsotig分析の結果、約18.6万のアイソテイング、N50アイソテイング長680bpの転写産物情報を取得できた(表(1)-2)。

さらに次世代シーケンサー454FLX+のDNA配列データを用いて、ブルーギルのマイクロサテライト領域の探索を行った結果、2塩基リピートからなるマイクロサテライトが5,074箇所、3塩基リピートからなるマイクロサテライトが661箇所、4塩基リピートからなるマイクロサテライトが595箇所、5塩基リピートからなるマイクロサテライトが111箇所見出された。また、これらのマイクロサテライトを増幅するためのプライマー設計を行った結果、それぞれ、426、99、66、14箇所について、マイクロサテライトを増幅可能なプライマーが設計できた。(表(1)-3、表(3)-9)。これらの情報はサブテーマ③に提供した(表(3)-9)。

表(1)-1 ブルーギル全ゲノム解析

Metrics	Newbler 2.9	Newbler 3.0
number of largecontig	180,895	181,927
total largecontig length (bp)	737,092,618	741,699,693
Average largecontig length (bp)	4,074	4,076
N50 largecontig length (bp)	8,728	8,933
Largest contig length (bp)	168,506	136,869
number of allcontig	370,696	360,184
total allcontig length (bp)	784,638,774	786,506,419
peak depth	75	77
estimate genome size (Mb)	797	805

表(1)-2 ブルーギルcDNA解析

Isotig Metrics	Newbler 2.9
numberOfIsotigs	186,063
avgContigCnt	1.8
largestContigCnt	16
numberWithOneContig	119,378
numberOfBases	91,799,187
avgIsotigSize	493
N50IsotigSize	677
largestIsotigSize	5,750

表(1)-3 ブルーギルSTRマーカー

STR type	No of STR loci found	No of STR loci with PCR primers
2-bp repeats	5074	426
3-bp repeats	661	99
4-bp repeats	595	66
5-bp repeats	111	14
sum	6441	605

iii) ブルーギルの発現遺伝子および全ゲノム塩基配列解析の高度化

全ゲノムシーケンスの追加解読の結果、これまでに解読したものと合わせて、総リード数9億8千200万本、総塩基数164 Gb、ゲノム被覆率205倍の塩基配列データを取得した(表(1)-4)。これらの全てのシーケンスデータを用いて *de novo* アセンブルを行った結果、配列2 kb以上のもので、コンティグ数約11万本、N50コンティグ長約6 kb、スキャホールド数約3千本、N50スキャホールド長約7.3 Mbの第二段階のドラフトゲノム(最終バージョン)を構築した(表(1)-5)。

このドラフトゲノムを公開されているメダカゲノムと比較したところ、コンティグN50については、メダカが9,628 bpであるのに対しブルーギルは6,364 bp、スキャホールドN50は、メダカが6,078 kbであるのに対しブルーギルは7,255 kbとなりコンティグについてはメダカが優れているが、スキャホールドについてはブルーギルの方が優れていた。またギャップの塩基数(N数)については、ブルーギルの方がメダカのゲノムデータの1/4程度と極めて少なかった(表(1)-6)。また、ドラフトゲノムの完成度を示す指標の一つであるCEGMA解析によって、脊椎動物に共通して存在するコアオーソログ遺伝子(233種類)の有無を調べた結果、230種類(98.7%)のコアオーソログ遺伝子が完全長で復元できることがわかった(図(1)-10)。この結果は、これまでに報告されている魚類ドラフトゲノムの中ではティラピアに次いで最も高い完成度である。このように本課題で構築したブルーギルドラフトゲノムは、非常に高い完成度であることが示された。

一方、標準化cDNAライブラリーの追加シーケンシングの結果、総リード数約2億4千万本、総塩基数約46 Gbの塩基配列データを取得した（表(1)-7）。

表(1)-4 アセンブルに使用したゲノムデータ

シーケンサー	ライブラリー	リード数	総塩基数 (bp)	被覆率 (×) *1	Contig	Scaffold
454FLX+	800bp SE lib	148,483	79,403,947	0.1	✓	
Proton	200bp SE 1-1	69,802,805	14,800,847,144	18.5	✓	
	200bp SE 1-2	74,365,965	15,843,275,586	19.8	✓	
	200bp SE 2-1	74,972,929	16,269,203,322	20.3	✓	
	200bp SE 2-2	70,735,087	15,202,236,449	19.0	✓	
NextSeq500	240bp PE (merged)	67,939,817	16,620,544,669	20.8	✓	
	240bp PE (unmerged)	34,449,308	5,069,608,537	6.3	✓	✓
	480bp PE	187,278,779	27,985,308,070	35.0	✓	✓
	720bp PE	72,640,778	10,761,210,333	13.5	✓	✓
	3-5Kb MP	152,186,070	18,846,218,931	23.6	✓	✓
	10Kb MP	124,720,461	15,265,940,802	19.1	✓	✓
	20Kb MP	53,193,866	7,454,422,779	9.3	✓	✓
	Total	982,434,348	164,198,220,569	205.2		

*1 ゲノムサイズを800MBとした場合

表(1)-5 全ゲノムアセンブルの結果（左：500bp以上、右：2kb以上）

<配列長500bp以上のもの>

項目	Contig	Scaffold (H27)	Scaffold (H28)
配列数	312,002	21,227	21,233
平均長 (bp)	2,531	39,150	39,031
N50長 (bp)	4,479	7,021,779	6,994,560
N50 配列数	45,256	31	31
N90長 (bp)	964	613,282	615,459
N90 配列数	196,443	157	154
最大長 (bp)	85,303	22,934,953	22,881,250
総塩基長 (bp)	789,538,490	831,037,221	828,743,228
N数	0	43,147,876	33,745,265

<配列長2kb以上のもの>

項目	Contig	Scaffold (H27)	Scaffold (H28)
配列数	111,698	3,169	3,155
平均長 (bp)	5,303	257,411	257,814
N50長 (bp)	6,364	7,255,588	7,228,303
N50 配列数	26,678	30	30
N90長 (bp)	2,623	825,465	871,417
N90 配列数	85,844	137	135
最大長 (bp)	85,303	22,934,953	22,881,250
総塩基長 (bp)	592,305,009	815,733,904	813,403,295
N数	0	42,363,159	33,439,333

表 (1)-6 最新のメダカゲノムデータとの比較 (左:メダカ、右:ブルーギル)

ASM31367v1

Organism name: *Oryzias latipes*

Intraspecific name: Strain: Hd-RK

BioSample: SAMO000005523

Submitter: Medaka genome sequencing project

Date: 2007/05/09

Assembly level: Chromosome

Genome representation: full

RefSeq category: representative genome

GenBank assembly accession: GCA_000313675.1 (latest)

RefSeq assembly accession: GCF_000313675.1 (latest)

RefSeq assembly and GenBank assembly identical: no (hide details)

Only in RefSeq: chromosome MT

Data displayed for RefSeq version

WGS Project: BAA704

<メダカ最新データ>

Global statistics	
Total sequence length	869,818,208
Total assembly gap length	169,431,611
Gaps between scaffolds	118
Number of scaffolds	7,307
Scaffold N50	6,078,048
Scaffold L50	42
Number of contigs	134,430
Contig N50	9,628
Contig L50	21,698
Total number of chromosomes and plasmids	25

<BG_配列長2kb以上のもの>

項目	Contig	Scaffold
配列数	111,698	3,169
平均長 (bp)	5,303	257,411
N50長 (bp)	6,364	7,255,588
N50 配列数	26,678	30
N90長 (bp)	2,623	825,465
N90 配列数	85,844	137
最大長 (bp)	85,303	22,934,953
総塩基長 (bp)	592,305,009	815,733,904
N数	0	42,363,159

➤ CEGMA解析: CVG (Core Vertebrate Genes)

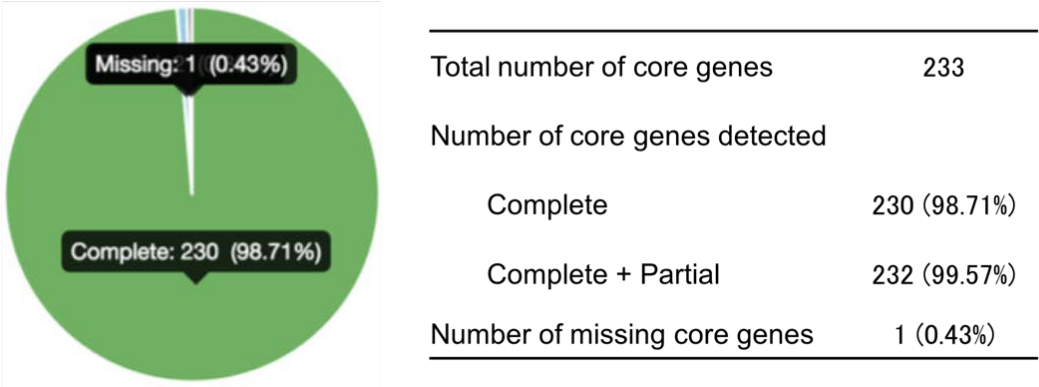


図 (1)-10 CEGMA解析によるドラフトゲノム完成度の解析

表(1)-7 遺伝子予測に用いたcDNAデータ

シーケンサー	ライブラリー	リード数	総塩基数 (bp)
Ion PGM	Lib1-1	1,675,883	462,691,121
	Lib1-2	1,506,780	395,399,095
	lib2	3,436,087	1,039,947,961
Ion Proton	200bp SE 1	66,065,402	13,065,763,788
	200bp SE 2	47,449,008	9,810,452,668
NextSeq500	240bp PE (merged)	47791060	7,191,373,211
	240bp PE (unmerged)	44029048	10,158,700,852
	480bp PE	28802264	4,333,300,137
	Total	240,755,532	46,457,628,833

iv) ブルーギルの遺伝子予測と遺伝子カタログデータの整備

取得した全ての標準化cDNAライブラリーのシーケンスデータ（表(1)-7）と第二段階のドラフトゲノムを用いて遺伝子予測を実施し、第二段階の遺伝子カタログ（最終バージョン）を作成した（図(1)-11）。その結果、54,810種類の遺伝子が予測され、予測遺伝子の平均長は約9 kb、CDS長は約1 kb、エクソン数は6個、エクソン長は約170 bpであり、魚類の予測遺伝子としては一般的な値だった。しかし、全遺伝子数54,810種類は通常よりも明らかに大きい値であり、これは、1種類の遺伝子を複数の遺伝子として予測している可能性が考えられた。

ブルーギル予測遺伝子とメダカ予測遺伝子との対応関係を調べた（図(1)-12）。その結果、ブルーギル予測遺伝子54,810種類のうち16,783遺伝子は、メダカ予測遺伝子（約20,000遺伝子）と相同性が確認された。また、このうちブルーギル9,065予測遺伝子は、メダカ予測遺伝子と一対一で対応していたことから、高い精度で予測されていることが考えられた。一方、残るブルーギルの7,718予測遺伝子は、メダカ予測遺伝子と多対一で対応していることから、1種類の遺伝子を複数の遺伝子として予測していることがわかった。これらの予測遺伝子については、直接、遺伝子解析等に用いることはできないが、クローニングや遺伝子選定のための基礎情報として十分な活用が見込めると考えられる。

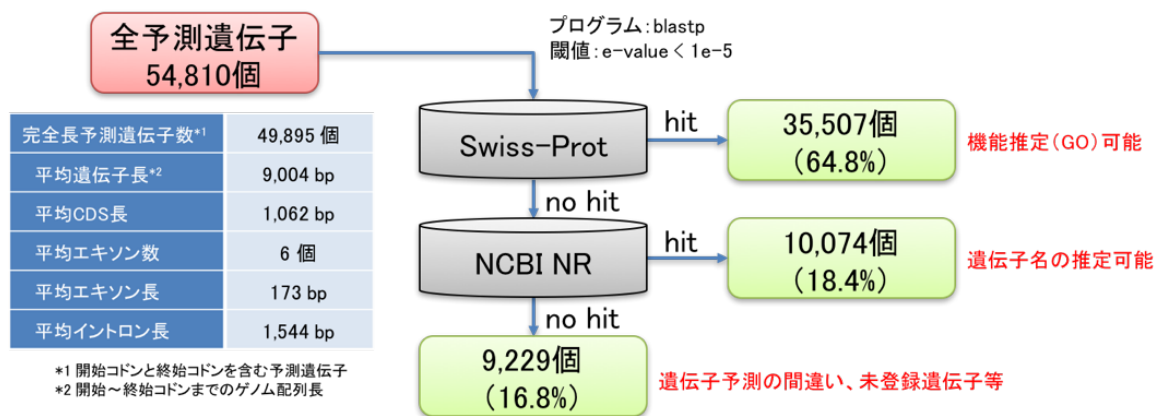


図 (1)-11 遺伝子予測結果の要約

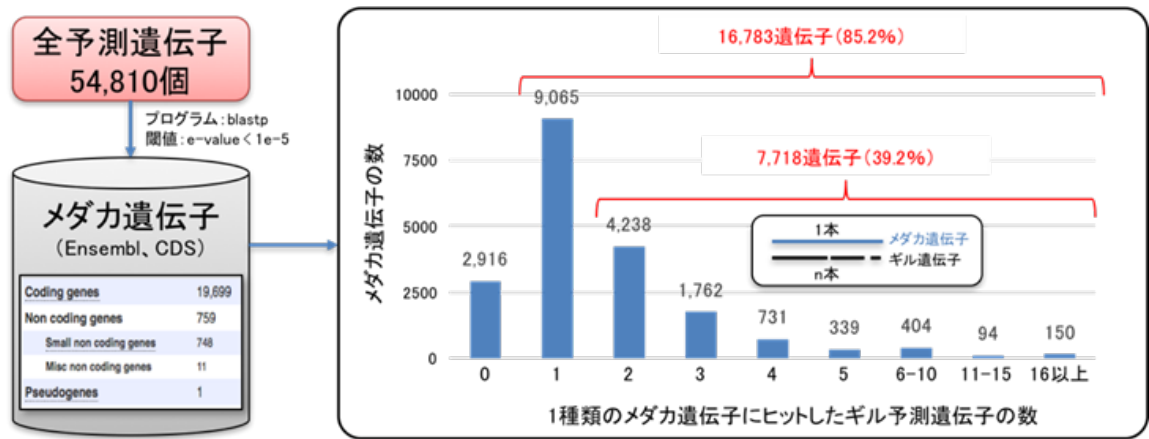


図 (1)-12 メダカ予測遺伝子との比較

v) 雌の成熟に関与する遺伝子のゲノムDNA配列の決定

得られたブルーギルの *foxl2* 遺伝子の cDNA 配列を用いて、同じくブルーギルの全ゲノム DNA 配列に対して相同性検索を行ったところ、その配列を含むスキnhールドが一つ得られた。そのスキnhールド中の当該配列に対して、タンパク翻訳領域 (ORF) の推定を行ったところ、いくつかの候補領域を得ることができた (図 (1)-13)。その中で最大の ORF 領域を持つものは 921bp であり、これを予想 *foxl2* 遺伝子の ORF 領域とした (図 (1)-14) 予想 *foxl2* 遺伝子の ORF 領域には、BamHI、PstI、SmaI の 3つの制限酵素サイトが存在した (図 (1)-15)。この配列を元に演繹したタンパクは、306アミノ酸を持つことが明らかとなった (図 (1)-16)。これらの結果から、ブルーギルの *foxl2* 遺伝子は、イントロンを持たないエクソン一つで構成されるゲ

ノム構造を持つことが明らかになった。

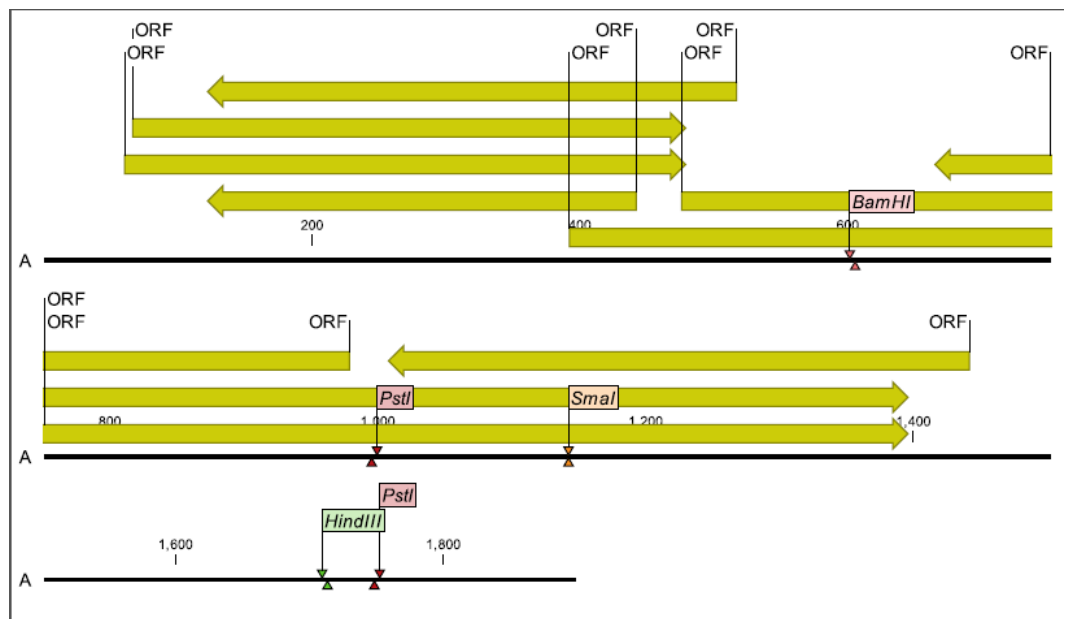


図 (1)-13 ゲノムDNAのスキヤホールドに予想された *foxl2* 遺伝子の複数のORF領域

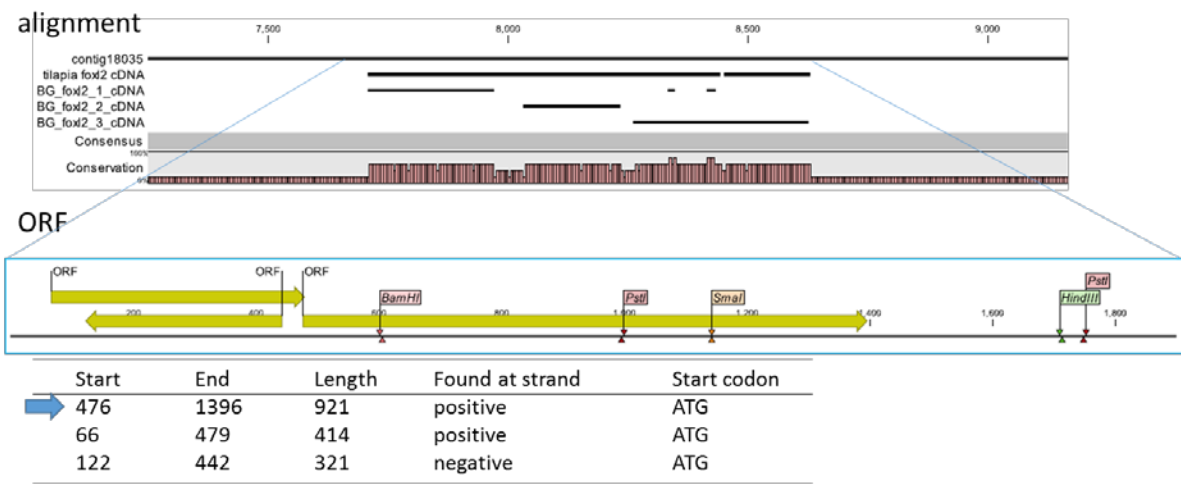
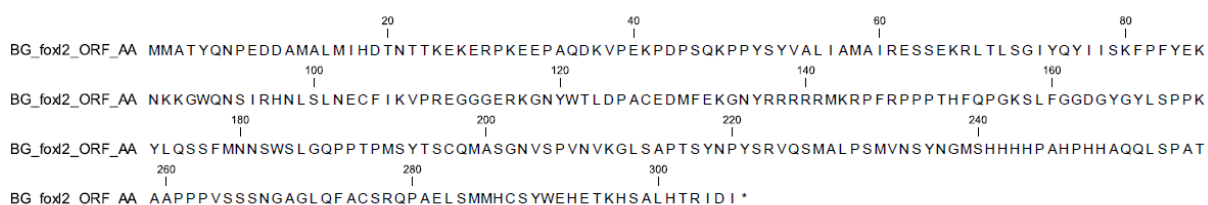


図 (1)-14 予想された *foxl2* 遺伝子の最大ORF領域
矢印：最大領域を持つORFを示す。



図(1)-15 *foxl2*遺伝子の予想ORF領域の塩基配列
 図中に、BamHI、PstI、SmaIの制限酵素サイトを示す。



図(1)-16 演繹されたF0XL2の予想タンパクのアミノ酸配列

項目 ii、iii、iv の試験結果から、雌特異的成熟遺伝子として選定した遺伝子の一つ *foxl2* 遺伝子について、cDNA ならびにゲノムDNAの塩基配列を明らかにし、またその配列を使ってタンパクの予想アミノ酸配列ならびにその遺伝子のゲノム構造を明らかにすることができた。これらの得られた結果によって、*foxl2* に対する人工ヌクレアーゼの標的候補領域の選定ならびに人工ヌクレアーゼRNAの準備、調整をすることができるようになった。

vi) 雌の成熟に関与する新たな遺伝子のゲノムDNA配列の決定

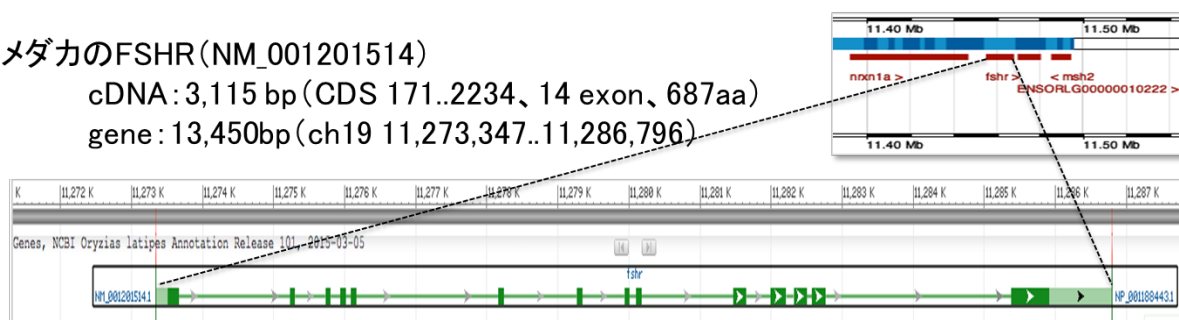
メダカの *fshr* 遺伝子 (NM_001201514) のcDNA配列 (図(1)-17) を用いて、ブルーギルの全

ゲノムDNA配列に対して相同性検索を行ったところ、その配列を含むスキャホールド212 (5Mb) が得られた。そのスキャホールド中の当該配列に対して、遺伝子構造の推定を行ったところ、14エクソンからなる一つの候補領域を得ることができた (図(1)-18) 。その予想FSHRタンパクは、677 (あるいは707) アミノ酸をコードしていた。予想FSHRタンパクをNCBIのblastpで検索をかけたところ、ニベ類と90%以上の相同性が認められた。

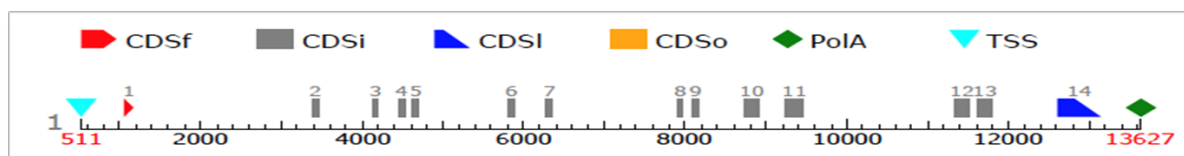
メダカのFSHR(NM_001201514)

cDNA: 3,115 bp (CDS 171..2234, 14 exon, 687aa)

gene: 13,450bp (ch19 11,273,347..11,286,796)



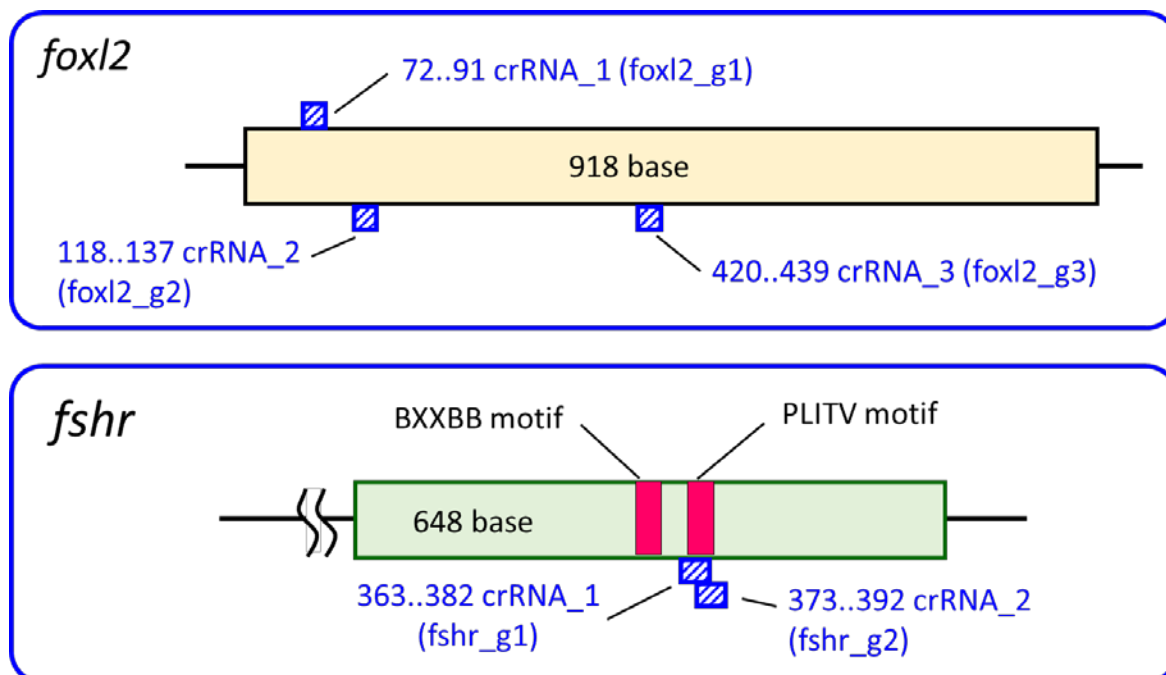
図(1)-17 ゲノムDNAのスキャホールドに予想されたメダカ *fshr* 遺伝子の領域



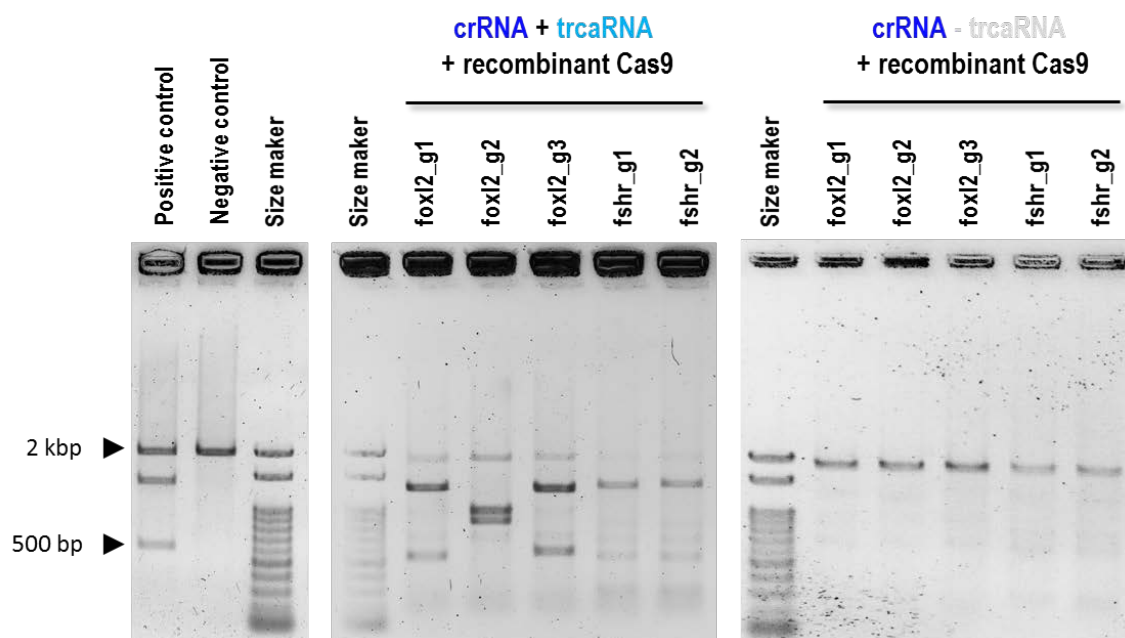
図(1)-18 予想された *fshr* 遺伝子の遺伝子構造 (14個のエクソン)

vii) 標的遺伝子特異的DNA分解酵素の発現ベクターの合成

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集のため、*foxl2*ならびに *fshr* に対しcrRNAの設計を、それぞれ、3箇所および2箇所行った (図(1)-19) 。次に、各crRNA (sgRNAの一部: BG_ *foxl2*_g1-g3, BG_ *fshr*_g1 & g2) の試験管内でのDNAの切断活性を調べたところ、すべてのcrRNAにおいて活性が認められた (図(1)-20) 。



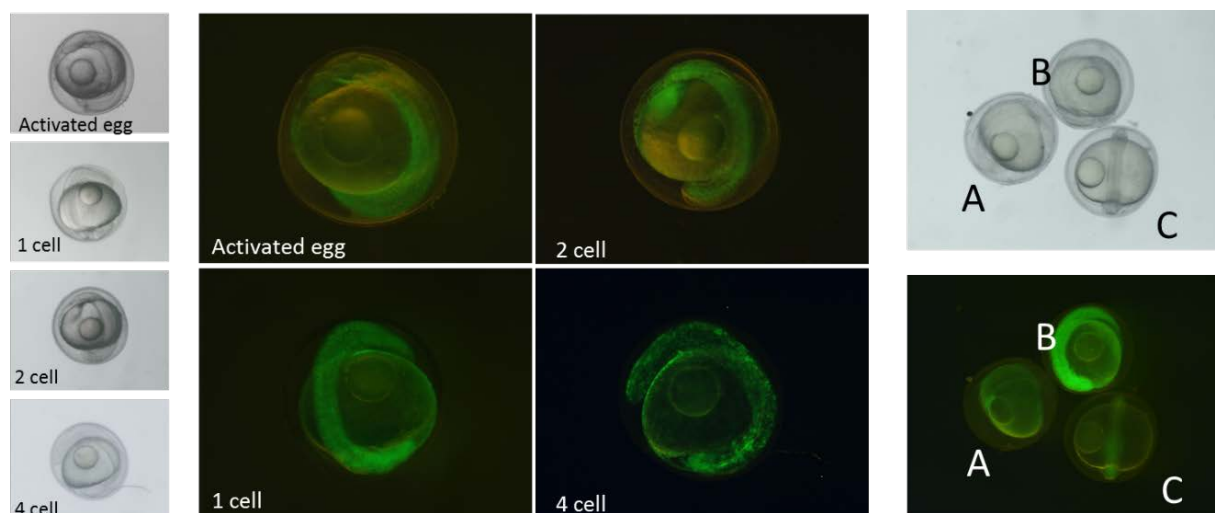
図(1)-19 *foxl2* および *fshr* 遺伝子の各crRNA
(上：*foxl2*上の設計部位、下：*fshr*上の設計部位)



図(1)-20 試験管内における *foxl2* および *fshr* 遺伝子の各crRNAのDNA切断活性
(左：陽性及び陰性対照区、中：各試験区、右：各陰性対照区)

viii) DNA分解酵素による成熟関連遺伝子の破壊

ブルーギル受精卵の顕微注入条件を検討するために、GFP mRNA、授精直後の付活卵、1細胞期（胚盤形成期）、2細胞期、4細胞期でそれぞれの時期に顕微注入を行い（図(1)-21左）、胚体形成期のGFPの発現を観察した（図(1)-21）。その結果、4細胞期に顕微注入した場合は、胚体中でモザイク状に発現していた。また、各個体によって、発現量に差があった（図(1)-21右）。胚軸形成率、GFP発現率等を測定し比較した（表(1)-8）。胚軸形成期に胚軸を形成できたのは2細胞期—4細胞期—付活期（受精直後から胚盤形成期まで）—1細胞期の順であった。このことは、1細胞期（胚盤形成期）が一番顕微注入ストレスに弱いことを示唆している。一方、胚軸を形成した胚体内、GFP発現率が高いのは、1細胞期—4細胞期—2細胞期—付活期の順であった。このことは、細胞を狙って打つ従来法の方が、胚盤を形成する前に特定の注入場所を定めずに打つランダム法より、将来の胚体へのRNAの導入効率が高いことを示している。しかしながら、従来法では、卵一つ一つを狙って打ちやすいように卵の向きを調整しなくてはならないので、非常に手間と時間がかかってしまうが、ランダム法では向きをそろえる必要がないので、処理できる時間はブルーギルで約4倍の効率で打つことができた（およそ1時間に400個/人）。ブルーギルは受精後2日でふ化するため、海産魚のようにふ化後の生残率が低い。そのため、多くの変異個体を育てるには、多くの顕微注入卵の数を確保できるランダム法が優れていると考えられた。



