

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

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
(4-1703)

平成29年度～令和元年度

Development of Verification Test Fish of a New Eradication Method,
Gene-Induced Suppression for Alien Population (GSAP)

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人水産研究・教育機構

〈研究分担機関〉

三重大学

いであ株式会社

令和2年5月

目次

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・ 1
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	
II－1 ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出 （国立研究開発法人水産研究・教育機構） 要旨	・・・・・・・・・・ 14
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II－2 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の実証 （国立研究開発法人水産研究・教育機構） 要旨	・・・・・・・・・・ 39
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II－3 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価 （三重大学） 要旨	・・・・・・・・・・ 63
1. はじめに	
2. 研究開発目的	

- 3. 研究開発方法
- 4. 結果及び考察
- 5. 本研究により得られた成果
- 6. 国際共同研究等の状況
- 7. 研究成果の発表状況
- 8. 引用文献

II-4 放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築 (いであ株式会社)

・・・・・・・・・・ 78

要旨

- 1. はじめに
- 2. 研究開発目的
- 3. 研究開発方法
- 4. 結果及び考察
- 5. 本研究により得られた成果
- 6. 国際共同研究等の状況
- 7. 研究成果の発表状況
- 8. 引用文献

III. 英文Abstract

・・・・・・・・・・ 100

I. 成果の概要

課題名 4-1703 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

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29～令和元年度

研究経費 (累計額) 119,539千円

(29年度：40,522千円、30年度38,495千円、元年度：40,522千円)

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

研究体制

- (1) ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出 (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実証 (国立研究開発法人水産研究・教育機構)
- (3) 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価 (三重大学)
- (4) 放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築 (いであ株式会社)

1. はじめに (研究背景等)

侵略的外来種であるブルーギル、オオクチバスがラムサール条約指定の貴重な湿地に侵入し、希少種の絶滅や固有生態系の破壊、それに伴う内水面漁業の衰退が深刻に危惧されている。莫大な予算と長期にわたる捕獲を中心とした駆除努力によって外来魚の生息密度を低下させることができて、駆除が進むにつれて捕獲による駆除率 (物理的駆除率) も低下し、最終的に増殖率と駆除率が平衡状態 (低密度維持) となり安定してしまうため、捕獲を主とした防除手法では根絶は極めて困難と考えられる (図1.0.1)。

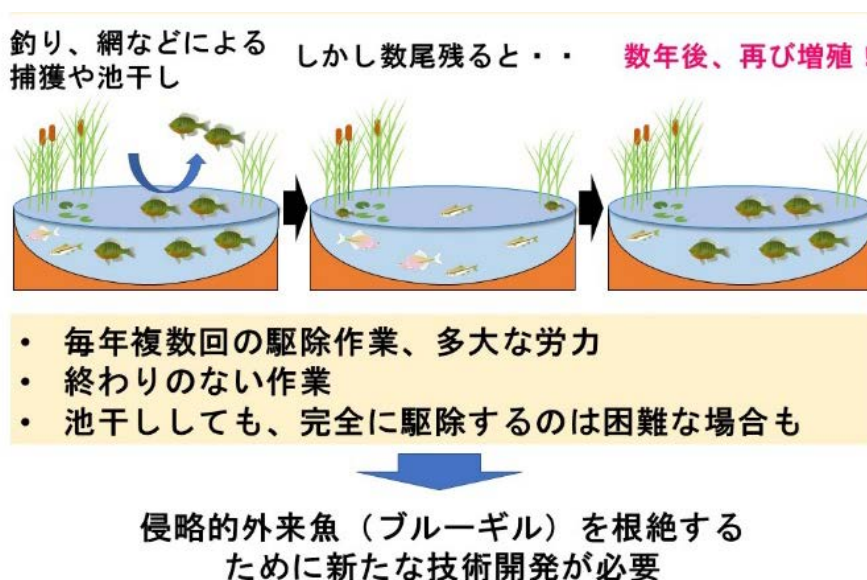


図1.0.1 捕獲による外来魚の駆除の背景

これまでも外来魚駆除のために、不妊化雄¹⁾ (Knippling, 1955) やYY魚 (トロイ染色体) の放流²⁻⁴⁾ (Gutierrez and Teem, 2006、箱山, 2010、箱山, 2011) 等、捕獲に頼らないいくつかの防除手法が考案・検討されたが、不妊化雄の大量放出による生態系や生物相への弊害の懸念やYY魚の大量生産の技術的な困難さや生産コストが問題とされ実施された例はない (図1.0.2)。

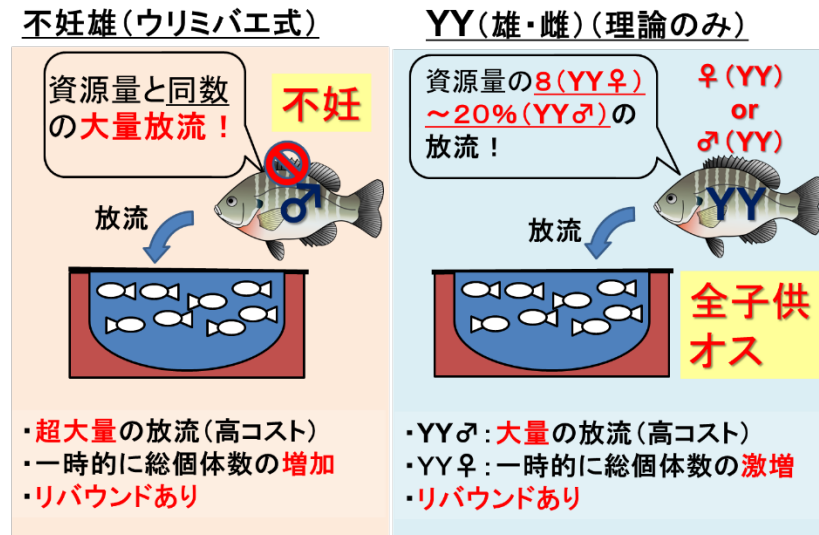


図1.0.2 従来考案された外来魚駆除の手法と問題点

近年、マラリア撲滅のため、蚊の不妊化を誘発する新たな手法として、ゲノム編集技術と遺伝子組み換え技術を組み合わせた遺伝子ドライブ（ジーンドライブ）（Esvelt, 2014）という手法が発表され、現在海外において実用化試験を実施している。しかしながら当該手法においては、蚊に外来遺伝子を組み込むことや、理論的には蚊を地球上から根絶しうることが専門家から指摘され、市民からも不安視され、実施には研究者の視点からも懸念すべき点が多い。我々は遺伝子ドライブの開発グループとは全く別に、2013年に外来遺伝子や遺伝子組換え技術を使わない新たな駆除（防除）手法として（図1.0.3）、ゆっくりと但し着実な駆除効果により駆除効果を維持できる“遺伝子制圧技術”を考案した。この方法は、遺伝子編集技術によって内在遺伝子のごく一部にDNAの塩基の一部に欠損を与え、遺伝子の機能を低下させる（図1.0.4）ことによって雌の妊性機能を喪失させ、次世代を残せないようにする（図1.0.5）もので、世代が進むにつれて集団サイズを小さくし、最後には根絶させることができる（図1.0.6）と考えられる。以下に遺伝子ドライブとの違いについて模式図を示す。遺伝子制圧は継続的な放出がなければ、不妊化遺伝子は視線消失するため、より安全性の高い技術といえる。

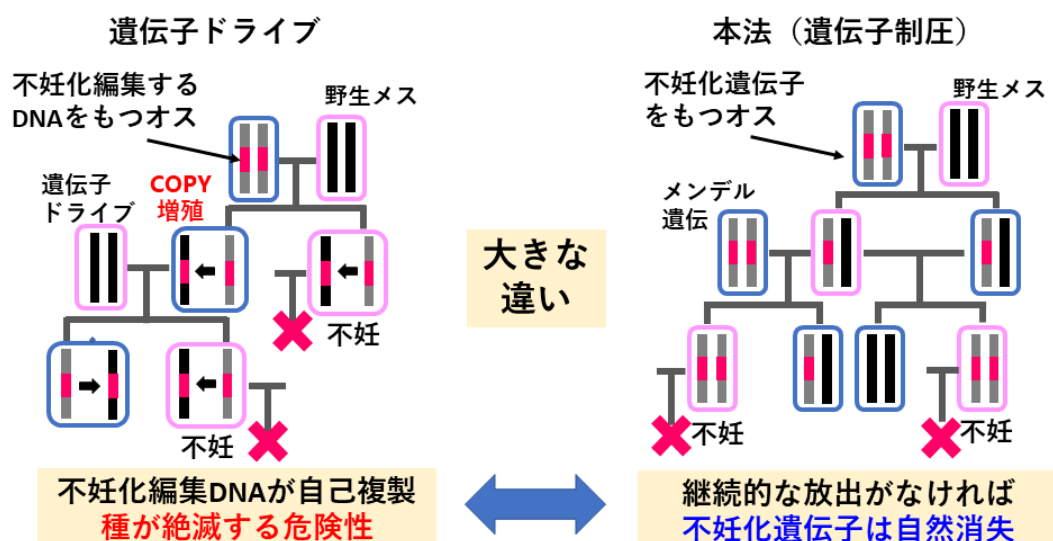


図1.0.3 遺伝子ドライブと遺伝子制圧の違い

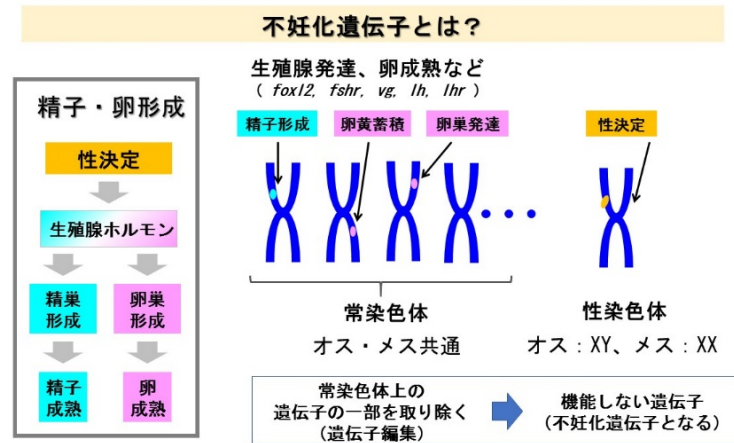


図1.0.4 遺伝子編集技術による不妊化遺伝子の作出概念

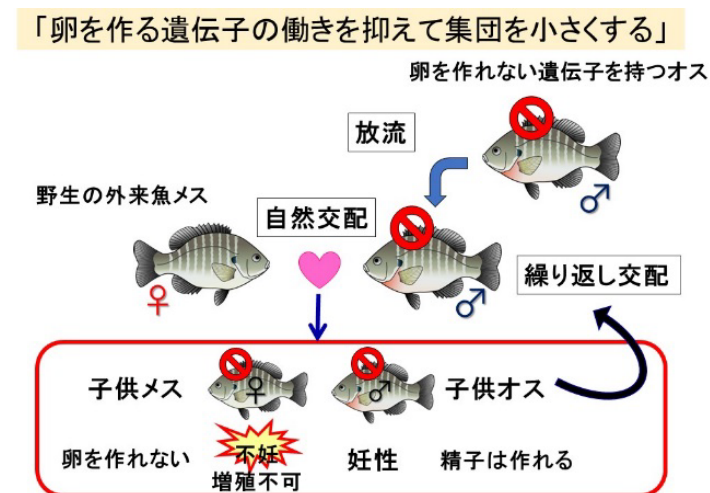


図1.0.5 不妊化遺伝子搭載魚の役割

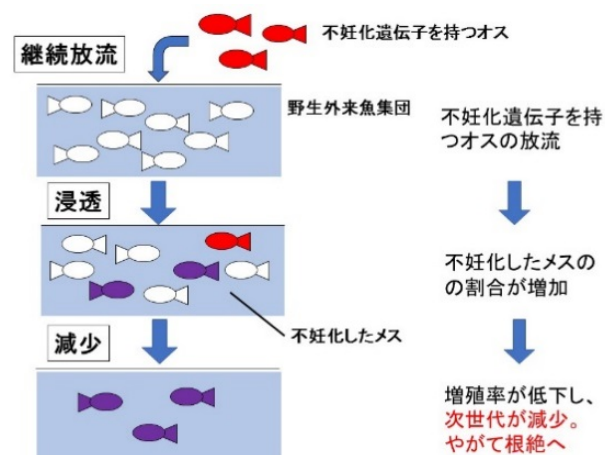


図1.0.6 遺伝子制圧技術の概念

これまでに我々は、この遺伝子制圧技術を用いて外来種個体群を駆除するための基礎技術の開発についてブルーギルを対象として進めてきた。以下に平成26-28年に実施した先行研究の成果概要を示す。

研究種目名：環境研究総合推進費（環境省）平成26-28年度

課題名：「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」

研究成果の概要：ブルーギルの2つの雌特異的成熟関連遺伝子についてゲノム配列を明らかにし、緑色蛍光タンパクや人工ヌクレアーゼRNAの受精卵への顕微注入技術の開発、あるいはブルーギルの人工催熟・人工交配、精子凍結条件の検討など研究計画を前倒しして研究を進めてきた。さらに、ブルーギルのDNAマーカーを開発し、琵琶湖内の各集団の遺伝的特徴の推定、形態解析、食性調査を行い、遺伝的分化並びに局地適応の可能性を明らかにした。

サブテーマと成果の概要は以下の通り。

（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。全ゲノム解析並びに発現遺伝子解析から、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。CRISPR/Cas9 の系を用いて *foxl2*、*fshr* 遺伝子とともに特異的に変異が入った個体F0個体を得た。

（２） 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の基盤開発

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ため、i) 人工授精、ii) 精子凍結、iii) 性転換、iv) 借り腹宿主となりうる三倍体作出、v) 生殖細胞移植など、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。

（３） 外来魚の生物特性の把握と資源量評価手法の開発

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ため、琵琶湖のブルーギルの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。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。なお、本研究テーマは国立大学法人 三重大と共同研究した。

以下に、これまでとこれからの開発計画を示す（図1.0.7）。

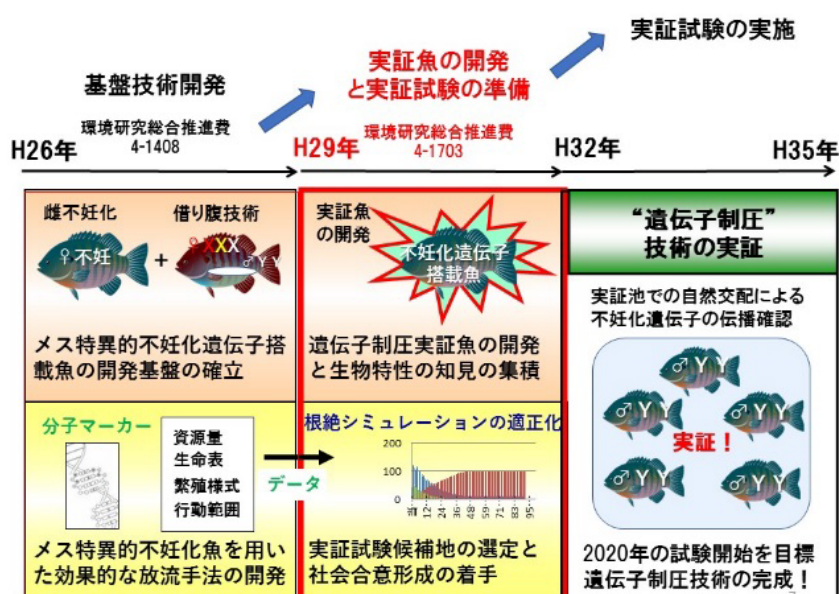


図1.0.7 遺伝子制圧技術の開発ステップ

これまでの遺伝子制圧技術の開発に向けた先行研究を引き継いで、本研究では、引き続きブルーギルを対象に“遺伝子制圧技術”の実証試験の実施に向けて必要な素材開発並び技術開発を行った。具体的には、実証魚の開発を中心に、さらに検討項目として、DNA中のオフターゲット（標的外変異）や、性別判別（雌雄判別）マーカー、借り腹による増殖技術、超雄（YY）個体の検討や、実証魚の生物特性（繁殖行動等）の把握、各試験候補地の資源量推定、各試験地の必要条件検討と選定、試験魚の生産体制の構築、実証試験に対する社会合意形成のための情報整理を行った。その他、ブルーギル同様に外来魚の全国的問題となっているオオクチバスに対して、不妊化遺伝子搭載魚の開発に必要な全ゲノム情報概要版の作成等、技術開発基盤の整備を目指した。本研究機関における計画と目標を以下に示す（図1.0.8）。



図1.0.8 研究計画と達成目標

本技術開発は、国際的取組みであるCOP10 で定めた愛知目標において、2020年までの短期目標「生物多様性の損失を止める効果的かつ緊急な行動の実施」に貢献すべく、緊急かつ直接的な行動として位置づけられる。また本技術の原理は外来魚だけでなく幅広く侵略的外来種に汎用できるため、社会的に大きな波及効果も期待される。

2. 研究開発目的

ブルーギルにおいて“遺伝子制圧技術”の実証試験に必要な、不妊化遺伝子をホモ化（同型対立遺伝子型化）した実証魚の開発と数百尾単位の実証試験用稚魚の生産に向け親魚の準備を行う。また実証魚の生産に用いる親魚の開発状況に応じて、DNA中のオフターゲット（標的外変異）の評価を検討する。さらに性別判別（雌雄判別）マーカーの開発、借り腹による増殖技術の実証と超雄（YY）個体の開発については、必要性を検討しながら開発を進める。さらに実証魚の生物特性（繁殖行動等）の把握するための飼育実験系の構築、将来の試験候補地の資源量の推定方法の検討、試験地候補地の条件検討と選定、試験魚の生産支援体制の構築、実証試験の社会合意形成の検討を進める。オオクチバスにおいては、不妊化遺伝子搭載魚の開発に必要な全ゲノムの概略版の作成を行う。各サブテーマの目標を以下に示す。

（1）ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出

ブルーギルにおいて不妊化遺伝子の多重化・ホモ化の確認、オフターゲットデータの評価（但し、不妊化遺伝子搭載実証試験魚の開発状況に応じて）、性別判別マーカーの開発を行う。オオクチバス

において全ゲノム情報概要版を完成する。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の実証

ブルーギル移植細胞の代理親魚生殖組織中での生を実証する。超雄個体の作出を実証する（但し、不妊化遺伝子搭載実証試験魚の開発状況に応じて）。

(3) 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価

ブルーギル実証魚の繁殖行動特性を把握する。実証試験候補地の野生資源量の推定を行う。

(4) 放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築

実証魚放流試験候補地の選定と実証試験の社会合意形成に向け、必要な情報を収集し整理する。試験魚の生産支援体制の構築と生産コストの算出および効率化を行う。

3. 研究開発の方法

(1) ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出

ブルーギルの雌特異的不妊化遺伝子の多重化・ホモ化に必要な予備交配家系の作出（交配）を行い、雌特異的成熟関連遺伝子候補について遺伝子編集を行い作出したF0およびF1世代の試験魚の変異導入の状況を確認し、またそれらの性成熟の状況を確認した。性判別マーカーの開発については、必要な解析家系の作出を行い、そのDNAを用いて性判別マーカーの開発を行った。また、ブルーギルゲノム情報の高度化、およびオフターゲットの評価法を進めるにあたり事前検討として、通常交配において後代のゲノム中に自然発生するDNA変異がどの程度発生するか解析（トリオ解析）を行った。オオクチバスの全ゲノム解析については、次世代シーケンサーを用いて全塩基配列（DNA）情報の取得を行い、高度な全ゲノム概要版を完成した。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の実証

本課題では不妊化魚の生産を取り扱うが、本来妊性を持たないはずの不妊化魚を再生産する、害魚であるはずのブルーギルを放流する、という矛盾を解決する必要がある。そのため、生産方法としては異種個体内で卵生産する借り腹手法の利用を、放流用種苗生産としては超オス放流を前提としたYY法の利用を想定し、それぞれの方法に必要な個別技術の開発を行っている。借り腹親魚候補の検討や生殖細胞移植はすでに前身のプロ研で開始したが、引き続き、親魚内での移植細胞の生着確認、親魚の生殖腺発達確認、および三倍体親魚の候補の追加検索を行った。また、放流による環境インパクトを軽減するため、放流用種苗としてはメスを増やさずにYY魚を想定している。その作製には、XYオスと交雑させるXYメス、すなわち性転換メスの作製が前提となる。その技術要素の一つとして、本課題では性ホルモン経口投与によるメスからオスへの性転換技術の開発を行った。借り腹生産、全オス生産とも最終的には開発した技術は統合して、不妊化魚の生産システムとして構築する予定であり、現時点では一つひとつの技術要素を個別に開発を進めているところである。

(3) 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価

遺伝子編集魚を用いた外来種の駆除において、遺伝子編集魚の雄の繁殖特性の評価は必須である。このことから、実験水槽を用いた遺伝子編集魚（雄）と野生魚（雌）の交配試験を行い、雌の誘因行動から受精卵の孵化に至るまでの繁殖行動の確認を行った。次に、遺伝子編集魚の実用化に当たっては当初の想定では、事前に放流試験を行う必要があったことから、実証試験候補地を選定し、当地におけるブルーギルの個体数推定並びに繁殖様式を中心とした集団構造の解明を行った。また、本プロジェクトの最終目標は琵琶湖のブルーギルの駆除であることから、マイクロサテライトマーカーを用いた琵琶湖のブルーギルの遺伝的特徴の把握、分布様式の解明を行うと共に有効集団サイズを指標とした資源量の推定も行った。

(4) 放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築

1) 放流試験候補地の選定と地域理解の醸成

放流試験候補地の選定と地域理解の醸成を目的に、サブテーマの枠を超えて放流試験検討ワーキンググループを組織した。ワーキンググループでは、まず放流試験候補地としての必要要件を検討した。次に、聞き取り調査・現地踏査を実施した湖沼・ため池等の適性について、収集した情報をもとに必要要件の観点から評価し、絞り込み及び選定を行った。

また、実証放流試験のための合意形成に向け、ステークホルダー洗い出しの方法、説明・理解醸成の方法について検討を行った。ステークホルダーについては、合意すべき項目・課題の視点から洗い出しを行い、本研究との関わり等を想定し、ステークホルダー一覧表として整理した。説明・理解醸成の方法については実施方針をとりまとめるとともに、各ステークホルダーの意見等を掘り起こす契機とするためのFAQを作成した。

2) 不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築

ブルーギルの飼育については、約70m²の施設に200L容円形水槽（稚魚～成魚飼育用、最大24基）、1,000L容角形水槽（成魚用、最大6基）、ふ化仔魚～稚魚用水槽を配置した。飼育水は脱塩素した上水道水のかけ流し式で、各水槽の回転率がおおむね4回/日となるようにした。飼育水温は24℃、照明は16h明・8h暗とした。成魚の飼育密度はおおむね50個体/200L、餌料は市販の配合飼料を2回/日、摂餌の状況を観察しながら残餌がないように与えた。ブルーギルの飼育とともに、親魚候補群に対して人為的に性成熟を促す催熟操作（水温と日長のコントロール等）を行った。催熟操作を行った親魚候補個体にhCGを腹腔内注射し、採卵及び人工授精を実施した。人工授精によって得られた仔魚は、淡水ワムシ、アルテミア、配合飼料を与えて飼育し、ふ化後390日まで、おおむね1回/月の頻度で全長、体重を記録した。

生産コストの試算については、飼育に係る原価を労務費、消耗品・薬品代、餌代、水道代、電気代等の年間の実績額から推定した。飼育施設・設備・装置等のインシヤルコストは含めなかった。

4. 結果及び考察

（1）ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出

不妊化遺伝子を搭載したブルーギルを作出するために、これまでに得られた全ゲノム情報と遺伝子編集技術を用いて、雌の性成熟や卵形成に関わる複数の遺伝子に対して変異導入個体としてモザイク変異を有するF0世代および少なくとも半分のゲノムに変異を持つヘテロ変異個体を作出し、その特徴や安全性を調べる段階まで開発が進んだ。この結果、これらの成熟関連遺伝子変異個体を用いて、閉鎖された飼育施設の中で自然交配による次世代への伝播を検討する段階まで開発レベルは達し、主たる研究目標の一つを達成することができた。一方、本課題では、不妊化魚の効率的な作出のための支援技術として、DNAによる性別判別マーカーの開発を計画した。そのためまず、性別判別マーカーの開発に必要な解析家系の作出を行い、親子それぞれ高純度なゲノムDNAを用いて解析を行った。その結果、連鎖群4にメスヘテロ型（ZW型）の性別判別マーカー候補を二つ同定することができた。但し、これら二つのマーカー間は比較的離れており、どんな家系由来の個体でも確実に性別判別できるマーカーになっておらず、より精度の高いマーカーを得るには、性別判別領域の更なる絞り込みが必要である。一方、オオクチバスについては、将来ブルーギル同様に本駆除技術の開発ができるように、ゲノム情報の整備を進めた結果、H30年度現在において、他生物種と比較して遜色のない高品質のドラフトゲノムを得ることができた。

（2）不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の実証

ブルーギルの精原細胞移植を試みた個体を各15ずつ解析したところ、PSの三倍体およびPSとLEの交雑魚の三倍体魚において、1-3個体と少数ではあったが、移植細胞に由来するBG遺伝子が生殖巣内に検出された。この結果、借り腹生産の母体魚として使用可能であることを示すことができた。但し、これらの個体について成熟・産卵まで確認する時間がなく、再生産までは確認できなかった。今後、引き続き継続飼育して、移植魚を飼育・成長させる必要がある。一方、借り腹に用いる親魚候補は自身の生殖細胞を作らず、かつすべてが卵を生産する全雌三倍体魚の利用が望ましい。三倍体化は受精後低温処理により実施したが、一部個体では低温処理の不良により妊性を失っていないと思われる個体も確認された。条件によるバラつきが生じやすい低温処理の欠点を補うため、他の親魚作製法も模索したところ、BG x

PSの致死性雑種が三倍体化（異質三倍体化）することにより生存性が回復することが明らかになった。致死性雑種の生存性回復を親魚選別法として用いれば、効率的かつ高確率で三倍体化母体を得ることができる。今後、再現性の確認や条件の至適化を進めることによる生産技術化が必要である。なお、全雌化のための性転換（オスからメスへ）はすでに雄性ホルモン（テストステロンおよびフアドロゾール）の経口投与で可能であることがこれまでに明らかとなっているが、さらに、全オス生産の前提となるメスからオスへの性転換に関し、雌性ホルモンであるE2の経口投与効果を検討した。その結果、100mg/kgで添加した飼料を性分化期である孵化後30-100日に投与することにより、すべての個体をメス化、すなわちオスからメスへの性転換が可能であることが明らかとなった。

これまでに借り腹技術の実施に必要な要素試験の成功事例を積み重ねた結果、ブルーギルにおいても借り腹による生産は理論的には可能と考えられる。その一方で、成功率の低さ、手間のかかり方、などの問題点が残されたままである。今後はより実用的な量産技術化に向けて個別技術の完成度を高めるとともに、労力、コスト、信頼性を加味して体系化する必要がある。

（3）不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価

1）不妊化遺伝子搭載魚の繁殖特性の把握

実験水槽を用いた遺伝子編集魚（雄）と野生魚（雌）の行動観察において、遺伝子編集魚は営巣から産卵に至る繁殖行動を示し、受精卵からは正常な仔魚を得ることが出来た。このことから遺伝子編集魚の雄は行動学・生理学的に見て繁殖能力にほぼ問題がないと考えられ、次のステップとして野外試験地を用いた実用性の確認が必要と思われる。このように配偶行動の実験系の確立と人工生産雄の（モザイク変異体）の配偶行動の観察は計画通り行った。また、不妊化遺伝子搭載魚のオスの配偶行動を確認することが出来たことから、予定通りの成果を得ることができたと言える。一方、雌機能的な不妊化遺伝子ホモ搭載魚については、サブテーマ1で試験魚の作出が遅れ、成熟年齢に達しなかったことから繁殖特性を確認出来ず、今後の課題と言える。

2）実証試験候補地における資源量（個体数）の推定

実証試験候補地において、ピーターセン法による個体数推定を行った所、勝田小池が1,440～2,481匹（0.30～0.52匹/m²）、幸神池が12,475～17,738匹（1.43～2.0匹/m²）となり、3年間の調査で大きな個体数ならびに遺伝的多様性に変化は殆ど見られなかった。このことから両池の生息個体数はほぼ安定していると考えられた。また、年齢組成についての調査から何れの池においても繁殖の主群は3歳魚であり、3-4歳魚の間での死亡率の高さが覗かれた。このことから、遺伝子編集魚の放流試験では3歳魚の使用が望ましいと考えられる。本課題において、体長を基に年齢査定を行い、予定通り個体数推定を行うことができた。ただし、個体により成長に若干のばらつきが見られ、体長のみでは年齢査定が難しい個体も見られたことから、今後より年齢組成の精度を上げるため、耳石による年齢査定を併用する必要があると思われる。

3）琵琶湖における資源量のモニタリング

2014-2019年の余呉湖を含む琵琶湖10地点において遺伝的多様性の変化について調べたところ、いずれの生息地も低下傾向が見られた。また、生息地間で僅かではあるものの遺伝的分化が認められ、余呉湖、竹生島、姉川は他の生息地との違いが認められた。遺伝子頻度情報を基に分布様式を調べたところ、琵琶湖は南北に遺伝的クラインを形成し、北湖は姉川が分布の中心であるのに対し、南湖は琵琶湖大橋以南にほぼ均一に分布している可能性が覗かれた。2014-2019年の各生息地の有効集団サイズについて見ると何れの生息地も減少傾向にあり、特に南湖において顕著であることが判った。また、過去50年間の有効集団サイズの変化を推定したところ、いずれの生息地も1990年以降、減少傾向認められ、滋賀県の外来魚駆除事業の結果とほぼ対応した。これらのことから琵琶湖のブルーギルについては、1) 世代当たりの移動能力は低い、2) 南湖と北湖で2つのクラスターが存在する可能性、3) いずれの生息地も減少傾向にあることが考えられた。このことから、遺伝子編集魚を用いた駆除に当たっては、複数の分布の中心地を対象にピンポイント的に放流を行うことが望ましいと言える。

一方、現在話題となっているここ2年間連続で琵琶湖のブルーギルの捕獲量が激減しているという滋

賀県の報告に関連し、本課題が始まる前から蓄積してきたDNAデータと合わせて解析することにより、有効集団サイズが小さくなっていることを科学的に示すことができた。この点は計画以上の成果であり、琵琶湖におけるブルーギル駆除活動が着実に成果を上げてきていることを科学的に示したものとして高く評価できると考えられる。

（４）放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築

1) 放流試験候補地の選定と地域理解の醸成

放流試験検討ワーキンググループでの検討や、管理者・関係者との協議、ブルーギル資源量調査の結果等を踏まえ、放流試験候補地を予備的に選定した。ただし、本研究のアドバイザー会合で放流試験候補地の選定に関し検討不足との指摘もあり、候補地の生態系の評価、屋外水槽での不妊化確認試験等を実施したうえで、再検討の余地があると考えられた。

一方、合意形成の優先順位や、説明の時期、方法、重点項目等を検討するためのツールとして、ステークホルダーをリストアップし、本研究との関わり等を想定してステークホルダー一覧表を整理した。但し、事前に全てのステークホルダーとそのニーズ等を想定することは困難であるため、既知のステークホルダーへの説明や聞き取りを通してフィードバックすることが効果的であると考えられた。

説明・理解醸成の方法については、説明会・意見交換会の開催や、既存組織（自治会等）の利用など、プロジェクトの段階やステークホルダーによって説明の時期・方法・重点項目を変える等の実施方針をとりまとめた。行政機関との意見交換では、環境DNAを利用した希少種・重要種調査の有効性や、特定外来生物の放流、魚介類採捕等、法令等に基づく手続きについて助言を得た。

合意形成について意見交換や議論をする中で、ステークホルダーの一部にはゲノム編集技術に関する潜在的な不安、倫理的な意見が少なからずあることや、様々な課題が明瞭となった。合意形成を進めるうえで地域社会と信頼関係を構築することは極めて重要であり、説明に先立ち、各ステークホルダーのニーズを詳細に把握するためのコミュニケーションツールとして、本研究・技術に関するFAQを作成した。以上まとめると、ステークホルダーの洗い出し方法や説明の方法の方針を示すことができ、一定の成果を得ることができた。ステークホルダー一覧表は、普遍的なツールとして利用が期待できる。一方で、実際の合意形成手続きについては、管理者等より資源量調査までの承諾は得ることができたものの、放流試験に関する本格的な説明や理解醸成については、行政との意見交換結果を踏まえて、時期尚早と判断されたため着手しなかった。

2) 不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築

計画通り、ブルーギルの生産システムを構築し、人為催熟及び人工授精により仔魚を生産した。その仔魚を飼育し、約18カ月後にはその個体を用いて再び仔魚の生産をすることができた。仔魚の生残率については、ふ化後50日で約50%であった。仔魚の成長については、ふ化後360日で全長112.1mm、体重24.86g（平均値）であり、野生個体での報告と比較すると成長はかなり良く、放流時期によっては放流個体が野生環境での交配に参加できる可能性が考えられた。一方で、個体によって成長に大きな差が生じることがわかり、放流魚の効率的な生産には体サイズによって選別し飼育することの必要性が示唆された。

生産コストの試算では、本飼育試験条件でふ化から1年間飼育し、1,000個体を生産した場合、約5,700円/個体であった。主に毎日の飼育管理にかかる労務費の割合が高く、次いで上水道代であった。飼育密度、飼育水等についてコスト削減策をとった場合、年間4,000個体が生産可能であり、生産コストは約2,200円/個体と試算された。内訳としては、労務費と調温に係る電力の比率が高く、実用化にはさらなるコスト削減が必要と考えられた。また、ここで算出した金額は、放流後の生残の観点から放流時の体サイズをなるべく大きくすることに力点を置き、ふ化から1年間飼育する想定で算出した。このように生産コストを試算し、原価構造を明らかにすることによって効率化に向けた課題抽出及び対応策の検討ができ、当初の計画を達成したといえる。一方、飼育期間を短くすれば、生産できる個体数（期間当たり、面積当たりとも）が大きくなり、1個体の単価は低くできる。体サイズが小さい分、放流後の生残率は下がると考えられるが、年間の放流個体数が多くなれば、生残できる絶対数も多くなる可能性があり、その妥協点の検討が今後重要であると考えられた。今回試算された生産コストは将来の同様の研究におい

て比較可能な経済的指標となり得ると考えられる。概ね計画通り実施することができた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