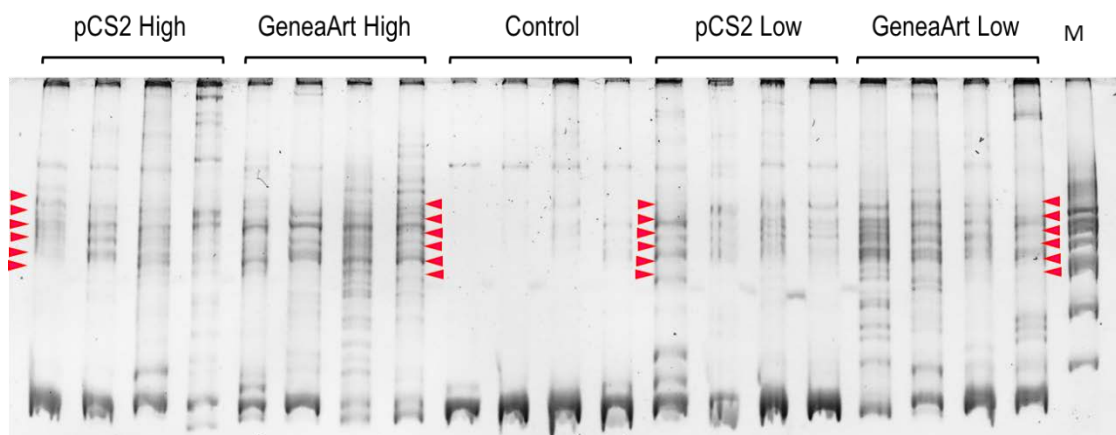
図(1)-21 GFP RNAの顕微注入試験

（左：受精卵の各ステージ、中：各ステージに注入した際の胚体形成期のGFP発現、
右：各個体の発現量の違い）

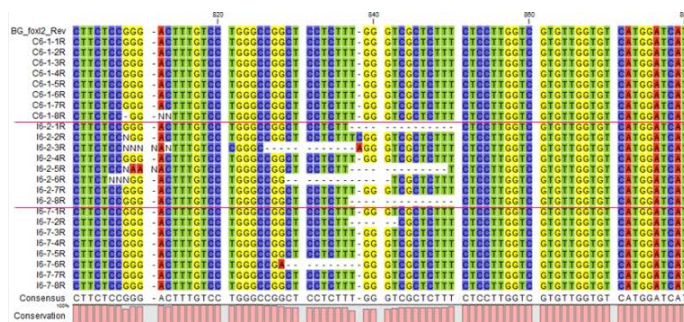
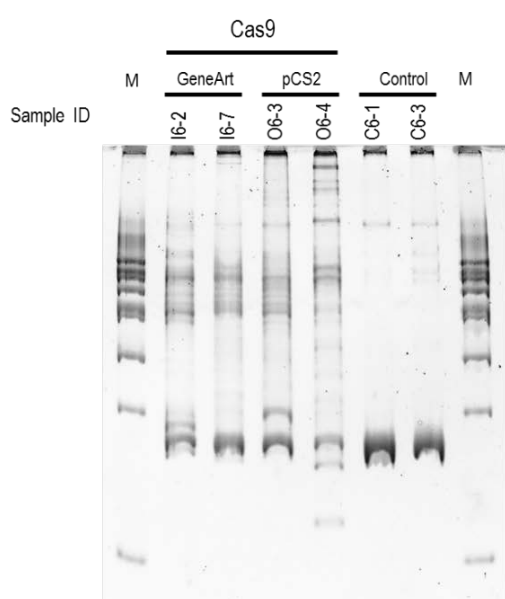
表(1)-8 GFP RNAの顕微注入試験

発生段階	試験 卵数	胚軸 形成数	GFP 発現		死卵 未発生卵数	胚軸 形成率	GFP発現率		死卵 未発生卵率
			+	-			+	-	
Activated egg	40	30	19	11	10	75.0	63.3	36.7	25.0
1 cell	26	16	15	1	10	61.5	93.8	6.3	38.5
2 cell	17	17	14	3	0	100.0	82.4	17.6	0.0
4 cell	9	8	7	1	1	88.9	87.5	12.5	11.1

実際にブルーギル受精卵への顕微注入によって、*foxl2*に対して、CRISPR/Cas9システムにより塩基配列の欠損（遺伝子破壊）を導入できるか検討を行った。具体的には、vi) で試験管内での切断活性の確認ができたBG_foxl2-g1を、ブルーギル受精卵に顕微注入し、HMA（Heteroduplex mobility assay）により、当該遺伝子に変異導入された個体を探索、選抜した（図(1)-22）。その結果、2種のCas9 RNAのどちらでも、ゲノム編集できることが明らかとなった。また低濃度（100ng/ μ l）より、高濃度（200ng/ μ l）の方が、変異を示すバンドがより明瞭に濃く見られた（図(1)-22左）。このことから、高濃度の方が変異導入効率が高いことが示唆されたため、今後の試験では高濃度を使うこととした。HMAにより選んだ変異個体（図(1)-23左）から当該遺伝子の配列の一部を増幅し、そのアンプリコンの塩基配列を解析し、変異の有無とその配列を同定した（図(1)-13右上：白抜きが塩基配列の欠損部）。変異が導入された配列から演繹されるアミノ酸配列を確認したところ（図(1)-23右下）、その半数の長さが70アミノ酸（本来は305アミノ酸）となっていた。また残りのアンプリコンについても、塩基欠損後の配列が大きく異なっているため、その遺伝子機能は破壊されたと考えられた。

図(1)-22 *foxl2* (BG_foxl2-g1) によるゲノム編集試験 (1)

2種のCas9の高濃度（左側）及び低濃度（右側）におけるHeteroduplex mobility assay (HMA)



改変されたFoxL2タンパク中のアミノ酸(赤字)

C6-1-1 NTTKEKERPKKEEPAQDKVPE...305aa

I6-2-1 NTTKEK**RSRPRTKSR**.....72aa

I6-2-3 NTTKEKERPCPGQ.....80aa

I6-2-2 NTTKEKERPDPTTTKEKEEP.....312aa

I6-2-5 NTTKEKE**EPAQDK**.....302aa

I6-2-6 NTTKEKERPAQDKV.....302aa

I6-2-8 NTTKEKRS**RPRTKSR**.....72aa

I6-7-2 NTTKEKER**RGAGPGQSPG**...81aa

I6-7-6 NTTKEKERPSAQDKVPE.....303aa

図(1)-23 *foxl2* (BG_foxl2-g1) によるゲノム編集試験 (2)

(左: HMAにより選んだ変異個体、右上: 塩基配列の欠損部位、右下: 塩基配列の欠損により演繹されたアミノ酸配列)

本試験結果から、遺伝子制圧技術開発に最低限2つ必要な雌特異的成熟遺伝子として *foxl2* および *fshr* を選定し、それぞれのcDNAならびにゲノムDNAの塩基配列を明らかにした。そして、それぞれの配列から試験管内で活性のあるcrRNAを得ることができた。さらに *foxl2* および *fshr* について、実際にブルーギルの受精卵に顕微注入し、遺伝子編集できることを実証した。さらに、GFP RNAを用いて、より生産性の高い顕微注入法を開発し、特許の出願を行うことができた。

ix) 成熟関連遺伝子の破壊個体の作出

CRISPR/Cas9 の系を用いて *foxl2* および *fshr* 単独あるいは、両遺伝子ともに特異的変異を導入した個体F0 (図(1)-24)、並びに *fshr* 単独に変異を導入したF0雄数尾と天然の雌との人工授精により作出したF1個体群を得た。これらF0ならびにF1には、標的遺伝子に対して変異が体細胞(および生殖細胞)モザイクヘテロ、あるいは全細胞完全ヘテロでそれぞれ変異が導入されていると考えられ、将来、遺伝子制圧技術の実証魚として必要となる親魚として利用が期待される。



図(1)-24 *fshr* (BG-*fshr*-g1) によるゲノム編集F0作出群
これらの中から*fshr*変異個体が選抜された

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究で得られたブルーギル初の全ゲノム情報は、これから遺伝子編集技術を開発する上で重要なばかりでなく、完全ではないがその全遺伝情報を網羅しているという点で極めて有益なものである。また生殖や成熟に関わる発現遺伝子の塩基配列データ（cDNA解析）は、これからのブルーギルの繁殖生理学研究に必要かつ最も基本的な分子生物学的情報である。さらに、本研究とは直接関連しないが、ブルーギルとその近縁種、さらにオオクチバス、コクチバスとの間の進化学的研究においても基礎的なデータとなるもので、その意義は大きい。

26年度出願した「生物個体群の根絶方法（特願2015-053498）」について、それまで雌特異的不妊化遺伝子が2つまでであったのを3つまで増やした根絶シミュレーションデータを補強材料として、既出の出願に基づいた優先権を主張して、27年度「生物個体群の縮小方法（特願2016-054558）」の出願を行った。名称の言葉が「根絶」から「縮小」へと変更となったが、その理由は「根絶」という言葉のイメージによる変更措置によるもので、科学的な内容において後退を意味するものではない。内容的にはむしろ、より幅広く深く根絶条件を検討したものとなっており、「外来種の根絶手法」のシミュレーション研究としての科学的意義は大きいものと認められる。

一方、魚類のゲノム編集に用いる魚卵への顕微注入法については、「魚類顕微注入法（特願2016-057619）」として出願を行ったが、本委託事業においてブルーギル卵で、また農水省プロ研でブリ卵について実施データを取得し、両種を用いた科学的な裏付けにより、従来の方法より簡便かつ効率的に顕微注入できることを科学的に明らかにしたことは、生物学的にも大きな意味もつものである。

ブルーギルにおいて精度の高い遺伝子データを得たことは、成熟関連遺伝子の検索に役立つだけでなく、生物多様性、進化などのあらゆる分子生物学の解析を行う際、例えば魚種間での遺伝子の相同性解析など、基本となる重要な情報を提供するものとして科学的価値は非常

に大きい。

2つの雌特異的成熟関連遺伝子を同時に遺伝子破壊できることを実証したことは、ブルーギルにおいて、その受精卵への顕微注入により非常に効率良く遺伝子編集を行う事ができることを示した。

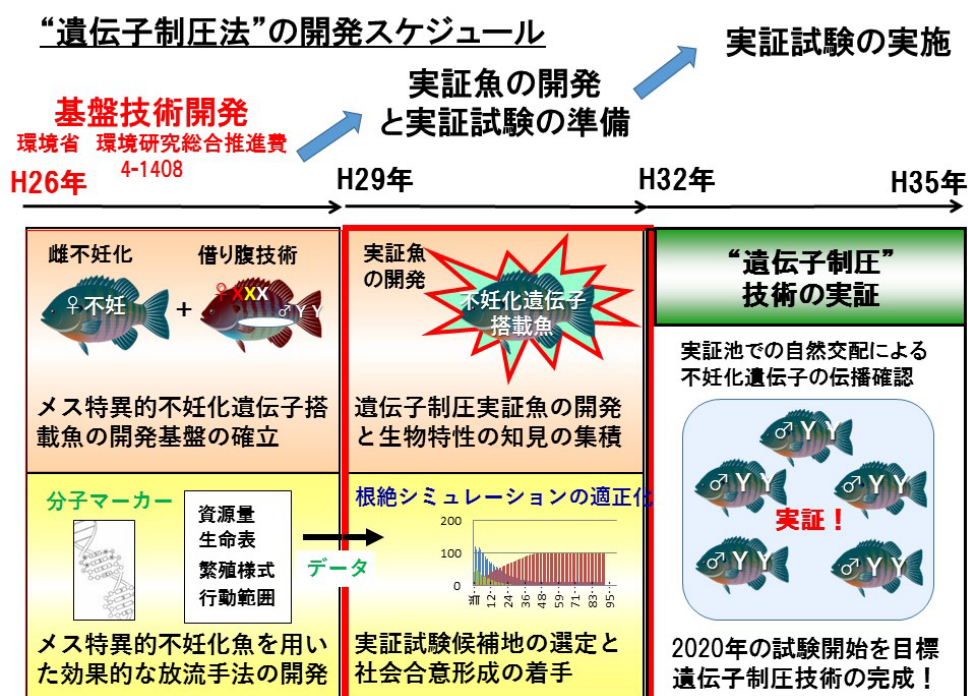
（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省、文科省、農林水産省の関係省庁担当者が参加した水産庁主催の「ゲノム編集技術を用いた水産物に関わる情報交換会」において、本研究成果である遺伝子編集魚を用いた外来魚根絶モデルのシミュレーション結果とゲノム編集技術を使った外来魚根絶技術の開発状況について説明を行い、これからの各省庁におけるゲノム編集魚の取扱制度の議論、意見交換に貢献した（平成28年11月18日）。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

従来の駆除技術のみでは対応が困難であった外来魚問題に対して、将来的に根絶可能な新技術として考案された現在開発中の遺伝子制圧技術の開発に必要な基盤技術が整備された。これにより、次のステップとして実証試験に向けた準備が可能となり、将来の実用化へ向かって研究開発が進むことは（図(1)-25）、愛知目標（COP10）の短期目標および長期目標に対する成果の一つとして貢献できる取組の一つといえる（図(1)-26）。



図(1)-25 遺伝子制圧法の開発スケジュール（計画）

社会・経済への成果の波及貢献

「国連生物多様性の10年」2011-2020

2010年(平成22年)10月に愛知県名古屋市で開催された
生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)で採択



1. 「生物多様性戦略計画2011-2020(愛知目標)」

- 目標9:「侵略的外来種が制御され、根絶される」
- 目標12:「絶滅危惧種の絶滅・減少が防止される」
- 目標7:「農業・養殖業・林業が持続可能に管理される」
- 目標19:「生物多様性に関連する知識・科学技術が改善される」



2. 短期目標(2020年)

「生物多様性の損失を止めるために効果的かつ緊急な行動を実施する」

→ “遺伝子制圧”駆除技術を開発

3. 長期目標(2050年)

「生物多様性が評価され、保全され、回復され、そして賢明に利用され、それによって生態系サービスが保持され、健全な地球が維持され、すべての人々に不可欠な恩恵が与えられる。」

→ 外来魚の根絶を実証、実用化へ

- ・ 生態系の回復、漁業被害の改善→ ラムサール条約湿地など
- ・ 他の外来種への応用

図(1)-26 愛知目標(COP10)への貢献

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Kawamura K, Fujiwara A, Yamada M, Furukawa W, Kurita J and Okamoto H (2017) Development and characterization of 24 polymorphic microsatellite markers for bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Genes & Genomics, 39, 5 (DOI: 10.1007/s13258-017-0531-x) (in press).

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 岡本裕之: FRA NEWS、49, p18 (2016)

「研究成果情報:卵を作る遺伝子の働きを抑えて外来魚を駆除する方法を考案」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 岡本裕之、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、藤原篤志、河村功一(2015) 遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の開発について、第10回外来魚情報交換会講演要旨集p16
- 2) Okamoto H, Kurita J, Nishiki I, Iwasaki Y, Fujiwara A, Yamaguchi T, Oku H, Masaoka T, Ishikawa T and Kawamura K, (2015) Methodology for eradication of invasive alien species. A new method of gene-induced suppression for alien population (GISAP), and the first whole-genome analysis of bluegill (*Lepomis macrochirus*), International Symposium on Genetics in Aquaculture XII, Santiago de Compostela, Spain, 196.
- 3) 岡本裕之、山口寿哉、藤原篤志、奥宏海、正岡哲治、石川卓、河村功一、栗田潤(2015) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－1：遺伝子制圧手法と基盤技術開発、平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集81.
- 4) 石川卓、岩崎裕貴、西木一生、藤原篤志、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之(2015) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－2：ブルーギルの不妊化技術の基盤開発、平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 5) 山口寿哉、栗田潤、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之(2015) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－3：ブルーギルの増殖技術の基盤開発、平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 6) 栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、石川卓、藤原篤志、岡本裕之(2015) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－4：米国湖沼におけるブルーギル個体群モデル上での遺伝子制圧シミュレーション、平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集83.
- 7) 奥宏海、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、栗田潤、岡本裕之(2015) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－5：ゲノム情報を利用したリパーゼ遺伝子族の特性解析、平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 8) 山口寿哉、石川卓、栗田潤、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之(2016) 「ブルーギルの根絶に向けた繁殖技術の開発、第11回外来魚情報交換会講演要旨集22.
- 9) 石川卓、岩崎裕貴、西木一生、藤原篤志、河村功一、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之(2017) 遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶を目的とした遺伝子制圧技術の基盤開発、第12回外来魚情報交換会講演要旨集25. (H29. 1. 28-29)
- 10) 岡本裕之、奥宏海、栗田潤、藤原篤志、石川卓、山口寿哉、正岡哲治、古澤昭人、河村佳正、横山雅仁、河村功一(2017) 遺伝子制圧技術による外来魚の根絶のための実証魚の開発に向けて、第12回外来魚情報交換会講演要旨集26. (H29. 1. 28-29)
- 11) 岩崎裕貴、西木一生、松浦愛子、藤原篤志、山口寿哉、奥宏海、石川卓、正岡哲治、栗田潤、岡本裕之(2017) ブルーギルのドラフトゲノム作成と遺伝子予測、平成29年度日本水産学会春季大会講演要旨集 (H29. 3. 26-30)

(3) 知的財産権

- 1) 岡本裕之、栗田潤、藤原篤志、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治：独立行政法人水産総合研究センター；「生物個体群の根絶法」、特願2015-053498、平成27年3月17日

- 2) 岡本裕之、栗田潤、藤原篤志、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、石川卓：水産総合研究センター；（優先権主張出願）「生物個体群の縮小方法」、特願2016- 054558、平成28年3月17日
- 3) 岡本裕之、石川卓、米加田徹、嶋田幸典：水産総合研究センター；「魚類顕微注入法」、特願2016-057619、平成28年3月22日

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) ボーイスカウト津久見第一団（カブスカウト）へ本研究の紹介とアンケート（平成26年6月29日、水産総合研究センター上浦庁舎、観客およびアンケート実施11名（うち小学生6人））
- 2) 玉城庁舎一般公開で本研究の紹介とアンケート（平成26年7月26日、水産総合研究センター玉城庁舎、観客約500名、アンケート実施32名）
- 3) 三重県南勢庁舎一般公開、本研究の紹介とアンケート（平成27年7月25日、水産総合研究センター南勢庁舎、観客約280名、アンケート実施30名）
- 4) 出前授業：岡本裕之：平成27年度大分県内水面漁業協同組合連合会事務担当者研修会における出前授業「遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の研究紹介」（平成28年2月26日、大分県立社会教育総合センター、聴講者26名）
- 5) 平成28年度多気町教育研究会研修会：岡本裕之、外来種問題と本研究の紹介（平成28年7月26日、水産研究・教育機構増養殖研究所玉城庁舎、参加者16名）
- 6) 三重県玉城庁舎一般公開：岡本裕之、外来種問題と本研究の紹介（平成28年7月30日、水産研究・教育機構増養殖研究所玉城庁舎、参加者416名）
- 7) 平成28年度玉城町教育振興会研修会：岡本裕之、外来種問題と本研究の紹介（平成28年8月23日、水産研究・教育機構増養殖研究所玉城庁舎、参加者20名）

（５）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（28年12月3日、関西版、夕刊第1面）
- 2) 朝日新聞WEBニュース（28年12月3日、インターネット、上記記事）
- 3) Yahoo Japan ニュース（28年12月4日、インターネット、上記、WEB記事紹介）
- 4) 産経新聞（29年2月15日、全国版、コラム「ゲノム編集でブルーギルを根絶へー遺伝子制圧法-」）

（６）その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Knipling EF (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. J. Econ. Entomol. (48), 459–462.
- 2) Gutierrez JB and Teem JL (2006) A model describing the effect of sex-reversed YY fish in an established wild population: The use of a Trojan Y chromosome to cause extinction of an introduced exotic species. J Theor Biol. Jul 21, 241(2), 333-41. Epub 2006 Jan 9.

- 3) Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T and Kitano T (2014) Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka. *Endocrinology*, Aug, 155(8), 3136-45. doi:10.1210/en.2013-2060. Epub 2014 May 30.
- 4) Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T and Itoh T (2014) Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.* Aug;24(8), 1384-95. doi: 10.1101/gr.170720.113.
- 5) Mario S and Stephan W (2003) Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics*. 19 (suppl_2), ii215-ii225. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg1080>.
- 6) Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I and Vorobyev D (2006) Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol.* 7 Suppl 1, S10.1-12. Epub 2006 Aug 7.

（２）不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発

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	育種基盤グループ	山口 寿哉
増養殖研究所	養殖システム研究センター	飼餌料グループ	奥 宏海
増養殖研究所	育種研究センター	ゲノム育種グループ	正岡 哲治

平成26～28年度累計予算額：29,285千円（うち平成28年度：8,140千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

メス特異的不妊化遺伝子搭載魚はメスが不妊なため、その増殖には借り腹技術等の繁殖関連技術が必要となる。本課題ではブルーギルにおける繁殖関連技術の実施条件を検討した。i)人工授精については、25℃で飼育したオスの腹部を圧迫することで人工授精可能な精子を得た。またメスの腹腔内にhCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）500単位を1回注射もしくは200単位を1日おきに2回腹腔内に注射することで、人工授精可能な卵が得られることが明らかとなった。ii)精子凍結については、凍結防除剤にメタノールを用いて1分あたりマイナス25℃の速度で冷却すると、精子の運動性を維持した状態で液体窒素中で凍結保存できることが明らかとなった。iii)遺伝的メスからオスへの性転換については、メチルテストステロンの経口投与によりオスの出現率が上昇し、さらにファドロゾールの投与（100 μ g/g diet）により100%オスになる条件が明らかになった。遺伝的オスからメスへの性転換については、エストロゲンを投与することで100%メスになる条件（100 μ g/g diet）が明らかになった。iv)借り腹宿主になりうる可能性が想定される異質三倍体の作出については、ブルーギル（BG）、近縁種であるパンプキンシード（*Lepomis gibbosus*）（PS）及びロングイヤースンフィッシュ（*Lepomis megalotis*）（LE）の3種間の交配試験により、LEのオスとBGのメスあるいはPSのメスとの間で雑種作出が可能であることが明らかとなった。BG三倍体については、受精卵を水温7℃、20分間処理することでほぼ完全に三倍体化できる事が明らかになった。一方、水温35℃、15～20分間処理では、三倍体化率は約50～60%の割合と比較的低率であった。v)生殖細胞の移植については、オス成魚の精原細胞を蛍光色素で標識し、孵化後6～10日齢の仔魚の腹腔に移植したところ、腹腔内で移植細胞を確認できた。さらに精原細胞由来の遺伝子発現を調べたところ、本来孵化仔魚で発現しない遺伝子の発現が確認されたことから、成魚由来の移植細胞の存在が強く示唆された。

これらの結果、メス特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルの増殖に必要な繁殖関連技術の基盤が開発された。今後、サブテーマ①で開発したメス特異的不妊化遺伝子を搭載した個体を用いて、実際に増殖技術の実証試験を実施する中で、より詳細な条件検討が必要と考えられる。

[キーワード]

人工授精、精子凍結、性転換、三倍体、近縁種間雑種、異質三倍体、生殖細胞移植

1. はじめに

メス不妊化遺伝子はメスが不妊であるために通常の交配による増殖が困難であることから様々な魚類において開発されてきた増殖技術を駆使する必要性が見込まれた。魚類の増殖技術は次世代を作出することが可能であることがほとんどの増殖技術を利用するための重要な要素であることから、精子や卵の配偶子を得るために飼育水温や日長といった環境条件の調査が行われ配偶子形成の促進条件の検討が行われてきた。しかしながら、それだけでは最終的な配偶子の成熟を促すことができない場合もあることから、排卵、排精を促すホルモン投与も行われるようになった。ブルーギルにおいても、水産総合研究センター（現 水産研究・教育機構）中央水産研究所内水面研究部が行った平成22年度外来魚抑制管理技術開発事業報告書のブルーギルの繁殖条件の解明と人為性転換魚の放流による駆除技術の開発¹⁾において、冬期でも夏期の日長を考慮した長日操作（14.5L）によりメスの成熟度合いが増すことが報告され、冬期でも水槽内で自然交配が可能ながことが報告されている。本研究課題においては、受精直後の受精卵が必要となることから人工授精が必要となるために長日操作や温度操作以外の操作として催熟ホルモンであるhCG（ヒト絨毛性ゴナトロピン）の投与により人為催熟を試みた。これのによりブルーギルにおいても人工授精により受精直後の卵を得ることが可能になったことから、様々な増殖技術がブルーギルにおいても実施可能となった。

精子凍結については、魚類も含めて様々な動物において遺伝情報の保存手法として利用されている。精子の凍結には凍結による精子へのダメージを軽減するために凍結防御剤が必須とされる。凍結防御剤にはメタノール、DMSO（ジメチルスルホキシド）やグリセリンなどをFBS（ウシ胎児血清）などの血清を用いて希釈して使用する手法が魚類では一般的と思われる。ブルーギルにおいても、この基本的な材料を用いて凍結防御剤の選定と凍結速度について調べた。

性ステロイドホルモンによる性転換について、魚類におけるオスの生殖腺形成に作用するホルモンは主にアンドロゲンの一つである11-KT（ケトテストステロン）とされている一方、メスではエストロゲンの一つであるエストラジオール-17 β が主なメス生殖腺形成ホルモンとされている。その為に同様の作用を持つアンドロゲンの17 α -メチルテストステロン（メチルテストステロン：MT）を投与することでオス化を誘導可能なことが知られている。メスにおいては、エストラジオール（E2）を投与することでメス化を誘導可能とされている。ブルーギルにおいても、メチルテストステロンを経口投与した試験が報告²⁾されているが、メス化を完全に抑制されてはいなかった。また、魚類生体内ではアロマターゼという酵素によりエストラジオール17 β が生成されるが、そのアロマターゼの働きを阻害することでエストラジオール17 β が生成されなくなり、オス化を誘導させることがヒラメ³⁾などの魚類で報告されている。ブルーギルにおいても同様の試験が報告⁴⁾されているが、オスへの性転換効率は高くなかった。メスへの性転換については、Wangらによりエストラジオールを経口投与することにより試験群が100%メスになることが報告⁵⁾されている。本研究においては、より高いオスへの性転換効率を目指し、メチルテストステロンとアロマターゼインヒビターの一つであるファドロゾールを用いたオス性転換試験を行った。メスへの性転換については、Wangらの報告の確認と国内のブルーギルを使用した場合も同様の高い性転換効率が得られるかどうかの確認を行った。

三倍体作出については、水産増養殖への応用が期待され、様々な手法を用いた染色体操作技術が魚類において進歩してきた。精子や卵の遺伝子を紫外線やガンマ線で破壊する手法や受精直後

の卵への物理的な刺激などによる染色体数のセット数の増減を人為操作する技術⁶⁾により魚類の三倍体が作出されてきた。これらの倍数体作出技術の知見を利用することで、ブルーギルにおいても三倍体の作出をこころみた。

生殖細胞の移植については、海洋大学の吉崎悟朗教授の研究室により三倍体化による不妊化したヤマメにニジマスの精原細胞を移植することでヤマメにニジマスの卵を作らせることが可能ながことが報告されている⁶⁾。精巣の中で精原細胞は精子のもととなる生殖細胞の初期の段階の細胞であり、さらにその中の一部には幹細胞様の細胞が含まれるとされている⁸⁾。幹細胞とは分裂して自分と同じ細胞を作る自己複製能を持ち、別の種類の細胞に分化する能力を持ちながら際限なく増殖する細胞と定義されている。その為、オスの精巣からメスの生殖腺へと移植した場合はメスの生殖細胞の幹細胞となり、増殖と自己複製を繰り返すことで卵のもとになる卵原細胞へと分化して最終的には卵が作られると予想される。その為、ブルーギルにおいてもオスの生殖幹細胞を含む精原細胞をメスの生殖腺に移植することで別個体オス由来の卵が作られると予想された。この手法を利用してメス特異的不妊化遺伝子を持つ卵の作出が可能になると予想される。

これらの増殖技術を利用することで、メス特異的不妊化遺伝子を持つ個体の増産、増殖が可能になることから、本研究においてはそれらの手法の開発を試みた。

2. 研究開発目的

ブルーギルにおいて遺伝子制圧技術の実施するためには、不妊化遺伝子搭載魚の効率的な増殖技術の開発が必要であるが、その基盤技術となる5つの手法の条件を検討した。

i) 人工授精

本研究課題で開発する技術のほとんどは人工授精により得られた卵や受精卵を利用することを前提とした手法となっている。例えば、ブルーギルの染色体操作を行うためには受精後10分以内の受精卵を高温や低温で処理する必要がある。また、三倍体作出のための雑種交配についても、近縁間雑種を自然交配により得ることは難しいため、人工授精による交配が必要になる。このように、人工授精は増殖技術の基礎的な手法となるために、遺伝子編集ブルーギルの増殖が必要となる本研究課題においても人工受精可能な精子や卵の採取などの条件の検討を行い、人工授精手法の開発を目的とした。

ii) 精子凍結

精子凍結技術を用いることで、比較的低コストでメス特異的不妊化遺伝子搭載魚の遺伝情報の維持・保存が可能となり、さらに、人工授精を行う場合も、その都度、オスから精子を採取する必要がなくなるという利点を得られる。メス特異的不妊化遺伝子を搭載したブルーギルの遺伝情報の保存について、メス特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルを通常のメスと交配させるか、もしくはメス特異的不妊化遺伝子をヘテロに持つ個体を掛け合わせ、さらに、ヒレなどからDNAを抽出して遺伝情報の確認をPCRなどの解析に遺伝子情報の確認を行うことで遺伝子情報を維持・保存可能だと推測される。しかしながら、この方法では不妊化遺伝子搭載ブルーギルの飼育や遺伝情報の解析のための費用、さらに、飼育スペースなどの施設にかかわる費用が必要となる。

そこで、不要なコストを削減するための技術として、精子凍結による遺伝子情報の保存技術の条件検討を試みた。精子凍結は哺乳類や他の魚類において、遺伝情報の保存手法として既に広く利用されている。ブルーギルにおいて、精子凍結の条件の検討が必要な要素としては凍結保護液の選択及び、凍結させる温度にかかわる要素が主な検討対象となる。

iii)性ステロイドホルモンなどの投与による性転換

ブルーギルはメス（XX）／オス（XY）の性決定様式を持つと推測されている。これらの性は遺伝的に決定されているが、性ステロイドホルモンを投与することで、遺伝的性から別の性へと人為的に性転換させることが可能である。性ステロイドホルモンによる性転換は比較的容易で低コストで性転換魚を作出可能な技術であることから、ブルーギルも含めた様々な魚種について性ステロイドホルモンによる性転換魚の作出が試みられている。このことは性ステロイドホルモンによる性転換に関する基礎的な知見が多く、この性転換手法は比較的利用しやすい技術と言える。

メス特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルによるブルーギルの根絶を目的とする本研究課題においては、遺伝的オスからメスへの性転換と遺伝的メスからオスへの性転換のメス化とオス化の両方の性転換手法が必要になると考えられた。ブルーギルの遺伝的オスをメス化させる性転換魚が必要になる理由として、YY超オスの作出が挙げられる。メス特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルの放流シミュレーションによると、YYの超オスにメス特異的不妊化遺伝子を搭載して放流することにより自然集団へのメス特異的不妊化遺伝子の拡散効率がより高まる可能性が示唆されている。そのため、遺伝的にはオスになる予定のXYブルーギルをメスへと性転換させ、XY（オス）とXY（性転換メス）を掛け合わせることでYY個体が作出可能になると考えられる。また、オスへの性転換手法が必要な理由として、メス特異的不妊化遺伝子を搭載した生殖細胞の移植先としてXXXの三倍体メスが必要になることが挙げられる。XXXの三倍体メスを作出する手法として、近縁種間雑種化による異質三倍体化が作出手法の一つとして挙げられ、この場合について、卵は基本的にはXXの二つ一对の染色体を持ち、どちらか片方が受精後に放出され、精子のXもしくはY染色体と接合することで一对の染色体となる。しかしながら、近縁種間雑種による異質三倍体は卵由来のX染色体が二つとも精子由来のXもしくはY染色体と接合することでXXXもしくはXXYの組み合わせで三倍体が作出される。本研究において必要なのはXXXの染色体の組み合わせを持つ個体であるが、このままでは通常のXYオス精子を利用した交配では2分の1の確率でXXXメスが出現することになり、XXXかXXYかの判別を行わなければならないために効率が悪くなる。このことを解決するために、性ステロイドホルモンによる性転換により作出したXXオスを用いることで解決できると予想された。環境などの外的要因による性転換が頻繁に起こる種も存在するが、卵の染色体の組み合わせは基本的にはXXの染色体を持つ。このXXの卵は近縁種精子と受精することで異質三倍体となる可能性があるが、精子を作るオス親魚となる近縁種オスを遺伝的なメスからオスへと性転換させることでXXのオスを作り出し、Xの染色体を持つ精子のみを作り出すことが可能になると予想された。このX染色体を持つ精子のみを作り出す親魚を性ステロイドホルモンなどによる性転換により作り出すことで、コスト削減と時間短縮に繋がると予想された。

iv) 近縁種間雑種作出もしくは染色体操作による三倍体作出

1組のゲノムが持つ染色体数が2の倍数である生物は二倍体とされ、二倍体の生物の染色体数を人為的な操作により染色体数を操作することで二倍体から三倍体を作出することが可能とされている。三倍体は配偶子（精子・卵）の形成がうまくいかずに不妊あるいは部分不妊になるとされ、細胞や様々な器官が大きくなることが一般的な傾向として知られている。この現象を利用した養殖魚への応用として、ニジマスやヤマメなどのサケ科魚類で既に応用されている。不妊であり、なおかつ三倍体個体は二倍体個体よりも大きくなることから国内の各県においても様々な三倍体品種が作出されている。このように、三倍体作出技術は養殖業への応用もされている一般的な技術であり、不妊という特性を利用して借り腹移植実験のような研究材料としても利用されている。本研究課題においても、三倍体はメス特異的な不妊化遺伝子を搭載した生殖細胞を移植するレシピエント（宿主）としての利用を目的としてブルーギルにおける三倍体作出手法の開発を行った。