まず、これまでブルーギルの性決定様式については、国内ではオスヘテロ型のXY型であると考えられていたが、性判別マーカーの開発の過程の中で、少なくとも今回の解析に用いた集団においては、メスヘテロのZW型であることが明らかとなった。近年、海外の文献の一部にZW型であることを示唆した報告があったが、ゲノム情報を用いてより直接的に明確に明らかにしたのは、本成果が初めてである。今後、ZW型の性決定様式が種内で固定されているのか、あるいは地域集団によって変わるかについては、なお検討が必要である。また温度の影響など、性決定の可塑性の可能性についても念頭に、更なる解析が必要と考えられる。遺伝子制圧技術においては、ZW型であっても基本的な駆除原理は変わることはないため、実現可能性が失われることはないが、不妊化遺伝子の集団への浸透性・効率性の面などにおいて技術的な修正について検討を進める必要がある。一方、ブルーギルの繁殖に関して、わが国ではこれまで駆除や繁殖抑制の観点から生態学的な議論が多かったが、本研究では、交雑性、生殖腺発達および性分化など生理学的な部分においても多くの学術的な基礎的知見を得ることができた。これまで、淡水魚としてはメダカ目、コイ目、およびサケ目魚類がモデル生物として繁殖生理研究には用いられてきた。ブルーギルは国内では珍しく、スズキ目の淡水魚類であり、マダイやブリなどの主要な養殖魚類と同じ分類群に属している。本研究において、三倍体化や性転換の特徴など多くの養殖魚類との共通の性質が見出されており、副次的な成果ではあるが、今後はより水産業に即した基盤研究対象モデルとしても利用できる可能性が考えられる。

その他の主な成果として、ブルーギル遺伝子編集魚が正常な繁殖能力を有する事を行動実験により確認したことが挙げられる。これにより、遺伝子編集魚を用いた外来魚駆除は実用化に向けて一段階前進したと言える。一方、野外調査によりブルーギルの繁殖が3歳魚を中心に行われることが明らかとなり、遺伝子編集魚の放流は3歳魚未満の個体の使用が望ましいことを提言できた。さらに、琵琶湖において6年間に渡る集団解析を行い、ブルーギルの遺伝的集団構造ならびに分散様式を明らかにし、遺伝子編集魚の放流方法について提言を行う事ができた。

最後に、現時点でゲノム編集魚の放流及びそれに伴う合意形成の先行事例はなく、本研究により合意形成に向けた手続きの方向性を示すことができた。また、本研究で示すことのできたブルーギルの生産コスト及びその削減のための課題等は、将来の同様の研究、あるいは実用化における大量生産技術開発の一助になると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境研究機関連絡会が主催する第15回環境研究シンポジウム「持続可能な生産と消費 資源循環型の社会の構築をめざして」(H29年11月22日、一橋大学 一橋講堂)において、「外来魚の根絶のための不妊化魚による新規駆除技術の基盤」についてポスター発表を行った。本シンポジウムは、環境研究に関わる国立研究開発法人12機関および筑波大学から構成される環境研究機関連絡会の主催によるもので、様々な分野の研究成果を元に関連行政機関担当者や研究者が意見交換を行った。本課題で進めている「遺伝子編集技術を用いた外来魚の駆除技術開発」について、他機関の研究者や行政担当者と成果の活用に向けどのように社会合意形成を進めるべきか意見交換を行った。現在の知見から、「科学的データに基づく正確な情報発信と正しい理解の醸成」が重要であると提言した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ・ 遺伝子編集魚の実証試験候補地は一般的なため池の規模である事から、今回得られた結果(ブルーギルの年齢組成ならびに資源量)は他のため池にも当てはまる可能性が高く、駆除技術の改良において

有益な知見になることが予想される。また、琵琶湖において明らかになった分布様式（複数の分布拡大の中心ならびに分布拡大パターン）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。

- ・合意形成に向けたステークホルダー一覧表を作成した。本一覧表は、本研究の合意形成に限定されるものではなく、ステークホルダー洗い出しの方法、合意形成の優先順位、説明の時期・方法・内容（重点項目）等を検討するための普遍的なツールとして利用が期待できる。
- ・合意形成を進めるうえで地域社会と信頼関係を構築することは非常に重要であり、まずは意見の掘り起こしが必要であるため、そのコミュニケーションツールとして本研究に関するFAQを作成した。ここで作成したFAQは、各ステークホルダーの全ての関心事に答え、全ての懸念を払拭するためものではなく、また内容も本研究に限ったものであるが、その考え方や方針は、今後類似した合意形成が必要となった場合に利用が期待できる。
- ・現在、ブルーギルの生産コストに関する知見はなく、本課題で試算された生産コストは今後同様の研究において比較可能な経済的な指標となり得る。

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) 山口寿哉、栗田潤、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：水産育種、49、43-52、(2020)、水産育種49、43-52 (2020).
「性ステロイドホルモンおよびアロマターゼ阻害剤経口投与によるブルーギルの性統御」

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 岡本裕之、藤原篤志、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、河村功一：第15回環境研究シンポジウム：(2017)
「外来魚の根絶のための不妊化魚による新規駆除技術の基盤開発」
- 2) 奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、河村功一、古澤昭人、河村佳正、風間崇宏、南野洋孝、横山雅仁、小川隆一：第13回外来魚情報交換会：(2018)
「遺伝子制圧法によるブルーギル駆除技術の開発とそれに対する意識調査」
- 3) 岡本裕之、石川卓、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、内野翼、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会 (2018)
「遺伝子制圧を目的としたブルーギルにおける *fshr* および *foxl2* の遺伝子編集F0個体の作出」
- 4) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会 (2018)
「硬骨魚類におけるRAD-seq法のSNPジェノタイピング精度」
- 5) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会 (2018)
「ブルーギルにおけるトリオ解析の試み」
- 6) 栗田潤、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：平成30年度日本水産学会春季大会 (2018)
「遺伝子編集技術を目的としたブルーギル *foxl2* 遺伝子発現調節領域の生物間ゲノム情報比較による推定」
- 7) Okamoto H, Ishikawa T, Oku H, Uchino T, Fujiwara A, Yamaguchi T, Masaoka T, Kawamura Y, Furusawa A, Kawamura K, Kurita J: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Generation of gene-edited bluegill *Lepomis macrochirus* for control and eradication of invasive species by gene induced suppression for alien species.

- 8) Oku H, Kurita J, Ishikawa T, Yamaguchi T, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Transplantation of bluegill *Lepomis macrochirus* spermatogonial cells to other kinds of genus *Lepomis*: preliminary study for surrogate production of bluegill.
- 9) Yamaguchi T, Kurita J, Ishikawa T, Oku H, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Sex reversal in bluegill (*Lepomis macrochirus*) by oral administration of sex hormone.
- 10) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成30年度日本水産学会秋季大会（2018）
「GRAS-Di法を用いたブルーギル連鎖地図の構築」
- 11) 内野翼、須田亜弥子、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成30年度日本水産学会秋季大会（2018）
「オオクチバスのドラフトゲノムの解析」
- 12) 栗田潤、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、桐生郁也、藤原篤志、岡本裕之：第13回外来魚情報交換会：（2019）
「ブルーギル初期飼育と3倍体作出技術」
- 13) 内野翼、須田亜弥子、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成31年度日本水産学会春季大会（2019）
「ブルーギルのドラフトゲノムの高度化」
- 14) 吉武和敏、内野翼、藤原篤志、奥宏海、栗田潤、岡本裕之、木下滋晴・浅川修一、H31年度日本水産学会春季大会（2019）
「連鎖解析データからスキャフォールドを伸長する新規ソフトウェアSEDLAの開発および検証」
- 15) 岡本裕之、奥宏海、内野翼、栗田潤、河村功一、正岡哲治、山口寿哉、山口友樹、古澤昭人、藤原篤志、令和元年度環境研究機関研究交流セミナー（2019）
「我が国固有の内水面生態系の保全と再生に向けた新たな外来魚の防除技術」
- 16) 岡本裕之、奥 宏海、栗田潤、石川 卓、山口寿哉、内野翼、正岡哲治、藤原篤志、河村功一、古澤昭人、令和元年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム（2019）
「ゲノム編集によるブルーギルの不妊化駆除技術開発」
- 17) Okamoto H, Araki K, Ishikawa T, Oku H, Kurita J, Masaoka T, Uchino T, Yamaguchi T, Fujiwara A and Furusawa A: 令和元年度日本水産学会秋季大会（2019）
“Production of F1 generation of *fshb* edited bluegill.”
- 18) Okamoto H, *et al.*: Marine Biotechnology conference 2019（2019）
“Evaluating the optimal timing of fish egg microinjection for genome editing.”

7. 研究者略歴

研究代表者

岡本 裕之（代表者）

東京水産大学大学院水産学研究科修了、博士（水産学）、養殖研究所遺伝育種部研究員、現在、水産研究・教育機構増養殖研究所育種研究センターグループ長

研究分担者

1) 藤原 篤志

北海道大学大学院修了、博士（地球環境科学）、現在、水産研究・教育機構本部研究開発コーディネーター

2) 奥 宏海

広島大学大学院生物圏科学研究科修了、博士（学術）、養殖研究所栄養代謝部研究員、中央水産

研究所内水面研究部主任研究員、現在、水産研究・教育機構増養殖研究所養殖システム研究センター主任研究員

3) 河村 功一

京都大学農学部卒業、農学博士、養殖研究所主任研究官、現在、三重大学生物資源学研究科教授

4) 古澤 昭人

北海道大学水産学部卒業、学士(水産学)、いであ株式会社環境創造研究所生物多様性研究センター長、現在、同環境生態部長

II. 成果の詳細

II-1 ゲノム情報解析と不妊化遺伝子多重搭載魚の作出

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
本部 研究推進部 研究開発コーディネーター	藤原 篤志
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

研究協力者 石川 卓（平成29～30年度）、内野 翼（平成29から30年度）、岩崎 裕貴（平成29～30年度）、山根 猛、鵜飼 広之、金岩 稔（平成29から令和元年度）

平成29(開始年度)～令和元年度研究経費（累計額）：61,038千円（研究経費は間接経費を含む）
（平成29年度：20,036千円、平成30年度：19,027千円、令和元年度：21,975千円）

【要旨】

全国でブルーギル、オオクチバスなどの侵略的外来魚の駆除のために、多大な労力をかけ捕獲が行われている。しかし、生息密度が低下すると捕獲が困難となり、根絶させるのは極めて難しい。池干しは効果的であるが使用できる場所が限られ、希少種の生息地や内水面の漁場など適さない場所も多い。またわずかな卵や稚魚を取り残す可能性もある。そのため、新たな防除手法として、外来魚の生息密度に関わらず駆除効果を維持し、根絶まで導くことができる技術の開発が必要である。

我々はブルーギルを対象に新たな防除技術「遺伝子制圧法」を考案した。本手法は、野生集団の雌を不妊化することで、次世代の集団サイズを減らし、根絶まで導く方法である。本方法では、雌の不妊化は、内在性の性成熟、卵形成に関わる遺伝子の働きを抑えることでもたやすいため、他生物からの外来遺伝子を組み込まないのが特徴である。これまでにブルーギルの全ゲノムおよび発現遺伝子の情報をデータベース化し、着目した雌の生殖能力に関係する遺伝子の配列情報を得ることができるようになった。不妊化遺伝子を搭載したブルーギルを作出するために、これまでに得られた全ゲノム情報と遺伝子編集技術を用いて、雌の性成熟や卵形成に関わる複数の遺伝子に対して変異導入個体としてモザイク変異を有するF0世代および少なくとも半分のゲノムに変異を持つヘテロ変異個体を作成し、その特徴や安全性を調べる段階まで進んだ。今後は、これらの成熟関連遺伝子変異個体を用いて、閉鎖された飼育施設の中で、自然交配による次世代への伝播し検討を実施する段階に達し、主たる研究目標を達成することができた。一方、本課題では、不妊化魚の効率的な作出のための技術として、DNAによる性判別マーカーの開発についても計画した。そのためにまず性判別マーカーの探索に必要な解析家系の交配を行い、親子の高純度なゲノムDNAを用いて、解析を行った。その結果、連鎖群4に、メスヘテロ型の性判別マーカーとして二つ同定することができた。但し、これら二つのマーカー間は離れており、どんな個体でも確実に性判別できるマーカーとまではなっておらず、より精度の高いマーカーを得るには、更なる領域の絞り込みが必要である。一方、オオクチバスについては、将来ブルーギル同様に本駆除技術開発がすぐできるように、ゲノム情報の整備を進めた結果、他生物種と比較して遜色のない高品質のドラフトゲノムを得ることができた。

【キーワード】

ブルーギル、全ゲノム解析、雌特異的成熟関連遺伝子、遺伝子編集、性決定様式

1. はじめに

ブルーギルやオオクチバスなどの侵略的外来魚は、全国の内水面の生態系の変容や内水面漁業の

衰退の要因の一つとして、環境問題、社会問題として一般にもよく知られている。これまで数十年にわたり、行政、漁協、市民が中心となって、各地で精力的に駆除努力が続けられている。しかしながら、根絶に成功した例は一部に限られている。その理由は、効果的な駆除手法が、主に捕獲など物理的な手段に頼らざるを得ないためと考えられる。一般に物理的な駆除を進め、やがて生息密度が低下すると駆除率も低下し、生息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⁾が知られる。しかし、この方法は一時的に大量の放出が必要なため、魚食性外来魚の場合、かえって在来魚資源に大きな打撃をもたらす危険性が懸念される。このほか、YY魚（トロイ染色体）の放流²⁻⁴⁾など、捕獲に頼らないいくつかの防除手法が考案・検討されたが、YY魚の大量生産の技術的な困難さや生産コストが問題とされ実施された例はない。一方、近年、蚊の不妊化を誘発する新たな手法として、ゲノム編集技術と遺伝子組み換え技術を組み合わせた遺伝子ドライブ（ジーンドライブ）⁵⁾が発表され、現在海外において実用化試験が実施されている。しかしながら当該手法は、蚊に外来遺伝子を組み込むことや、理論的には蚊を地球上から根絶しうることが専門家から指摘され、使用には懸念すべき点が多い。

外来魚駆除の問題に対して、従来の物理的な駆除技術を補完するため、新技術として遺伝子制圧法の開発を進めている。本方法では、雌の妊性に機能する遺伝子（図1.1.1）の働きをゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Cas9（図1.1.2）を用いて抑制して、雌特異的不妊化遺伝子を作成し、この遺伝子を有する雌特異的不妊化遺伝子搭載魚（雄）を外来魚野生集団中に放出し、野生集団の繁殖力を減じることによって、個体群を縮小していく方法である。

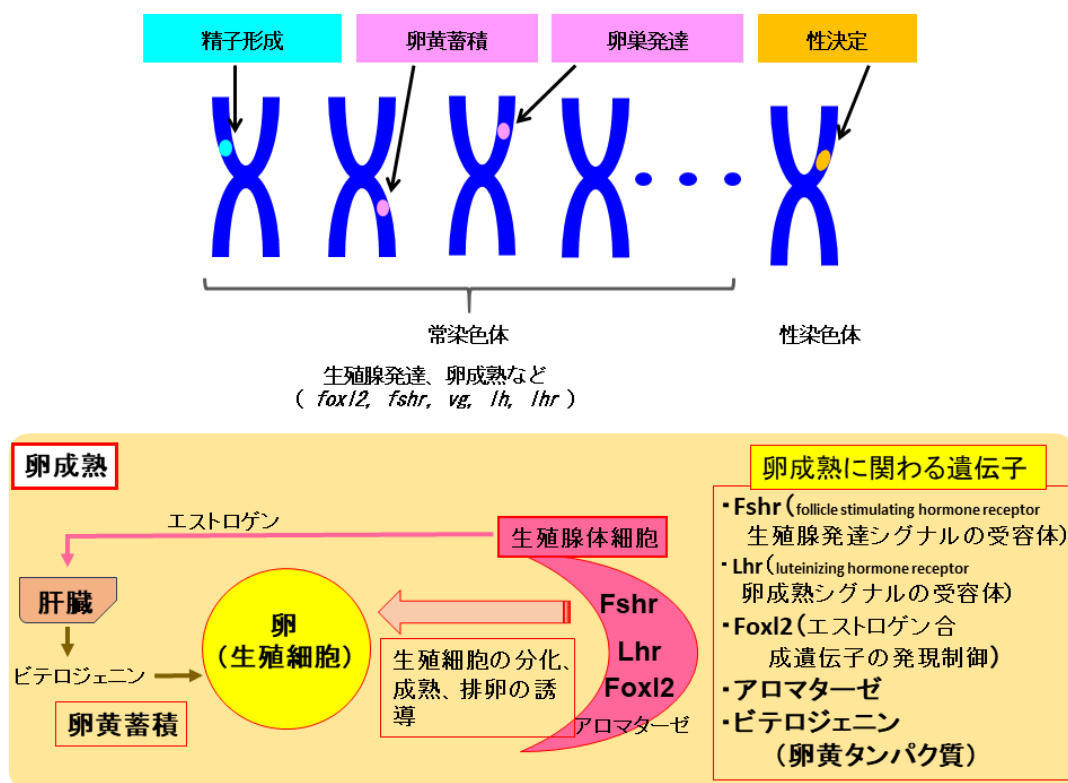
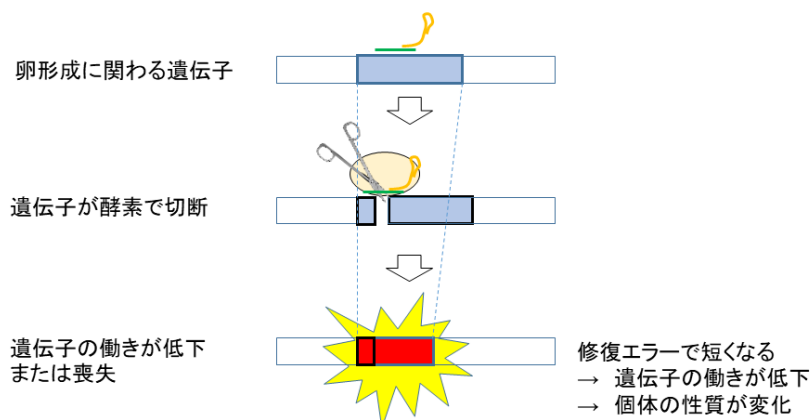


図1.1.1 遺伝子編集によって雌特異的不妊化遺伝子の候補となる卵形成、卵成熟関連遺伝子

CRISPR/Cas9 によるメス特異的不妊化遺伝子の生成



- メスの妊性(卵形成、発生)に関わる機能が失われる
- メス特異的不妊化遺伝子として機能する

図1. 1. 2 遺伝子編集による雌特異的不妊化遺伝子の作出概念図

本課題では、遺伝子編集技術を使って雌の成熟、繁殖に関わる機能が低下した遺伝子（不妊化遺伝子）を持つ個体を作出することが主な目的である。またあわせて、効率的に不妊化遺伝子を作出するために有用となる性判別マーカーの開発と、ブルーギルと並んで在来魚に侵略的影響を与えているオオクチバスについても、本技術開発ができるように全ゲノム情報の整備を行った。

2. 研究開発目的

ブルーギルにおいて“遺伝子制圧技術”の実証試験に必要な、不妊化遺伝子をホモ化（同型対立遺伝子型化）した実証魚の開発と数百尾単位の実証試験用稚魚の生産に向け親魚の準備を行う。また実証魚の生産に用いる親魚の開発状況に応じて、DNA中のオフターゲット（標的外変異）の評価を検討する。さらに性判別（雌雄判別）マーカーの開発、借り腹による増殖技術の実証と超雄（YY）個体の開発については、必要性を検討しながら開発を進める。さらに実証魚の生物特性（繁殖行動等）の把握するための飼育実験系の構築、将来の試験候補地の資源量の推定方法の検討、試験地候補地の条件検討と選定、試験魚の生産支援体制の構築、実証試験の社会合意形成の検討を進める。オオクチバスにおいては、不妊化遺伝子搭載魚の開発に必要な全ゲノムの概略版の作成を行う。各サブテーマの目標を以下に示す。

（1）不妊化遺伝子搭載魚の作出

これまでにブルーギルにおいて、不妊化遺伝子搭載雄の作出に必要な全ゲノム情報を整備し、遺伝子編集に必要なブルーギルの基本的な繁殖技術や顕微注入の基盤技術を開発した。次の開発段階として、不妊化遺伝子搭載雄の生物学的特性データを取得するための実証魚の作出の始祖となる遺伝子編集F0個体ならびにF1個体を作出することを目的とした。

（2）ブルーギル性判別マーカーの探索

遺伝子制圧法の駆除力強化のために、超雄（YY）化した不妊化遺伝子搭載魚を放流魚として使用することを検討している。超雄の作出には性判別マーカーの利用が有用であるが、性判別マーカーの開発には先ず連鎖地図情報が必要となる。これまでに、連鎖地図構築に用いるゲノムワイド多型検出技術には、取得データの精度検証によりGRAS-Di法が有効である結果を得ている。そこで本研究ではGRAS-Di法を用いて、ブルーギルの連鎖地図の構築を行うとともに性判別マーカーの開発をすすめた。一方、オフターゲットの評価については、不妊化遺伝子のホモ化個体が得られてからの検討となるが、

事前情報として、減数分裂時に生じる自然突然変異の発生状況を明らかにしておく。具体的には、交配により親から子へ世代が代わる際に変異がどの程度発生するか、両親と子の間のゲノム情報の比較解析(トリオ解析)により、基礎的知見を収集しておく。

(3) オオクチバスのゲノム情報収集

オオクチバス (*Micropterus salmoides*) は、環境省の特定外来生物に指定されており生態系への悪影響が高い侵略的外来種である。本種の効率的な駆除技術として、将来ブルーギル同様に不妊化遺伝子搭載魚を用いた遺伝子制圧技術を検討している。その第一歩として、ゲノム編集試験を行う際に必要となるゲノム研究基盤を得るため、オオクチバスのドラフトゲノムの構築を目指した。

3. 研究開発方法

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出

a. 効率的な遺伝子編集条件の検討

これまでに育成した *fshr* の遺伝子編集導入選抜個体 F0 (体細胞変異モザイク) から得られた精液を用いて、野生型雌と人工交配を実施した。しかしながら、そこから得られた数百の次世代 F1 について HMA 法により変異の導入を確認したところ、いずれの個体においても、生殖細胞系列への変異の伝播は確認できなかった。このことは、遺伝子編集時に発生中の細胞 (割球) 内での変異導入率が低く、変異が入った細胞の割合が低かったため、体細胞系列では変異導入細胞が検出できたものの、数の少ない生殖細胞系列には変異導入細胞が含まれなかったことが理由と考えられた。そのため、新たに個体内変異導入率を高頻度にあげる導入条件を検討した。

b. 遺伝子編集 F0 および F1 個体の作出

ブルーギルの雌特異的不妊化遺伝子の多重化・ホモ化に必要な予備交配家系の作出 (交配) を行い、性成熟するまで育成した。ブルーギル及び遺伝子編集個体の飼育については、研究所内の遺伝子組み換え実験安全委員会に置いて研究実施計画と実施施設 (逃亡防止二重防止対策が取れる屋内施設) (図 3. 1. 1) について事前審査を受けた上で、飼育試験を実施した。



パイプハウス



共同実験棟2

図3. 1. 1 編集ブルーギルの飼育施設と施設内の水槽の一例

雌の生殖腺で発現し性分化や卵巣機能の維持に重要な遺伝子の一つである *fshr* および *foxl2* の機能阻害のため、CRISPR/Cas の系を用いて、遺伝子編集 F0 個体の作出を行った。*fshr* は 2 つ、*foxl2* は 3 つの crRNA を設計し、*in vitro* で切断活性を確認した後に、Cas9 RNA とともに受精卵に顕微注入を行い、*fshr* の単独編集および *fshr* と *foxl2* の共編集を実施した。変異体の検出は HMA (heteroduplex mobility assay) あるいは塩基配列解析により行った。

また新たに雌特異的不妊化候補遺伝子となる、卵成熟関連遺伝子の遺伝子情報を収集し、整理した。

c. 雌特異的不妊化候補遺伝子の編集個体の表現型解析

次世代シーケンス技術を用いて、雌特異的不妊化候補遺伝子において、遺伝子機能の低下が示唆される遺伝子編集変異ホモ(配列置換型)個体について、生殖腺の発達状況を外部形態及び組織切片の観察により解析した。

(2) ブルーギル性判別マーカーの探索

a. 性判別マーカー解析家系の作出と連鎖地図の作成

三重県勝田大池からブルーギル2個体を採取し、三重県増養殖研究所で人為交配を行った(図3.1.2)。人為交配により得られた子供96個体と親2個体からゲノムDNAを抽出し、GRAS-Di法によるライブラリー作成後、Illumina HiSeq2500によりシーケンスを行った。

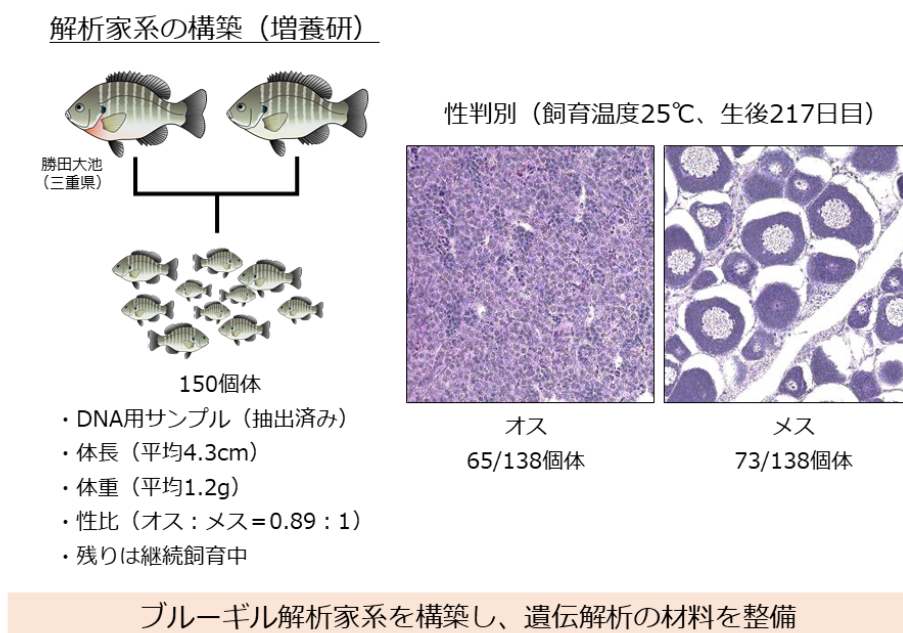


図3.1.2 性判別マーカーの開発のための解析家系の構築

リードの前処理後、BWA-MEMを用いてドラフトゲノムにマッピングを行った。変異解析にはHaplotypeCallerを、連鎖地図構築にはLep-MAPを、連鎖地図とドラフトゲノム情報の統合にはALLMAPSをそれぞれ用いた(図3.1.3)。

RAD-seqとGRAS-Di®の変異解析

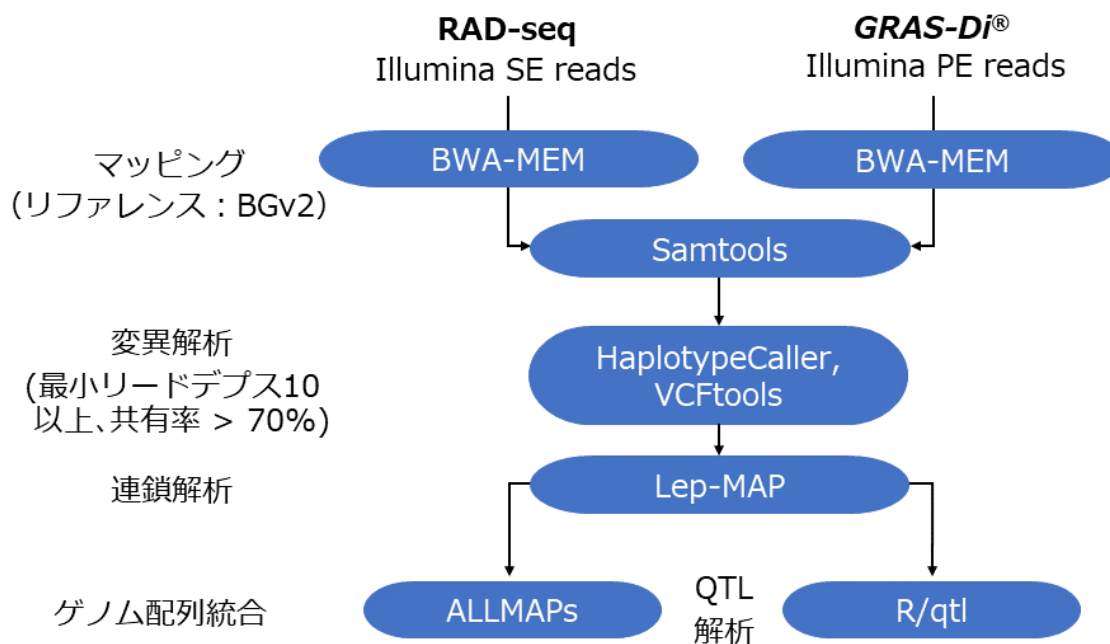


図3.1.3 性判別マーカーの開発のための解析概要図

b. ブルーギルのゲノム情報の高度化

性判別マーカーの開発試験の結果、性決定様式はZW型であることが示唆された。これまでブルーギルの性決定様式はXY型と考えられていたため、更なる詳細な解析のため、ブルーギルのドラフトゲノムのさらなる高度化を行い、ZW型の性決定様式に間違いがないか確認することとした。

c. 減数分裂時に生成する新規突然変異の検出（トリオ解析）

ブルーギルにおいて一世代で、新規 (*de novo*) の変異がどのくらい生じるか、両親と子の全ゲノム情報の比較解析（トリオ解析）により実施し、評価した。三重県勝田大池から採取されたブルーギル親2個体と、三重県増養殖研究所で人為交配して得られた子供3個体からゲノムDNAを抽出した。インサートサイズ420 bpのショットガンライブラリーを作成し、NextSeq500 (Illumina) によりペアエンドシーケンシングを行った。低精度配列のトリミングにはTrimmomaticを、ドラフトゲノムへのマッピングにはBWAを、変異解析にはHaplotypeCallerとVCFtoolsをそれぞれ用いた (図3.1.4)。

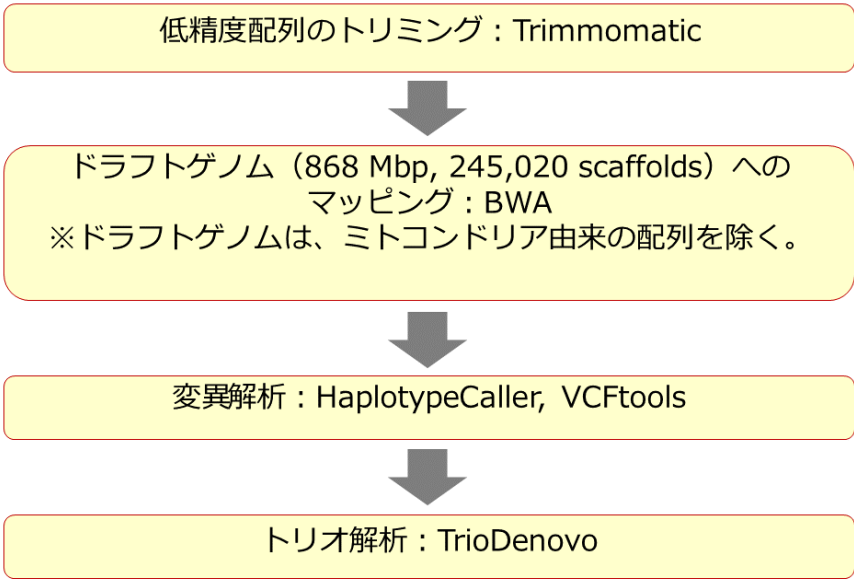


図3.1.4 トリオ解析のための解析パイプライン

(3) オオクチバスのゲノム情報収集

大分県清六池からオオクチバス雄成魚を採取し、血液からゲノムDNAを抽出した。4種類のインサートサイズ (240 bp, 360 bp, 480 bp, 720 bp) のショットガンライブラリーを作成し、Illumina NextSeq500により150 bpペアエンドシーケンスを行った。また、PacBio Sequelによりロングリードシーケンスを行った。得られた2種類のNGSリードを用いたハイブリッドアセンブリを実施し、ドラフトゲノム配列を構築した(図3.1.5)。

データ取得と*de novo*アセンブリ

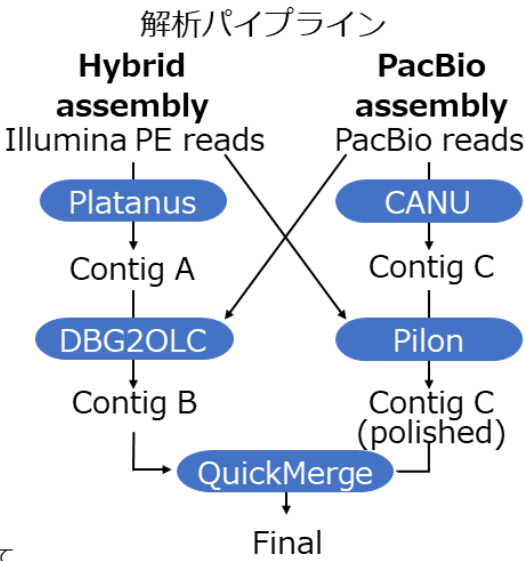
(A) ショートリード

lib	reads	size	bases	coverage
240PE	168,738,269	190	32,060,271,110	33
360PE	135,506,280	145	19,648,410,600	20
480PE	100,369,154	145	14,553,527,330	15
720PE	7,143,632	145	1,035,826,640	1
total	411,757,335	-	67,298,035,680	69

(B) ロングリード

filter	reads	size	bases	coverage
raw	2,593,305	10,370.3	26,893,257,311	27

※オオクチバスのゲノムサイズ=978 Mbpとして
coverageを算出 (Animal Genome Size Databaseより)



合計79.0 Gbpのデータを取得し、ハイブリッドアセンブリを実施

図3.1.5 オオクチバスのドラフトゲノムの解析パイプライン

4. 結果及び考察

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の作出

a. 効率的な遺伝子編集条件の検討

より効率的に遺伝子編集を実施するため、アドバイザーの熊本大学の北野健教授のコメントならびに論文⁷⁾を参考に、個体内変異導入率を高頻度にあげる導入条件を検討した(図4.1.1、図4.1.2)。その結果、Cas9タンパクの併用と各種RNAを高濃度にすることによって、変異導入個体の作出率は変わらないものの、個体内の変異導入率は高くなることが明らかになった。

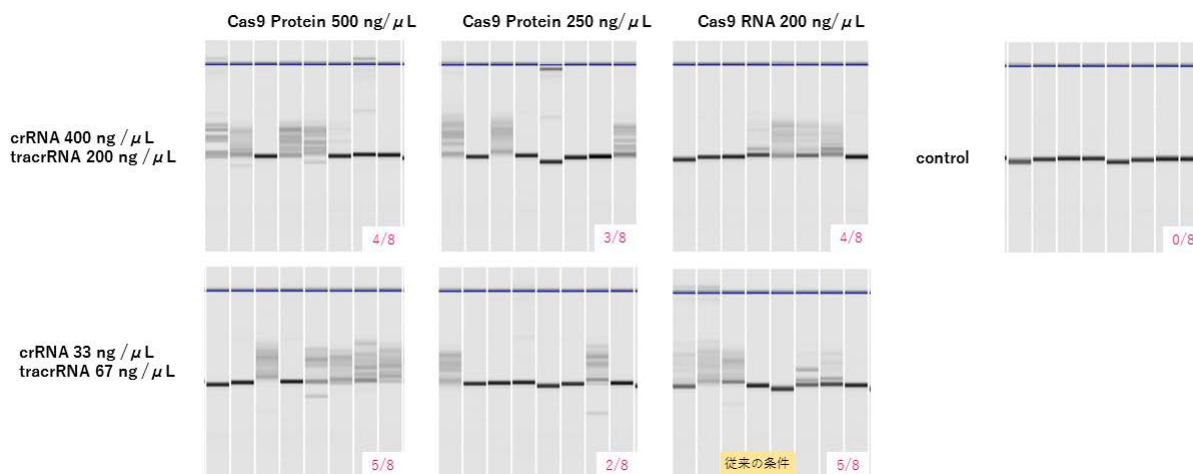


図4.1.1 遺伝子編集導入効率の検討(変異導入個体の作出率)