本研究においての三倍体が必要になる理由としては、メス特異的な不妊化遺伝子を持つブルーギルをサブテーマ①で作出した場合、メス特異的に不妊であるためにオスは精子を作るがメスは不妊となり受精可能な卵を作ることはできないと予想される。しかしながら、借り腹移植を利用することで、三倍体にメス特異的な不妊化遺伝子を持った生殖細胞を移植することで、メス特異的な不妊化遺伝子を持った卵が作出可能であると予想された。このため、本研究課題においても三倍体が必要となる。三倍体を作出する手法としては、近縁種間雑種交配により異質三倍体を作出する手法、もしくは、ブルーギルの受精卵に温度などのストレスを与えることで、受精直後に放出される予定の第一極体の放出を阻止する手法がある。先ず近縁種間雑種を利用する手法を検討する理由については、ブルーギル、ブルーギルの近縁種であるパンブキンシード (*Lepomis gibbosus*) 及び、ロングイヤーサンフィッシュ (*Lepomis megalotis*) の3種を交配させることで近縁種間雑種が得られ、さらに、異質三倍体であることが確認できた場合、近縁種を交配させるだけで三倍体入手することが可能になる。このことは、後述する染色体操作に三倍体作出よりも人為処理を行わないために孵化仔魚を多く得られる可能性もあり、なお且つ、仔魚の生残や成長などへの影響が少ない可能性が考えられる。一方、染色体操作による三倍体作出については、通常の飼育温度よりも低温もしくは高温で受精卵をある一定時間処理することで、第一極体の放出が阻止され、二倍体となるはずの受精卵が得られる。この染色体操作による三倍体作出は近縁種間雑種により得られる異質三倍体作出よりも、ブルーギルの受精卵を処理するだけで三倍体得られることから、簡易でさらに確実に三倍体を得ることができる。しかしながら、高いストレスにさらされた受精卵の生残が低くなる傾向があり、処理により得られた受精卵や孵化仔魚の全てが三倍体化しているとは限らないということが予想された。このように、三倍体を得る手法として近縁種間雑種による異質三倍体化及び、染色体操作による三倍体作出の二つの手法について、本研究課題ではブルーギルにおいて雑種の作出と染色体操作の条件検討を行い、今後のメス特異的な不妊化遺伝子搭載ブルーギルの安定した生産体制が必要になった場合にどちらの手法が適しているかを検討するための基礎的な手法を整備する。これにより最終的な生産時の生産コストの低減や時間短縮に役立つと考えられる。

v) 生殖細胞の他個体への移植

移植については、上述した各手法を用いて作出された三倍体にメスト異的不妊化遺伝子を搭載しさらに、その遺伝子搭載魚を性転換手法により得られたYYオスの精原細胞を移植することでメスト異的不妊化遺伝子を搭載している卵を作出可能になると予想された。この精原細胞を他個体に移植することでドナー由来の卵や精子を作らせる手法については、すでに、海洋大学の吉崎悟朗教授の研究室により三倍体化による不妊化したヤマメにニジマスの精原細胞を移植することでヤマメにニジマスの卵を作らせることが可能なことが報告されている（Okutsu et al., 2007）。このように、実験的には異種間においてもドナー由来の生殖細胞から卵や精子を作らせることは可能とされている。

本研究においては、同種間の生殖細胞の移植であることから異種間の移植と比較して容易であり、ブルーギルにおいても生殖細胞の移植は可能であると推測された。このことから生殖細胞の移植や三倍体化手法や性転換手法を組み合わせることで得られるメスト異的不妊化遺伝子を搭載した卵を産む親魚の作出は最終的にメスト異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルの増産に必要となるために本研究においては生殖細胞（精原細胞）の移植手法の開発が必要とされた。

3. 研究開発方法

i) 人工授精

ブルーギルの精子と卵を入手し、人工授精により受精卵を得ることが試験遂行に必須であることから、ブルーギル精子と卵の入手及び人工授精法の確立を試みた。精子及び卵は繁殖時期（5～7月頃）の湖沼から入手したブルーギルもしくは、繁殖水温（25℃）で飼育したブルーギルから採取した。採卵については、一般的に魚類の採卵に用いられているヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG: Human chorionic gonadotropin）を用いた。hCG投与後は24、48時間後に腹部を圧迫し採卵を行った。得られた卵は実体顕微鏡による観察と人工授精を乾導法で行った。

ii) 精子凍結

ブルーギル精子の凍結技術開発を行うことで、サブテーマ①で作出された雌特異的不妊化ブルーギルの遺伝情報を長期間保管することが可能になる。また、凍結して保管された精子を用いることで、飼育スペースの節約、人工授精の簡易化等の遺伝子編集魚生産の低コスト化という利点が得られると考えられる。このような理由によりブルーギル精子凍結手法の開発を試みた。まずは、一般的に用いられる凍結防御剤であるメタノールとジメチルスルホキシドについての検討を行った。ウシ胎児血清を用いて希釈したブルーギル精液を凍結防御剤と混ぜて液体窒素で凍結させた。凍結はデュワー瓶の中に液体窒素を入れ、液体窒素の液面に発泡スチロールを浮かべ、その上に精液を含む凍結剤を注入した凍結用のストローを載せて凍結速度を調節して凍結を行った。凍結した精子の運動性は解凍後に光学顕微鏡下で調べた。

iii) 性ステロイドホルモン投与による性転換

雌特異的不妊化ブルーギルを安定して生産する為には性ステロイドホルモンを用いた性転換魚の作出手法が必要になる。そこで、性ステロイドホルモンや性ステロイドホルモンの拮抗阻害剤を用いたブルーギル仔魚の性転換誘導試験を行った。今年度の性転換試験には雄の性ステロイド

ホルモンで雄化を誘導することが知られているメチルテストステロン (Methyltestosterone) と雌の性ステロイドの拮抗阻害剤であり雌化を抑制して雄化を誘導するファドロゾール (Fadrozole) を用いた。これらの性転換試薬はエタノールに溶解させて人工配合飼料 (ヒカリクレストキャット、キョーリン) の粉末に染み込ませ、乾燥させた後に性転換誘導飼料として経口投与した。性転換試験はブルーギル仔魚が人工飼料を安定して食べ始める孵化後30日から性転換誘導飼料の投与を開始した。性転換率については、生殖腺の形態が雄型 (精巣) か雌型 (卵巣) に分化する時期まで性転換誘導飼料を継続投与し、生殖腺の雌雄の比率を調べることで性転換率とすることとした。性転換誘導飼料投与を継続し、孵化後100日齢において生殖腺が卵巣、精巣へ分化しているかどうかを調べる為に一部の稚魚をブアン固定した後にパラフィン切片を作成してヘマトキシリン・エオシン染色により生殖腺の状況を調べた。

iv) 近縁種間雑種交配もしくは染色体操作による三倍体作出

サブテーマ①において作出予定の雌特異的不妊化ブルーギルの雄は精子を正常に作るが雌は不妊になる為に受精可能な卵を作ることができないと推測される。その為、通常の交配では雌特異的不妊化ブルーギルを安定して生産することができない。雌特異的不妊化ブルーギルを安定して生産する為には、三倍体ブルーギルへの生殖細胞の移植と性ステロイドホルモンによる性転換といった繁殖技術を駆使した親魚を作出する必要がある。そこで、染色体操作によるブルーギル三倍体作出手法の確立を試みた。

まずは低温処理を開始する適切な時期を決める為に受精卵の組織標本を作製し、受精卵の時間経過による染色体の動態を調べた。人工授精した通常 (2倍体) の卵を受精後0、1、5、10、30、60分毎にブアン固定を行った。固定した受精卵をパラフィン包埋し、ミクロトームを用いてパラフィン切片を作製した。スライドグラスに伸展した切片はヘマトキシリン・エオシン染色を行い、光学顕微鏡下で染色体を観察した。

次に、低温処理の温度条件、低温処理開始時期、及び低温処理の継続時間についての検討を行った。低温処理は氷を用いて水温を下げた水槽を用いた。付着する性質を持つブルーギル受精卵はプラスチックシャーレに付着させ、受精卵をシャーレごと低温に調節した水槽に沈めることで低温処理を行った。倍数性の確認方法については、生き残った受精卵を孵化まで飼育し、孵化仔魚1個体を1検体としてDNAをCystain[®] DNA 2step (Symex) を用いて染色し、プロイディアナライザー (cyFlow SL, PARTEC) を用いて孵化仔魚の倍数性を調べた。低温処理を行わない試験区を二倍体のコントロール区とした。

三倍体作出手法としては染色体操作法の他に、近縁種間雑種による非還元型卵 (XX) と性転換雄の精子 (X) を交配させる手法が考えられる。この近縁種間雑種を用いた三倍体作出手法は雑種親魚を交配させるだけで三倍体魚を得られる可能性があることから、雑種親魚の作出手法が確立されると染色体操作による三倍体作出よりも低コストでの雌特異的不妊化魚の生産が可能になると考えられる。そこで、ブルーギル近縁種のパンブキンシード (PS) (*Lepomis gibbosus*)、ロングイヤースンフィッシュ (LE) (*Lepomis megalotis*) とブルーギルを用いて近縁種間交配試験を行った。これらのブルーギル近縁種は滋賀県立琵琶湖博物館様から提供していただいた。近縁種の採卵はブルーギルと同様にhCGを用いて採卵を行った。精子の採取についてはhCGの注射は必要なかった。得られた孵化仔魚は観察を行い、生き残った個体については飼育を継続した。卵黄

吸収後に浮上した仔魚には淡水ワムシ、ホウネンエビの幼生、アルテミア幼生をエサとして飼育を行った。

v) 生殖細胞の他個体への移植

不妊化三倍体ヘメス特異的不妊化遺伝子を搭載したオスの精原細胞の移植によりメスでも不妊化遺伝子を持つ卵を作ることができると予想されたため、精原細胞の移植手法の条件検討を行った。当歳魚の未熟な生殖腺は精原細胞を多く含むため、まずは生殖腺を摘出し、コラゲナーゼとディスパーゼを用いて生殖腺細胞を分離した。分離した細胞はL15培地を添加し、遠心により収集した。収集した細胞はPKH26 (シグマアルドリッチ) を用いて説明書に従って細胞の染色を行った。ホストとなる孵化仔魚については、人工授精により得られた6～10日齢の仔魚を用いた。移植操作については、実体顕微鏡下において、マイクロインジェクション機器 (ナリシゲ) を用いて孵化仔魚の背骨から腹腔にかけての部分に顕微注入した。

移植を行ったふ化仔魚に精巣由来の生殖細胞や体細胞が含まれているかどうかを確認するために、ふ化仔魚では発現していないドナー (精巣) 由来のmRNAの発現の有無をRT-PCR法を用いて調べた。ドナー由来の遺伝子については、生殖腺形成に関わるいくつかの遺伝子について、ゲノムデータベースより配列を検索し、雌雄の生殖腺においてRT-PCRにより発現を調べた。また、孵化仔魚時期には発現せずに精巣における精子形成の一時期にのみ発現する減数分裂マーカーのSycp3 (synaptonemal complex 3) 遺伝子については、生殖細胞において発現していることを確認するために免疫組織化学染色を行うことで、生殖細胞に発現していることを確認した。

サンプルについては、移植した翌日の生存している孵化仔魚の頭部と尾部を剃刀で切り離し、腹部の部分のサンプルとしてRNAの抽出を行った。比較対象として、移植を行っていない孵化仔魚から同様に切り分け、RNAを抽出した。また、移植前の分離した生殖腺細胞からもRNAを抽出してRT-PCRのサンプルとした。

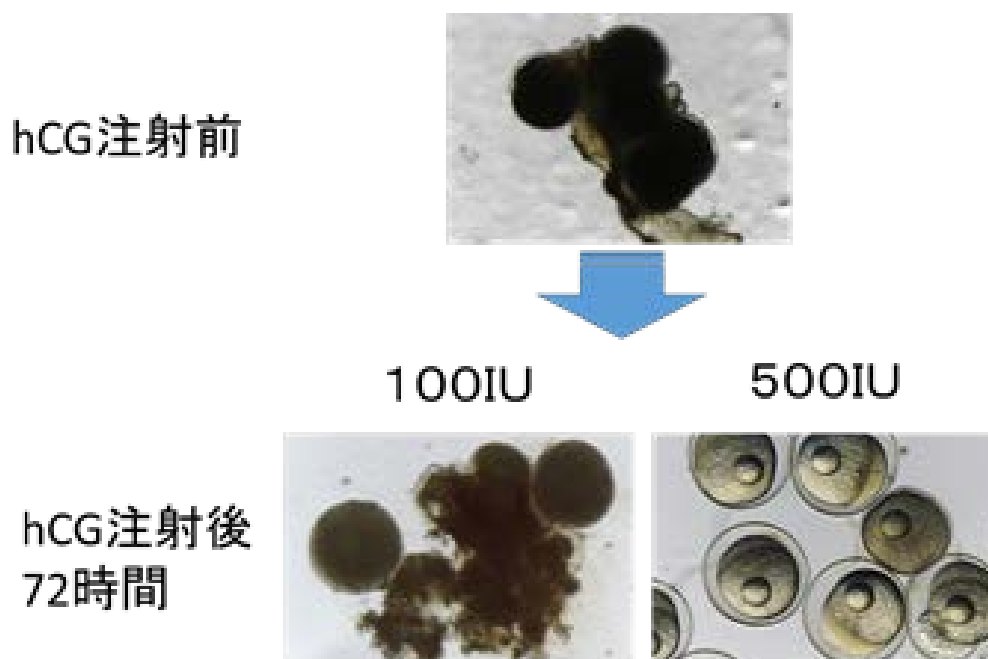
4. 結果及び考察

i) 人工授精

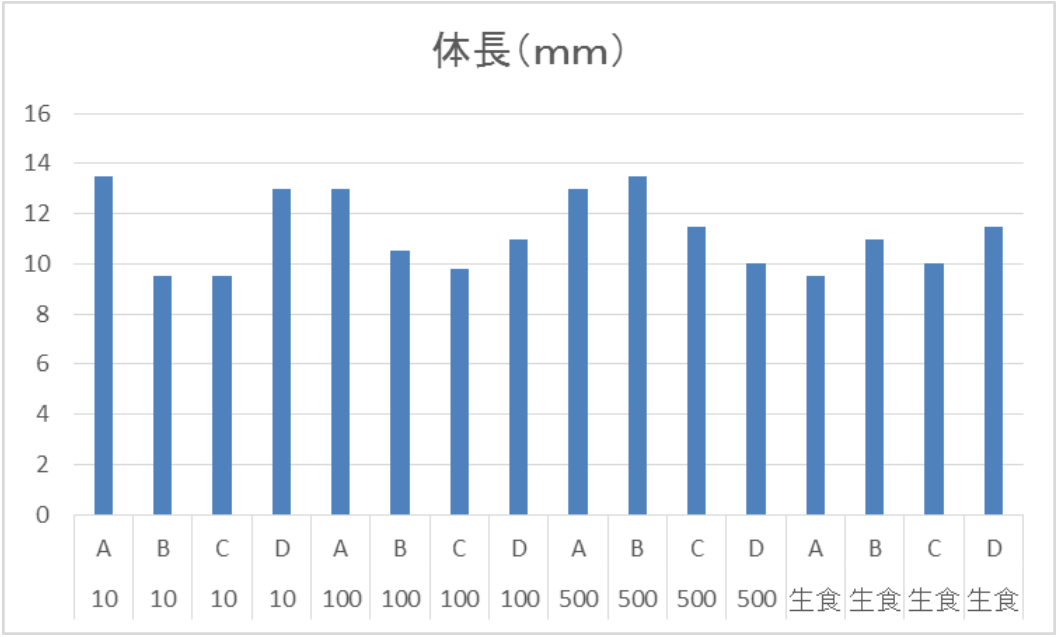
精子は繁殖時期 (5～7月頃) の湖沼から入手したブルーギルもしくは、繁殖水温 (25℃) で飼育したブルーギルの腹部を圧迫することで採取することができた。精子の採取についてはhCGの注射は不必要だった。一方で、雌個体の腹部を圧迫して得られる卵は排卵前の受精不可能な卵だった。そこで、hCGを用いた採卵を試み、hCG濃度の検討を行った。その結果、hCGを高濃度 (500IU/個体) で注射することによって得られた卵は減数分裂に伴う卵核胞崩壊による卵の透明化がみられ、排卵された状態であることが確認された。また、比較的低濃度となる200IU/個体でも24～48時間後に再度注射することで受精可能な卵を得ることができた。このように、hCGを500IU/個体もしくは再度hCGを注射することで48～72時間後に人工授精可能な状態になった卵を得ることが可能になった (図(2)-1)。このことは、ブルーギルにおいても、他の魚類と同様に、hCGによる人為崔熟が可能であることを示していた。しかしながら、hCGの濃度について、ヒラメなどの養殖魚では100～200IU/個体の濃度であるのに対して、500IU/個体という高濃度のhCGでなければ排卵の誘導は安定しないこと、さらに、排卵のタイミングが個体ごとに異なり、ある個体は未熟でさら

に時間がかかるが、別の個体は過熟で人工授精を行うことができないという排卵タイミングのズレが見受けられた。一方、低濃度の200IU/個体を24～48時間後に再度注射することで受精可能な卵を得ることができた。また、低濃度による催熟については、注射後の翌日に採卵する24時間前に再度注射することにより採卵時には人工授精に適した卵を得られる割合が高い傾向が見受けられた。これらの結果から推測されるのは、ブルーギルは他の魚類と比較してhCGに対する感受性が低い可能性が考えられた。その為、採卵する場合はhCGを高濃度で1回注射するのではなく、一度低濃度でのhCG注射を行い、翌日に腹部を圧迫することで排卵時の腹部の軟化の確認を行い、さらに少量の卵を取り出し、卵の透明化の程度や排卵時の卵巢腔液の分泌量の程度を調べることで排卵に向かっているかどうかを確認し、排卵が進んでいる個体に対してhCGを再度注射することで翌日以降の採卵に備えるという手法が現状では元も適していると考えられた。

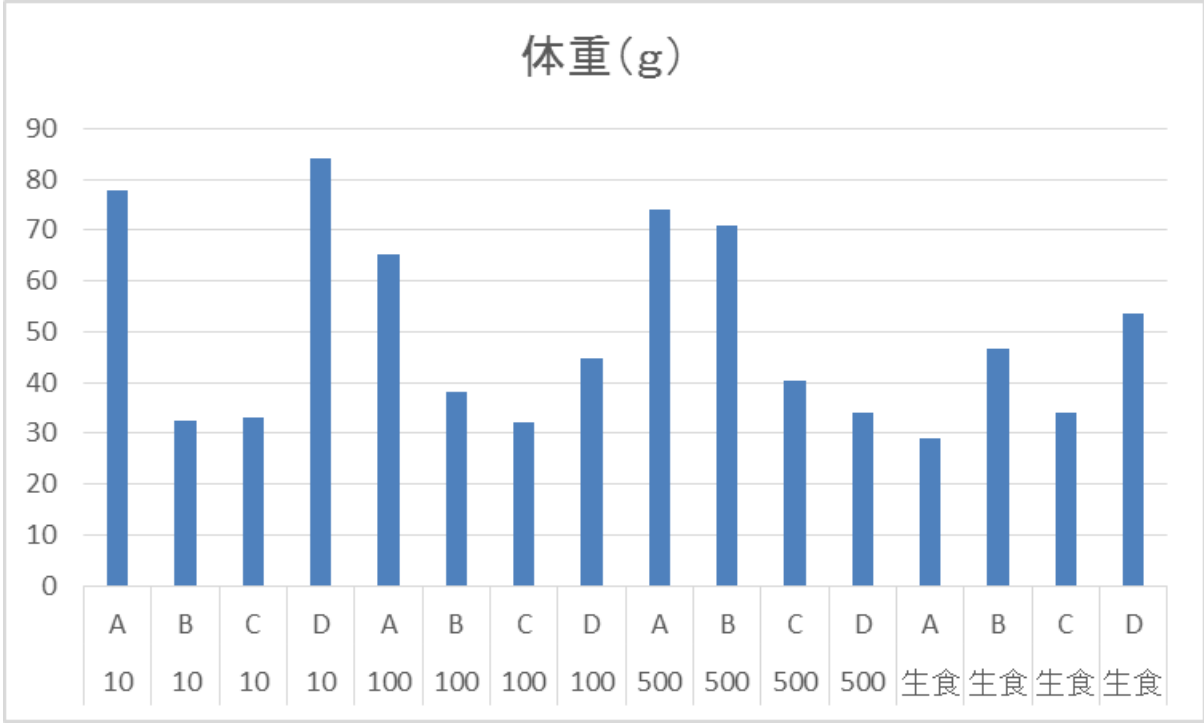
また、メスにhCGを注射する前に体長（図(2)-2）と体重（図(2)-3）および排卵前卵の卵径（図(2)-4）を測定し、hCGに対する感受性の違いについて調べた。濃度は10、100、500IUおよび、ネガティブコントロールとしてhCGの溶媒である生理食塩水（生食）をそれぞれ1回注射したのちの72時間後に排卵の様子を調べた。しかしながら、体調、体重と平均卵径の違いによる感受性の差は認められず、高濃度の500IUのみがhCGによる卵の透明化が確認され、排卵が進行していることが確認された（図(2)-5）。



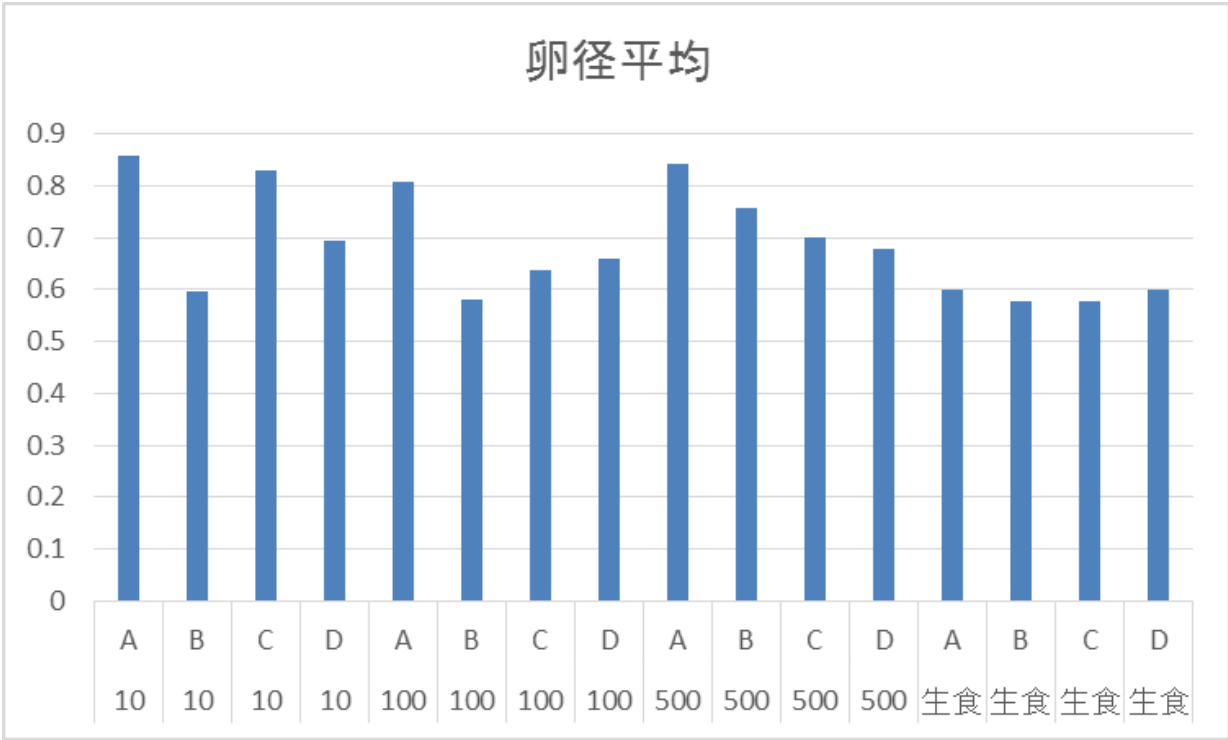
図(2)-1 メスのブルーギルにおける hCG 注射による人工催熟



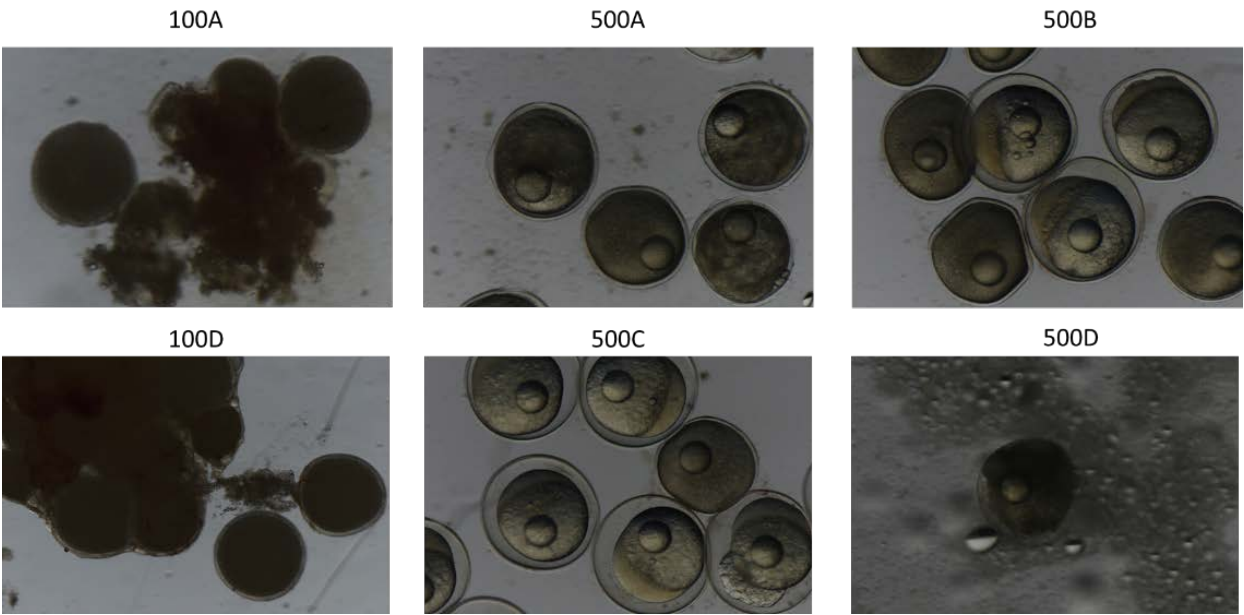
図(2)-2 hCG 注射前メスの体長
*アルファベットはそれぞれの処理における個体を示す。



図(2)-3 hCG 注射前メスの体重
*アルファベットはそれぞれの処理における個体を示す。



図(2)-4 hCG注射前メスの未排卵卵の卵径
*アルファベットはそれぞれの処理における個体を示す。



図(2)-5 hCG注射後のメスから得られた卵の写真
生食、10IU、100IU注射メスの卵は100A、D個体のように卵の透明化が見受けられなかった。
500Dの個体の卵は過熟だった。

ii)精子凍結

精子凍結の条件検討については、ジメチルスルホキシドを凍結防御剤として用いた場合は凍結する前に精子が完全に動かなくなり、精子の運動性が全く維持されないことが分かった。一方で、メタノールを用いた場合は凍結解凍後も精子の運動性が維持されることが分かった（表(2)-1）。この結果をもとに、精子凍結液に含まれる精液、メタノール、ウシ胎児血清の各濃度の検討を行ったところ、精子の運動性の維持に適した条件として、終濃度が精液5%、メタノール5%、ウシ胎児血清90%の組成が適していることが分かった。さらに、液体窒素による精子凍結速度を熱電対により計測し、ブルーギル精子の凍結に適した凍結速度を調べたところ、一分間にマイナス25℃の冷却速度が精子の運動性の維持に適していることが分かった。（図(2)-6）

凍結防御剤の検討

解凍後の運動性

メタノール	DMSO
++	-

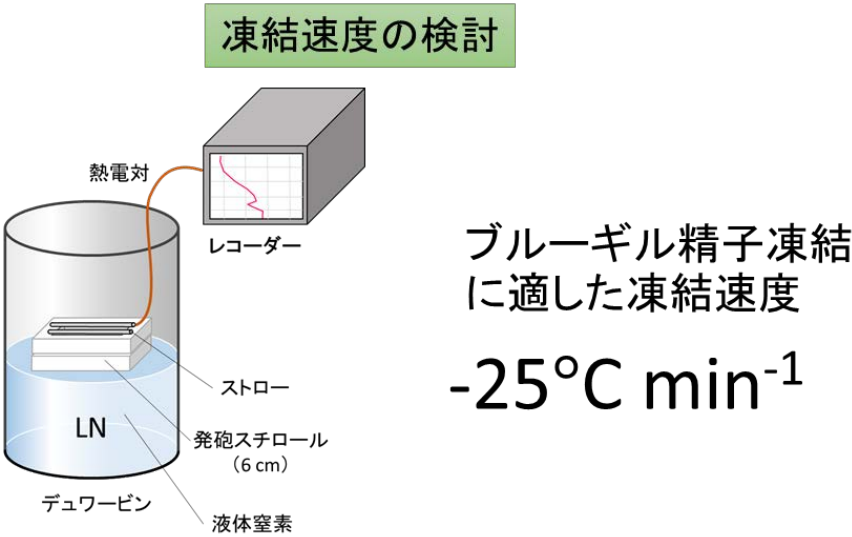
ブルーギル
精子凍結液組成

5% 精液

5% MeOH

90% FBS

表(2)-1 精子凍結保護剤の検討結果

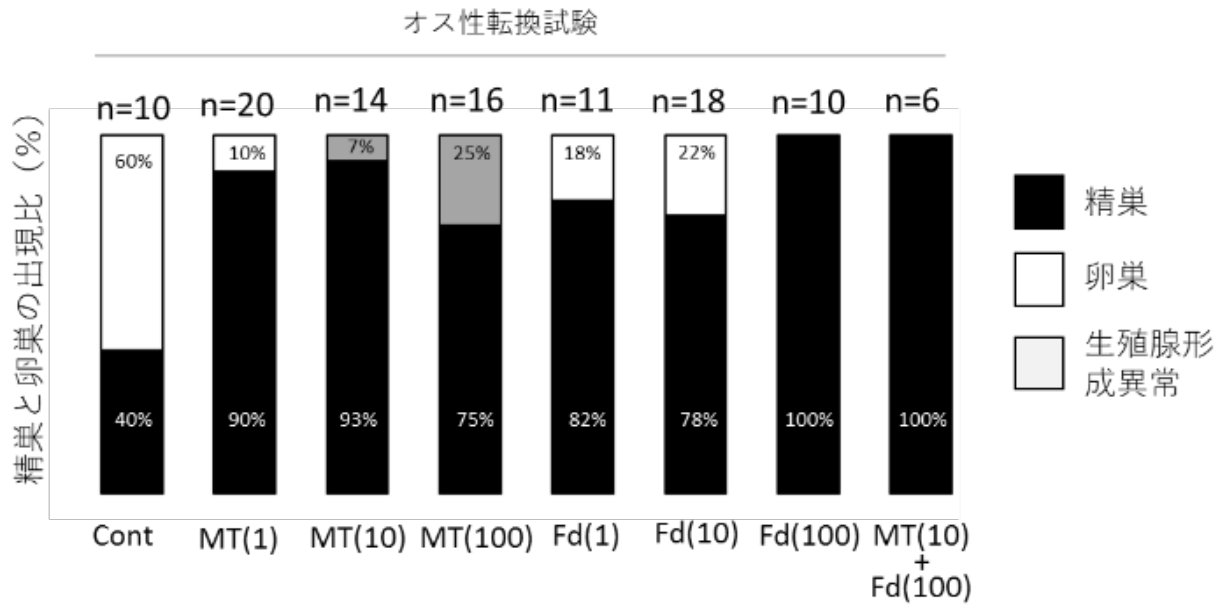


図(2)- 6 精子凍結速度の検討結果

iii) 性ステロイドホルモン投与による性転換

メチルテストステロン (MT) を単体投与した試験群について、MT 1 μ g/g(diet)の投与群では若干の卵巢を持つメスが確認され、MT 10 μ g/g(diet)では7%の割合で卵巢内に精子を持つ生殖腺形成異常個体が出現した (図(2)-7)。さらに、MT 100 μ g/g(diet)処理群では、大きさが極めて小さい生殖腺内に精子として放出される直前の精母細胞が充満している生殖腺形成異常の精巢が確認された (図(2)-8)。しかしながら、ファドロゾール (Fd) 処理ではFd 1 μ g/g(diet)とFd 10 μ g/g(diet)処理群では卵巢を持つメスが出現したが、Fd 100 μ g/g(diet)処理群ではコントロール群と比較して非常によく似た精巢を持つ個体のみが出現した (図(2)-9)。また、MT 10 μ g/g(diet)とFd 100 μ g/g(diet)処理のコンビネーション投与群では、正常精巢が確認された (図(2)-9)。エストロゲン処理については、既知の情報通りに完全にメス化する結果が得られた (図(2)-8)。