Cas9タンパクあるいはRNAおよび各種RNAの濃度条件を検討した。

上段一番左端が最も高濃度であったが、変異が入った個体の割合は8個体中4個体(50%)で、下段一番左から3番目の従来の条件の場合(8個体中5個体:62.5%)と大きな違いはなかった。

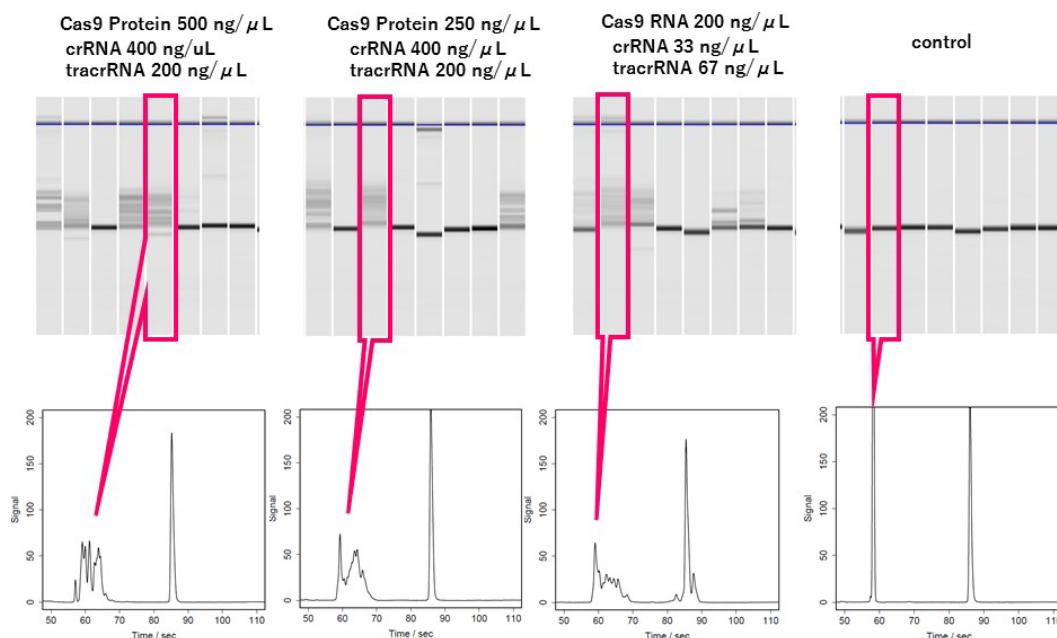


図4.1.2 遺伝子編集導入効率の検討(個体内変異導入率)

変異導入上段一番左端のものが最も高濃度であったが、変異が入った同一個体内において、を示すバンドの数は、他の低濃度条件より多く、変異が入っていないバンド(未編集DNA)の割合が減っていた(下段の各ピークの高さを参照)。

また、F0（変異モザイク世代）が成熟した段階で、オスなら精液からDNA抽出を行い、変異が導入されていることを確認することにより、次世代作成を待たずに効率的に研究が進められることがわかった。*foxl2*について、成熟したF0親魚2尾の精液（微量）で変異が確認でき（図4.1.3）、これらの個体について水温をコントロールした人工催熟プログラムを実施し、F1作出の準備を進めた。*foxl2*について、成熟したF0親魚2尾の精液（微量）で変異を確認したF0（変異モザイク）個体から、水温をコントロールした人工催熟プログラムを実施し、F1作出を試みたが、作出したF1ではバンドシフトによる変異が数十個体調べたが確認できなかった。

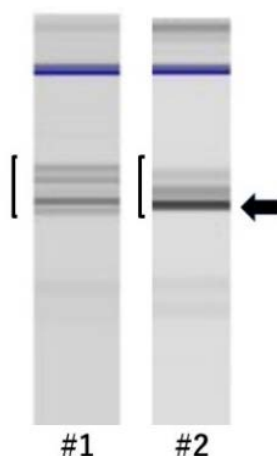


図4.1.3 *foxl2* の遺伝子編集が確認されたF0親魚2個体における精液での変異確認

#1個体の方が、#2個体より多くのバンドシフトが確認できることから、

変異が入っている細胞（精子）の割合が高いことが分かる。

矢印：変異の入っていないDNAバンド、括弧：変異が入ってシフトしたDNAバンド

b. 遺伝子編集F0およびF1個体の作出

*fshr*については、編集率が高いF0を再度作出した。一方、新たに不妊化遺伝子となりうる編集候補遺伝子として、*FSH-β*遺伝子、卵巣型*cyp19a*遺伝子、ビテロジェニンA, B, C各遺伝子、コリオジェニンH, L各遺伝子を同定した。さらにタンパク質コード領域以外のターゲットとして、ヒトmiRNA-42, miRNA-200bに対応するマイクロRNAコード領域およびそのターゲットとなるZEB1遺伝子3' UTR miRNA結合領域、NR5A2/LRH-1遺伝子予想卵巣エンハンサー領域を同定した。また、雌の生殖腺で発現し性分化や卵巣機能の維持に重要な遺伝子*foxl2*は、機能欠損により遺伝的雌の雄化または不妊化が期待される候補遺伝子の一つであるが、下垂体、胚発生期の顔面（目の周囲）など、生殖腺以外においても発現が認められることから、他の組織においても重要な機能を担っていると考えられる。*foxl2*遺伝子予想卵巣エンハンサー領域については、卵巣だけではなく生存に有用な組織での発現が必須であることが知られているが、多種の生物種のゲノムDNAとの比較から探索し、卵特異的なエンハンサーの推定を行った（図4.1.4）。その他の候補遺伝子について、一部遺伝子編集魚の作出を開始した（表4.1.1）。*FSH-β*について、設計したcrRNAのエクソン上の位置を以下に示す（図4.1.5）。

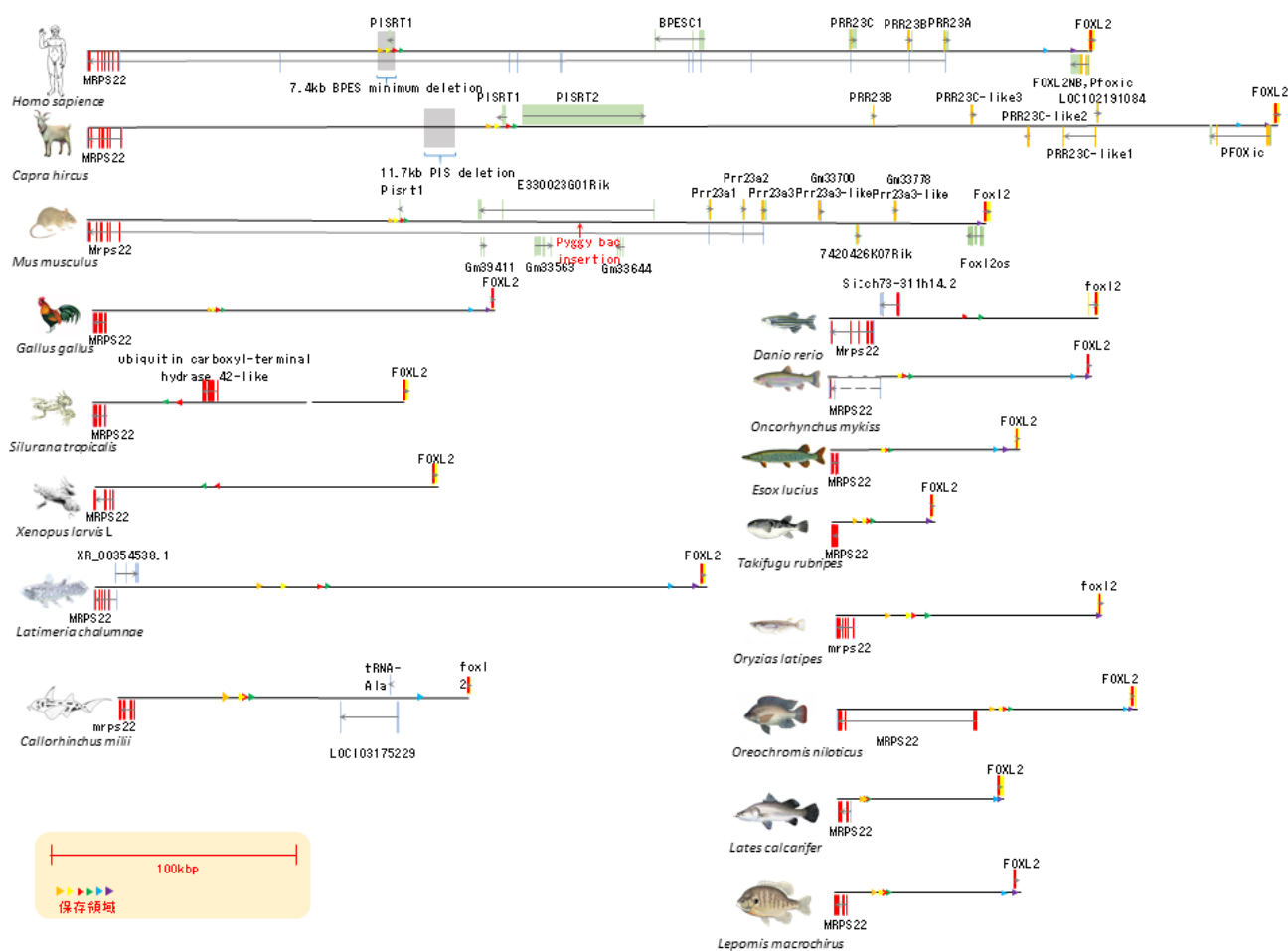


図4. 1. 4 foxl2エンハンサーの各種類口類における保存領域のゲノム上の位置

表4. 1. 1 様々な雌成熟関連遺伝子の遺伝子編集魚の開発状況（赤字は予定）

遺伝子	ガイドRNA	F0の作出	F1および遺伝子の多重化・ホモ化状況
fshr	3種作成済	作出選抜済	ポジF0育成中
foxl2	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1 作出(稚魚育成中)
fsh-β	2種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→ホモ/ヘテロポジF1作出(親魚) →20春ホモ/ヘテロF2大量種苗生産予定
VgA	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1 作出(稚魚育成中)
VgB	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1 作出(稚魚育成中)
VgC	2種作成済	作出選抜済	同上
chg H	2種作成済	作出選抜済	WTと交配→ヘテロ+WT集団(稚魚育成中)
CYP19a	2種作成済	作出選抜済	WTと交配→ヘテロ+WT集団

FSH-β、*foxl2*、*fshr*、卵巣型*cyp19a*、ビテロジェニンA, B, C各遺伝子について、これまでに作出したゲノム編集F0からF1を作出し、サンガー法および次世代シーケンサーを用いて、個体ごとに変異塩基配列解析を行った。

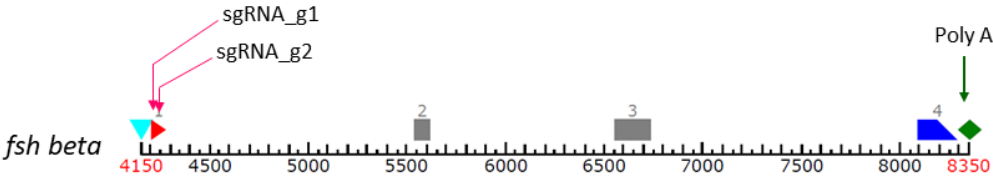


図4. 1. 5 *fsh-β*上に設計したcrRNAの位置

c. 雌特異的不妊化候補遺伝子の編集個体の表現型解析

*FSH-β*については、F1のうち48個体について塩基配列を解析したところ、同じタイプの変異がゲノム中に両アレルに入っているホモ型変異の個体が、2-6パーセントの割合で得られていることが判明した（図4. 1. 6）。

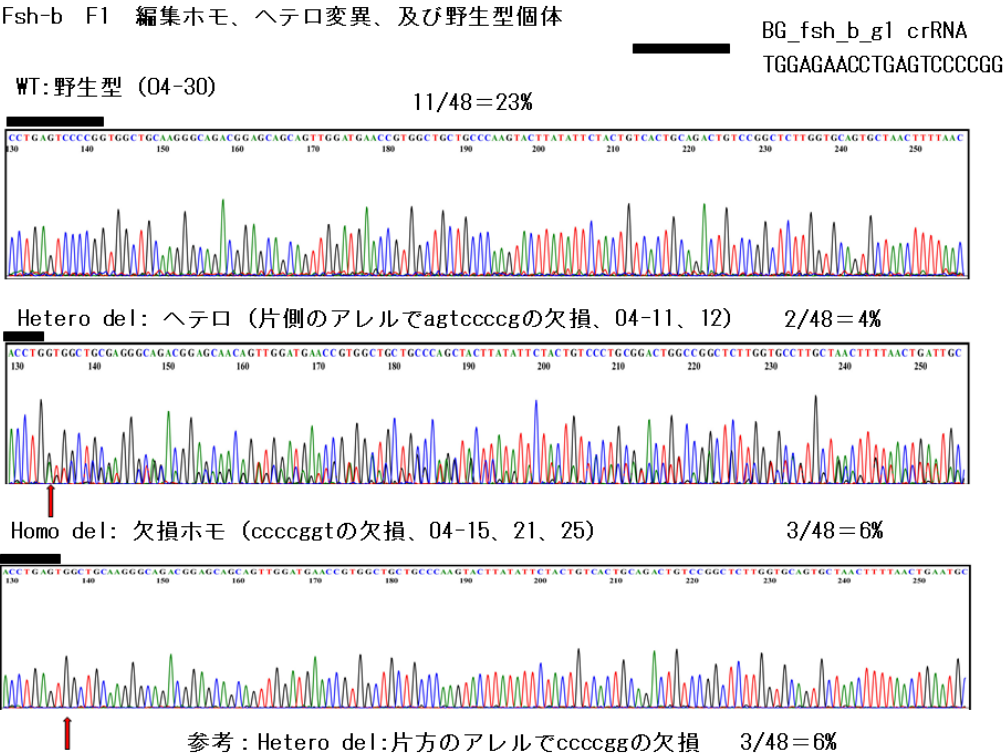


図4. 1. 6 *fsh-β*上に生じた欠損変異の一例

そのうち、エクソン上のccccggがttggaatgにホモで置換された雄雌各1個体について（図4.1.7）、置換変異以降のアミノ酸配列の変異を演繹したところ、大きくタンパクのアミノ酸配列が欠損することが示されたことから、機能的なFSH-βタンパク分子は形成できないことが示唆された（図4.1.8）。

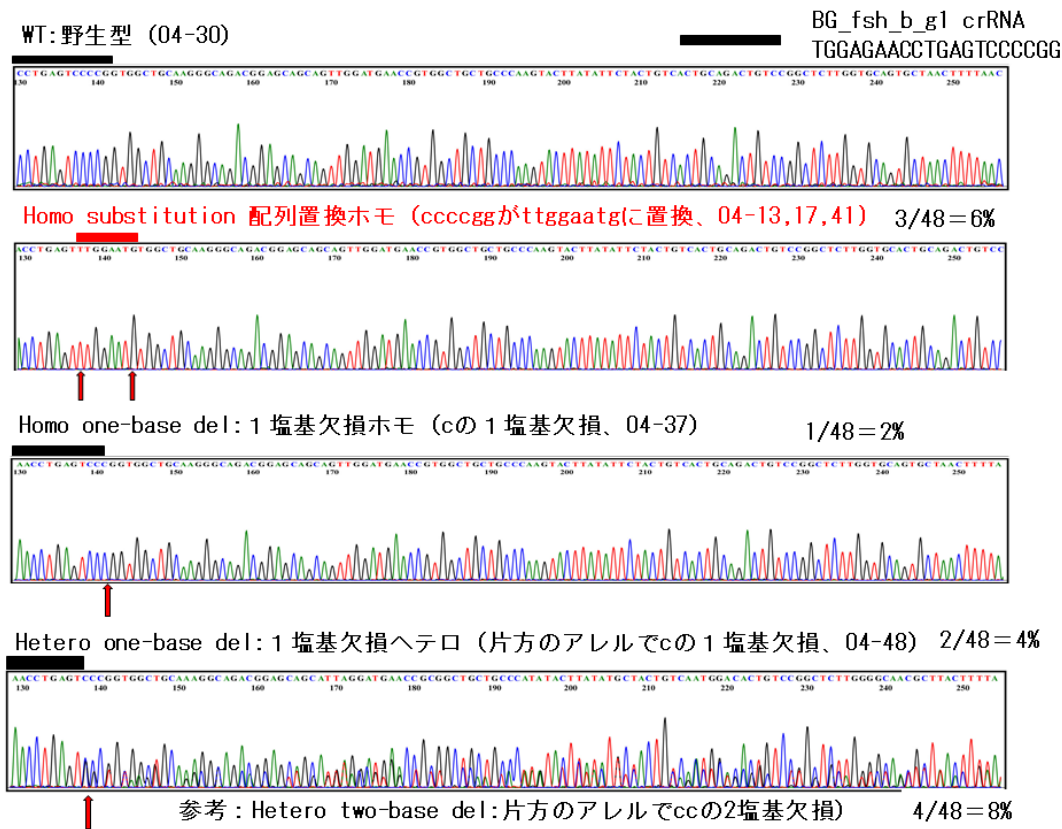


図4.1.7 *fsh-β*上のコード領域配列内に見られた置換及び欠損変異

変異型のFSHβタンパクのアミノ酸配列

MLENLSGCKGRSSSWMNRGCCPSTYILLSLQTVRLLVQC* *：停止コードン

↑

変異箇所

野生型のFSHβタンパクのアミノ酸配列

MLENLSRWLQGGTEQQLDEPWLLPKRKGLEPLALPKLLREKDHDFGGLSRRLYQTRQRM
QLVYVMAAVLALVRVGQGCFSFCHLTNISPVECSGSIETIYTTICEGQCYHEDPVYIGYHDWAE
QKICNGDWTYEVKHIEGCPVGVTPVARNCECTACNAGNTYCGRFPYISSCLSF