ブルーギルにおいても、既知の情報の通りにメチルテストステロンによるオス化が確認されたが、同様に卵巢内に精子を持つなどの生殖腺形成異常個体が出現した。卵巢内精子はブルーギルにおけるメチルテストステロン処理を行ったAI-Ablani (1997)、AI-Ablani and Phelps (1997)の報告によると、より高濃度の600 μ g/g(diet)処理することで95~45%の割合で卵巢内精子が出現することが報告されている。また、場合によっては不妊の生殖腺が出現することも報告されている。本研究においても、高濃度のメチルテストステロン処理は最も高濃度となった100 μ g/g(diet)の処理試験区において25%の個体が精巢構造と卵巢構造を持つ卵巢内精巢を示す結果となった。このように、メチルテストステロン処理は既知の情報通りにオスへの性転換には適さないことが分かった。一方、アロマターゼの阻害剤であるファドロゾール処理試験区ではコントロール処理群と比較して非常によく似た精巢構造を示す結果が得られている。アロマターゼ阻害剤を利用した性転換については、ブルーギルではレトロゾールを用いた性転換試験が報告されている (Gao et al., 2009)。レトロゾールによる遺伝的メスからオスへの性転換についても、卵巢内精巢が出現することが示されている。しかしながら、本実験で行ったファドロゾールによる遺伝的メスからオスへの性転換についてはそのような卵巢内精は確認されなかった。ファドロゾールによる性転換はヒラメにおいても同様の性転換試験が行われている (Kitano et al., 2000) が、性転換個体における生殖腺の異常は報告されていない。このことから、ブルーギルにおける性転換にはアロマターゼ阻害剤を用いる手法が有効だと考えられ、アロマターゼ阻害剤としては、レトロゾールよりもファドロゾールが適している可能性が推察された。一方、ファドロゾールと低濃度メチルテストステロンのコンビネーション処理試験については、厳密な比較は難しいが、コントロール群よりも精子形成が進んでいるように見受けられた。生殖腺の異常は無かったが、アロマターゼを阻害し、低濃度メチルテストステロンのアンドロゲン作用により精巢形成が通常よりも早く進行した可能性も考えられる。エストロゲン処理については、Wangらの報告 (2008)と同様に完全に遺伝的オスをメスに性転換させることに成功した。生殖腺の構造も組織切片観察による比較ではコントロール群との差は見受けられなかったことから、本研究の試験では生殖腺形成異常は出現しなかったと推察される。しかしながら、Wangらの報告ではエストラジオールの高濃度投与や別の試験群について精巢内卵巢の出現も報告されていることから、エストラジオール投与による性転換においても場合によっては生殖腺形成の異常が起こる可能性がある。このため、今後行われる不妊化遺伝子搭載魚を用いた性転換試験については処理魚の一部の生殖腺の組織観察を行い、試験群の調査をする必要があると思われる。



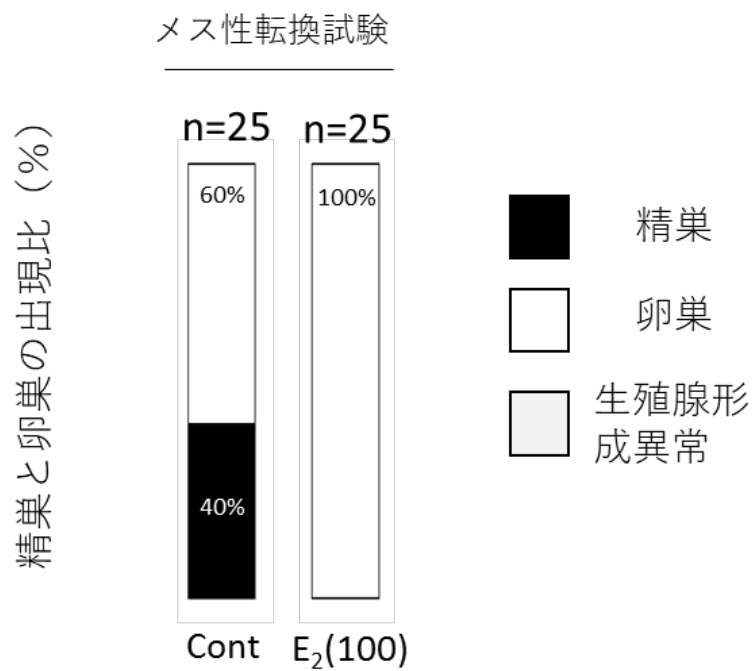
Cont：通常エサ飼育の対象群

MT：メチルテストステロン処理

Fd：ファドロゾール処理

* ()内の数字は性転換飼料に含まれるホルモン等の濃度 ($\mu\text{g/g(diet)}$) を示す

図(2)- 7 オス性転換試験における精巣、卵巢、および生殖腺形成異常の出現比

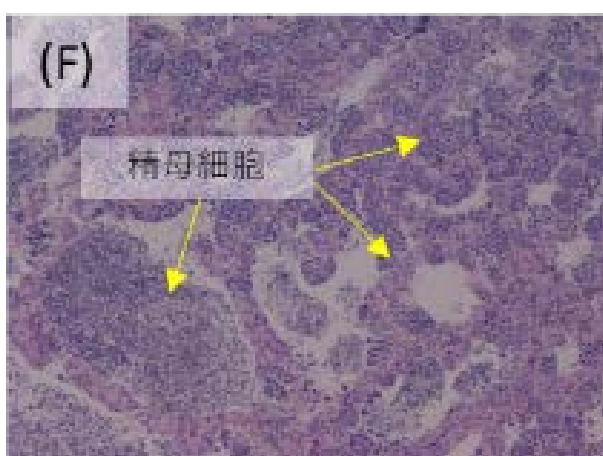
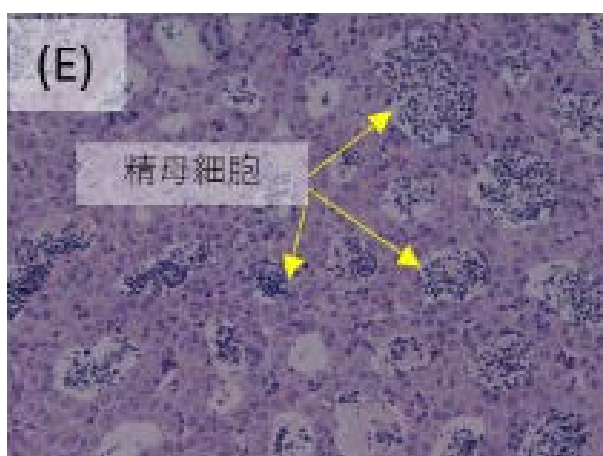
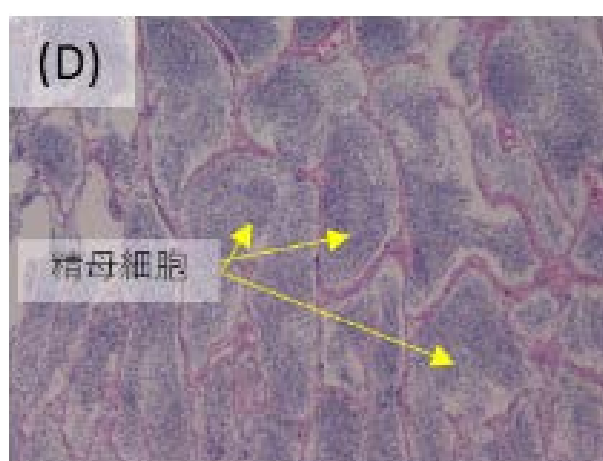
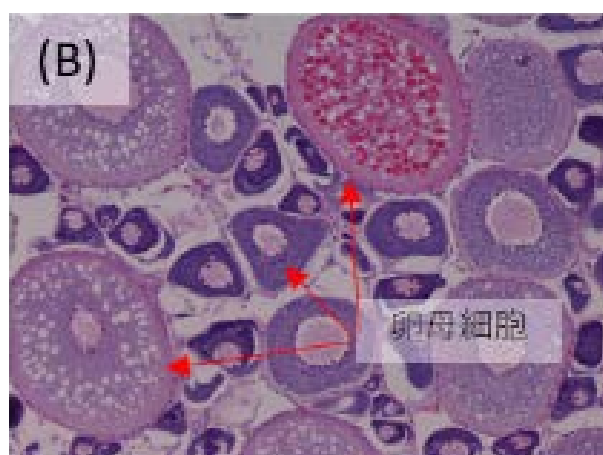
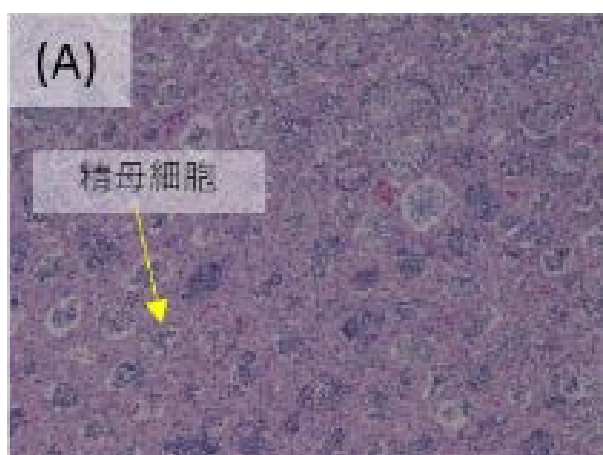


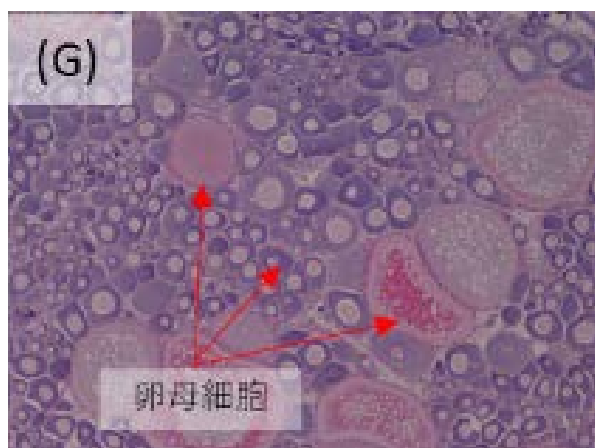
Cont：通常エサ飼育の対象群

E₂：エストラジオール処理

* ()内の数字は性転換飼料に含まれる
ホルモン等の濃度 (μg/g(diet)) を示す

図(2)- 8 メス性転換試験における精巣、卵巢、および生殖腺形成異常の出現比





(A)通常エサ飼育群のオスの精巣

(B)通常エサ飼育群のメスの卵巢

(C)メチルテストステロン処理群に見られる卵巢内精子形成

(D)メチルテストステロン処理群に見られる極端な精子形成

(E)ファドロゾール処理群の精巣

(F)メチルテストステロン+ファドロゾール処理群の精巣

(G)エストラジオール処理群のメスの卵巢

図(2)- 9 性転換試験における生殖腺のヘマトキシリン・エオシン染色による組織観察

iv) 近縁種間雑種交配もしくは染色体操作による三倍体作出

異質三倍体のための近縁種雑種作出については、写真（図(2)-10）のブルーギル、パンプキンシードとロングイヤーサンフィッシュの雌雄について人工授精による交配を行い、生残するかどうかについて調べた。その結果、ブルーギルのオス精子とパンプキンシードのメスもしくは、ロングイヤーサンフィッシュのメスと人工授精した場合は孵化仔魚の奇形が多く出現することが分かった。一方で、パンプキンシードのオス精子とブルーギルのメス卵もしくはロングイヤーサンフィッシュのメス卵を人工授精させた場合は、パンプキンシード精子×ブルーギル卵の組み合わせについて、孵化仔魚は得られるが卵黄吸収後に浮上するはずの仔魚が浮上しないことが判明した。一方、パンプキンシード精子×ロングイヤーサンフィッシュ卵を人工授精した場合は全て孵化前後に致死になることが判明した。しかしながら、ロングイヤーサンフィッシュのオス精子とブルーギルメス卵を人工授精した場合は正常個体が比較的多く出現する結果が得られた。また、ロングイヤーサンフィッシュのオス精子とパンプキンシードのメス卵を人工授精した場合も正常個体が比較的多くなる結果が得られた。ブルーギル近縁種の雑種作出については、ロングイヤーサンフィッシュのオス精子を用いることで、他の組み合わせと比較して正常個体が多く出現する結果が得られた（表(2)-2）（図(2)-11）（図(2)-12）。本研究実施期間内にこれらの正常個体の解析までには至らなかったが、近縁種3種の雌雄全ての組み合わせについての交配試験を行うことができた。これにより近縁種間の異質三倍体については交配試験の結果を参照することで試験時間の短縮が期待される。

染色体操作による三倍体作出については、まずは受精卵の染色体組織像の観察を行った。その結果、ブルーギル受精卵は受精後5分頃には染色体は分裂を開始しており、10分頃には減数分裂を終えた卵核と精子核が融合途中かもしくは、融合が終了しているという観察結果が得られた（図(2)-13）。これらの結果から、三倍体を作成する為には卵の染色体分裂がして卵と精子の核の融合が完了する受精後5分から10分を含むように受精卵の低温処理を行う必要があることが分かった。

低温処理による三倍体作出の条件検討の結果、水温5℃の低温処理を行った場合、3倍体の出現率は比較的高くなる傾向がみられたが生残率が低く、10分以上低温処理を継続した場合はほとんどの受精卵が死ぬことが分かった。また、10℃の処理を行った場合については生残率が高く15分以上処理を継続しても生残率は高かったが、三倍体出現率が比較的低いことが分かった。そこで、処理水温を7℃に設定したところ、生残率も高く三倍体出現率も高いことが分かった。そこで、処理水温を7℃に設定した低温処理開始時期と低温処理継続時間の検討を行った。その結果、受精後1分から7℃の低温処理を開始した場合は約60～100%の高い三倍体出現率を示す結果が得られた。一方で、低温処理を受精後5分以降に開始した場合は三倍体出現率が下がる傾向を示す結果が得られた。この結果から低温処理は受精後1分までに開始する必要があることが分かった。低温処理の継続時間については、処理開始から10分以上処理する必要があることが分かった（図(2)-14）（表(2)-3）。これらの結果をまとめると、低温処理によるブルーギル三倍体作出条件は受精後1分までに水温7℃の低温処理を開始し、10分以上低温処理を継続することで、比較的高い生残率を維持したまま60～100%の三倍体出現率が得られる事が分かった。この結果は、組織切片の解析結果が示した受精後5分から10分の間を含むように低温処理を行う必要があるという結果と合致していた。高温処理については、35℃で10分、15分、20分と処理したが、三倍体化率はそれぞれ20%、60%、

50%の三倍体化率だった。また、水温を40℃で染色体操作を行った場合はふ化前に仔魚が全滅してしまった（表(2)-4）。

三倍体作出については、低温処理と高温処理による三倍体作出を試みたが、高温処理では処理温度を上げると三倍体出現率は上がるが、ふ化仔魚がほぼ全て三倍体化する条件温度に達する前に、高温により受精卵が死ぬことが分かった。このため、高温処理ではふ化仔魚を高い割合で三倍体化させることは難しいと考えられた。この結果から、ブルーギルにおける温度による三倍体作出には低温処理が適していることが示された。



ブルーギル（B G）
(*Lepomis macrochirus*)



パンプキンシード（P S）
(*Lepomis gibbosus*)



ロングイヤーサンフィッシュ（L E）
(*Lepomis megalotis*)

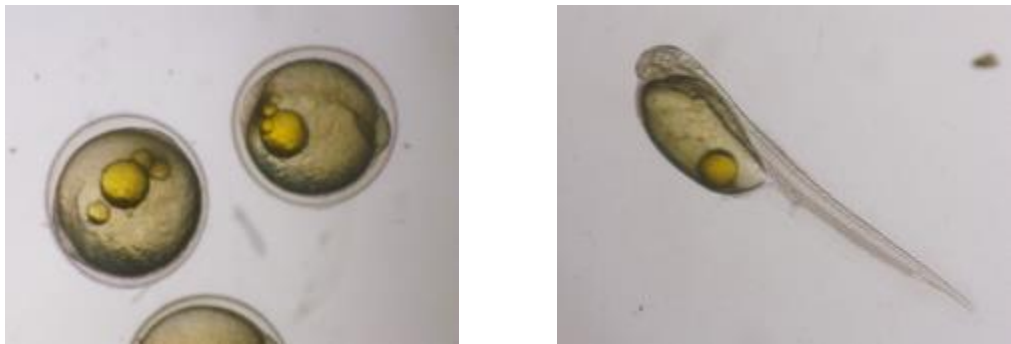
図(2)- 10 ブルーギルと近縁種パンプキンシードとロングイヤーサンフィッシュの写真

*ブルーギル近縁種は滋賀県立琵琶湖博物館から提供していただいた

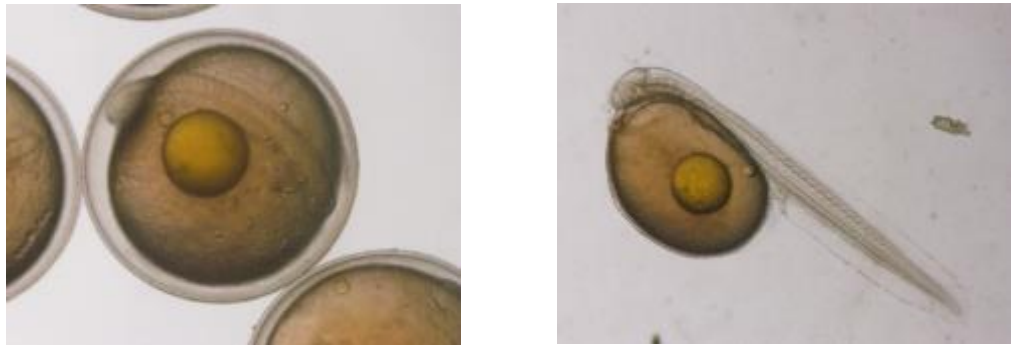
表(2)- 2 近縁種間交配試験の組み合わせにおける生残への影響

	BG♂	PS♂	LE♂
BG♀	正常	浮上しない	正常多い
PS♀	奇形多い	正常	正常多い
LE♀	奇形多い	致死性	正常

パンプキンシード



ロングイヤーサンフィッシュ



図(2)- 11 パンプキンシードとロングイヤーサンフィッシュの孵化前後の仔魚



$P S \text{ ♀} \times B G \text{ ♂}$

奇形が多い



$L E \text{ ♀} \times P S \text{ ♂}$

致死性

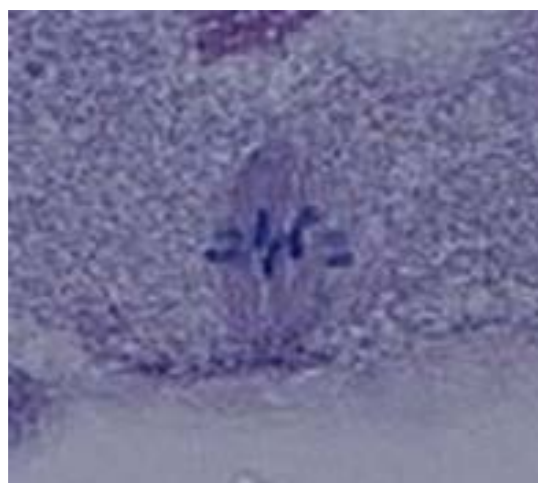
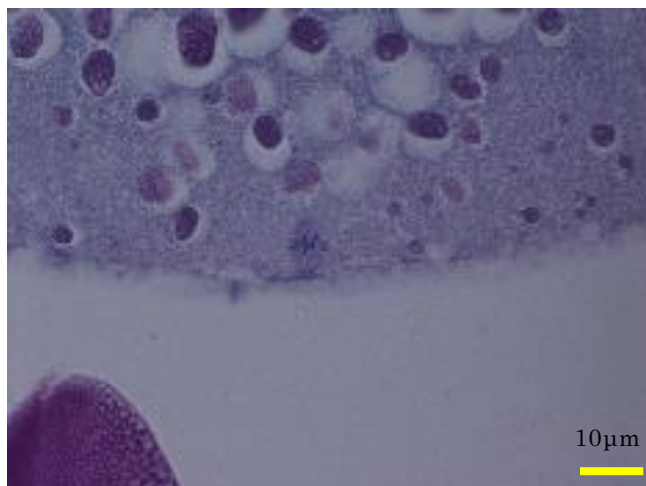


$P S \text{ ♀} \times L E \text{ ♂}$

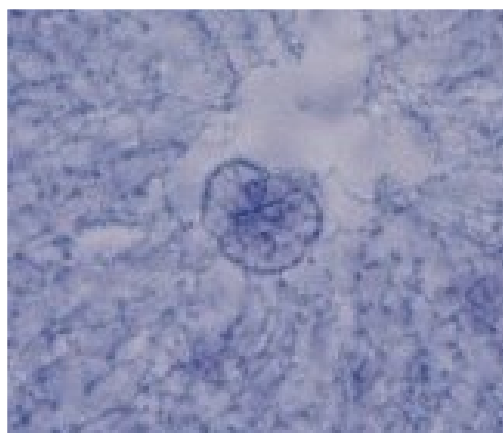
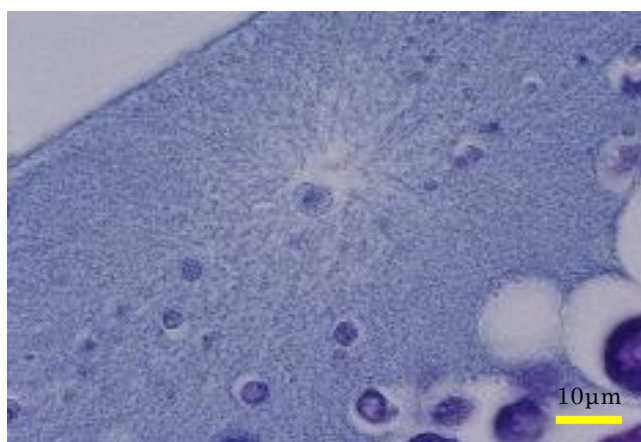
正常

図(2)- 12 近縁種雑種の交配により得られた孵化仔魚

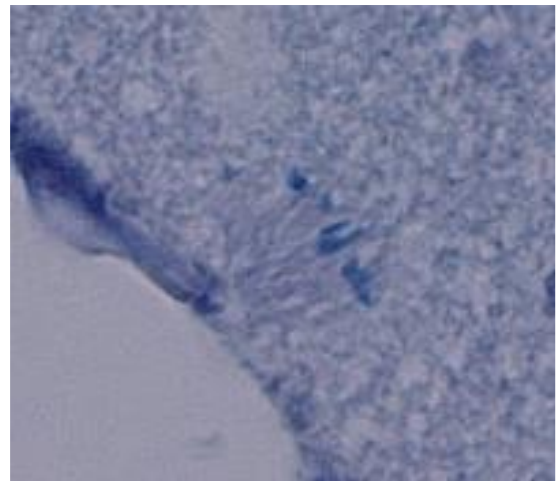
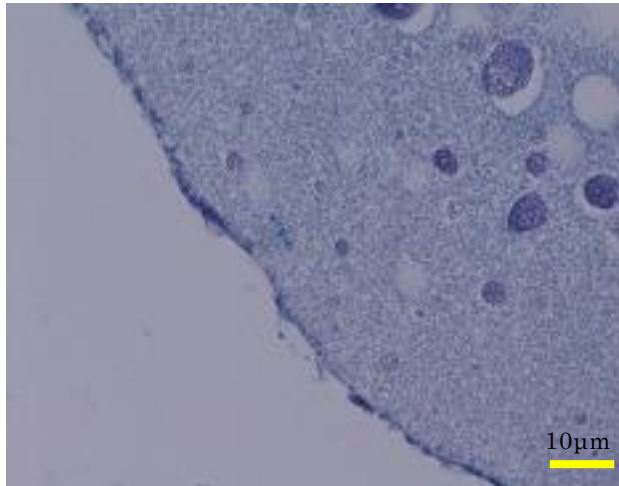
受精後 0 分



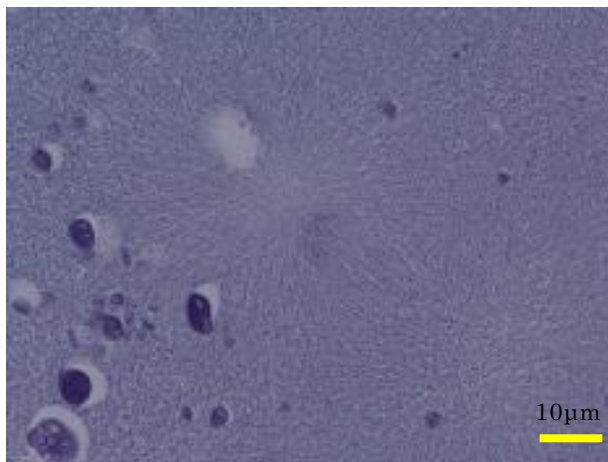
受精後 1 0 分



受精後 1 分

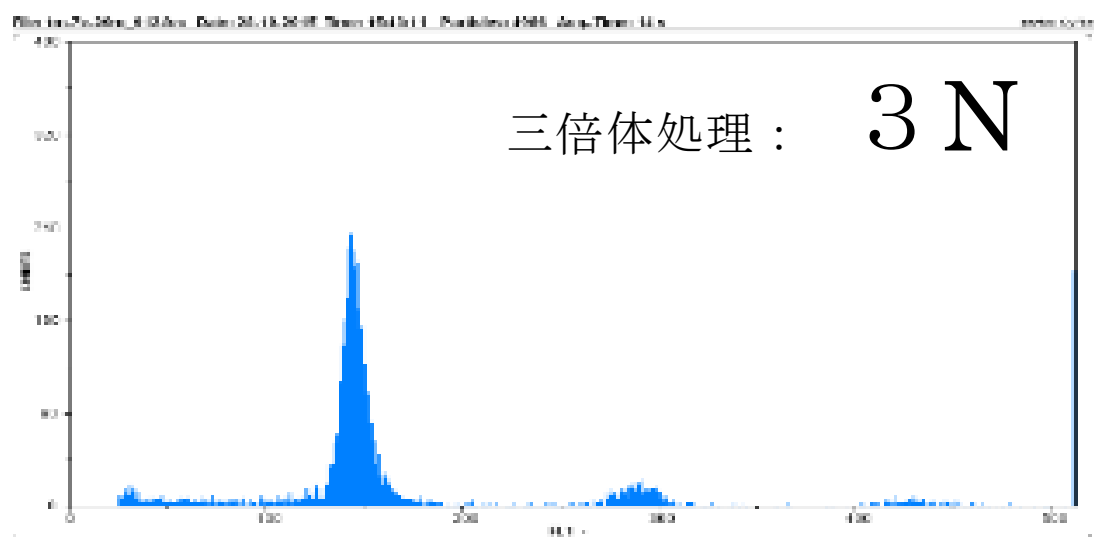
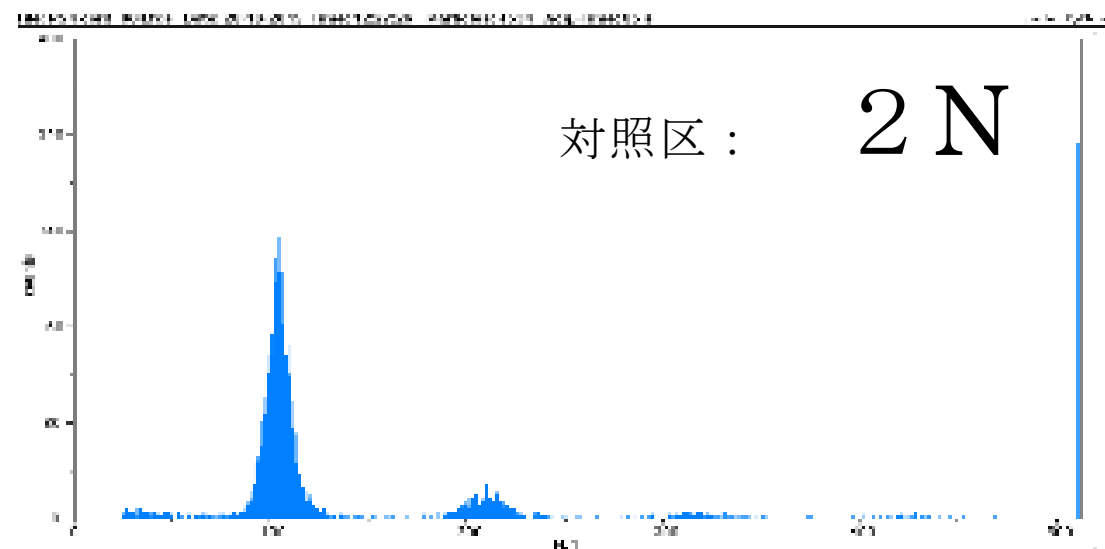


受精後 30 分



図(2)- 13 組織学的解析によるブルーギル受精卵(2N)の染色体観察

フローサイトメーターによる倍数性の解析



図(2)- 14 フローサイトメーターによる倍数性の解析

表(2)- 3 低温処理による三倍体作出試験の結果

低温処理試験		低温処理による三倍体作出試験の結果		
処理水温		処理時間		
		10分	15分	20分
	5℃	100%(1)	0% (孵化仔魚なし)	0% (孵化仔魚なし)
	7℃	60%(10)	70%(10)	100%(9)
	10℃	0%(10)	0%(10)	20%(10)

* 処理水温は全て受精後 1 分以内に処理を開始した
* 対照区は全て 2 倍体だった
* () 内の数字は解析したサンプルの数を示す

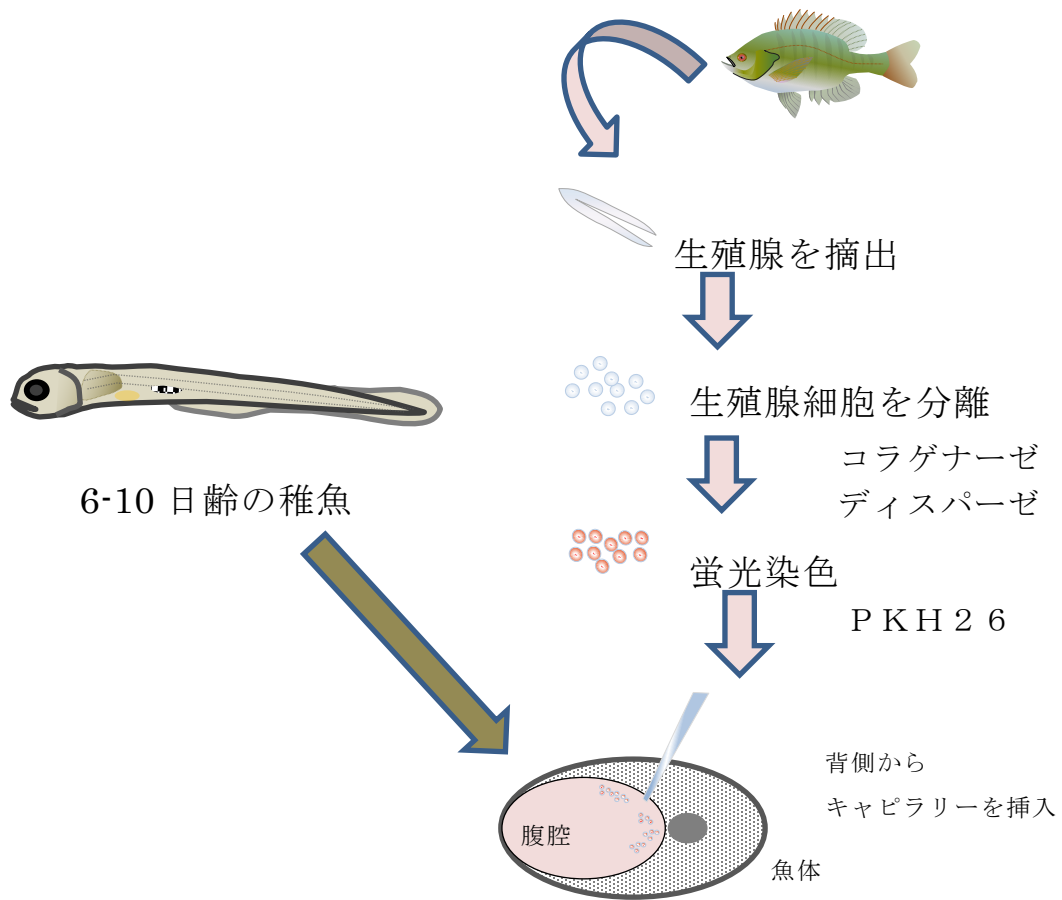
表(2)- 4 高温処理による三倍体作出試験の結果

高温処理試験				
処理水温		処理時間		
		10分	15分	20分
	3 0℃	1 0%(1 0)	1 0%(1 0)	0%(1 0)
	3 5℃	2 0%(1 0)	6 0%(1 0)	5 0%(1 0)
	4 0℃	0% (孵化仔魚なし)	0% (孵化仔魚なし)	0% (孵化仔魚なし)

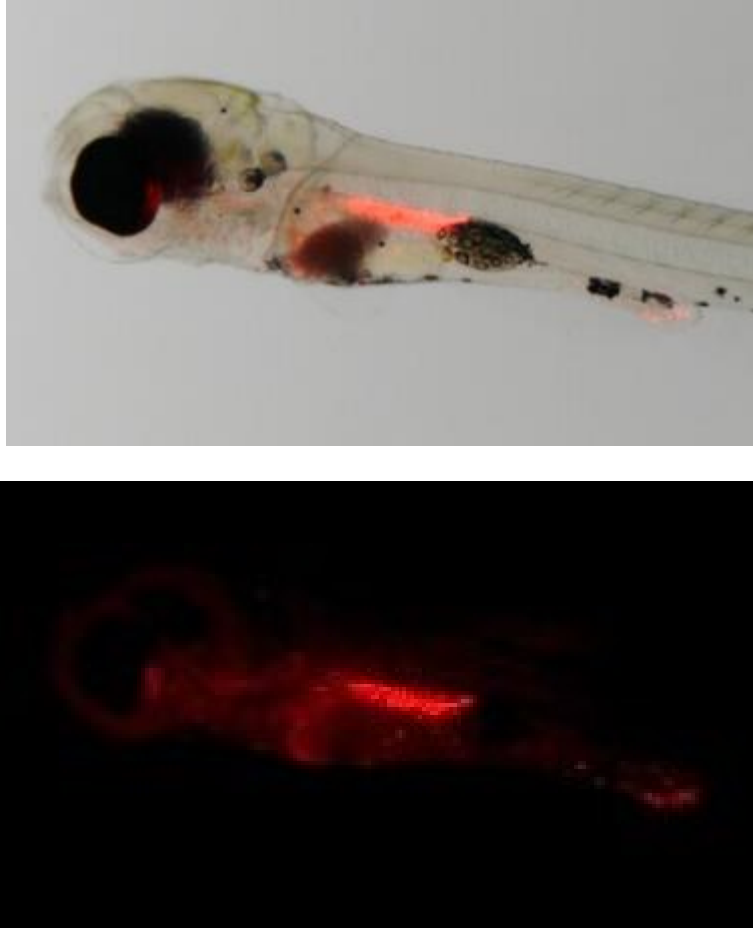
- * 処理水温は全て受精後 1 分以内に処理を開始した
- * 対照区は全て 2 倍体だった
- * () 内の数字は解析したサンプルの数を示す

v)生殖細胞の他個体への移植

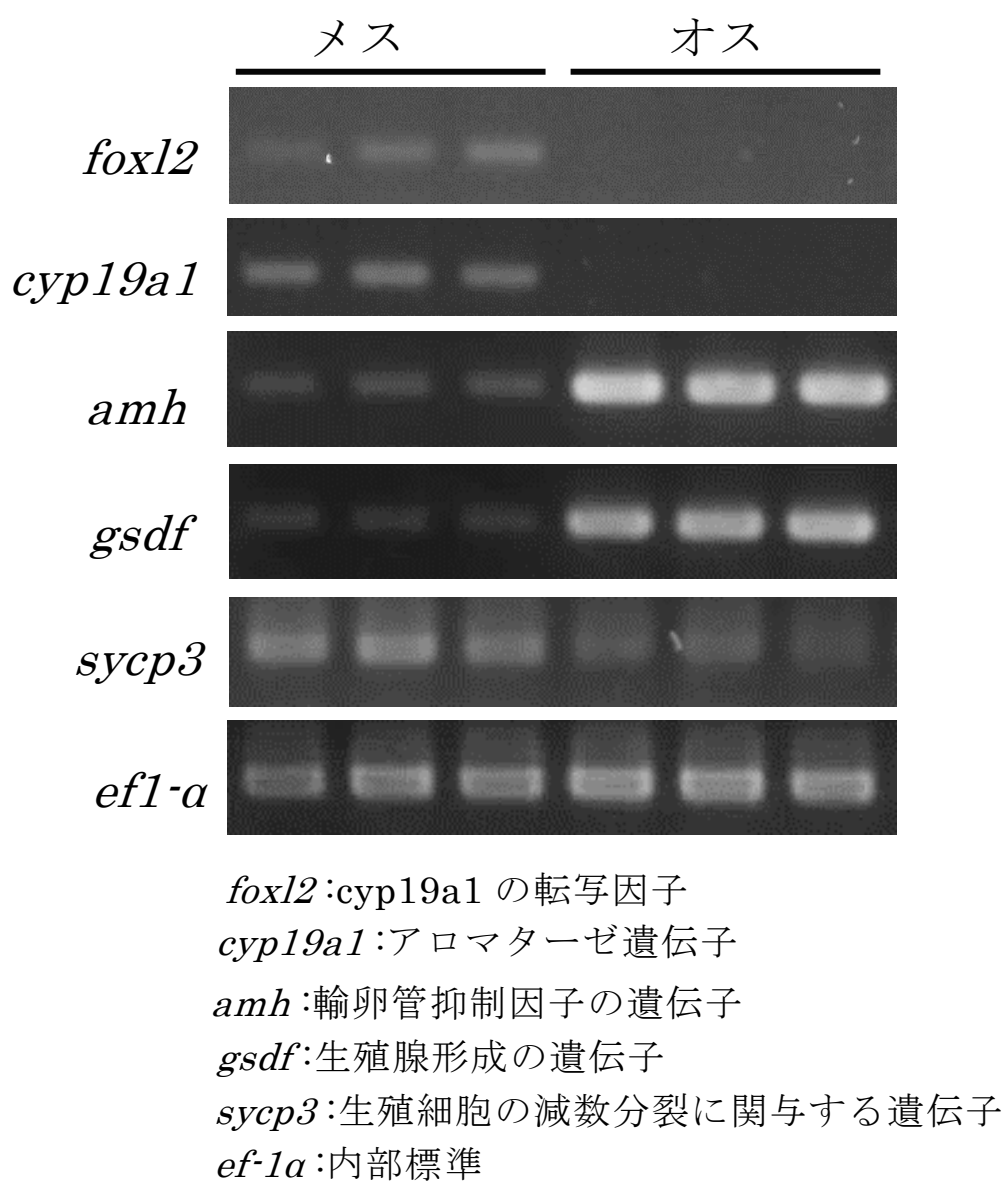
生殖細胞の他個体への移植について、孵化仔魚へのオス精巣由来の精原細胞の移植試験を行った。ドナー由来の精原細胞は精巣細胞をディスパーゼやコラゲナーゼで細胞間接着を弱めることでバラバラに単離され、PKH26により赤い蛍光色素で標識した。蛍光色素で標識することで細胞は死ぬことは無かったが、物理的なストレスにより死んだ細胞も含まれていた。それらの死んだ細胞や他の筋様細胞などと異なり、精原細胞は丸い形状を示していたことから、ある程度、精原細胞を選択して顕微注入用のガラスキャピラリーで吸い込み、孵化仔魚の生殖腺原基が存在する付近にガラスキャピラリーを刺し、細胞の注入を行った（図(2)-15）。その結果、移植の翌日に蛍光観察を行ったところ、赤い蛍光を発する細胞が移植を行い生きている孵化仔魚において確認された（図(2)-16）。このことから、少なくとも蛍光色素で標識した細胞が孵化仔魚内に入っていることが確認された。次に、移植した細胞が本当に精巣由来の細胞を含むのか？特に生殖腺細胞を含むかどうかを確認するために、まずは精巣や卵巣において生殖腺の雌雄判別に用いられる遺伝子やある程度発達した精巣でなければ発現が始まらない遺伝子についてのRT-PCRによる転写レベルの発現解析を行った。その結果、ブルーギルにおいても、メス特異的に発現することが知られているアロマターゼやfoxl2について、メス特異的な発現が認められた（図(2)-17）。また、オスで比較的高い発現を示すことが知られているamhやgsdfについても、ブルーギルにおいてオスで高い発現を示すことが分かった（図(2)-17）。さらに、ある程度発達した精巣では減数分裂が開始され、精母細胞が作られて精子形成が行われるが、この減数分裂時に特異的に発現することで減数分裂のマーカーとして一般的に利用されているsycp3遺伝子について発現を調べたところ、移植に用いた精巣において発現していることが確認された（図(2)-17）。このsycp3遺伝子の発現細胞が生殖細胞かどうかの確認を免疫組織化学染色により確認した。抗体を用いてSycp3の局在を調べたところ、精巣内の生殖細胞の一部において、核内の染色体がパキテン期に似た様子を示す細胞においてシグナルが確認された（図(2)-18 (A)）。この発現パターンは一般的なsycp3タンパク質の発現パターンと一致している。その為、ブルーギルにおいても、sycp3は生殖細胞において発現し、減数分裂のマーカーとして利用可能だと考えられた。そこで、移植を行ったブルーギル孵化仔魚において、オスの体細胞マーカーとして利用可能なamhとsycp3についてRT-PCRによりmRNAの発現を調べた。その結果、比較対象としてインジェクションを行っていない仔魚ではこれらの遺伝子の発現はみられなかった。しかしながら、移植を行った仔魚ではamhとsycp3遺伝子のmRNAの発現が確認された（図(2)-18 (B)）。本来ならば、孵化後9日齢の孵化仔魚の生殖腺においてはamhとsycp3は発現していないことから、ドナーの精巣由来の細胞がホストの体内に存在していることを示唆する結果と言える。これらの結果から、ブルーギルにおいても生殖細胞の移植は可能ということが明らかとなった。



図(2)- 15 生殖細胞移植の概略図

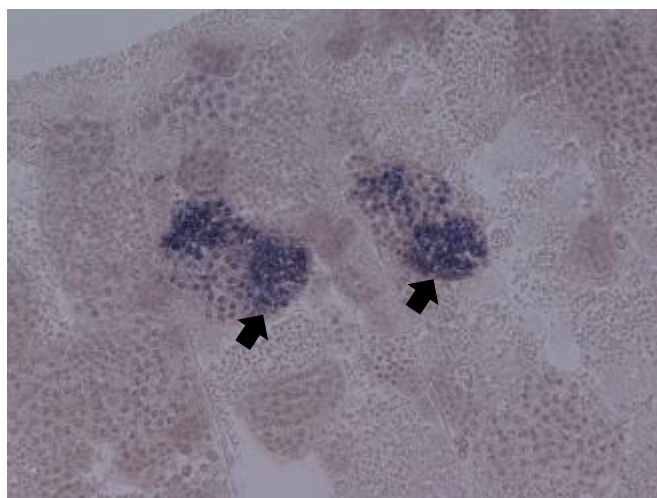


図(2)- 16 移植した別個体由来の細胞（赤色蛍光）の蛍光写真



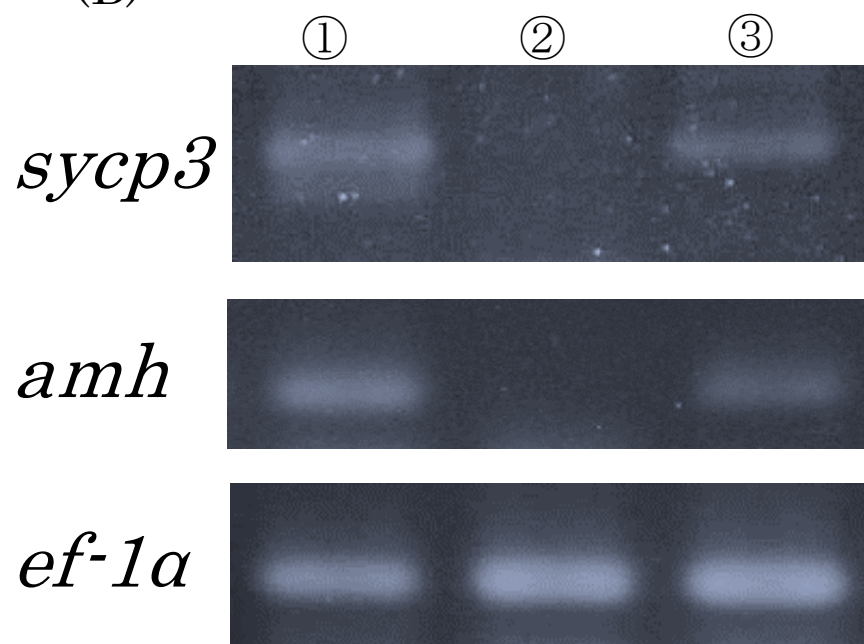
図(2)- 17 ブルーギルにおける生殖腺形成関連遺伝子の発現解析

(A)



* 矢印は Sycp3 タンパク質のシグナルを示す

(B)



①オス生殖腺から分離した生殖腺細胞

②移植を行っていない 9 日齢孵化仔魚（1 個体）

③移植を行った 9 日齢孵化仔魚（1 個体）

図(2)- 18 移植したドナー（精巢）由来の細胞の確認

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

文献などに記載されているブルーギルの受精卵や仔魚を得る手法は主に人工の繁殖巣に産卵させることで受精卵や仔魚を得ていた。しかしながら、この手法では遺伝子編集に必要な1細胞期までの受精卵を得ることは難しかった。本研究ではhCGを用いた採卵と人工授精法を成功させたことで、遺伝子編集試験を目的とした顕微注入を可能にした。また、人工授精により受精卵の染色体の動態を詳細に調べることが可能になり、1対1交配も可能になるなど、基礎的な研究を行う上で非常に有用な手法を開発できたと考えられる。さらに、在来種の精子あるいは卵を使用することでブルーギルとの交雑試験も可能になることから、外来魚と在来種間の研究、検証にも役立つと考えられる。

三倍体作出、性転換誘導試験といった繁殖技術について、日本国内では養殖魚や在来種において、繁殖に関わる基礎的な試験、解析が行われ、それらの情報を基に繁殖技術の条件の検討が行われてきた。一方、外来魚の繁殖は国内では大きな問題となっているにもかかわらず、ブルーギルやブラックバスの繁殖制御機構に関わる基礎的な分子生物学的研究はほとんど行われておらず、繁殖技術に関する情報も少ない。本課題の報告は遺伝子編集だけではなく、様々な技術に応用可能な基礎的な研究報告として科学的に意義のある成果だと考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

外来魚の根絶の新技术である遺伝子制圧技術の実証技術の開発に必要な増殖関連の基盤技術として、ホルモンによる人工催熟技術、精子凍結技術、3倍体作出技術、生殖細胞移植技術が整備されたことは、愛知目標（COP10）の2020年までの短期目標「生物の多様性の損失を止めるために効果的かつ緊急な行動を実施する」の達成に向けた具体的な取組の一つである。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 石川卓、岩崎裕貴、西木一生、藤原篤志、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之 (2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－2：ブルーギルの不妊化技術の基盤開発」平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 2) 山口寿哉、栗田潤、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之 (2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－3：ブルーギルの増殖技術の基盤開発」平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 3) 奥宏海、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、栗田潤、岡本裕之 (2015)「遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－5：ゲノム情報を利用したリパーゼ遺伝子族の特性解析」平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集82.
- 4) 山口寿哉、石川卓、栗田潤、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之 (2016)「ブルーギルの根絶に向けた繁殖技術の開発」第11回外来魚情報交換会講演要旨集22.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 平成22年度外来魚抑制管理技術開発事業報告書 水産総合研究センター中央水産研究所内水面研究部「ブルーギルの繁殖条件の解明と人為性転換魚の放流による駆除技術の開発」
- 2) Al-Ablani SA and Phelps RP (2002) Paradoxes in exogenous androgen treatments of bluegill. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 61-64.
- 3) Kitano T, Takamune K, Nagahama Y and Abe SI (2000) Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.*, 56, 1-5.
- 4) Gao ZX, Wang HP, Wallat G, Yao H, Rapp D, O'Bryant P, MacDonald R and Wang WM (2010) Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill

sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture Research, 1282-1289.

- 5) Wang HP, Gao Z, Beres B, Ottobre J, Wallat G, Tiu L, Rapp D, O'Bryant P and Yao H (2008) Effects of estradiol-17 on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture, 285, 216-223.
- 6) Thorgaard GH (1983) Chromosome set manipulation and sex control in fish. In "Fish Physiology" (Hoar WS, Randall DJ and Donaldson EM eds.), Vol.9, PartB, Academic Press, New York, 405-434.
- 7) Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y and Yoshizaki G (2007) Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 317, 1517-1517.
- 8) Nakagawa T, Nabeshima Y and Yoshida S (2007) Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. Dev. Cell 12, Feb;12(2), 195-206.

(3) 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発

三重大学生物資源学部

生物圏生命科学専攻 海洋生物学講座 水圏分子生態学研究室

河村功一

平成26(開始年度)～28年度累計予算額：12,621千円（うち平成28年度：3,700千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

外来魚駆除において、集団構造と繁殖様式を中心とした生態情報は必須である。しかしながら、本課題が駆除の最終ターゲットとしている琵琶湖のブルーギルについてはこうした基礎的知見が殆ど存在しない。このことから本サブテーマでは琵琶湖のブルーギルの生態解明を目的として、形態解析と分子マーカーを用いた集団解析による調査分析を行った。平成26-28年の3年間にかけて琵琶湖と余呉湖の計14地点において計2,022個体を採集し、分析を行った。Morphometryを用いた形態解析において、生息地間で体型に違いが認められ、琵琶湖北部と南部は尾柄高が低いのに対し、中部の個体は尾柄高が高いことが判った。Rad-seq分析により得られた3,455遺伝子座を用いて集団解析を行った所、遺伝的多様性（ヘテロ接合度とアليل数）は侵入地点の西の湖周辺が最も高く、逆に琵琶湖北部は低かった。集団間の遺伝的分化（ F_{ST} ）に付いてみると余呉湖と琵琶湖の間では有意な分化が認められたものの、琵琶湖内では殆ど認められなかったが、分子系統樹において南湖と北湖の集団は遺伝的に大きく二つに別れることが分かった。また、各遺伝子座についてOutlier解析を行った所、7座において有意となり、琵琶湖内における正の自然選択による集団分化が示唆された。また、Outlier解析とMorphometry解析との間には対応が見られ、形態分化における遺伝的要因の存在が伺われた。今回、新たに開発したマイクロサテライト18座を用いて解析を行った所、琵琶湖におけるブルーギルの分散の中心は安曇川と守山であることが分かった。有効集団サイズについて見ると南湖の生息地は何れも高く、北湖の約3倍に達したが、経年変化についてみると何れの生息地も減少傾向が見られた。有効集団サイズを元に生命表を作成したところ、琵琶湖の場合、ブルーギルの生存率は3-4歳の間に大きく低下し、個体レベルでの繁殖貢献度は年齢と共に増加する事が判った。このことから、琵琶湖における遺伝子編集魚の放流は3歳魚を用いて安曇川と守山の周辺で重点的に行う事が効果的であると考えられた。

[キーワード]

遺伝的集団構造、有効集団サイズ、遺伝的多様性、生命表、モルフォメトリー解析

1. はじめに

ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) はスズキ目サンフィッシュ科に属する北米中東部原産の淡水魚であるが、本種は遊漁の対象種として同じサンフィッシュ科に属するオオクチバス

(*Micropterus salmoides*)、コクチバス (*Micropterus dolomieu*) などと共に北米だけでなく世

界各地に移植されている¹⁾。しかしながら、本種は旺盛な繁殖力と広範囲な雑食性といった食害により²⁾、在来の生態系に対する悪影響が日本を始めとする多くの国において問題となっている³⁾。

日本へのブルーギルの導入は1960年にシカゴ市長から日本政府に贈呈されたミシシッピ川産18個体が唯一の公式記録とされているが（そのうち15個体が繁殖）⁴⁾、ミトコンドリアDNAとマイクロサテライトDNAを用いたDNA解析により、日本各地に生息する個体は何れもこの1960年導入の15個体に由来する可能性が高いことが明らかにされている^{3,5)}。琵琶湖におけるブルーギルの侵入は聞き込み調査により1960年代前半に琵琶湖の内湖の一つである西の湖で生じたとされ、約10年間でほぼ全域に分布を拡大したことが判っている⁶⁾。Kawamura et al.^{3,5)}によるDNA解析により、琵琶湖のブルーギルは日本の生息地の中で最も遺伝的多様性が高い集団であるだけでなく、日本各地に生息するブルーギルの多くが琵琶湖由来である可能性が高い事も示唆されている。このことから、琵琶湖は日本におけるブルーギルの最大の生息地であると共に最大の供給源であり、琵琶湖におけるブルーギルの根絶は日本のブルーギル問題解決の要と言うこともでき、正に喫緊の課題でもある。

2. 研究開発目的

外来魚駆除の実践において、集団構造と繁殖様式を中心とした生態情報は必須である。なぜならば、こうした生態情報は駆除技術の開発を含む駆除事業の効率化において重要な情報であり、こうした情報無くして、対象種の根絶は実質不可能である⁷⁾。本課題が駆除の最終目標としている琵琶湖のブルーギルの場合、現在駆除事業の成果は横這いの状況にあり、生息数に殆ど変化が見られないといった外来魚駆除における典型的な頭打ちの状態が続いている⁸⁾。こうした状況を打破するためには、琵琶湖におけるブルーギルの分布の現状ならびにその生態を詳細に把握し、適切な駆除対策の立案が必要である。本サブテーマでは、こうした背景を踏まえ、駆除対策の立案において有益とされる生態情報（集団構造、分布拡大様式、繁殖様式、個体数、繁殖貢献度）の収集を目的として、野外調査と分子マーカーを用いた集団解析による調査研究を行った。

3. 研究開発方法

（1）材料

平成26年から28年の3年間にかけて琵琶湖（余呉湖を含む）内の14地点（図(3)-1）において採集した計3,022個体（表(3)-1）を分析に用いた。採集個体はDNA分析用に鰭組織の一部を100%エタノールで固定し、魚体は15%ホルマリンにて固定した。なお、各採集地点において、標準体長についてヒストグラムを作成し、年齢査定を行った。

（2）方法

1) 形態解析

a. モルフォメトリ解析による地理的変異の解明

生息地点間での形態的差の有無を見るため、モルフォメトリ解析を行った。琵琶湖内各地点において採集した個体からランダムに選んだ20-50個体の雌（2-5歳魚）について左体側面をデジタルカメラにより撮影し、SUNY Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>)により提供されているソフトウェアtpsDIG2w32を用い、計13の各landmark（図(3)-2）の座標情報

を取得した。得られたデータについて同じくSUNY Stony Brookにより提供されているソフトウェアtpsRelw32を用い、モルフオメトリー解析の一つであるRelative warp analysis (RWA)⁹⁾を行った。RWAはベクトル情報を用いた主成分分析であり、成分寄与率の高い主成分について生息地間での有意差の有無をKruskal-Wallis testにより調べると共に、有意差が見られる場合には各生息地における基本体型をThin plate spline wireframe deformation gridに表示し、体型の違いを確認した。なお、雄は繁殖期においては二次性徴による体型の変化が知られていることから¹⁰⁾、本解析では用いなかった。

b. FA解析

左右対称型の生物においては計数形質に左右性の揺らぎ (Fluctuating asymmetry: FA) がみられることが知られており、FAは遺伝的多様性の間接的な指標だけでなく、集団の適応度の指標になることも報告されている¹¹⁾。このことから、琵琶湖内の13地点 (余呉湖を含む) において採集した579個体 (39-52個体/地点) について、左右の第一鰓弓と胸鰭をアリザリンレッドで染色した後¹²⁾、実体顕微鏡EZ4HD (Leica, Germany) を用いて鰓耙数と胸鰭条数の計数をそれぞれ行った。FAは $[2 \times | \text{右側計数値} - \text{左側計数値} | / \text{左右の計数値の和}]$ により求め、集団間での有意差の有無を調べた。

2) Rad-seq 分析による集団解析

a. 各集団の遺伝的特徴の推定

曽根沼、和邇、沖の白石を除く 11 地点の採集個体の中からランダムに 9-10 個体を選び、計 101 個体を用いて次世代シーケンサーによる Rad-seq 分析を中央水産研究所 (担当: 藤原) に依頼して行った (Rad-seq 分析の詳細については、サブテーマ 1 の不妊化遺伝子搭載魚の作出技術の基盤開発を参照)。Rad-seq 分析により得られたデータについてソフトウェア Stacks¹³⁾を用い、Single nucleotide polymorphism (SNP) 情報を抽出し、遺伝的多様性のパラメーターとして各集団の平均ヘテロ接合度 (H_E) と平均アليل数 (A) をソフトウェア FSTAT 2.9.3.2¹⁴⁾により推定した。また、集団間の遺伝的分化の有無を見るため、ARLEQUIN 3.5.2.2¹⁵⁾により固定指数 (F_{ST}) を求め、 10^5 回のモンテカルロシミュレーションを行う事により、有意差の有無について検定した。なお、検定水準は Sequential Bonferroni 補正¹⁶⁾を行ったものを用いた。

地理的距離による遺伝的隔離の程度を見るため、遺伝的距離として固定指数を線形化したもの ($F_{ST} / (1 - F_{ST})$) と Google Map より求めた地理的距離を用いて Mantel Test を行った。さらに集団間の遺伝的類縁関係を見るため、ソフトウェア Phylip 3.695¹⁷⁾の GENDIST によりアليل頻度情報から Nei の遺伝的距離¹⁸⁾を求め、NEIGHBOR により近隣結合樹を作成した。系統樹の分岐の有意性は 10^5 回のブートストラップ検定を SEQBOOT により行くと共に、系統樹は DRAWTREE を用いて作成した。

b. 繁殖集団数を含めた遺伝的集団構造

Rad-seq 分析により得られた SNP データを使い、ソフトウェア STRUCTURE 2.3.4¹⁹⁾を用いたアサイメントテストにより繁殖集団数 (cluster) の推定を行った。STRUCTURE の計算において、サンプル集団について事前情報なしの admixture モデルと頻度依存モデルを用い、 10^5 回の burn-in

period の後、 10^6 回のベイズシミュレーションを繰り返すことにより $\ln P(D)$ を求めるという作業を 1 から 10 の各 cluster 数 (k) について各 10 回繰り返すことにより行った。最適 cluster 数の決定は Δk method²⁰⁾ により行い、各集団における各 cluster の割合ならびに各個体が帰属する cluster を推定した。

c. 形態的特徴と遺伝的特徴の関係

遺伝的分化と形態分化の関係を見るため、SNP データから得られた集団間の F_{ST} と RWA 解析から得られた集団間の主成分得点差(各集団の主成分得点の平均値の差)の関係について調べた。次に SNP データを用い、ソフトウェア Lositan²¹⁾ を用いた outlier 解析により正の自然選択を受けている可能性の高い座を抽出した。正の自然選択が示唆された座については、集団間の F_{ST} を求め、RWA 解析の結果との対応を調べた。また、FA と遺伝的多様性の関係を見るため、計数形質(鰓耙数、胸鰭条数)の FA と SNP の遺伝的多様性 (H_E と A) の関係について相関を調べた。

3) マイクロサテライト DNA を用いた集団解析

a. マイクロサテライトマーカーの開発

ブルーギルについては既に幾つかマイクロサテライトマーカー (MS) が開発されているものの^{22,23)}、日本産ブルーギルの場合、ファウンダーが 15 個体と遺伝的多様性が低いことから⁵⁾、集団解析において十分な数の分子マーカーがあるとは言い難い状況にある。このため、本サブテーマでは新たにマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

守山で採集された 1 個体から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、454 GS-FLX+ (Roche Applied Sciences) により全ゲノムを対象とした pyrosequencing を行った。得られたデータについてソフトウェア Newbler v2.9 (Roche Applied Sciences) によるアセンブルを行った後、ソフトウェア Auto-Primer pipeline²⁴⁾ によりマイクロサテライト DNA の検出ならびに PCR プライマーのデザインを行った。

得られたマイクロサテライト DNA のうち、motif が 3-6 塩基で長さが 400 bp 以下のものについて PCR による有効性の確認を行った。プライマーペアのうち長鎖については 5' 側に CAG 配列 (5'-CAGTCGGGCGTCATCA 3') を連結させ、5' 末端を 6FAM, VIC, NED, PET のいずれかの蛍光で標識した CAG-tag プライマーと合わせて PCR を行った²⁵⁾。PCR カクテルの組成は、1xPCR Buffer (10 mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), 0.2 mM dNTPs, 0.2 uM 短鎖 primer, 0.02 uM 5' 末端に CAG tag を連結させた長鎖 primer, 0.18 uM 5' 末端を蛍光標識した CAG tag primer, 0.5 units TaKaRa Taq DNA Polymerase (Takara) に 50 ng template DNA を加えて 10 ul とし、Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) により PCR を行った。PCR はタッチダウン法²⁶⁾により、以下のプロトコルで行った。

1st step (5 cycle) : Denature 96°C 20 秒

Annealing 60°C 30 秒

Extension 72°C 1 分

2nd step (21 cycle) : Denature 96°C 30 秒

Annealing (60°C から 50°C まで、cycle 毎に 0.5°C 下げる) 30 秒

Extension 72°C 1 分
 3rd step (10 cycle) : Denature 96°C 30 秒
 Annealing 50°C 30 秒
 Extension 72°C 1 分

PCR は守山で採集した 47 個体を用いて行い、PCR 後、蛍光が異なる PCR 産物を混合し、GeneScan 500LIZ Size Standard (Applied Biosystems) と共に HiDi Formamide (Applied Biosystems) に溶かしたものを Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) 上で電気泳動を行い、ソフトウェア GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) を用いてアレルの検出を行った。明瞭な増幅が確認されたプライマーペアについては、琵琶湖内の 8 地点から採集したサンプル 201 個体 (22-31 個体/地点) を用いて上記と同様の条件で PCR を行い、多型性の有無を確認することにより、以降の分析で用いるプライマーペアを決定した。

b. マイクロサテライトから見た各集団の遺伝的特徴

多型検出において有効性の確認された座を用い、琵琶湖内 (余呉湖を含む) の 13 集団 (21-48 個体/集団) について上記と同様の方法によりアレルの検出を行い、各個体の遺伝子型を決定した。MS の各遺伝子座におけるヌルアレルの検出はソフトウェア Micro-Checker 2.2.3²⁷⁾を用いて行い、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無の確認、ヘテロ接合度の観察値 (H_O) と期待値 (H_E) の計算は GENEPOP 4.2²⁸⁾により行った。なお HWetest において有意水準は Sequential-Bonferroni 補正を行ったものを用いた。各集団のアレルリッチネス (A_R) は FSTAT により求めた。

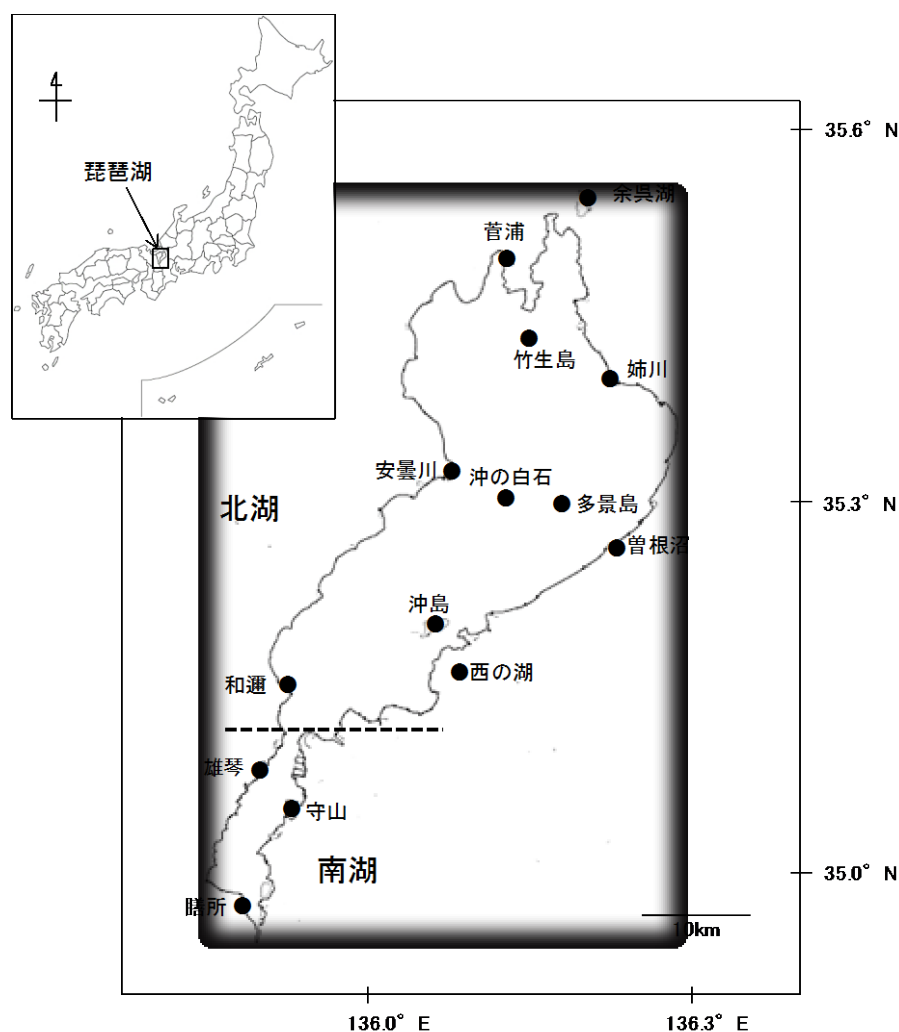
c. 個体移動ならびに分布拡大様式

生息地間における個体移動ならびに分布拡大の中心を明らかにするため、ソフトウェア BayesAss 3.0²⁹⁾と Migrate-n 3.6^{30,31)}の 2 つを用いて推定を行った。BayesAss は過去 2-3 世代における分布拡大の中心と移動様式を推定するものであり、各集団における他集団からの移入個体の割合を推定した。移動推定において Rad-seq 分析の SNP データではなく、MS データを用いた理由は BayesAss が 35 座までしか対応していないことによる。BayesAss の計算においては最初の 5×10^7 回のシミュレーションを burn-in として切り捨てた後、 5×10^8 回の MCMC シミュレーションを行った。データサンプリングは 10^4 回ごとに行った。パラメーターは allele frequencies = 1、inbreeding coefficient = 1、migration rate = 1 とし、マニュアルの指示に従い、Acceptance rate を適正範囲内に抑えるよう設定した。シミュレーションの収束の確認にはソフトウェア TRACER v1.6³²⁾を用いた。また、長期間における移動の推定は Migrate-n により行った。計算はマニュアルに従い、Brownian motion model を用い、分析は ML 法により行った。Migrate-n においてはソフトの仕様により、各集団における他集団からの移入個体を有効集団サイズ (N_e) にて推定した。

d. 有効集団サイズによる各生息地の個体数の推定並びに生命表の作成

平成 26 年から 28 年における琵琶湖の各生息地における有効集団サイズ (N_e) をソフトウェア NeEstimator 2.01³³⁾と Variation of Effective size 1.0 (VarEff)³⁴⁾を用いて行った。NeEstimator は