図4.1.8 *fsh-β*上のコード領域配列内のccccggがttggaatgにホモで置換された事例

A:編集ホモ個体の塩基配列、B:編集ホモ個体の演繹アミノ酸配列、
C:野生型のアミノ酸配列、赤矢印は変異の位置

両ホモ置換変異個体を解剖して、その生殖腺の発達状況を野生型個体と比較し調べたところ、

雄雌それぞれの精巣、卵巣ともに外見から成熟発達中の様子が観察された（図4.1.9）。さらに生殖腺の組織切片を作出して観察したところ、卵巣内には卵が、精巣内には精子が形成されている様子が観察された（図1.4.10）。同タイプの変異を持つ個体は他には見つからなかったため、産卵シーズンにおいて実際に産卵、採精してみて、本置換変異による妊性の有無を明らかにすることはできなかった。

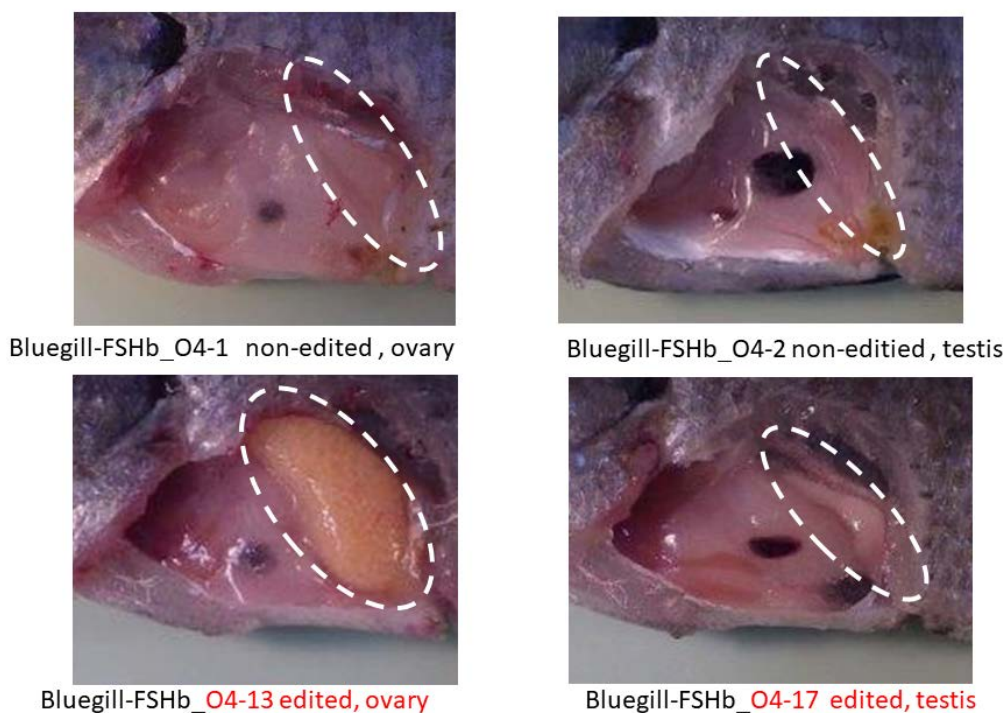


図4.1.9 *fsh-β*上のccccggがttggaatgにホモで置換された編集個体と野生型個体の生殖腺

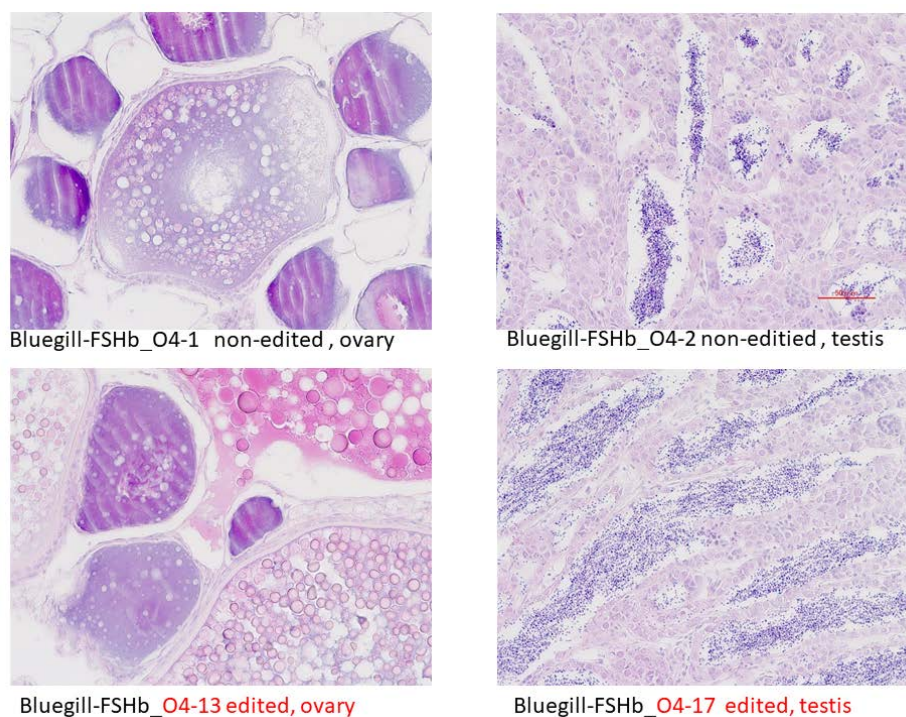


図4.1.10 *fsh-β*上のccccggがttggaatgにホモで置換された個体の生殖腺の組織切片像

マウスでの *fsh-β* 遺伝子のノックアウト変異個体の表現型は、雄では精液量の減少（但し、機能的に正常）、雌では卵母細胞の成熟率が低く、排卵しづらいが、絨毛性ゴナドトロピンの投与により回復することが知られている⁷⁾。今回の *fsh-β* 遺伝子の機能ノックアウトと想定される個体では、卵黄蓄積が正常に行われていたが、最終成熟局面である排卵にどのような影響を与えるかについては、今後さらに詳細な解析が必要である。

今後、その他の欠損型の変異ホモ個体について通常の産卵期まで十分に成熟させて、その生殖腺の成熟状況と次世代の作出能を明らかにする必要がある(図4. 1. 11)。

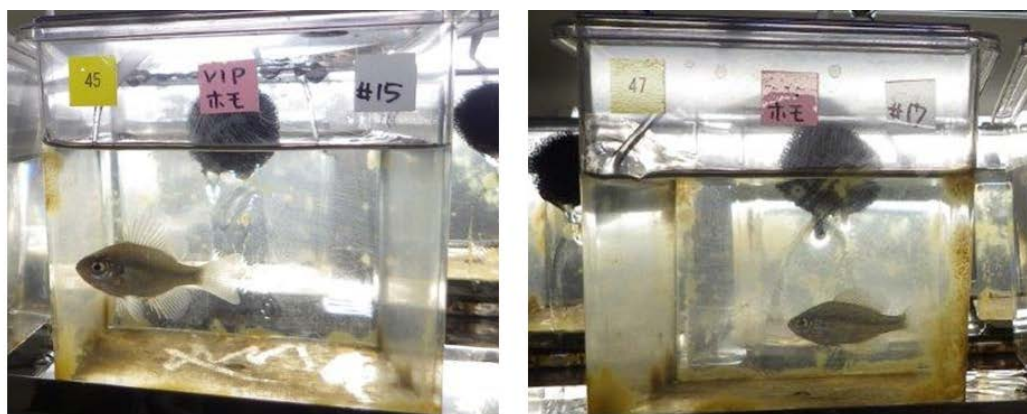


図4. 1. 11 *fsh-β* 上の配列がホモで欠損または置換された個体の一例

左：ccccggtの欠損ホモ個体、右：CCCCggがttggaatgに置換したホモ個体
それぞれ3ないし4の同タイプの変異を有する個体が確認された

一方、*foxl2*、*fshr*、卵巣型 *cyp19a*、ピテロジェニンA, B, C各遺伝子については、次世代シーケンサーでゲノム編集F0およびF1 個体において、変異の入り方を解析した。*fshr*単独編集についてはF0個体を約500個体作出し、ヒレ由来DNAを用いてHMAで1次選抜を行ったところ、内7個体が編集陽性候補と判定された。それらを成魚まで育成し生残した6個体について、再度HMAおよび塩基配列解析を行ったところ、雄雌各1個体が編集陽性で残り4個体は陰性であった。一方、*fshr*と*foxl2*の共編集を試みた群からは、*foxl2*単独陽性、*fshr*および*foxl2*共陽性の個体がそれぞれ5、3個体得られた。これらのゲノム編集F0およびF1魚は、変異の入り方でグループ化し、今後、同タイプの変異を持つオスメス個体を親魚として、メス特異的不妊化遺伝子を使った防除（駆除）技術の実証試験魚の作出に活用する予定である。一方、本年度作出したF1魚の作出試験から、現在の研究施設で数百から千個体程度の変異導入魚を生産できることが明らかとなり、将来の実証試験の実施に目途を立てることができた。

(2) ブルーギル性判別マーカーの探索

a. 性判別マーカー解析家系の作出と連鎖地図の作成

三重県勝田大池由来のブルーギル成熟個体の1対1交配により、解析家系としてF1をおよそ150尾作出し、飼育を開始した。飼育温度は25℃とし、生後217日目でサンプリングを行い、F1の体長、

体重、性別データの取得およびDNA抽出を実施した。性判別マーカーの探索に必要な解析家系の構築とサンプリングが終了し、H30年度以降に行う遺伝解析の準備が整った。さらに一部計画を前倒しして、遺伝解析に用いる次世代シーケンサーを用いた多型解析の選択肢（RAD法、アンプリコン法、GRAS-Di法など）を広げる予備検討として、解析家系の両親の全ゲノムリシーケンス解析を実施した。その結果、解析家系に存在するほぼすべてのDNA多型を同定することができ、両親の多型情報を活用した信頼性の高い遺伝解析の準備が整った（図4.1.12）。

両親の全ゲノム多型解析

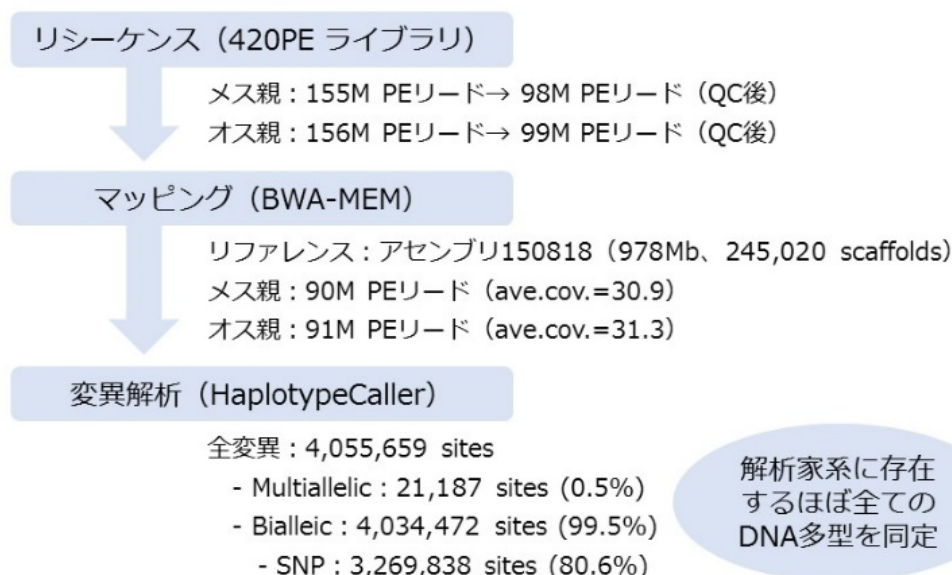


図4.1.12 性判別用家系の両親のゲノム多型解析

性判別マーカー開発に用いる解析家系として作出したF1の遺伝解析を開始した。全ゲノムリシーケンスデータを用いた精度検証の結果から、GRAS-Di法を選択した。GRAS-Di法を用いて親2個体及びF1子世代96個体を解析した結果、これらのサンプルで解析に十分なシーケンスデータを得ることができた（QC後、平均234万ペアエンドリード）。このデータと本事業（先行課題4-1408）で構築した全ゲノムアセンブリver. 150818により2,056 SNPを用いて変異解析を実施した。その結果、オス26連鎖群、メス23連鎖群から構成される1,930 SNPを配置した連鎖地図を構築した。また性決定遺伝子座の探索（性決定のQTL解析）の結果、メス地図の連鎖群16の末端部において、メス親ヘテロのSNPを検出した。この結果、性決定様式はZW型であることが示唆された。

b. ブルーギルのゲノム情報の高度化

これまでブルーギルの性決定様式はXY型と考えられていたため、更なる詳細な解析のため、ブルーギルのドラフトゲノムのさらなる高度化を行った。まず三重県五桂池由来の成魚メス1個体（全長15.1cm）の筋肉からゲノムDNAを抽出（図4.1.13）。全ゲノムデータを取得する方法として、ショートリード型およびロングリード型次世代シーケンサーを活用した効率的なハイブリッド *de novo*（新生）アセンブリを実施することにした。

ゲノム解読の解析個体

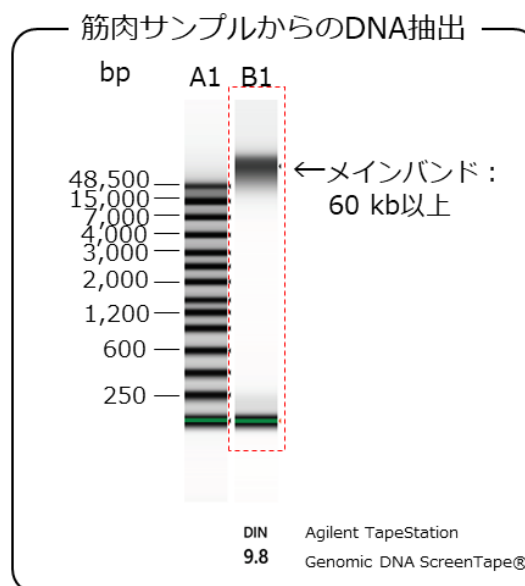
材料：メス成魚1個体



採取地：三重県五桂池

全長：15.1 cm

DNA抽出組織：筋肉

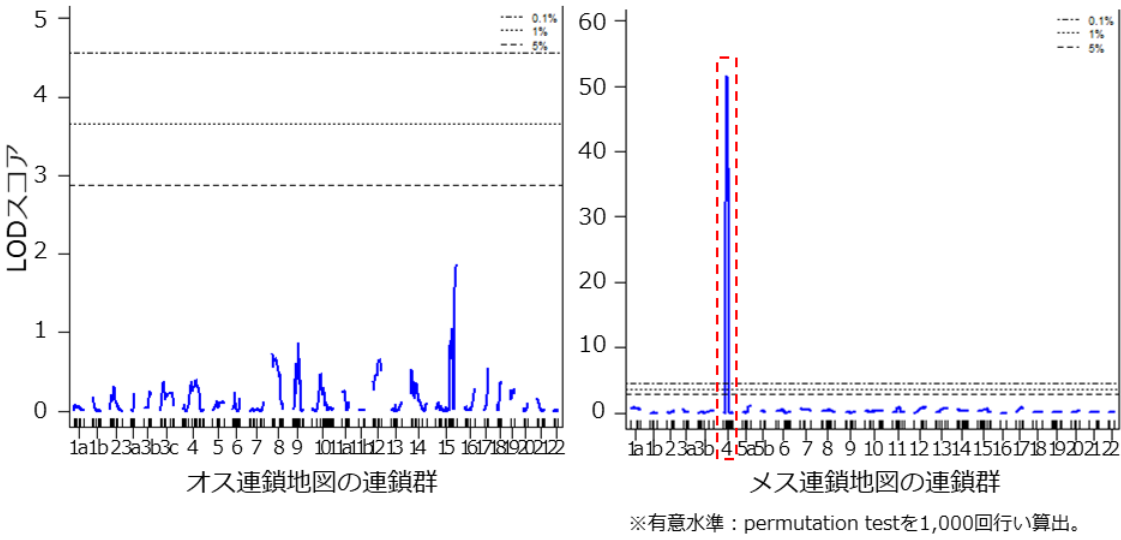


メス成魚の筋肉サンプルから高分子DNAを抽出

3

図4.1.13 ブルーギルドラフトゲノムの高度化に用いた個体とゲノムDNA

ショートリードおよびロングリードのシーケンスデータ（合計79.0Gb）を統合して解析した結果、総塩基長846Mbp、コンティグ数2,498のアセンブリ（BGv2）を構築した。既存の全ゲノムアセンブリ（150818）と比較して、コンティグ数は約1/168に減少し、N50長は約200倍に増加した。次に、H30年度に親2個体及びF1子世代94個体のGRAS-Di法により取得したシーケンスデータ、さらに新たにRAD-seq法により取得したシーケンスデータ（QC後、平均776万シングルエンドリード）を用いて、全ゲノムアセンブリBGv2をリファレンス配列としてマッピングし、連鎖地図を構築した。その結果、1,792座位のSNPマーカーを配置した24連鎖群が構築された。ブルーギルの染色体数（2n）は48本であるため、H30年度に構築されたオス26連鎖群、メス23連鎖群とした従来の連鎖地図を修正することができた。この連鎖地図を使って、性決定遺伝子座の探索を再度行った結果、メス親ヘテロのSNPとして連鎖群4（従来、連鎖群16と呼んでいたデータ領域に相当）に検出された。95%の信頼区間の条件を満たす領域は、10.0-11.7cM付近、マーカー数は2、コンティグ数は2であった（図4.1.14）。H30年度の解析において、性決定遺伝子座はメス親ヘテロのSNPとして得られ、性決定様式はZW型であることが示唆されたが、本年度の解析も同様の結果となった。この結果により、これまで一般にブルーギルの性決定様式はXY型と考えられていたが、本研究においてZW型であることが確認された。本成果は、メス特異的不妊化魚を使った防除技術の開発を進めるうえで、試験計画を修正するための重要な知見となる。