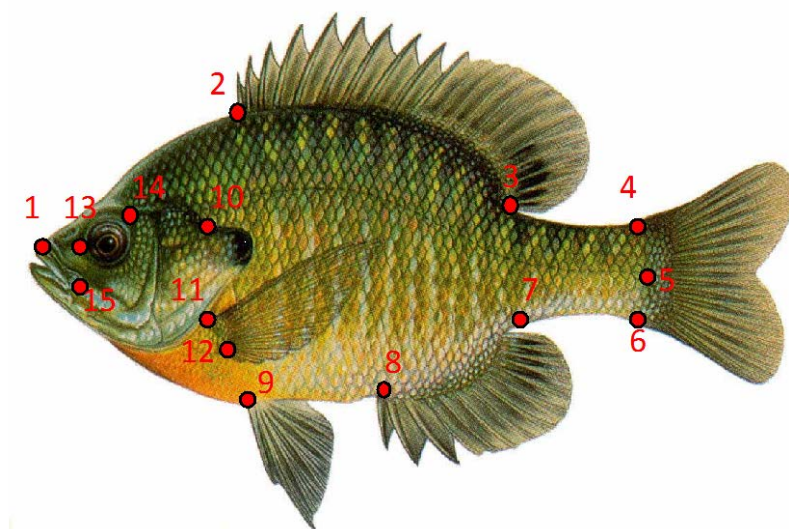
Linkage disequilibrium (LD) 法^{35,36)}と Moment based temporal (Temporal) 法³⁷⁾により N_e を求めるものであるのに対し、VarEff は合祖理論と近似尤度に着目して N_e を求めるものである。また、同様に N_e を用いて生命表を作成した。生命表の作成には各年齢の標本数が多かった平成 27 年採集の個体を用い、LD 法で各年齢の N_e を求めた。さらに平成 27 年採集の成魚サンプルと平成 28 年採集の仔魚サンプルを用い、各年級群の繁殖貢献度の推定を Temporal 法により行った。1 個体当たりの繁殖貢献度は各年級群の繁殖貢献度を各年齢の N_e で除することにより求めた。



図(3)-1 本研究で用いたサンプルの採集地点

表(3)-1 各採集地点における採集個体数

採集地点	2014年	2015年	2016年	Total
余呉湖	50	94	50	194
菅浦	60	71	50	181
竹生島	－	126	50	176
姉川	52	70	50	172
安曇川	50	72	50	172
多景島	－	123	50	173
曾根沼	－	70	－	70
沖島	－	101	3	104
西の湖	52	86	50	188
和邇	51	35	50	136
守山	50	51	50	151
雄琴	－	84	50	134
膳所	66	55	50	171
Total	431	1, 038	553	2, 022



図(3)-2 モルフォメトリー解析で用いたlandmarkの位置

4. 結果及び考察

(1) 結果

1) 形態解析

a. モルフォメトリー解析

平成26年に採集したサンプルについて各採集地点における標準体長組成を調べたところ、図(3)-3の結果となり、琵琶湖のブルーギルは主に0-3歳から構成され、4歳魚以上の個体は極めて少ない事が判った。RWA分析において第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)について調べたところ、第一主成分は体高の高さ、第二主成分は尾柄高の違いによりそれぞれ説明されることが判った(図(3)-4)。PC1は標準体長との間に正の相関が見られたが($p < 0.001$)、PC2については標準体長との間に有意な相関は見られなかった。PC2について集団間で比較を行ったところ、幾つかの組合せにおいて有意差($p < 0.05$)が認められ(表(3)-2)、各集団の特徴について見ると琵琶湖北部と南部は尾柄高が低いのに対し、中部は高い結果となった(図(3)-5)。

b. FA解析

第一鰓弓の鰓耙数と胸鰭条数(何れも左右を平均したもの)について調べると、鰓耙数においては集団間で差は見られなかったが($p > 0.05$)、胸鰭条数においては集団間で差が見られた(図(3)-6)。FAについてみると、鰓耙数と胸鰭条数の何れに置いても集団間で有意差は見られなかった(表(3)-3)。

2) Rad-seq 分析による集団解析

a. 各集団の遺伝的特徴

Rad-seq 分析において計 3,455 遺伝子座の SNP が検出され、 H_0 においては 0.263-0.372、 A においては 1.981-2.067 となった(表(3)-4)。 H_0 は西の湖で最大、雄琴で最小となり、 A は多景島で最大、雄琴で最小となった。集団間における遺伝的多様性の違いについてみたところ、いずれのパラメーターにおいても集団間で有意差が認められた(Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$)(表(3)-5)。 H_0 は半数以上の集団間で有意差がみられたのに対し、 A は一部の集団間においてのみ有意差が認められた。

集団間の遺伝的分化の程度について見ると、一部の集団間で有意な遺伝的分化が見られた(表(3)-6)。特に余呉湖と琵琶湖の集団は遺伝的に大きく分化していることが分かった($p < 0.001$)。一方、離島集団間では有意な遺伝的分化は全く見られなかった($p > 0.05$)。

Mantel test において遺伝的距離と地理的距離の間には有意な正の相関が認められた($p < 0.05$)(図(3)-7)。集団間の遺伝的類縁関係についてみると北湖と南湖の二つに大きく分かれる結果となった(ブートストラップ値：83%)(図(3)-8)。

b. 繁殖集団数を含めた遺伝的集団構造

STRUCTUREを用いたアサイメントテストにおいて、尤度の上昇は k が3から4の間で最大となり、琵琶湖のブルーギルの最適cluster数は4と推定された(図(3)-9)。各 k の値におけるcluster組成を見ると、いずれの集団においても全てのclusterの存在が認められ、集団間で大きな違いは見られなかったものの、clusterの混合比は均一とはならなかった(図(3)-10)。

c. 形態的特徴と遺伝的特徴の関係

RWA解析において集団間で有意差が見られた第二主成分について集団間の平均値の差を求め、SNPの F_{ST} との関係を調べて見たが、両者の間に相関は認められなかった（図(3)-11）。Lositanを用いたOutlier解析（ $\alpha = 0.005$ ）において、正の自然選択を受けている可能性の高い座として9座の存在が指摘され（図(3)-12）、各座について集団間の F_{ST} を求めたところ、6座においては特定の集団の特殊性が示され（表(3)-7）、琵琶湖の北部、中部、南部の集団は遺伝的に識別可能である事が判った。また、胸鰭条数と鰓耙数のFAとSNPの遺伝的多様性パラメーター（ H_0 と A ）の関係について調べて見たところ、何れのパラメーターの組合せにおいても有意な正の相関は見られなかった（図(3)-13）。

3) マイクロサテライト DNA を用いた集団解析

a. マイクロサテライトマーカーの開発

次世代シーケンサーを用いてMSの探索を行ったところ、計6,441のMSが探索された（表(3)-8）。そのうちプライマー設計可能であった605座のうち、60座についてプライマーを設計し、有効性の確認を行った所、20座について明瞭な増幅ならびに多型性が確認された（表(3)-9）。そのうち、多型性の高い座を18座選び、8集団についてHWEの適合度を調べた所、何れの座においても逸脱は見られず、使用可能な座であることが判明した（表(3)-10）

b. 各集団の遺伝的特徴

各集団の3年間（平成26年—28年）における遺伝的多様性（ H_E , A_R ）の変化を調べて見たところ、平成26年は、 H_E が0.528-0.569, A_R が3.974-4.425となり、 H_E は西の湖で最大、余呉湖で最小、 A_R は西の湖で最大、膳所で最小となった（表(3)-11）。平成27年は、 H_E が0.529-0.589, A_R が3.842-4.135とり、 H_E は守山で最大、沖島で最小、 A_R は余呉湖で最大、菅浦で最小となった。平成28年は、 H_E が0.519-0.562, A_R が3.692-4.236となり、 H_E は守山で最大、和邇で最小、 A_R は安曇川で最大、膳所で最小となった。集団間で遺伝的多様性の有意差について検定を行ったところ、 H_E と A_R はいずれの年においても有意差は認められなかった（Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$ ）。また、遺伝的多様性は個々の生息地だけでなく琵琶湖全体においても、減少傾向が見られた。

c. 個体移動ならびに分布拡大様式

BayesAssを用い、過去3世代における移動の推定を行ったところ、いずれの生息地においても約3割の個体は他集団から移入個体となり、特に西の湖からの移入が10-20%と高い結果となった（表(3)-12）。Migrate-nを用いた長期における移動の推定においては、守山・安曇川からの分散が大きく、移入先として多景島が最大となった（表(3)-13）。

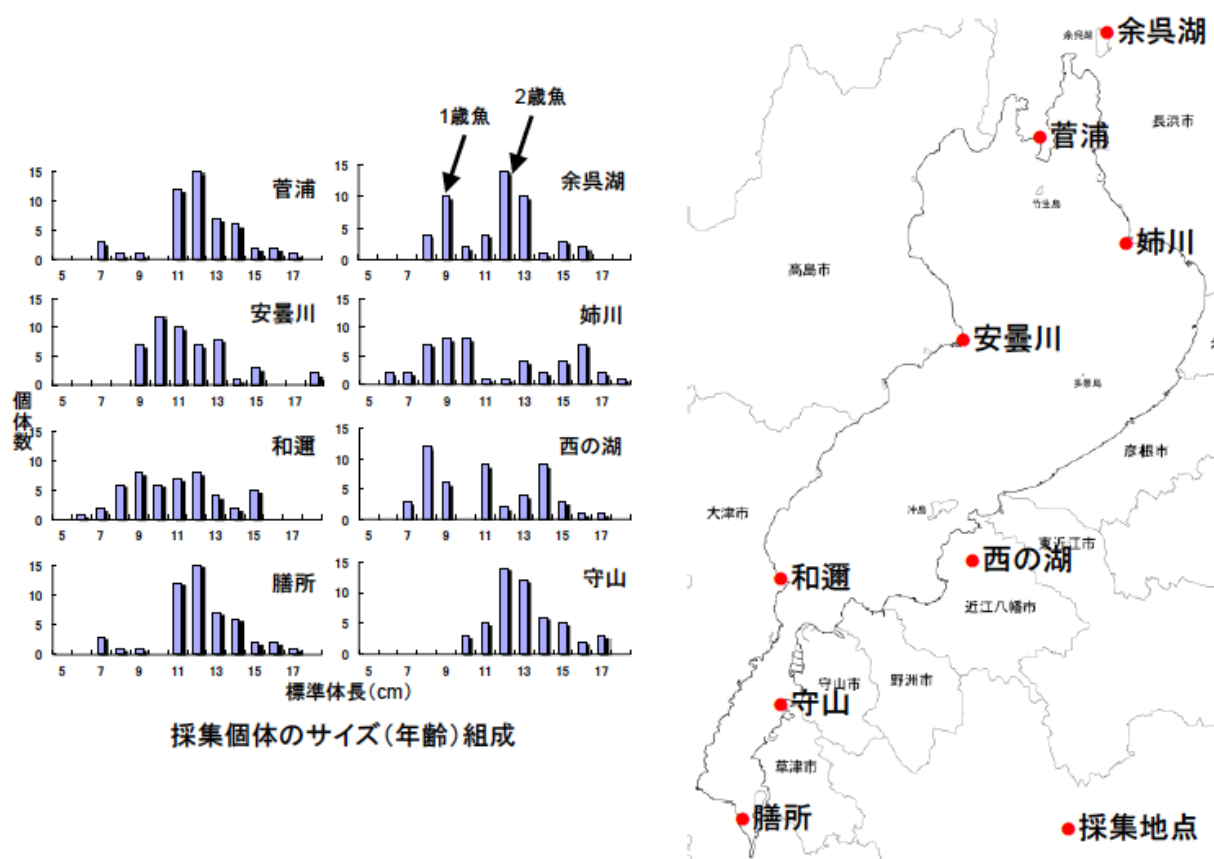
d. 個体数の推定並びに生命表の作成

琵琶湖全体における各年の N_e を推定したところLD法においては平成28年が最大となり、次いで27年、26年の結果となった（表(3)-14）。Temporal法において平成26年よりも27年の方が大きい結果となった。VarEffを用いた推定では平成26年が最大で28年が最少となった。LD法、Temporal

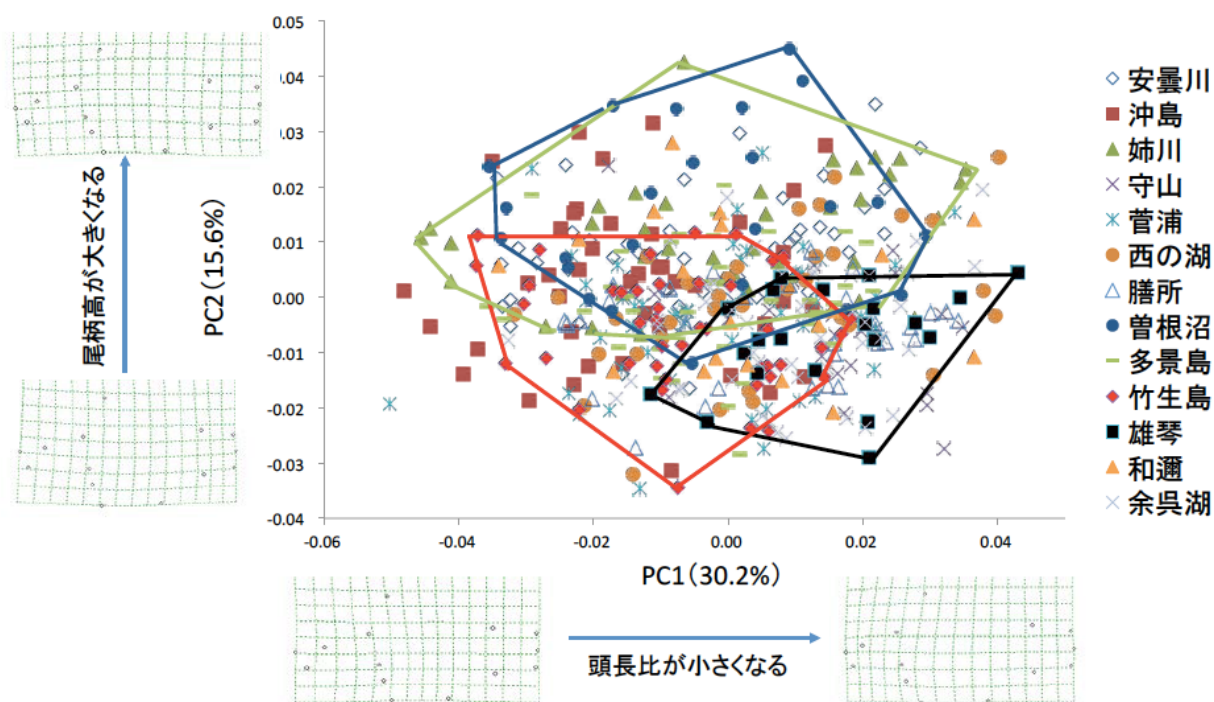
法では経年に伴い N_e は増加したのに対し、VarEffでは減少した。

VarEffを用いて各年における各集団の N_e を推定したところ、膳所が最大で、次いで守山、雄琴となり、全体的特徴として南湖集団の N_e が大きい結果となった（表(3)-15）。また各地点の N_e の経年変化を見てみるといずれの集団においても減少傾向がみられた。

LD法を用いて各年齢の N_e に基づく生命表を作成したところ、3歳魚から4歳魚にかけて N_e の減少が大きい結果となった（表(3)-16）。0歳魚の N_e はサンプル数が少ないことから無限大となった。Temporal法を用いて年齢別の繁殖貢献度を推定したところ、繁殖貢献度は加齢に伴い上昇し（表(3)-17）、1個体当たりの繁殖貢献度は5歳魚で最大となった（表(3)-18）。



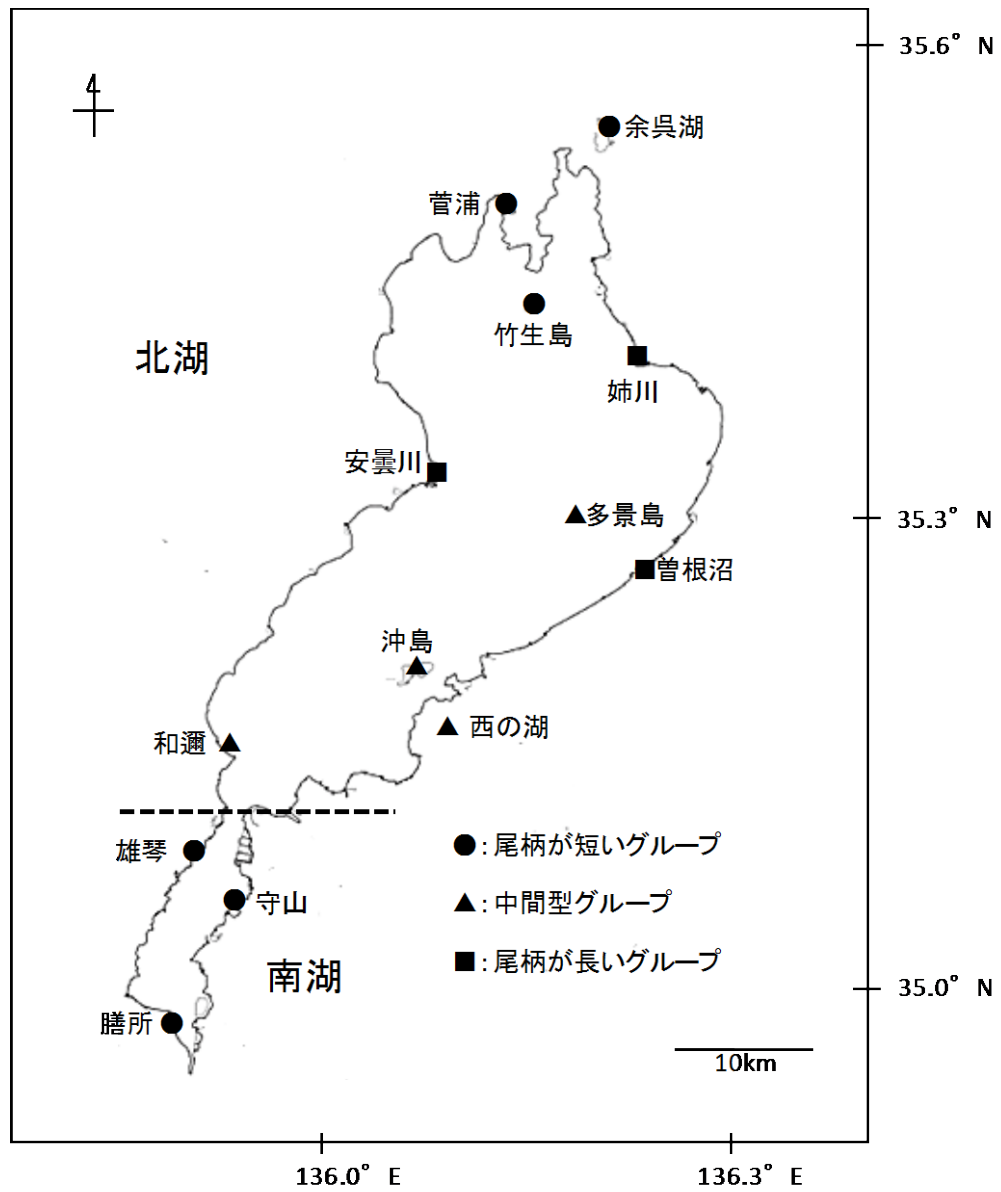
図(3)-3 各採集地点におけるサイズ組成



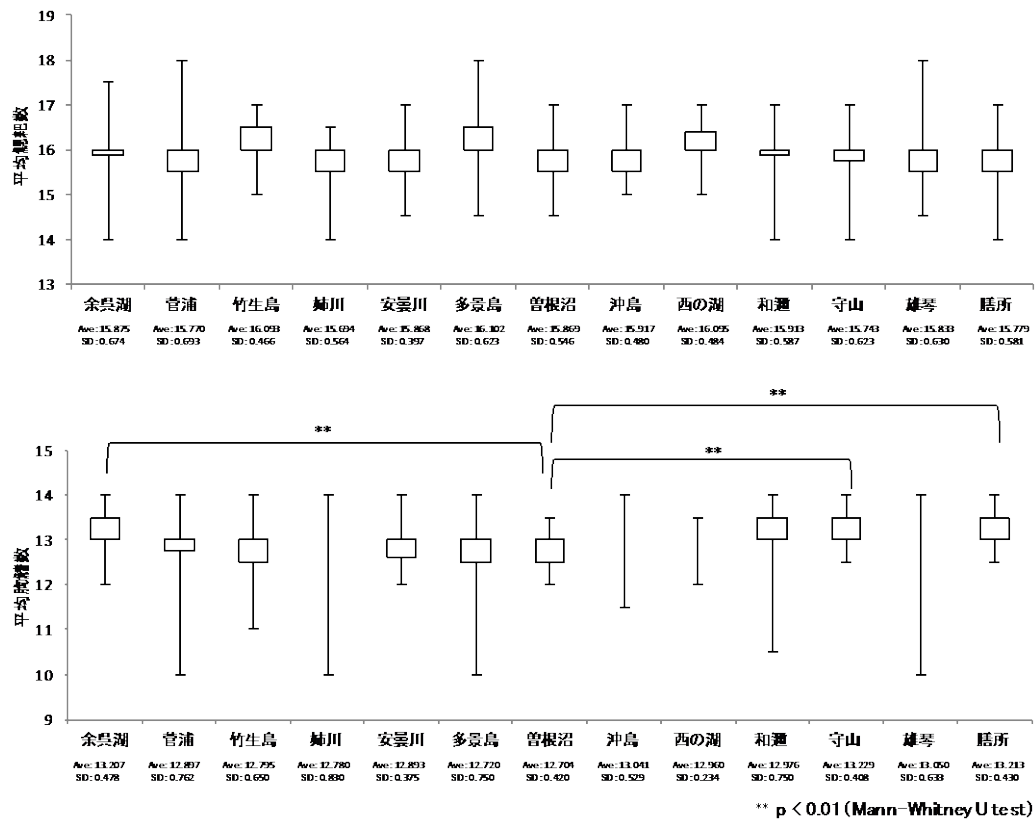
図(3)-4 Relative warp analysisを用いたモルフォメトリ解析の結果

表(3)-2 RWAのPC2に見る集団間の違い

	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	曾根沼	沖島	西の湖	和邇	守山	雄琴	膳所
余呉湖													
菅浦	1.000												
竹生島	1.000	1.000											
姉川	0.000	0.005	0.001										
安曇川	0.004	0.076	0.014	1.000									
多景島	0.990	1.000	0.998	0.100	0.522								
曾根沼	0.001	0.015	0.003	1.000	0.999	0.149							
沖島	0.667	0.969	0.802	0.646	0.980	1.000	0.657						
西の湖	0.989	1.000	0.997	0.233	0.735	1.000	0.275	1.000					
和邇	0.995	1.000	0.998	0.659	0.959	1.000	0.633	1.000	1.000				
守山	1.000	1.000	1.000	0.004	0.050	0.996	0.008	0.824	0.994	0.996			
雄琴	1.000	1.000	1.000	0.004	0.044	0.987	0.007	0.757	0.985	0.990	1.000		
膳所	1.000	1.000	1.000	0.001	0.011	0.985	0.002	0.676	0.983	0.990	1.000	1.000	



図(3)-5 モルフォメトリー分析においてみられた各集団における体型の違い



図(3)-6 各集団における鰓耙数と胸鰭条数 (いずれも左右の平均値)

表(3)-3 各集団間における胸鰭条数、鰓耙数のFAの違い (鰓耙のFA\胸鰭のFA)

胸鰭FA/鰓耙FA	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	曾根沼	沖島	西の湖	和邇	守山	雄琴	膳所
余呉湖	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.994
菅浦	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.997	1.000	0.983	1.000	1.000
竹生島	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.992	1.000	0.972	1.000	1.000
姉川	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000
安曇川	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.995	1.000	1.000
多景島	0.813	0.998	0.991	0.993	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.994
曾根沼	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.997
沖島	1.000	0.995	1.000	0.999	1.000	0.617	0.962	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000
西の湖	0.997	0.698	0.925	0.869	0.959	0.098	0.477	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	0.874
和邇	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	0.653	1.000	0.989	1.000	1.000
守山	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.846	0.996	1.000	0.996	1.000	1.000	0.999	0.736
雄琴	1.000	0.996	1.000	1.000	1.000	0.642	0.969	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000
膳所	1.000	0.967	0.998	0.995	1.000	0.356	0.862	1.000	1.000	0.950	1.000	1.000	1.000

表(3)-4 Rad-seq分析による各集団の遺伝的多様性

Rad-seq analysis (3,455locus)			
集団	n	H_0	A
余呉湖	9	0.283	2.028
菅浦	10	0.321	2.056
竹生島	9	0.300	2.030
姉川	9	0.298	2.046
安曇川	10	0.312	2.051
多景島	10	0.297	2.067
曾根沼	-	-	-
沖島	9	0.314	2.035
西の湖	10	0.327	2.051
和邇	-	-	-
守山	9	0.312	2.026
雄琴	7	0.263	1.981
膳所	9	0.272	2.055
Total	101	0.300	2.039

n : 分析個体数, H_0 : ヘテロ接合度の観察値, A : 平均アレル数

表(3)-5 集団間における遺伝的多様性の違い (Rad-seq分析)

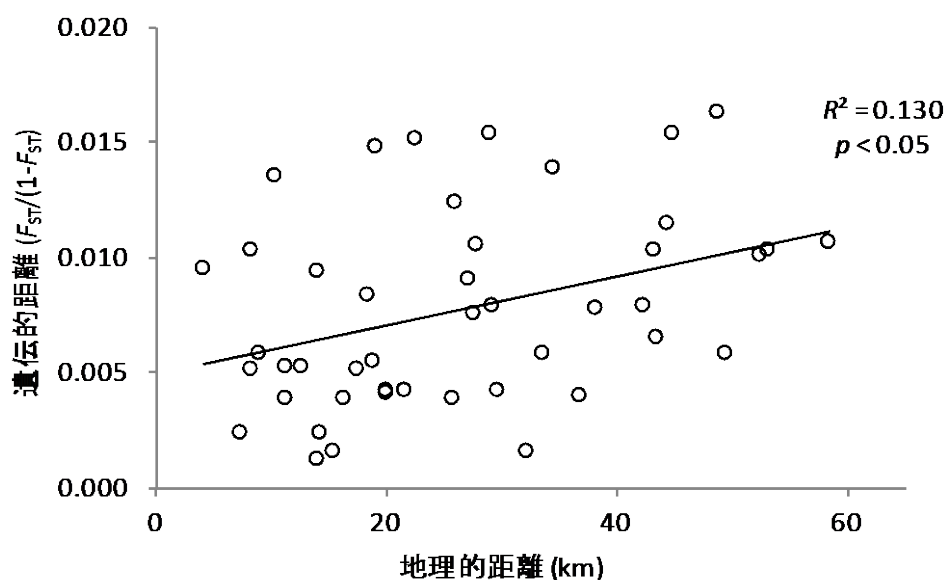
<i>HolA</i>	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	沖島	西の湖	守山	雄琴	膳所
余呉湖	-	1.000	1.000	1.000	1.000	0.825	1.000	1.000	1.000	0.156	1.000
菅浦	0.000***	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000**	1.000
竹生島	0.275	0.012	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.122	1.000
姉川	1.000	0.000**	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.002	1.000
安曇川	0.000**	1.000	1.000	0.418	-	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000**	1.000
多景島	1.000	0.000***	1.000	1.000	0.036	-	1.000	1.000	0.574	0.000***	1.000
沖島	0.000***	1.000	0.104	0.004	1.000	0.000**	-	1.000	1.000	0.034	1.000
西の湖	0.000***	1.000	0.000***	0.000***	0.017	0.000***	1.000	-	1.000	0.000**	1.000
守山	0.000***	1.000	0.086	0.003	1.000	0.000**	1.000	1.000	-	0.236	1.000
雄琴	0.418	0.000***	0.000***	0.000**	0.000***	0.006	0.000***	0.000***	0.000***	-	0.000**
膳所	0.009	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000**	0.000***	0.000***	0.000***	1.000	-

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 検定水準についてはSequential Bonferroni補正 (Rice, 1989) を行った.

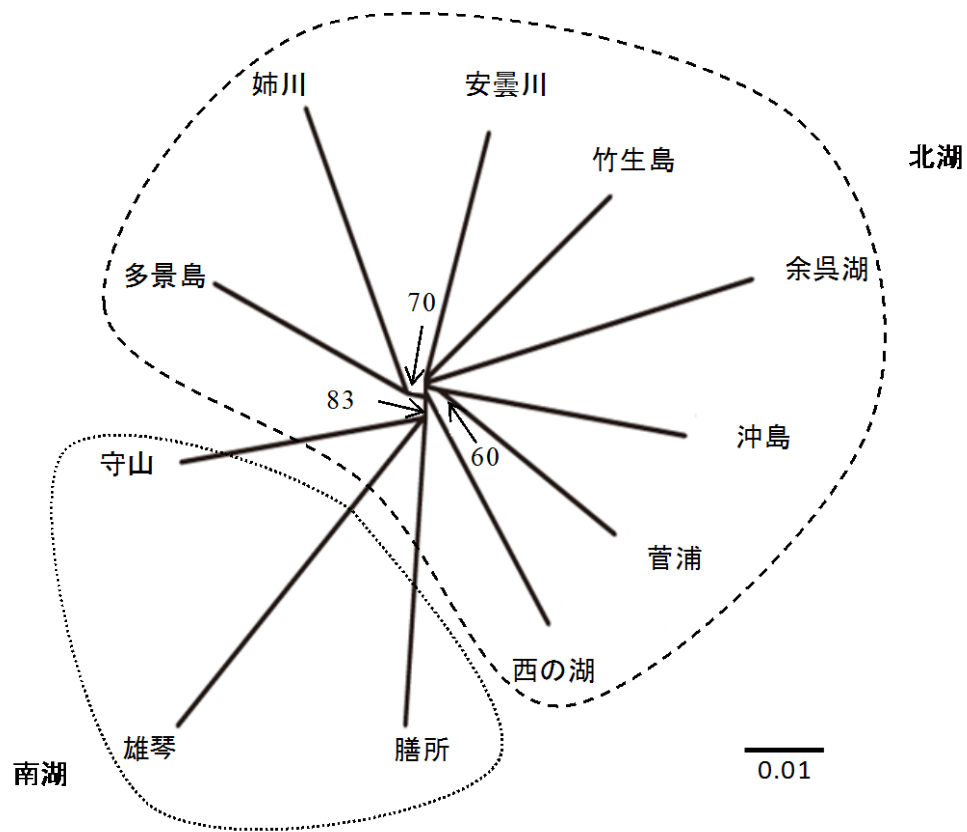
表(3)-6 集団間における遺伝的分化の程度（固定指数： F_{ST} ）（Rad-seq分析）

F_{ST}/P 値	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	沖島	西の湖	守山	雄琴	膳所
余呉湖		0.000**	0.001	0.000**	0.000***	0.000***	0.000**	0.000***	0.000***	0.000**	0.000**
菅浦	0.014		0.505	0.005	0.099	0.283	0.447	0.031	0.033	0.000**	0.011
竹生島	0.014	0.002		0.022	0.596	0.928	0.357	0.162	0.113	0.248	0.118
姉川	0.019	0.009	0.010		0.208	0.669	0.001*	0.019	0.007	0.01	0.099
安曇川	0.014	0.004	0.002	0.005		0.191	0.054	0.014	0.009	0.003	0.147
多景島	0.020	0.004	0.001	0.004	0.005		0.833	0.254	0.189	0.029	0.349
沖島	0.019	0.002	0.004	0.012	0.005	0.002		0.032	0.01	0.003	0.076
西の湖	0.016	0.004	0.004	0.008	0.005	0.004	0.005		0.065	0.000**	0.002
守山	0.017	0.006	0.006	0.011	0.008	0.006	0.008	0.004		0.189	0.543
雄琴	0.025	0.016	0.010	0.015	0.015	0.014	0.015	0.015	0.009		0.281
膳所	0.023	0.011	0.010	0.010	0.008	0.008	0.009	0.01	0.006	0.013	

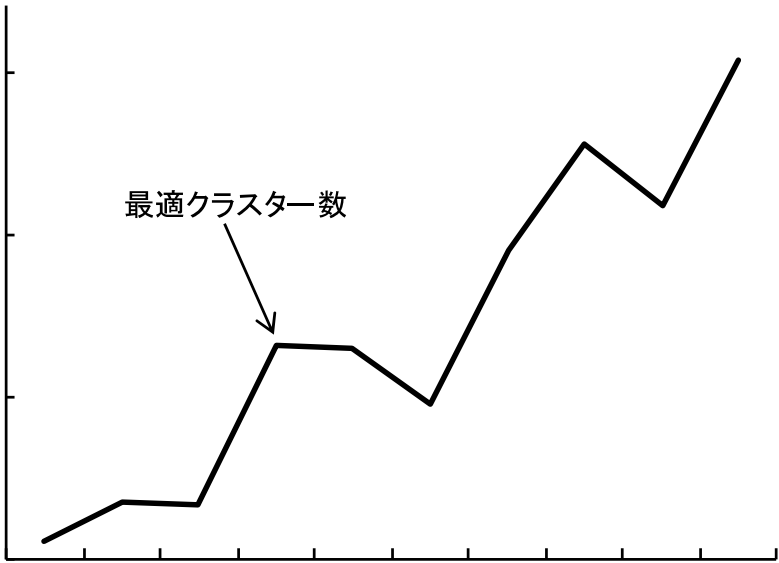
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 検定水準についてはSequential Bonferroni 補正 (Rice, 1989) を行った。



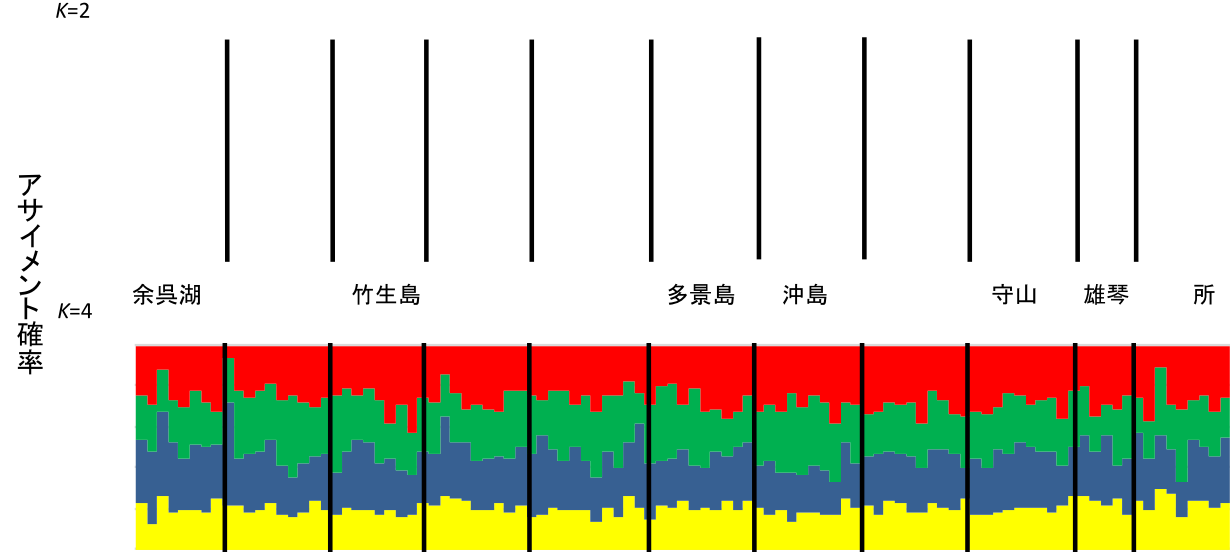
図(3)-7 Mantel testによる琵琶湖の各集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係



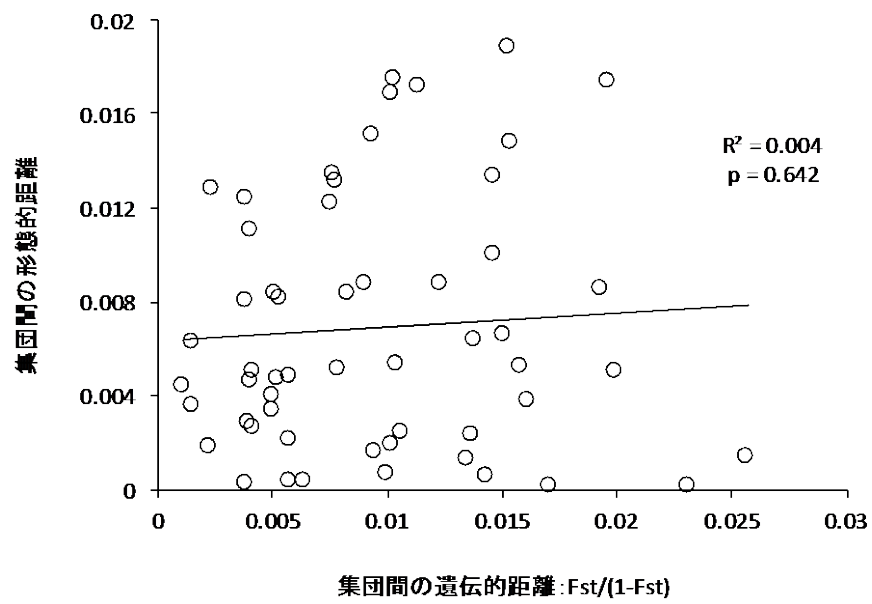
図(3)-8 近隣結合法による琵琶湖の各集団間の遺伝的關係
ノード上の数値はブートストラップ値(10⁵回)をバーは遺伝的距離を表す。



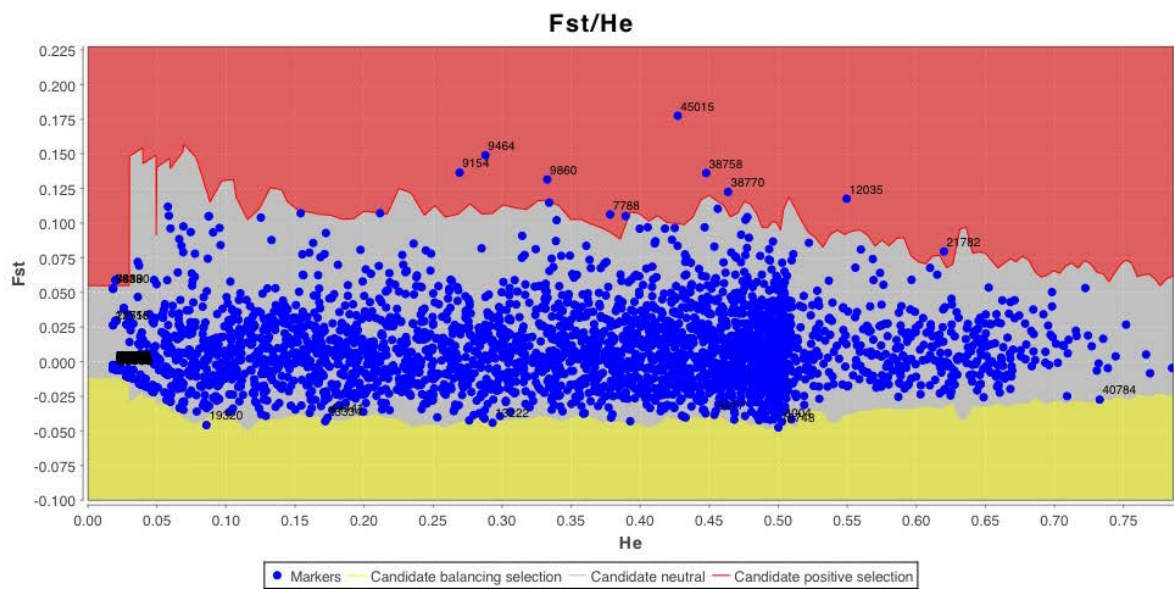
図(3)-9 STRUCTUREにおけるKと $Ln P(D)$ の関係



図(3)-10 STRUCTUREによる繁殖集団数の推定



図(3)-11 遺伝的距離と形態的距離. 形態的距離はRWAのPC2の平均値の差を用いた

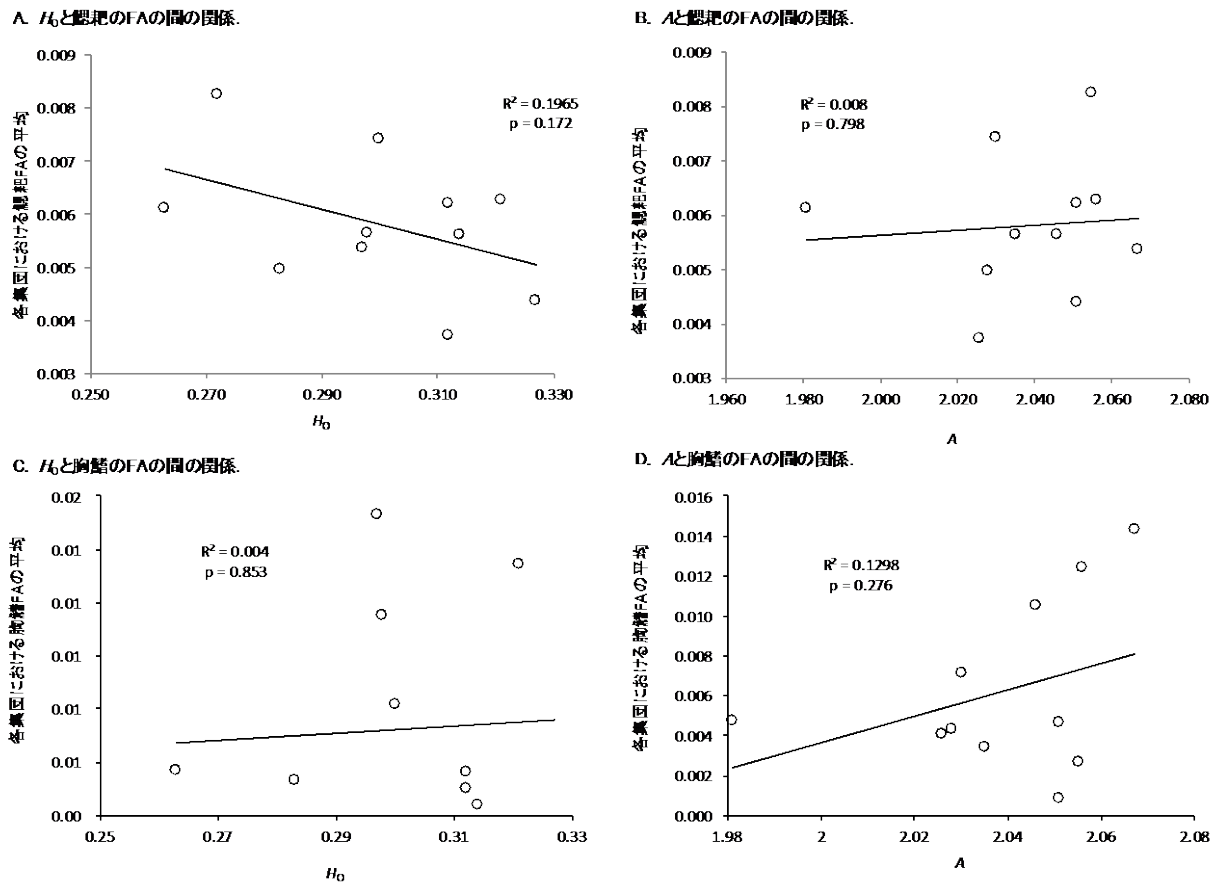


図(3)-12 LositanによるOutlier解析の結果

表(3)-7 正の自然選択が示唆されたRad-seq分析の9860座における集団間での遺伝的分化の程度

F_{ST}/p 値	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	沖島	西の湖	守山	雄琴	膳所
余呉湖		0.136	0.293	1	0.722	0.46	0.712	0.346	0.625	0.636	0.01
菅浦	0.073		1	0.303	0.119	1	0.05	1	0.586	0.533	0
竹生島	0.057	-0.055		0.575	0.122	1	0.112	1	1	0.547	0
姉川	-0.048	0.018	0.005		0.475	0.716	0.455	0.624	1	1	0.002
安曇川	-0.039	0.153	0.135	-0.005		0.346	1	0.261	0.271	0.45	0.047
多景島	0.002	-0.034	-0.041	-0.035	0.071		0.198	1	1	1	0.004
沖島	-0.027	0.193	0.173	0.017	-0.053	0.104		0.129	0.252	0.439	0.078
西の湖	0.002	-0.034	-0.041	-0.035	0.071	-0.053	0.104		1	1	0
守山	-0.013	-0.029	-0.038	-0.045	0.052	-0.055	0.082	-0.055		1	0.001
雄琴	-0.046	-0.009	-0.021	-0.066	0.006	-0.055	0.031	-0.055	-0.063		0.002
膳所	0.249	0.519	0.498	0.326	0.157	0.435	0.118	0.435	0.409	0.344	

*膳所集団は他集団と有意に異なる



図(3)-13 遺伝的多様性とFAの関係. H_0 : 平均ヘテロ接合度, A : 平均アレル数

表(3)-8 次世代シーケンサーによるブルーギルのマイクロサテライト (MS) 探索の結果

	繰り返し(motif)の長さ (bp)				total
	2	3	4	5	
探索された座の数	5,074	661	595	111	6,441
プライマー設計可能な座の数	426	99	66	14	605
プライマーをデザインした座の数※		30	30		60
PCRで増幅ならびに体型性が確認された座の数		4	16		20

※アレルサイズが100-300bpのものを対象

表 (3)-9 本課題において開発されたマイクロサテライトマーカー

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	N_A	Size range (bp)	H_O	H_E	HWE p value	GenBank accession no.
LM308	F: (CAG)ACTGGGTCTCAGCTCCAGTTTCTTA R: CGCTTCTACAAAGCTCTCCATCT	(GCA) 8	5	209-224	0.404	0.422	0.581	LC120782
LM314	F: (CAG)AAGACAACACTCCTTCCATGCT R: TAGATGGTCTTGATGGATCGTG	(CAA) 9	2	282-291	0.277	0.300	0.621	LC120783
LM315	F: (CAG)TATAAGCAGAGAAATACCCCGC R: TCACCATAACCCACTGATGAAG	(AAC) 10	4	203-221	0.532	0.640	0.335	LC120784
LM330	F: (CAG)GCACATTTCTGCTACTACGTTCT R: CCTGCAAGTTACTAGTGCCAAC	(GAA) 28	4	266-290	0.489	0.606	0.308	LC120785
LM338	F: (CAG)AGGGAAAGGTATGGAGGATGAT R: GAAAAAGACGGGGGAATTAATAAG	(GAT) 15	3	141-147	0.273	0.332	0.471	LC126287
LM341	F: (CAG)TAATTTTCATCCCAACCTCATCC R: GAGGTATCTTCCACCATTGAGC	(ATT) 10	2	213-222	0.462	0.494	1.000	LC126289
LM401	F: (CAG)ATGAGCAGCAAAACACACTAA R: ATGGGCATGTCTATAAGCTGAA	(ATAG) 1	7	162-202	0.851	0.776	0.804	LC120786
LM402	F: (CAG)CTGTGCGCAAAACAGGATAAAT R: GAGATTATATCTCCACGCTGGC	(ATCC) 20	8	216-260	0.830	0.841	0.549	LC120787
LM410	F: (CAG)GTGCCTAGAAATCATGTCCCTC R: GGACCCGACAAGTTCAAATAGA	(CTTT) 12	2	123-131	0.213	0.225	0.553	LC120788
LM414	F: (CAG)TGAACCCCTGCATCCTAGAATTT R: GTAAATGGTGTGATGTGTGCC	(TAGA) 7	4	294-306	0.617	0.632	0.897	LC120790
LM415	F: (CAG)AACTGTCTCTCTCACGTCCCTC R: TTCAACACCAAGGTTTCACTG	(CTCA) 10	8	235-311	0.660	0.705	0.318	LC120791
LM419	F: (CAG)GTGACTCCATACAGCCACCATA R: ATTGCACATATACCACTCTGCG	(CTAA) 30	17	196-292	0.872	0.888	0.564	LC120793
LM420	F: (CAG)TGTGAGAAAAAGAGAGTGACGC R: TTAATAAGGCTTTATCTGCGGC	(GGCA) 7	2	243-247	0.532	0.482	0.546	LC120794
LM421	F: (CAG)TGTTCAATTTCTGCCTGACAGT R: CGTACATCAAAACAGATTTCGGA	(TTCC) 7	2	152-160	0.319	0.271	0.578	LC120795
LM422	F: (CAG)TACGGAAGGGAAGAAGTCAA R: CTCAACTTAAATATACCCGGCAG	(ATAT) 12	4	222-258	0.553	0.694	0.156	LC120796
LM423	F: (CAG)AAAAATCTGTAGCAAGCAAGCC R: ACATCTTCTTCGGTCTCTTTGC	(ATCC) 6	2	270-278	0.532	0.490	0.766	LC120797
LM425	F: (CAG)AGTGCATTCTCCATCAAAGGTT R: TTATGCCATGTCATCTCCTGTC	(TATT) 7	4	232-256	0.383	0.425	0.008	LC120798
LM426	F: (CAG)GGCTTTAACTGTTAGTTATTGAGGC R: TACGGAAGCACAGAGAGATCAA	(TTTA) 8	4	125-149	0.489	0.645	0.077	LC120799
LM427	F: (CAG)TAGACTTGCGTCTGTCTCATCAT R: CTTCAGTATAGTTGGTGCTGCG	(GAAT) 7	3	214-222	0.553	0.535	0.395	LC120800
LM428	F: (CAG)TTTCTGCAAAATGCTACCTGAGA R: TTCTGCTGCAACTCGAAATCTA	(GATG) 9	3	163-171	0.468	0.404	0.463	LC120801
LM503	F: (CAG)CAACATTACGTGTACGGTCAT R: CTGTCTTCCAGTATCCTTTGGG	(GGTGA) 3	3	153-173	0.625	0.573	0.494	LC126291
LM505	F: (CAG)TAATTCTAATCAGGCGTGTTCCA R: TTGATGAATAATCTTTGCACGG	(TAATA) 3	3	304-314	0.231	0.481	0.094	LC126292
LM508	F: (CAG)TGTTCATAACACCGACAGGAG R: GTTTCATGTTCCCCATGTCT	(AACCT) 2	2	105-120	0.120	0.185	0.201	LC126295
LM509	F: (CAG)TTTCCAGCTTTTCCAGTG R: GGCGGAGTGGTCACTATTACTC	(GGAGA) 2	2	304-309	0.162	0.196	0.346	LC126296

N_A , アリル数; H_O , ヘテロ接合度 (観察値); H_E , ヘテロ接合度 (期待値); (CAG), 5' 末端に CAGTCGGGCGTCATCA 配列を連結. 何れの座に置いても HWE からの逸脱は見られず (有意水準は sequential Bonferroni 補正を行ったものを仕様, $p = 0.05$).

表(3)-10 本課題において開発されたマイクロサテライトマーカー18座から見た琵琶湖（余呉湖を含む）の8集団の遺伝的特徴

Locus		余呉湖	菅浦	姉川	安曇川	西の湖	和邇	守山	膳所
LM308	n	22	26	28	25	31	26	21	22
	A_R	3	5	4	5	3	5	3	3
	H_E	0.320	0.554	0.418	0.191	0.394	0.365	0.223	0.318
	H_0	0.364	0.654	0.393	0.200	0.290	0.385	0.095	0.273
	F_{IS}	-0.135	-0.181	0.06	-0.048	0.262	-0.055	0.572	0.143
LM314	A_R	2	2	3	2	3	2	2	3
	H_E	0.089	0.317	0.168	0.302	0.233	0.265	0.286	0.279
	H_0	0.091	0.308	0.179	0.280	0.194	0.308	0.238	0.318
	F_{IS}	-0.024	0.029	-0.063	0.072	0.169	-0.163	0.167	-0.14
LM315	A_R	3	4	3	3	3	3	3	3
	H_E	0.640	0.677	0.660	0.675	0.609	0.603	0.594	0.630
	H_0	0.546	0.654	0.607	0.720	0.484	0.654	0.381	0.500
	F_{IS}	0.147	0.034	0.08	-0.067	0.205	-0.084	0.359	0.206
LM330	A_R	4	3	3	3	3	3	4	3
	H_E	0.614	0.571	0.603	0.647	0.654	0.558	0.637	0.640
	H_0	0.818	0.500	0.607	0.640	0.774	0.615	0.476	0.636
	F_{IS}	-0.333	0.124	-0.007	0.01	-0.184	-0.103	0.252	0.005
LM401	A_R	5	7	6	6	8	6	6	5
	H_E	0.689	0.785	0.763	0.817	0.767	0.805	0.775	0.656
	H_0	0.636	0.885	0.750	0.760	0.871	0.769	0.810	0.818
	F_{IS}	0.077	-0.126	0.017	0.069	-0.135	0.045	-0.045	-0.248
LM402	A_R	8	8	8	9	9	8	7	7
	H_E	0.846	0.853	0.827	0.853	0.854	0.832	0.829	0.814
	H_0	0.864	0.846	0.750	0.760	0.774	0.885	0.810	0.909
	F_{IS}	-0.02	0.008	0.094	0.109	0.094	-0.063	0.023	-0.117
LM410	A_R	2	2	2	2	3	2	2	2
	H_E	0.333	0.208	0.320	0.327	0.343	0.292	0.252	0.169
	H_0	0.318	0.231	0.393	0.320	0.387	0.269	0.191	0.182
	F_{IS}	0.045	-0.111	-0.227	0.02	-0.13	0.079	0.245	-0.077
LM414	A_R	5	4	4	5	4	5	4	4
	H_E	0.471	0.646	0.554	0.609	0.533	0.643	0.619	0.581
	H_0	0.409	0.654	0.500	0.640	0.516	0.654	0.571	0.500
	F_{IS}	0.131	-0.012	0.097	-0.051	0.032	-0.017	0.077	0.14
LM415	A_R	8	7	8	7	8	7	8	7
	H_E	0.603	0.729	0.771	0.702	0.809	0.761	0.671	0.817
	H_0	0.682	0.615	0.750	0.680	0.807	0.654	0.714	0.955
	F_{IS}	-0.131	0.156	0.027	0.031	0.003	0.141	-0.064	-0.168
LM419	A_R	15	14	12	11	17	15	16	13
	H_E	0.920	0.891	0.900	0.896	0.890	0.899	0.877	0.899
	H_0	0.818	0.962	0.964	0.800	0.936	0.885	0.762	0.909
	F_{IS}	0.111	-0.079	-0.071	0.107	-0.051	0.016	0.132	-0.011
LM420	A_R	2	2	2	2	2	2	2	2
	H_E	0.504	0.483	0.487	0.507	0.502	0.503	0.491	0.507
	H_0	0.636	0.462	0.429	0.520	0.581	0.500	0.619	0.682
	F_{IS}	-0.262	0.045	0.12	-0.026	-0.156	0.006	-0.262	-0.346
LM421	A_R	2	2	3	5	2	3	2	3
	H_E	0.089	0.237	0.310	0.416	0.275	0.373	0.314	0.470
	H_0	0.091	0.269	0.286	0.240	0.258	0.231	0.381	0.455
	F_{IS}	-0.024	-0.136	0.077	0.423	0.063	0.381	-0.212	0.032
LM422	A_R	3	4	3	5	4	4	4	4
	H_E	0.657	0.700	0.606	0.663	0.693	0.685	0.698	0.689
	H_0	0.727	0.654	0.464	0.680	0.581	0.539	0.429	0.636
	F_{IS}	-0.107	0.066	0.234	-0.025	0.162	0.214	0.386	0.077
LM423	A_R	2	2	2	2	2	2	2	2
	H_E	0.511	0.506	0.447	0.488	0.445	0.505	0.469	0.387
	H_0	0.546	0.539	0.286	0.560	0.387	0.423	0.524	0.227
	F_{IS}	-0.068	-0.064	0.361	-0.147	0.13	0.162	-0.117	0.413
LM425	A_R	3	3	4	3	4	3	3	3
	H_E	0.547	0.439	0.639	0.598	0.593	0.409	0.407	0.537
	H_0	0.636	0.346	0.607	0.600	0.645	0.423	0.429	0.591
	F_{IS}	-0.164	0.212*	0.05	-0.004	-0.088	-0.034	-0.053	-0.101
LM426	A_R	4	4	3	3	3	3	3	4
	H_E	0.658	0.640	0.638	0.633	0.645	0.675	0.652	0.683
	H_0	0.409	0.423	0.607	0.560	0.677	0.500	0.571	0.546
	F_{IS}	0.378	0.339	0.048	0.115	-0.05	0.26	0.124	0.201
LM427	A_R	3	2	2	2	3	3	3	2
	H_E	0.556	0.509	0.499	0.503	0.523	0.526	0.574	0.504
	H_0	0.455	0.500	0.500	0.480	0.419	0.577	0.619	0.636
	F_{IS}	0.183	0.018	-0.003	0.046	0.198	-0.096	-0.079	-0.262
LM428	A_R	2	2	3	2	2	3	2	2
	H_E	0.461	0.382	0.351	0.372	0.480	0.457	0.436	0.487
	H_0	0.409	0.423	0.321	0.400	0.645	0.385	0.524	0.409
	F_{IS}	0.113	-0.109	0.083	-0.076	-0.345	0.158	-0.202	0.16

	A_R	4.167	4.278	4.222	4.611	4.278	4.389	4.222	4.000
Average for	H_e	0.528	0.563	0.553	0.567	0.569	0.564	0.545	0.559
all loci	H_0	0.525	0.551	0.522	0.547	0.568	0.536	0.508	0.566
	F_{IS}	0.006	0.020	0.057	0.035	0.002	0.050	0.067	-0.011

n , サンプル数; A_R , アリル数; H_0 , ヘテロ接合度 (観察値); H_e , ヘテロ接合度 (期待値); F_{IS} , 近交係数. 有意水準はsequential Bonferroni補正を行ったものを使用 ($p = 0.05$).

表(3)-11 マイクロサテライトマーカー18座から見た各集団の遺伝的多様性の経年変化

調査年度	2014				2015				2016			
集団	n	H_0	H_e	A_R	n	H_0	H_e	A_R	n	H_0	H_e	A_R
余呉湖	22	0.525	0.528	4.167	20	0.520	0.557	4.135	20	0.553	0.537	3.891
菅浦	26	0.551	0.563	4.120	20	0.578	0.573	3.842	20	0.525	0.537	3.870
竹生島	-	-	-	-	48	0.531	0.563	3.952	20	0.534	0.552	4.029
姉川	28	0.522	0.553	4.019	19	0.496	0.534	3.904	20	0.485	0.534	3.991
安曇川	25	0.547	0.567	4.160	20	0.589	0.564	4.079	20	0.522	0.558	4.236
多景島	-	-	-	-	34	0.467	0.540	4.076	20	0.514	0.545	3.819
曾根沼	-	-	-	-	24	0.526	0.543	4.033	-	-	-	-
沖島	-	-	-	-	32	0.500	0.529	3.984	-	-	-	-
西の湖	31	0.568	0.569	4.425	20	0.485	0.563	4.059	20	0.542	0.544	4.032
和邇	26	0.536	0.564	4.249	20	0.546	0.569	3.903	20	0.535	0.519	3.975
守山	21	0.508	0.545	4.167	20	0.593	0.581	4.027	20	0.584	0.562	4.097
雄琴	-	-	-	-	30	0.508	0.554	4.007	20	0.535	0.558	3.834
膳所	22	0.566	0.559	3.974	20	0.507	0.566	3.998	20	0.528	0.554	3.692
total	201	0.540	0.556	4.103	327	0.526	0.557	4.000	220	0.532	0.545	3.951

n , サンプル数; A_R , アリル数; H_0 , ヘテロ接合度 (観察値); H_e , ヘテロ接合度 (期待値)

表(3)-12 BayesAssによる過去3世代における移入 (%) の推定

To/From	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	曾根沼	沖島	西の湖	和邇	守山	雄琴	膳所
菅浦	0.679	0.012	0.094	0.012	0.012	0.012	0.012	0.120	0.012	0.012	0.012	0.012
竹生島	0.010	0.677	0.089	0.011	0.011	0.011	0.011	0.138	0.012	0.010	0.011	0.011
姉川	0.011	0.012	0.716	0.012	0.011	0.011	0.011	0.164	0.020	0.011	0.011	0.011
安曇川	0.011	0.011	0.077	0.678	0.011	0.011	0.011	0.148	0.011	0.011	0.011	0.011
多景島	0.012	0.012	0.107	0.013	0.678	0.012	0.012	0.110	0.012	0.011	0.012	0.012
曾根沼	0.010	0.011	0.046	0.013	0.011	0.677	0.010	0.180	0.011	0.010	0.011	0.010
沖島	0.011	0.011	0.026	0.011	0.011	0.011	0.677	0.201	0.012	0.011	0.010	0.010
西の湖	0.011	0.013	0.106	0.012	0.011	0.011	0.011	0.772	0.021	0.011	0.011	0.011
和邇	0.011	0.011	0.036	0.011	0.011	0.011	0.011	0.182	0.688	0.011	0.011	0.010
守山	0.010	0.011	0.070	0.011	0.010	0.010	0.010	0.159	0.011	0.677	0.010	0.010
雄琴	0.011	0.011	0.069	0.012	0.011	0.011	0.011	0.155	0.012	0.011	0.678	0.011
膳所	0.011	0.011	0.111	0.011	0.011	0.011	0.011	0.114	0.011	0.011	0.011	0.678

*太字は10%以上の移入を表す

表(3)-13 Migrateによる長期における移入（有効集団サイズ）の推定

To/From	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	多景島	曾根沼	沖島	西の湖	和邇	守山	雄琴	膳所	Total
菅浦		6.687	16.873	17.082	4.425	21.124	24.500	13.972	9.531	1.702	13.447	15.427	144.769
竹生島	21.472		14.513	12.833	17.586	21.694	21.032	26.565	37.794	31.246	15.904	9.190	229.829
姉川	6.948	8.720		6.077	26.274	2.422	5.186	3.582	5.937	6.410	1.945	1.893	75.392
安曇川	3.532	3.084	8.453		24.971	7.522	5.512	6.592	4.540	14.712	15.046	13.731	107.695
多景島	12.316	4.094	29.702	36.981		23.945	16.006	11.800	10.339	58.886	14.743	35.692	254.503
曾根沼	27.396	10.391	6.726	23.645	8.462		23.621	13.769	16.684	34.717	7.829	0.898	174.139
沖島	3.971	6.606	15.926	5.347	8.915	11.399		6.996	15.090	18.804	11.954	10.050	115.058
西の湖	3.533	1.421	7.013	2.708	6.748	9.464	4.101		7.180	2.482	8.641	11.391	64.679
和邇	5.457	3.281	29.858	5.638	5.374	1.720	4.327	3.547		5.407	4.351	12.477	81.437
守山	3.970	31.893	8.473	53.977	3.720	24.028	1.290	4.039	3.182		6.716	19.298	160.585
雄琴	23.705	2.237	3.248	13.467	1.786	12.338	5.143	9.417	14.559	6.695		12.824	105.419
膳所	5.967	6.768	13.017	11.499	35.706	10.094	8.321	7.166	7.135	8.473	6.738		120.883
Total	118.267	85.181	153.801	189.253	143.967	145.750	119.037	107.444	131.970	189.533	107.313	142.872	

表(3)-14 琵琶湖全体における各年の有効集団サイズの推定

調査年度	n	LD 法		Temporal 法		VarEff	
		Ne	95% CIs	Ne	95% CIs	Ne	95% CIs
平成26年	201	401.7	(299.4-588)	253.8	(141.1-535.3)	156.0	(13.5-443.1)
平成27年	327	1146.6	(725.5-2488.5)	284.0	(151.4-659.9)	142.6	(11.5-396.3)
平成28年	220	1158.9	(594.2-9249)	-	-	128.7	(9.4-372.1)

n, サンプル数 ; Ne, 有効集団サイズ ; CIs, 95%信頼範囲

表(3)-15 VarEffによる各集団の有効集団サイズの経年変化

集団	平成26年		平成27年		平成28年	
	Ne	95% CIs	Ne	95% CIs	Ne	95% CIs
余呉湖	141.0	(11.9-476.1)	125.0	(10.2-432.2)	112.0	(8.6-347.0)
菅浦	139.5	(12.9-446.3)	126.5	(11.0-401.5)	114.4	(9.3-378.3)
竹生島	152.7	(15.0-506.9)	152.7	(12.2-434.5)	136.9	(9.9-405.9)
姉川	287.5	(64.3-494.0)	278.3	(57.9-490.5)	270.4	(53.8-489.2)
安曇川	133.8	(9.7-486.0)	116.2	(8.1-413.1)	100.8	(6.7-289.5)
多景島	137.8	(10.8-515.5)	123.1	(9.2-434.8)	107.1	(7.5-381.6)
曾根沼	130.5	(10.8-430.2)	117.6	(9.1-378.0)	-	-
沖島	229.1	(18.3-493.1)	214.2	(14.5-467.3)	-	-
西の湖	206.1	(15.0-727.9)	182.8	(12.3-594.6)	160.0	(10.0-556.3)
和邇	128.2	(12.1-353.9)	119.2	(10.5-323.4)	110.8	(9.2-307.6)
守山	465.6	(48.7-882.3)	450.2	(37.2-882.3)	428.9	(24.8-882.7)
雄琴	330.8	(31.9-631.6)	311.0	(25.5-614.3)	288.4	(18.8-590.1)
膳所	478.9	(57.0-1101.5)	470.1	(46.2-1101.5)	457.7	(33.7-1101.5)