メス連鎖地図（メス親ヘテロSNP）の連鎖群4に性決定遺伝子座を検出 11

図4.1.14 連鎖群4における性決定遺伝子座領域

c. 減数分裂時に生成する新規突然変異の検出（トリオ解析）

1個体あたり平均1億6650万のペアエンドリードを取得した。低精度配列のトリミングでは、リードの78%が保持され、ゲノムサイズの被覆率は1個体あたり平均46倍となった。マッピング後の変異解析では、ドラフトゲノムと異なる351万箇所の変異が検出された。これらの変異のうち、親子間で矛盾のある変異の大部分は同一Scaffold上に存在（図4.1.15）し、その検出率は、平均 $5.4 \times 10^{-5}/\text{bp}$ であった。リードデプスやアレル頻度から、*de novo*変異の絞り込みを行った。間隔が100kb以上離れた矛盾サイトを検出したところ、トランジション変異はトランスバージョン変異より平均で2.2倍多く出現した（図4.1.16）。また、親子間で矛盾のある変異の推定率は、平均 $1.4 \times 10^{-7}/\text{bp}$ となり、他生物の変異率（ヒト・マウス： $1.2 \times 10^{-8}/\text{bp}$ ，タイセイヨウニシン： $2.0 \times 10^{-8}/\text{bp}$ ）と比較して、高い値を示した。

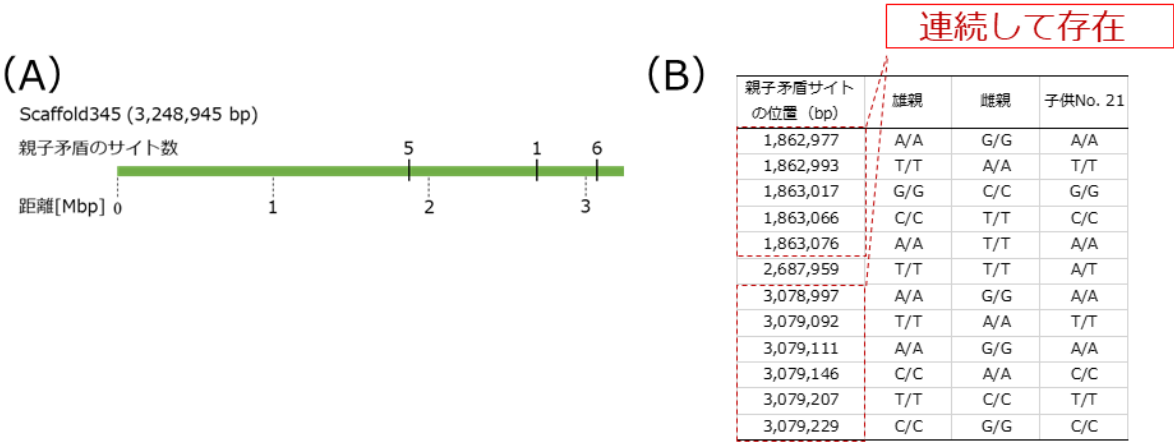


図4.1.15 Scaffold 345 上の親子矛盾サイト
(A) Scaffold 345 全体図、(B) 位置情報

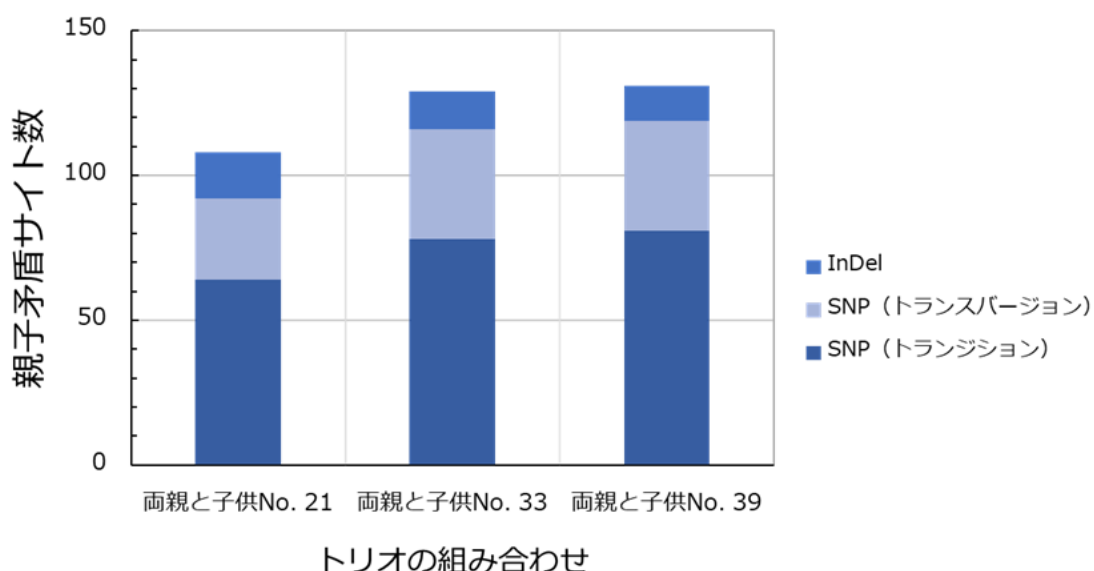


図4. 1. 16 親子間の矛盾サイトの内訳

(3) オオクチバスのゲノム情報収集

大分県の清六池由来の成魚オス1個体(全長39.0cm、体重979.14g)からゲノムDNAを抽出した(図4. 1. 17)。DNA解析用として筋肉、血液より、RNA解析用として全31組織よりサンプルを得た。全ゲノムデータを取得する方法として、ショートリード型およびロングリード型次世代シーケンサーを活用した効率的なハイブリッド*de novo*アセンブリを実施することにした。まず、イルミナを用いたショートリードのデータを取得し、*de novo*アセンブリを行った。その結果総塩基長880Mbp、コンティグ数82万のコンティグを構築した(図4. 1. 18)。さらに外注によりPacBioを用いたロングリードのデータを取得した。

PacBio Sequel (ロングリード) データの取得

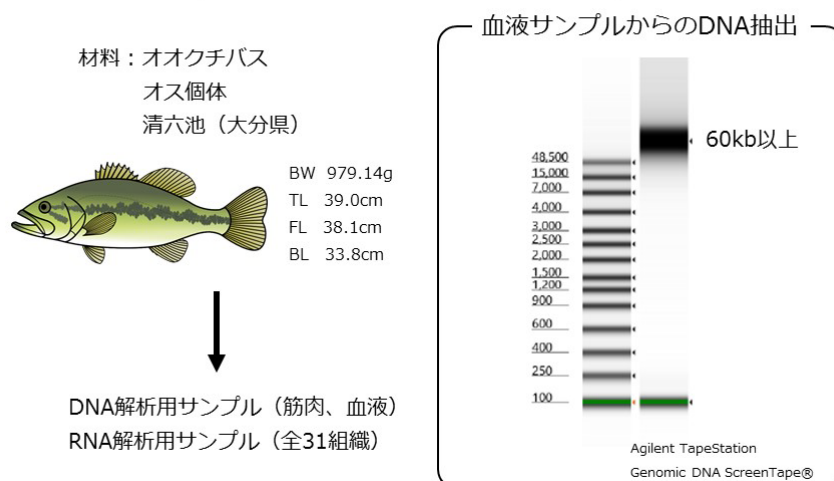


図4. 1. 17 オオクチバスのサンプリング情報とゲノムDNAの抽出

イルミナ（ショートリード）データの取得と*de novo*アセンブリ

lib	filter	reads	size	bases	coverage		lib	reads	size	bases	coverage
240PE	raw	509,839,032	149	75,966,015,768	78	選 抜 →	240PE	168,738,269	190	32,060,271,110	33
	after QC	380,660,274	145	55,195,739,730	56		360PE	135,506,280	145	19,648,410,600	20
	merge	168,738,269	190	32,060,271,110	33		480PE	100,369,154	145	14,553,527,330	15
360PE	raw	455,085,892	149	67,807,797,908	69	↓	720PE	7,143,632	145	1,035,826,640	1
	after QC	322,748,426	145	46,798,521,770	48		total	411,757,335	-	67,298,035,680	69
480PE	raw	346,883,194	149	51,685,595,906	53						
	after QC	213,521,964	145	30,960,684,780	32						
720PE	raw	31,497,026	149	4,693,056,874	5						
	after QC	7,143,632	145	1,035,826,640	1						

Coverageはゲノムサイズ978Mbとして計算

Platanus (1.2.4)

総塩基長=881,766,358 bp
コンティグ数=820,329
コンティグ長=1,075 bp (ave)
77,936 bp (largest)
5,347 bp (N50)

図4.1.18 オオクチバスゲノムのショートリードアセンブリ（短鎖解析データ結合）

シーケンスと前処理の結果、合計94 Gb（Illumina 67 Gb、PacBio 27 Gb）のデータを取得した。ショートリードおよびロングリードのゲノムデータを統合して解析した結果、総塩基長843Mbp、コンティグ数482のコンティグを構築した。非常に高品質のドラフトゲノムを構築することができた。具体的には、NCBIデータベースの硬骨魚25種のアセンブリ（Chromosome level assembly）と比較したところ、コンティグ数（482本）は4番目に少なく、N50長（13,330,889bp）は最長であったことから、非常に高品質のドラフトゲノムであることが明らかになった（H30年度当時）。これによって、オオクチバスにおいてもブルーギル同様にゲノム編集による不妊化遺伝子の作出がいつでも可能なゲノム配列情報が整備できたといえる。

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

まず、これまでブルーギルの性決定様式については、国内ではオスヘテロ型のXY型であると考えられていたが、性判別マーカーの開発の過程の中で、少なくとも今回の解析に用いた集団においては、メスヘテロ型のZW型であることが明らかとなった（海外の文献の一部にもZW型であることを示唆したものもあるため、性決定様式が種内で固定されているのか、あるいは地域集団によって変わるのかについては、なお検討が必要であると考えられる。今回、ブルーギルの性決定様式がゲノム情報解析から明らかになったが、ブルーギルの基本的な繁殖生理を考えるうえで、性決定の可塑性等の可能性も念頭に、生物学的実験等による更なる解析が必要と考えられる。遺伝子制圧技術においては、ZW型であっても基本的な駆除原理に影響はないが、効率性の面からの技術的な修正については検討を進める必要がある。

一方、*foxl2*遺伝子の各組織特異的発現調節領域については哺乳類においても長く不明であったが、ブルーギル等の条鰭類と四肢動物を含めた肉鰭類のゲノム情報を比較することにより、遺伝子のはるか上流にエンハンサー群として位置していることが初めて推察され、今後予想卵巣エンハンサー領域を新たな編集ターゲットとすることが可能となった。このことは*foxl2*遺伝子コード領域自

体の編集による卵巣機能以外の予想機能障害を、卵巣特異的調節領域を編集ターゲットとすることで回避できるものと期待される。同様に遺伝子そのものの破壊が弊害となることが予想されターゲットにできなかった*NR5A2/LRH-1*など他の遺伝子でも、タンパク質コード領域を避け、卵巣特異的発現調節領域をターゲットとすることで新たな不妊化遺伝子候補とし得ることから、発現調節領域を同定してターゲットにすることは不妊化遺伝子の今後の多重搭載化にとって極めて有効と考えられる。その他の様々な雌の成熟に関わる遺伝子については、遺伝子編集技術を用いた機能の一部欠損型個体の作出が進んでいる。

このように成熟に関わる多くの遺伝子について機能欠損魚を作出する試みは、メダカ、ゼブラフィッシュなどの小型実験魚類以外ではほとんど行われておらず、スズキ目における成熟特性の発見につながるかもしれない。またこれらの解析から、新たな繁殖生理学的知見、成熟および初回成熟の制御の仕組みが明らかになる可能性がある。特にブルーギルにおいては、多回産卵であること、営巣や卵・仔魚哺育を行うことなど、他の小型実験魚類や養殖対象種とは異なる独特な繁殖特性を有することが知られている。本研究では遺伝子編集魚の行動観察も含めた特性評価を企図しており、繁殖遺伝子と行動の関係については新規性の高い知見が得られることも期待される。また、レボミス属の雑種の作出は、種間、亜種間の生殖隔離のメカニズムの解析に使える実験魚系統として活用できると考えられる。

一方、現在遺伝子編集魚を野外使用するための前提として、まず外来遺伝子を保持しないこと（遺伝子組み換え魚ではないこと）を示すことに加え、遺伝子編集で副次的に生じるとされるオフターゲット変異を何らかの形で評価する必要があると考えられている。今回、減数分裂時に自然に生じる新規（*de novo*）変異、すなわち世代を経ることで突然変異が自然にどの程度発生しているかについて、ブルーギル初の科学的データを得ることができた。今後、この減数分裂時に発生する自然突然変異と、遺伝子編集により副次的に発生するオフターゲット変異を区別可能なのか、あるいはどのように評価すべきかを検討する際に極めて重要となる知見であるといえる。

オオクチバスの全ゲノムの取得については、高い品質のドラフトゲノムを得ることができた。これは将来、同じサンフィッシュ科であるブルーギルとの間でゲノム構造比較解析ができる事に繋がり、国内で侵略的外来魚として趨勢を誇っている両種について進化遺伝学的立場から新たな知見が得られることが期待できる。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

1) 第15回環境研究シンポジウム「持続可能な生産と消費 資源循環型の社会の構築をめざして」

（主催：環境研究機関連絡会、29年11月22日、一橋大学 一橋講堂）において、「外来魚の根絶のための不妊化魚による新規駆除技術の基盤開発」についてポスター発表を行った。本シンポジウムは、環境研究に関わる国立研究開発法人12機関および筑波大学から構成される環境研究機関連絡会が主催で、各研究成果について行政および研究関係者間で意見交換を行った。本課題で進めている遺伝子編集技術を用いた外来魚の駆除技術開発について、現在の開発状況に加えて、成果の活用に向けどのように社会合意形成を進めるべきかについて、行政担当者と意見交換を行った。科学的データに基づく正確な情報発信と正しい理解の醸成が重要であると提言した。

2) 令和元年10月29日、遺伝子編集技術を用いた本技術開発の現状について、大阪維新の会所属議員3名により見学依頼があり、三重県の増養殖研究所内にて研究紹介を行った。淀川のワンドにおける駆除活動が大阪府内で行われ市民の外来種問題に対する意識は高区活動も行われているが、現状では広すぎて駆除しきれないとの話が紹介された。また市民から、ゲノム編集や編集食品について説明を求められることが多いということで対応に苦慮していたが、本研究紹介を通じて、説明するための情報が得られたとのことであった。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

- 1) 令和元年度12月13日つくば市において、令和元年度環境研究機関研究交流セミナー（主催：環境研究機関連絡会、参加者約80名）において「我が国固有の内水面生態系の保全と再生に向けた新たな外来魚の防除技術」の発表を行った。環境土木の研究者や研究機関管理職と意見交換を実施した。考案した手法では駆除（根絶）に数十年かかるシミュレーション結果となっていることに対し、一見時間がかかることが欠点のようだが、急激に棲息生物相に変化を与えるより、時間をかけて駆除する方が生態系への影響はより少ないと考えられるという指摘があった。従来とは異なる新たな技術開発により、新たな視点による環境戦略の構築に貢献することが期待される。
- 2) 令和2年1月29日付で、特定非営利活動法人日本消費者連盟「遺伝子操作による外来魚駆除に対する公開質問状」が送付され、遺伝子操作をした生物を環境に放出することについて種の絶滅や近縁種や生態系に大きな影響を及ぼしうるため、環境影響評価に関し質問を受けた。それに対し令和2年2月17日付けで当機構所長名により回答を発出した。その内容は、環境影響評価については、専門家の意見を伺いながら閉鎖された研究施設内で、捕食や増殖による水中生物相への影響など環境影響評価することが必要であること、また海外で研究が進められているゲノム編集技術と遺伝子組み換え技術を組み合わせた遺伝子ドライブ技術と混同されていたため、当手法では種の絶滅の可能性がある遺伝子ドライブ技術は用いておらず、また将来も使う予定はない旨回答した。本回答は同団体のWEBサイト上で公開されている（<https://nishoren.net/new-information/12614>）。今後、ゲノム編集生物の野外利用に関する研究が実施されることも想定されるため、どのような環境影響評価が必要か検討する際、具体的な事例として、影響評価の項目立てや試験データの取得方法について検討するための予備試験やモデルケースとして本試験魚が利用できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) 日本水産学会ミニシンポジウム「魚類における不妊化研究の最前線」（開催日令和元年9月8日、福井県立大学、聴講者約50名）において、Lene Kleppe氏（ノルウェー海洋研究所・ノルウェー）を招聘し、「遺伝子編集による大西洋サケの不妊化（<https://doi.org/10.2331/suisan.WA2697-4>）」について招待講演を実施した。背景としては、遺伝子編集を用いた魚類の不妊化技術の開発状況およびその実用化に向けた社会合意形成についてノルウェー国内およびEU圏内の動きについて情報を得ることによって、本課題で進めている侵略的外来種の抑制手法技術開発の実用化への道筋を検討し見定める一助とするためである。ノルウェーでは、遺伝子編集を用いた養殖大西洋サケの不妊化技術開発により、野生集団への遺伝的移入の問題の解決を図る研究が世界的にもトップレベルで進んでいる。現在、遺伝子編集魚を社会生活や産業活動の中で活用する研究は世界各国で進んでいるが、その規制については各国で対応が個別に検討されている状況である。将来的には、国際的な枠組みでの議論に収斂していくことが予想されるが、世界的な動きを把握することは今後の環境技術研究の開発を進めるうえでも有益であると考えられる。将来的には、遺伝子編集魚の健全性の評価手法技術の開発について、両国を中心に国際共同研究が実施できるよう研究資金の獲得について準備を検討している。