Ne, 有効集団サイズ ; CIs, 95%信頼範囲

表(3)-16 LD法を用いた各年級群の有効集団サイズ（平成26年のサンプル使用）

Age	1	2	3	4
n	12	118	125	27
N_e	∞	866.1	3906.6	255.8
95% CIs	(35.4- ∞)	(367.1- ∞)	(611.4- ∞)	(69.8- ∞)

n , サンプル数 ; N_e , 有効集団サイズ ; CIs, 95%信頼範囲

表(3)-17 有効集団サイズから見た年齢別の繁殖貢献度
（平成26年（親魚）と27年（仔魚）のサンプル使用）

Age	2	3	4	5
n	12	118	125	27
N_e	92.1	218.6	400.0	1100.7
95% CIs	(23.5- ∞)	(82.7- ∞)	(111.4- ∞)	(65.0- ∞)

n , サンプル数 ; N_e , 有効集団サイズ ; CIs, 95%信頼範囲

表(3)-18 有効集団サイズから見た年齢別の1個体当たりの繁殖貢献度
（表17を表16で除することによる推定）

Age	2	3	4	5
繁殖貢献度/1個体	—	0.252	0.102	4.310

（2）考察

1）遺伝的多様性

Rad-seq分析とは全ゲノムを制限酵素で切断し、切断部位から50-100bpのシーケンスを行い、SNPを検出する手法である。SNPが表現型を支配する直接の原因変異である可能性もあることから、近年、同一motifのリピート数の変異であるMSよりも注目されている³⁸⁾。本研究のRad-seq分析の結果、琵琶湖のブルーギルにおいては集団間で遺伝的多様性に違いがあることが分かった（表(3)-5）。一方、MS分析ではいずれの年においても遺伝的多様性に有意差は認められなかった（表(3)-11）。この違いとして、Rad-seq分析は20座程度を対象としたMS分析よりは分析精度が高いことが挙げられる。Rad-seq分析においてヘテロ接合度は西の湖が最大となったが（表(3)-4）、これは西の湖が琵琶湖のブルーギルの侵入地点であることと関係していることも考えられる。アレル数については雄琴集団が他の集団と比べ、有意に低い結果となったが、これは駆除事業による個体数の減少によるものとも考えられる。加藤ら³⁹⁾は京都市深泥池における外来魚駆除事業にお

けるブルーギルの遺伝的多様性の低下を報告しており、遺伝的多様性のモニタリングは駆除効果の検証において有効であると考えられる。

2) 遺伝的集団構造

集団間における遺伝的分化の程度について見てみると余呉湖集団は琵琶湖集団と遺伝的に大きく分化していることが分かった(表(3)-6)。現在、余呉湖は琵琶湖の流入河川である余呉川と琵琶湖の水を揚水するために設置された導水路により琵琶湖と繋がっているが⁴⁰⁾、Rad-seq分析の結果は両者を介してのブルーギルの移動は殆ど存在しない可能性を示唆している。離島集団間では F_{ST} の p 値は0.35以上となり、有意な遺伝的分化は認められなかった。離島集団間の距離は14-25kmであるが、この結果は離島集団間における遺伝的交流の存在を強く示唆している。中程度の距離による隔離が存在する離島集団間で遺伝的分化がみられなかった理由として琵琶湖内の湖流が関係している可能性が挙げられる(図(3)-14)。琵琶湖北湖の湖流は夏季の成層期に発生すると考えられており、その流速は8cm/s程度であるとされている⁴¹⁾。この湖流が春-夏季に産まれた仔稚魚を運び、離島集団間の遺伝的交流を引き起こしている可能性は高い。Mantel testでは地理的距離と遺伝的距離の間に正の相関がみられたが(図(3)-7)、この結果はブルーギルの行動範囲は狭いという従来の知見⁴²⁾をよく支持している。Rad-seq情報から作成した分子系統樹において琵琶湖のブルーギルは北湖と南湖に大きく分かれる結果となったが(図(3)-8)、この結果は北湖と南湖の間では遺伝的交流が比較的少ないことを示すものといえる。

STRUCTUREを用いたアサメントテストの結果、繁殖集団数は4であることが示唆されたものの、clusterの地域性は見られずclusterの混合率は高かった(図(3)-9, 10)。このことは琵琶湖に生息するブルーギルは、単一繁殖集団ではなく複数の地域繁殖集団から構成されているものの、隣接した集団間における遺伝的交流は高い可能性を示すものと言える。

3) 琵琶湖におけるブルーギルの分布拡散の中心と移動様式

BayesAssを用いた移動推定において約7割の個体は定住性が高い結果となったが(表(3)-12)、この結果はブルーギルの移動能力は低いという従来の知見⁴²⁾を支持すると同時に今回のMantel testの結果を裏付けるものと言える(図(3)-7)。また、移入元としては西の湖が何れの集団においても高い結果となったが、これは西の湖が琵琶湖におけるブルーギルの侵入地点である事と対応している可能性も考えられる。Migrate-nを用いた長期の移動推定においては、北湖の安曇川と南湖の守山からの分散が大きい結果となったが(表(3)-13)、これは夏季に琵琶湖に発生する湖流が関係している可能性が考えられる(図(3)-14)。西の湖と守山は距離的に近いことから、BayesAssとMigrate-nの結果は、琵琶湖におけるブルーギルの分散の主な中心が琵琶湖南東部である可能性を示すものと言える。

4) 有効集団サイズから見た琵琶湖におけるブルーギルの個体数

各年の N_e を推定したところLD法とTemporal法は増加傾向を示したのに対し、VarEffは減少傾向を示すと言った異なる結果が見られた(表(3)-14)。近年、 N_e を推定においては、合祖理論を用いた推定法の方が、従来の連鎖不平衡や世代間の遺伝分散の違いを用いた推定法よりも精度が高いこと報告されている³⁴⁾。また、鵜飼⁸⁾は琵琶湖におけるブルーギルの生息個体数が減少傾向であ

ることを報告していることから、VarEffによる N_e の推定は妥当であると考えられる。ブルーギルの現存数と比べ、 N_e の値が低い要因として、日本のブルーギルのファウンダーが15個体と少ないことと⁴⁾、短期における爆発的増加の2つがあげられる。

VarEffにより推定した N_e において南湖の集団は何れも北湖の集団の約3倍となった。ブルーギルの産卵は一般に水深1m前後の砂泥ないしは砂礫底で行われ、礫底は好まれないことが知られている²⁾。琵琶湖の平均水深は北湖が44mであるのに対し南湖は3.5mであり⁴³⁾、水深1m前後の底質は北湖が主に礫であるのに対し、南湖は主に砂泥質である⁴⁴⁾。このことから南湖は環境として北湖よりもブルーギルの産卵に適していると言うことができ、このためブルーギルの N_e が大きいと考えられる。またVarEffにより推定した各集団の N_e は経年変化として減少傾向が見られたが、これは琵琶湖において行われている外来魚の駆除によるものと見ることも出来る。

5) 生命表と繁殖貢献度

LD法により各年齢の N_e を求めたところ、3歳と4歳の間で大きな低下が見られた。日本におけるブルーギルの性成熟は2歳魚以上とされており²⁾、この年齢における個体数の減少は日本におけるブルーギルの繁殖は実質、2年間であることを示唆している。北米の原産地におけるブルーギルの平均寿命は4-6年とされており⁴⁵⁾、これと比べると日本のブルーギルの寿命はかなり短い、この理由が餌環境と遺伝の何れの要因に因るものであるかについては不明である。表(3)-16において1歳魚の N_e が無限大となった理由は解析個体数が少ないため、結果が収束しなかったことによる³³⁾。LD法において正確な N_e を推定するための標本数は100以上とされており⁴⁶⁾、今後、MS情報を用いて正確な生命表を作成するためには各年級群の標本数を増やすことが重要である。

琵琶湖のブルーギルの年齢別繁殖貢献度について見ると年齢に比例して高くなることが分かった(表(3)-18)。加齢に伴う繁殖貢献度の上昇は個体の大型化によるものと考えられる。ブルーギルの雌は大型になるほど一産卵期の産卵回数が多くなり⁴⁷⁾、1回当たりの抱卵数は平均サイズの個体で21,000-36,000であるが⁴⁸⁾、抱卵数は魚体サイズに比例して増加し、全長235mmの個体では64,000にまで達する事が報告されている²⁾。また、雄に関しては大型個体ほど効率的に卵・仔稚魚を保護するとされ⁴⁹⁾、こうした雌雄の成熟個体の相互的なファクターにより孵化仔魚の生存率が高くなることが予想される。さらに雌は大型の雄との交配を好むとされ⁵⁰⁾、こうしたことも大型個体の繁殖貢献度を向上させる要因の一つと考えられる。

6) 形態分析

モルフォメトリ分析の結果、琵琶湖のブルーギルは体型に地域性が見られることが明らかとなった(図(3)-4, 5)。ブルーギルの雌における体型分化の要因として遺伝的浮動と環境適応の何れかが考えられるが、雌の場合、雄のような繁殖戦略の違いによる体型分化は存在しないとされている²⁾。古川⁵¹⁾は琵琶湖のブルーギルの雌において、食性の違いによる体型の違いは存在しないとしている。今回、SNP情報を用いたOutlier解析において対立遺伝子の地域性の存在が指摘され(表(3)-7)、琵琶湖内の各集団は遺伝的に隔離されたものでないことから(表(3)-6)、雌における生息地間での体型の違いは摂餌適応以外の環境適応による可能性も考えられる。Yonekura et al.⁵²⁾は琵琶湖のブルーギルにおける体型の違いは食性の違いによるエコタイプに対応しているとしている。本サブテーマの結果とYonekura et al.⁵²⁾の結果が異なった理由としては、雌

雄個体の分離の有無も理由として考えられる。

FAは初期発生時の遺伝的ストレス、物理的環境ストレスなどにより生じるとされている^{53, 54)}。本研究において胸鰭のFAを生じる要因として、遺伝的多様性 (H_0 , A) との相関は見られなかったことから物理的環境ストレスがFAの要因である可能性は高いと考えられる。淡水魚における初期発生時の主要な物理的環境ストレスとして、水温や産卵巣の底質環境を上げることができる。中村ほか⁴⁸⁾ は初期発生時の低水温と奇形魚の出現について報告しており、横川²⁾ は産卵巣の底質が砂利質や泥質の場合は砂礫質に比べ、卵発生における貧酸素状態が生じやすく、奇形魚が生じやすいとしている。琵琶湖に生息するブルーギルにおいてもこうした要因により胸鰭のFAが生じた可能性はありうる。また、鰓耙についてはFAが見られなかったことから、ブルーギルの鰓耙は環境ストレスの影響を受けにくいことも考えられる。

7) 形態的特徴と遺伝的特徴の関係

魚類においては北半球に生息するイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) において降海型と陸封型の間における表現型の違いとSNPの対応が報告されている^{55, 56)}。本研究では正の自然選択を受けている可能性の高い座が幾つか検出されたが(表(3)-7)、**体型の違いと完全に対応したものは見られなかった**。体型は複数の遺伝子が発現に関与する量的遺伝子であることから⁵⁷⁾、体型と遺伝子型の関連を見るためにはGTL解析を行う必要がある。また、遺伝的特徴と形態的特徴の相関を見るためには自然選択を受けやすい形質の追加分析も重要であると考えられる。

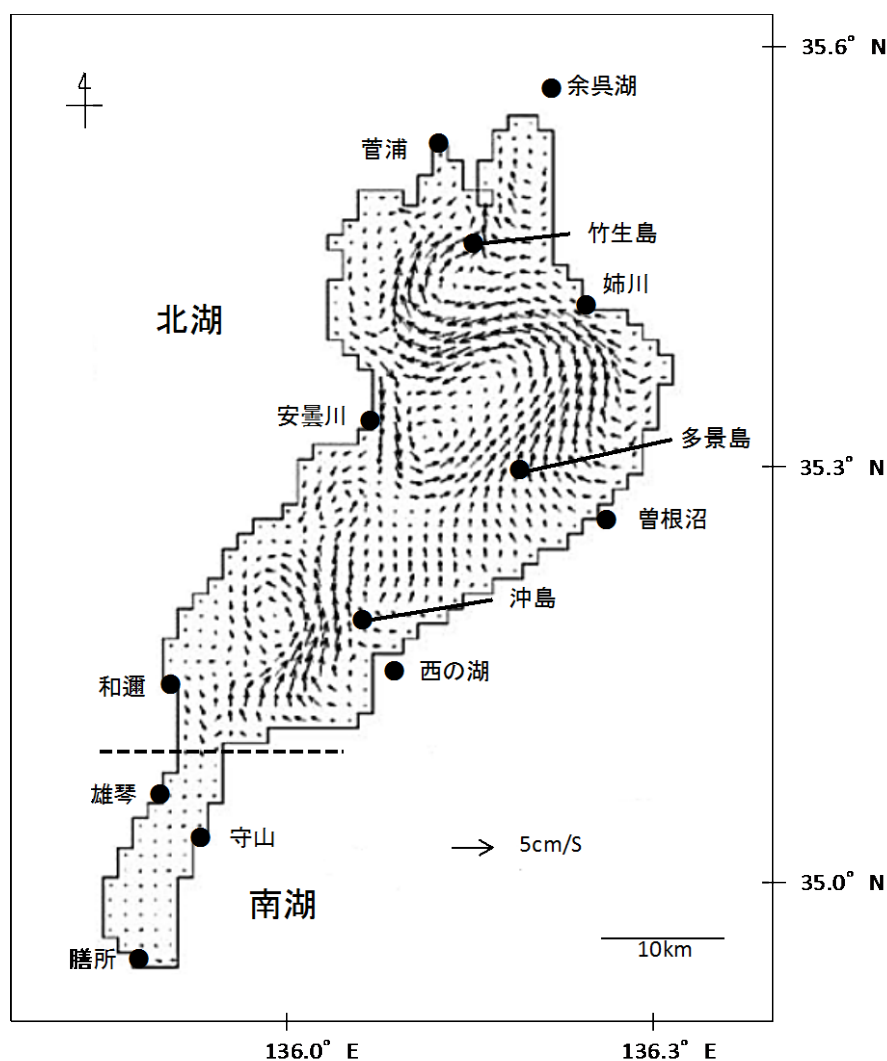
8) 琵琶湖のブルーギルの駆除の効率化

琵琶湖においては、21世紀初頭からブルーギルの駆除が継続的に行われている。具体的な駆除の手法としては電気ショッカー、魴、産卵床の破壊、釣り、トラップ等が用いられているが、ブルーギルの個体数を減らすためには、より効率的な駆除戦略が必要である。本サブテーマの調査研究により琵琶湖のブルーギルは南湖において生息密度が高いことが分かった。また、琵琶湖南東部の守山から西の湖の間の沿岸域はブルーギルの拡散の中心である可能性が高いことから、こうした地域において重点的に駆除を行うことにより効率的な駆除が可能と考えられる。また、北湖においては安曇川周辺がブルーギルの拡散の中心であると考えられることから、安曇川周辺においても重点的に駆除を行うことが望ましいと考えられる。しかし、従来の方法による駆除では駆除が進むにつれ駆除率が低下することから根絶は不可能であり、現在、琵琶湖における駆除は既にこうした状態下にあると見ることもできる⁸⁾。さらに、琵琶湖のような広大水域では内湖などにおいて局所的に駆除を行っても近隣からの個体移入による個体数の回復が予想され、費用対効果が期待できない⁵⁸⁾。今回、本研究により守山・安曇川周辺は琵琶湖のブルーギルの拡散の中心であることが示唆されたことから、これら2地点で重点的に駆除を行う事により、駆除効果を上げる事が可能であると考えられる(図(3)-15)

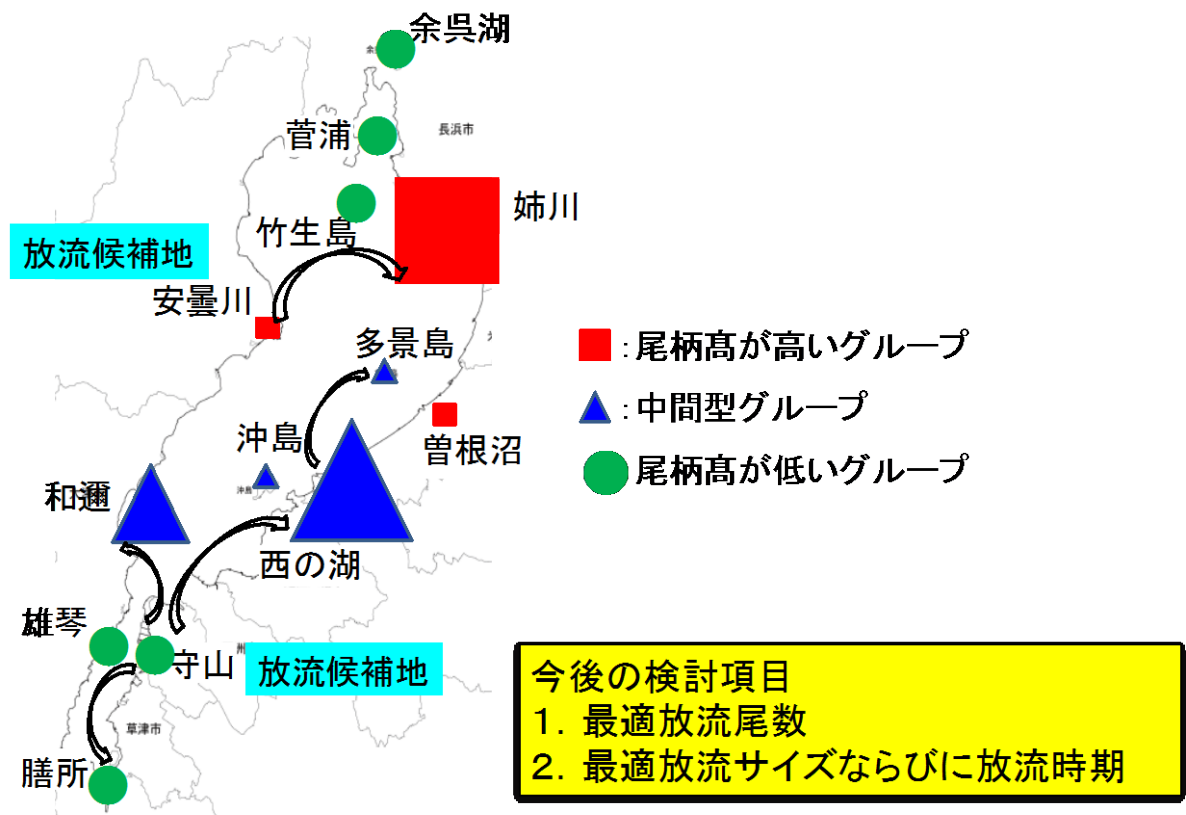
今回の調査研究により琵琶湖に生息するブルーギルは大きく余呉湖集団、北湖集団、南湖集団の3つに分かれることが分かった。余呉湖集団については琵琶湖集団からの独立性が高いことから個別対応が必要である。また、高齢個体ほど繁殖貢献度が高いことから、不妊化遺伝子搭載魚の放流の際にはより繁殖貢献度が高い高齢個体の使用が望まれる。しかしながら、ブルーギルの成長等を考慮すると、高齢個体の大量生産はコスト的に難しいと考えられることから、若齢個体に

おける繁殖貢献度の高い家系の作出も必要と考えられる。ブルーギルの雄は繁殖戦略により縄張り雄とスニーカーに分かれるが^{59, 60)}、Neff⁶¹⁾ はスニーカーよりも縄張り雄の方が繁殖において有利であるとしており、不妊化遺伝子をより効率的に次世代に拡散させるためには縄張り雄を放流することが望ましいと考えられる。縄張り雄と寝取り雄は主に体高の違いにより識別可能であるとされており^{49, 62)}、両者の形態の違いに着目して生産を行うことが、縄張り雄を効率よく生産するための1つの手段になる可能性がある。

今回の調査研究の結果から、琵琶湖に生息するブルーギルの資源量は減少傾向であることが分かった。新手法である不妊化遺伝子搭載雄を放流することにより一層の駆除が可能と考えられるが、従来の駆除と併せて行うことが重要である。今後の展望としては雌特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギルの生態調査や小規模なため池等での駆除のための実証試験を行う必要があると考えられる。



図(3)-14 琵琶湖表層の流れと各集団の位置関係. 北澤・熊谷³⁹⁾ を基に作成



図(3)-15 適切な不妊化魚の放流方法の構築 (イメージ図)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

今回の分析結果から、琵琶湖におけるブルーギルの生息密度は何れの生息地においても南湖は北湖の約3倍であり、さらに分散の中心が北湖においては安曇川、南湖においては守山である可能性が示唆された。また、有効集団サイズのモニタリングにおいて琵琶湖のブルーギルの個体数は何れの生息地においても減少しており、駆除効果の検証に置いて有効集団サイズのモニタリングは効果的であると言える。また、生命表と繁殖貢献度の推定結果から不妊化遺伝子搭載魚の放流において3歳魚の使用が最も効果的であることが明らかとなった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

琵琶湖においては、行政、NPO等によるブルーギル駆除が継続して行われているが、完全な駆除には程遠い状況にある。本研究により得られた琵琶湖（余呉湖を含む）におけるブルーギルの集団構造、分散の中心、生息密度、年齢構成といった知見は、今後の駆除事業の効率化において有益な知見をもたらすことが期待される。

具体的には、琵琶湖のブルーギルの分布拡大の中心は、北湖は安曇川河口、南湖は守山周辺である可能性が高いことから、これら2地点を中心とした駆除事業の実施が効率的かつ有効であるとの予測を提示した。特に守山周辺は琵琶湖のブルーギルの分散の一大中心地であることから、当地を重点駆除地域とするべきである。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Kawamura K, Fujiwara A, Yamada M, Furukawa W, Kurita J and Okamoto H (2017) Development and characterization of 24 polymorphic microsatellite markers for bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Genes & Genomics*, 39, 5 (DOI: 10.1007/s13258-017-0531-x) (in press).

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 五箇公一編：生物の科学 遺伝、2015, 2, 116-122 (2015)「交雑がもたらす遺伝子汚染の

実態-雑種に隠された危険性（国内外来種問題）（執筆担当：河村功一）」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 岡本裕之、山口寿哉、藤原篤志、奥宏海、正岡哲治、石川卓、河村功一、栗田潤（2015）遺伝子編集技術を用いた不妊化魚による外来魚の根絶手法の基盤開発－１：遺伝子制圧手法と基盤技術開発」平成27年度日本水産学会秋季大会
- 2) Okamoto H, Kurita J, Nishiki I, Iwasaki Y, Fujiwara A, Yamaguchi T, Oku H, Masaoka T, Ishikawa T and Kawamura K, (2015) Methodology for eradication of invasive alien species. A new method of gene-induced suppression for alien population (GISAP), and the first whole-genome analysis of bluegill (*Lepomis macrochirus*), International Symposium on Genetics in Aquaculture XII, Santiago de Compostela, Spain, 196.
- 3) 古川 航、河村功一、岩崎裕樹、西木一生、藤原篤志、山田充哉、岡本裕之、栗田潤（2016）琵琶湖産ブルーギルの遺伝的特徴と移動様式、平成28年度日本水産学会秋季大会

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 平成28年度三重大学生物資源学研究科公開講座「外来魚問題について考える」（主催：三重大学、平成28年10月22日、三重大学生物資源学部大会議室、観客約50名）にて講演
- 2) 三重県立津高等学校における特別授業「外来魚問題とその対策について」（平成28年10月14日、聴講者約50名）

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

８．引用文献

- 1) Froese P and Pauly D (2017) Fish Base. <http://www.fishbase.org/search.php>
- 2) 全国内水面漁業協同組合連合会. (1992)ブラックバスとブルーギルのすべて, 全国内水面漁業協同組合連合会, 東京.
- 3) Kawamura K, Yonekura R, Katano O, Taniguchi Y and Saitoh K (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology* 15, 613-621.
- 4) 丸山為藏・藤井一則・木島利通・前田弘也（1987）外国産新魚種の導入過程、水産庁研究部資源課 水産庁養殖研究所, 東京.
- 5) Kawamura K, Yonekura R, Ozaki Y, Katano O, Taniguchi Y and Saitoh K. (2010) The role

- of propagule pressure in the invasion success of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan. *Molecular Ecology* 19, 5371-5388.
- 6) 寺島 彰 (1980) ブルーギル —琵琶湖にも空いていた生態的地位. 日本の淡水生物 — 侵略と攪乱の生態学 (川合禎次・川那部浩哉・水野信彦編), pp. 63-70, 東海大学出版会, 東京.
 - 7) Sax DF, Stachowicz JJ and Gaines SD. (2005) *Species invasions –Insight into ecology, evolution and biogeography*, Sinauer, New York.
 - 8) 鶴飼広之 (2017) 大津漁業協同組合地先漁場における外来魚の漁獲動向について-2003年～2015年度漁期を例に-. *海洋と生物* 228, 10-16, 生物研究社, 東京.
 - 9) Zelditch ML, Swiderski DL and Sheets HD (2012) *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press, New York.
 - 10) Ehlinger TJ (1997) Male reproductive competition and sex-specific growth patterns in bluegill. *North American Journal of Fisheries Management* 17, 508-515.
 - 11) 椿 宜高 (1994) 遺伝的多様性と左右対称性のゆらぎ. *科学* 64, 607-608.
 - 12) 河村功一・細谷和海 (1991) 改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製. *養殖研究所研究報告* 20, 11-18.
 - 13) Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A and Cresko W (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22, 3124-3140.
 - 14) Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.
 - 15) Excoffier L and Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
 - 16) Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
 - 17) Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. Available at <http://www.evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
 - 18) Nei M (1972) Genetic distance between populations. *American naturalist* 106, 283-292.
 - 19) Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
 - 20) Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.
 - 21) Antao T, Lopes A, Lopes RJ and Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC bioinformatics* 9, 323.
 - 22) Colbourne JK, Neff BD, Wright JM and Gross MR. (1996) DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites to assess the relative fitness of male mating strategies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*

- 53, 342-349.
- 23) Neff BD, Fu P and Gross MR (1999) Microsatellite evolution in sunfish (Centrarchidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1198-1205.
 - 24) Nakamura Y, Shigenobu Y, Sugaya T, Kurokawa T and Saitoh K. (2013) Automated screening and primer design of fish microsatellite DNA loci on pyrosequencing data. *Ichthyological Research* 60, 184-187.
 - 25) Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
 - 26) Don R, Cox P, Wainwright B, Baker K and Mattick J. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19, 4008.
 - 27) van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP and Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
 - 28) Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
 - 29) Wilson GA and Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.
 - 30) Beerli P and Felsenstein J (1999) Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152, 763-773.
 - 31) Beerli P and Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 98, 4563-4568
 - 32) Rambaut A and Drummond AJ (2007) Tracer v1. 4. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
 - 33) Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth G, Tillett BJ and Ovenden JR (2014) NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14, 209-214.
 - 34) Nikolic N, Chevalet C (2014) VarEff. Variation of Effective size. Software VAREFF (package R in file. zip) and the documentation. Available at https://qgsp.jouy.inra.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=60
 - 35) Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38, 209-216.
 - 36) Bartley D, Bagley M, Gall G and Bentley B (1992) Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conservation Biology* 6, 365-375.
 - 37) Waples RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121, 379-391.

- 38) 中村祐輔 (2000) SNP 解析・マイクロアレーによる創薬とオーダーメイド医療. 羊土社, 東京.
- 39) 加藤幹男・真鍋由紀・四反田武志・安部倉完・竹門康弘・長澤哲也・谷田一三 (2010) 深泥池における外来魚駆除事業がブルーギル個体群の遺伝的多様性に及ぼす効果について. 応用生態工学 13, 77-82.
- 40) 遊磨正秀・嘉田由紀子・中山節子・橋本文華・藤岡和佳・村上宣雄・桐畑長雄・桐畑正弘・桐畑貢・桐畑みか乃 (1998) 身近な水辺環境における「人—水辺—生物」間の相互作用. 環境技術 27, 289-295.
- 41) 北澤大輔・熊谷道夫 (2007) 流動場—生態系結合モデルによる琵琶湖生態系シミュレーション. 生産研究 59, 21-26.
- 42) Fish PA and Savitz J (1983) Variations in home ranges of largemouth bass, yellow perch, bluegills, and pumpkinseeds in an Illinois lake. Transactions of the American Fisheries Society 112, 147-153.
- 43) 中井克樹・浜端悦治 (2002) 琵琶湖~ 外来種に席卷される古代湖. 外来種ハンドブック (日本生態学会編), pp. 265-268, 地人書館.
- 44) 滋賀県 (2013) 底質. 平成14~15年度 琵琶湖沿岸帯調査報告書. pp.7-13. Available at http://www.pref.shiga.lg.jp/g/suisan-s/engantaityousa/files/h14007_013.pdf
- 45) Parr CS (2002) *Lepomis macrochirus*. Animal Diversity Web. Available at : http://animaldiversity.org/accounts/Lepomis_macrochirus/
- 46) England PR, Cornuet JM, Berthier P, Tallmon DA and Luikart G (2006) Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. Conservation Genetics 7, 303-308.
- 47) 香川県水産試験場 (1992) 平成3年度外来魚現地実態調査報告. 外来魚対策検討委託事業報告書, 香川.
- 48) 中村中六・笠原正五郎・矢田敏晃 (1971) 実験動物としてのブルーギルサンフィッシュに関する研究: II. 卵内発生と稚仔の成長. 広島大学水畜産学部紀要 10, 139-151.
- 49) 池田裕司 (2009) 琵琶湖南湖におけるブルーギルの繁殖に関する行動生態学研究. 平成21年度三重大学大学院生物資源研究科修士論文.
- 50) Aday DD, Philipp DP, Wahl DH (2006) Sex-specific life history patterns in bluegill (*Lepomis macrochirus*): interacting mechanisms influence individual body size. Oecologia 147, 31-38.
- 51) 古川 航 (2015) 琵琶湖産ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の形態変異に関する研究. 平成27年度三重大学生物資源学部卒業論文.
- 52) Yonekura R, Nakai K and Yuma M (2002) Trophic polymorphism in introduced bluegill in Japan. Ecological Research 17, 49-57.
- 53) Leary RF, Allendorf FW, Knudsen KL (1984) Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. The American Naturalist 124, 540-551.
- 54) Jagoe CH and Haines TA (1985) Fluctuating asymmetry in fishes inhabiting acidified

- and unacidified lakes. *Canadian Journal of Zoology* 63, 130-138.
- 55) Colosimo PF, Hosemann KE, Balabhadra S, Villarreal G, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Schluter D and Kingsley DM (2005) Widespread parallel evolution in sticklebacks by repeated fixation of ectodysplasin alleles. *Science* 307, 1928-1933.
 - 56) Davey JW and Blaxter ML (2010) RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9, 416-423.
 - 57) Comeron JM, Kreitman M and Francisco M (2003) On the power to detect SNP/phenotype association in candidate quantitative trait loci genomic regions: a simulation study. *Pacific Symposium on Biocomputing*, pp. 478-489.
 - 58) 米倉竜次 (2010) 外来魚ブルーギルの捕食量抑制に与える人工音響の効果--順応と集団比較. 岐阜県河川環境研究所研究報告 55, 17-22.
 - 59) Gross MR (1979) Cuckoldry in sunfishes (*Lepomis*: Centrarchidae). *Canadian Journal of Zoology* 57, 1507-1509.
 - 60) Dominey WJ (1981) Maintenance of female mimicry as a reproductive strategy in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology and ethology of fishes* 1, 59-64.
 - 61) Neff B (2001) Genetic paternity analysis and breeding success in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Journal of Heredity* 92, 111-119.
 - 62) Ehlinger TJ (1997) Male reproductive competition and sex-specific growth patterns in bluegill. *North American Journal of Fisheries Management* 17, 508-515.

Development of a New Method for Exterminating Invasive Foreign Fish Based on Infertility Using Gene Editing Technology

Principal Investigator: Hiroyuki OKAMOTO

Institution: National Research Institute of Aquaculture (NRIA),
Japan Fisheries Research and Education Agency
422-1 Nakatsuhamaura, Minami-Ise, Mie 516-0183, Japan
Tel: +81-596-66-1830 / Fax: +81-596-66-1962
E-mail: hiokamot@affrc.go.jp

Cooperated by: Graduate School and Faculty of Biosciences, Mie University

[Abstract]

Key Words: Eradication, Invasive alien species, Gene editing, Bluegill (*Lepomis macrochirus*)

Invasive alien fish species breed in lakes nearly nationwide. Bluegill (*Lepomis macrochirus*) is presumed to have a much larger population than that of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). We proposed a new eradication method for invasive species by complementing it with physical extermination. The main feature of this method is that it focuses on reducing fertile female breeding in the subject population. Male fish carrying a female-specific sterilization gene are released into the group to decrease fertility in the population. We have developed three basic techniques to substantiate this new eradication method. We prepared the draft genome DNA sequence of bluegill to produce male carrier fish with a female-specific sterilization gene using gene editing technology. The results of the bluegill whole genome DNA analysis showed a total of 982 million reads, 164 Gb data, and genome coverage of 205. We applied the genome DNA data to gene edit a female-specific fertilization gene. We produced two gene-edited fish lines, such as the F0 and F1 families. These fish will be used to establish a population of sterile fish with the female-specific sterilization gene. Difficulties in mass production of gene-edited bluegill were expected. Thus, regeneration techniques, such as artificial insemination, sperm cryopreservation, sex change, hybrid or triploid production, and reproductive cell transplantation are required. In this study, we developed these technologies in bluegill and closely related species to produce a large number of gene-edited bluegill. The life history and morphological characteristics of wild bluegill in Japan must be understood for efficient release of the gene-edited fish. Geographical variations in caudal peduncle depth were recognized among Lake Biwa bluegill populations. In addition, minor geographical variations were also observed in a Rad-seq analysis. A population analysis with molecular markers revealed that the Lake Biwa populations were composed of multiple breeding

populations, which were roughly classified into Lake Yogo, northern lake, and southern lake populations. Gene flow among neighboring populations was high, despite limited dispersal of fish in Lake Biwa. Although the centers of dispersal were suggested to be Adogawa in the northern lake and Moriyama in the southern lake, the effective population size (N_e) of all populations tended to decline. The N_e of the southern lake population was approximately three times higher than that of the northern lake. Mortality was highest between 3- and 4-year-old fish, but reproductive contribution per individual increased with age. In conclusion, bluegill should be aggressively eliminated from Lake Yogo and nearby areas of Adogawa and Moriyama. Genome-edited bluegill should be released as 3-year-old fish.