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。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 岡本裕之：みなと新聞、養殖研究フロンタイン「ゲノム編集（下）、外来魚を不妊化し駆除へ」（H31年1月17日）投稿記事
- 2) 岡本裕之：増養殖研究所レター、No8、p17、研究情報「ゲノム編集で外来魚を駆除する技術開

発」(H31年3月)

- 3) 平井俊朗、岡本裕之、北野健：日本水産学会誌、86(2)、98、(2020)、ミニシンポジウム記録「魚類における不妊化技術の最前線」はじめに、<https://doi.org/10.2331/suisan.WA2697-1>
- 4) 岡本裕之、奥 宏海、栗田潤、石川 卓、山口寿哉、内野翼、正岡哲治、藤原篤志、河村功一、古澤昭人：日本水産学会誌、86(2)、98、(2020)、ミニシンポジウム記録「魚類における不妊化技術の最前線」2. ゲノム編集によるブルーギルの不妊化駆除技術開発、<https://doi.org/10.2331/suisan.WA2697-3>

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 岡本裕之、藤原篤志、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、河村功一：第15回環境研究シンポジウム：(2017)
「外来魚の根絶のための不妊化魚による新規駆除技術の基盤開発」
- 2) 奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、河村功一、古澤昭人、河村佳正、風間崇宏、南野洋孝、横山雅仁、小川隆一：第13回外来魚情報交換会：(2018)
「遺伝子制圧法によるブルーギル駆除技術の開発とそれに対する意識調査」
- 3) 岡本裕之、石川卓、栗田潤、山口寿哉、奥宏海、正岡哲治、内野翼、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会(2018)
「遺伝子制圧を目的としたブルーギルにおける *fshr* および *foxl2* の遺伝子編集F0個体の作出」
- 4) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会(2018)
「硬骨魚類におけるRAD-seq法のSNPジェノタイピング精度」
- 5) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志：平成30年度日本水産学会春季大会(2018)
「ブルーギルにおけるトリオ解析の試み」
- 6) 栗田潤、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：平成30年度日本水産学会春季大会(2018)
「遺伝子編集技術を目的としたブルーギル *foxl2* 遺伝子発現調節領域の生物間ゲノム情報比較による推定」
- 7) Okamoto H, Ishikawa T, Oku H, Uchino T, Fujiwara A, Yamaguchi T, Masaoka T, Kawamura Y, Furusawa A, Kawamura K, Kurita J: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Generation of gene-edited bluegill *Lepomis macrochirus* for control and eradication of invasive species by gene induced suppression for alien species.
- 8) Oku H, Kurita J, Ishikawa T, Yamaguchi T, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Transplantation of bluegill *Lepomis macrochirus* spermatogonial cells to other kinds of genus *Lepomis*: preliminary study for surrogate production of bluegill.
- 9) Yamaguchi T, Kurita J, Ishikawa T, Oku H, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Sex reversal in bluegill (*Lepomis macrochirus*) by oral administration of sex hormone.
- 10) 内野翼、須田亜弥子、岩崎裕貴、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成30年度日本水産学会秋季大会(2018)
「GRAS-Di法を用いたブルーギル連鎖地図の構築」
- 11) 内野翼、須田亜弥子、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成30年度日本水産学会秋季大会(2018)
「オオクチバスのドラフトゲノムの解析」

- 12) 栗田潤、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、桐生郁也、藤原篤志、岡本裕之：第13回外来魚情報交換会：(2019)
「ブルーギル初期飼育と3倍体作出技術」
- 13) 内野翼、須田亜弥子、西木一生、奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、藤原篤志、平成31年度日本水産学会春季大会 (2019)
「ブルーギルのドラフトゲノムの高度化」
- 14) 吉武和敏、内野翼、藤原篤志、奥宏海、栗田潤、岡本裕之、木下滋晴・浅川修一、H31年度日本水産学会春季大会 (2019)
「連鎖解析データからスキャフォールドを伸長する新規ソフトウェアSEDLAの開発および検証」
- 15) 岡本裕之、奥宏海、内野翼、栗田潤、河村功一、正岡哲治、山口寿哉、山口友樹、古澤昭人、藤原篤志、令和元年度環境研究機関研究交流セミナー (2019)
「我が国固有の内水面生態系の保全と再生に向けた新たな外来魚の防除技術」
- 16) 岡本裕之、奥 宏海、栗田潤、石川 卓、山口寿哉、内野翼、正岡哲治、藤原篤志、河村功一、古澤昭人、令和元年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム (2019)
「ゲノム編集によるブルーギルの不妊化駆除技術開発」
- 17) Okamoto H, Araki K, Ishikawa T, Oku H, Kurita J, Masaoka T, Uchino T, Yamaguchi T, Fujiwara A and Furusawa A: 令和元年度日本水産学会秋季大会 (2019)
“Production of F1 generation of *fshb* edited bluegill.”
- 18) Okamoto H, *et al.*: Marine Biotechnology conference 2019 (2019)
“Evaluating the optimal timing of fish egg microinjection for genome editing.”

(3) 知的財産権

- 1) 「生物個体群の縮小方法」(特願2016-054558)：令和2年5月28日現在、審査対応中(先行課題4-1408にて出願)
- 2) 「魚類頭微注入法」(特願2016-057619)：令和2年5月28日現在、審査対応中(先行課題4-1408にて出願)

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 水産研究・教育機構増養殖研究所育種研究センターホームページ、H29年4月1日より、ゲノム育種グループの研究紹介)、外来種問題における遺伝子制圧法の概念について発信中
- 2) 平成29年度多気町教育研究会理科教育部会研修会(主催：三重県多気郡教育研究会理科教育部会、H29年7月26日、増養殖研究所玉城庁舎、聴講者20名)にて講演
- 3) 平成29年度多気町教育研究会環境部会研修会(主催：三重県多気郡教育研究会環境部会、H29年7月26日、増養殖研究所玉城庁舎、聴講者10名)にて講演
- 4) 平成29年度水産研究・教育機構増養殖研究所一般公開(H29年7月29日、参加者242名)にて成果紹介
- 5) 平成29年度玉城町教育振興会研修会(主催：三重県玉城町教育振興会、H29年8月22日、増養殖研究所玉城庁舎、聴講者18名)にて講演
- 6) 第123回名古屋市立大学サイエンスカフェ「ゲノム編集で外来魚を根絶へ～卵を作る遺伝子の働きを抑えて～」(主催：名古屋市立大学大学院システム科学研究科、H29年8月25日、ナディアパーク7階7thカフェ、聴講者約50名)にて講演
- 7) 平成29年度宮川用水土地改良区研修会(主催：宮川用水土地改良区、H29年11月2日、増養殖研究所玉城庁舎、聴講者45名)にて講演
- 8) 平成29年度天竜川漁協研修会(主催：天竜川漁業協同組合、H29年11月10日、増養殖研究所南勢庁舎、聴講者11名)にて講演
- 9) 平成29年度香川県淡水漁協研修会(主催：香川県淡水漁業協同組合、H30年1月29日、増養殖研究

所玉城庁舎、聴講者13名）にて講演

- 10) 第13回外来魚情報交換会（主催：琵琶湖を戻す会、H30年1月27-28日、草津市立まちづくりセンター、聴講者約100名）にて講演
- 11) 灘中学校および灘高校生物部学校外学修活動「遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の研究紹介」（H30年7月31日、聴講者25名）
- 12) 東京大学農学部3年生学校外学修活動「遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の研究紹介」（H30年9月5日、聴講者8名）
- 13) 平成30年度多気町教育振興会研修会（主催：三重県多気町教育研究会、H30年7月25日、増養殖研究所、聴講者25名）にて講演
- 14) 平成30年度三重県伊勢市教職員（理科担当）研修会（主催：三重県伊勢市教職員、H30年8月1日、増養殖研究所、聴講者15名）にて講演
- 15) 平成30年度水産研究・教育機構増養殖研究所一般公開（H30年7月28日、参加者245名）にて成果紹介
- 16) 第14回外来魚情報交換会（主催：琵琶湖を戻す会、H31年1月26-27日、草津市立まちづくりセンター、聴講者216名）にて講演
- 17) 愛知県三谷水産高校学校外学修活動「遺伝子を用いた新たな外来魚の駆除手法の研究紹介」（R1年5月30日、聴講者45名）
- 18) 令和元年度愛知県海部農業経営者の会研修会（主催：愛知県海部農業経営者の会、R1年6月27日、増養殖研究所、聴講者17名）にて講演
- 19) 令和元年度日本水産学会秋季大会ミニシンポジウムII、魚類における不妊化研究の最前線「ゲノム編集によるブルーギルの不妊化駆除技術開発」（主催：日本水産学会、R1年9月8日、福井県立大学、聴講者約50名）にて講演
- 20) 国立研究開発法人水産研究・教育機構第17回成果発表会「平成から令和へ、新時代の水産技術」「ゲノム編集技術を用いた新しい外来魚対策～現状と将来展望について～」（R2年1月22日、聴講者222名）にて講演

（５）マスコミ等への公表・報道等

- 1) びわ湖放送（H29年7月1日、びわ湖の日特番内「ブルーギルの駆除技術開発」について5分ほど紹介）
- 2) 小学館 雑誌 DIME（H30年4月16日、ゲノム編集技術の活用例の可能性の一つとして外来魚駆除）
- 3) みなと新聞、養殖研究フロンタイン「ゲノム編集(下)、外来魚を不妊化し駆除へ」（H31年1月17日）投稿記事
- 4) 毎日新聞（R1年7月31日、全国版、朝刊1面およびWEB、「熱狂ゲノム、第一部身近に迫る技術①」）
- 5) CBCラジオ 北野誠のズバリサタデー（R1年8月24日、今週のここ掘れニュース「遺伝子操作で外来魚駆除」の成果について10分ほど質問形式やり取り）
- 6) 朝日新聞（R1年9月28日、関西版夕刊、「現場へ、ゲノム編集って何？」）
- 7) NHKニュース「おはよう日本」およびWEB（令和元年10月27日、ゲノム編集技術を使ったブルーギル駆除開発の成果について、2分ほど紹介）
- 8) 中日新聞、東京新聞（R2年1月24日、朝刊、「環境視点 ゲノム編集で外来魚駆除」）

（６）その他

＜行政との意見交換と今後の研究の方向性について＞

（１）令和元年10月18日環境省中部環境事務所において、将来想定される野外実証試験の実施要件について留意すべき点について情報提供を受けた。主な指摘事項は以下の通り。１）カルタヘナ法の扱いに

なるかならないかによって実施要件が大きく変わるため、外来核酸の有無、オフターゲット情報等が必要であること。2) 野外実証試験区域からわずかも逸失すると外来生物法違反になること。3) 実施審査は、有識者会議で検討されるため、審査に必要と考えられる生物特性情報をあらかじめ管理区域で収集しておくことが必須であること。

(2) 令和元年10月31日文部科学省内会議室において、文部科学省、環境省、農林水産省、水産庁関係担当者と、野外実証試験を将来実施するために必要な要件について情報提供を受けた。各省担当者の主な指摘事項は以下の通り。1) 過去に動物での一種使用(野外使用)の事例はなく、一種使用の前に当該生物(雌特異的不妊化遺伝子搭載ブルーギル)の作業特性(駆除能力)の証明が必要。2) 正確な駆除シミュレーションを行うために実際に野外集団に対して試験しなくては取れないデータがあるとしても、まずは二種使用(管理区域内使用)による模擬試験において、駆除効果に関するデータ収集を優先すべき。3) 外来の核酸が入っていないことを確認することが前提。これらの指摘事項を考慮すると、従来想定していた自然交配による不妊化遺伝子の野生集団への浸透性試験の実施検討は先送りし、まずは実証モデル試験として、半野生ブルーギル集団を二種使用区画内で自然繁殖させ、本手法の駆除効果の有効性を示す生物特性データの収集や水中生物相への影響を調査する試験を次の開発ステップとして検討する方針に修正することとした。

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) 箱山洋、平成21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「外来魚と在来魚の共存条件、個体数推定及び駆除法の数理的解析」
- 4) 箱山洋、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的転換魚の放流による駆除技術の開発」
- 5) Esvelt K M, Smidler A L, Catteruccia F, Church G M (2014). Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. [eLife](#) 3, e03401.
- 6) Sawamura R, Osafune N, Murakami T, Furukawa F, Kitano T (2017) Generation of biallelic F0 mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system. Genes to Cells. 22, 756-763.
- 7) Kumar TR (2018) *Fshb* knockout mouse model, two decades later and into the future. Endocrinology. 159(5), 1941-1949.

Ⅱ－２ 不妊化遺伝子搭載魚の増殖技術の実証

国立研究開発法人水産研究・教育機構

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	魚病研究センター	免疫グループ	栗田 潤
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

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：28,473千円（研究経費は間接経費を含む）
（平成29年度：10,477千円、平成30年度：9,460千円、令和元年度：8,536千円）

【要旨】

遺伝子制圧法の実施においては、不妊化したブルーギル（BG）を大量生産して野外放流することを前提としている。そのためには不妊化魚の再生産のための「借り腹技術」および野外放流による環境インパクト軽減のための「YY魚の作製・放流」を検討している。借り腹においては、親魚作製のための雑種化、三倍体化および細胞移植、YY魚作製においては性転換技術、が要素として含まれており、各技術要素について個別に検討しているところである。本課題において借り腹に関しては、近縁種パンプキンシード（PS）およびロングイヤー・サンフィッシュ（LE）を用いた三倍体の作出・育成、および細胞移植について検討し、PSの三倍体およびPSxLE交雑魚の三倍体においてBG生殖細胞の移植細胞生着を確認した。その過程で、本来自身の生殖細胞を産生しないはずの低温処理三倍体化個体のいくつかにおいて、正常な卵巣・精巣の組織像が確認され、三倍体化に関しては作成時の低温処理において条件のバラつきが懸念された。そのため追加検討BG x PSなどの致死性雑種の三倍体化による生存性回復を確認し、今後、高確率での親魚選別法（三倍体選別）に使用することを検討している。また、YY魚作製に関しては、XYオスと交雑するXYメス、すなわちオスからメスへの性転換技術を開発した。性分化期である孵化後30-100日に雌性ホルモンE2を100mg/kg含む飼料で飼育することにより、遺伝的オスを含むすべての飼育個体がメス化することを確認した。本研究において、個別技術について成功事例を積み重ねているが、将来的にはこれまで確立した技術要素を統合し、放流用の不妊化魚の量産システムとして技術体系にすることを考えている。

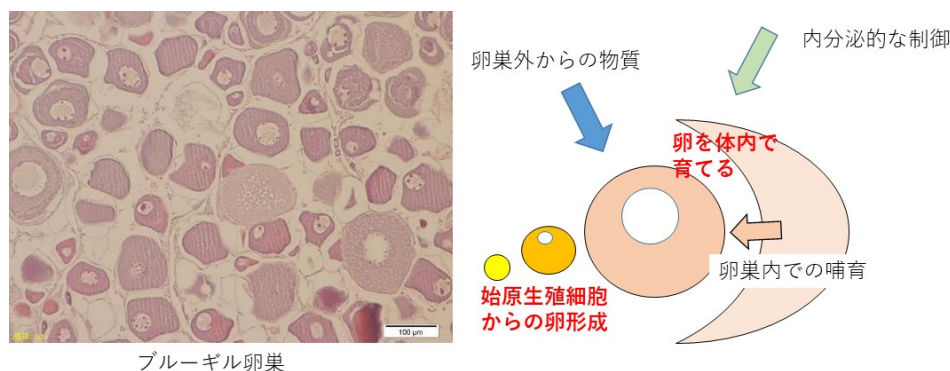
【キーワード】

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

本研究課題で開発を進めている遺伝子制圧法とは、メス特異的不妊化遺伝子を侵略的外来魚ブルーギルの野生集団中に放流し、交配を通じて蔓延させ、それにより繁殖集団全体の再生産能力を低下させることにより最終的にはその集団を根絶させることである¹⁾。各個体が生理学的に生殖能力を有するためには、配偶子のもとになる始原生殖細胞を生産する能力を持つとともに、それを卵や精子まで体内で哺育する能力をあわせて持つ必要がある（図1.2.1）。

卵は一人で育つ訳ではない



卵を作る能力とそれを育てる能力の両方が必要

(サブテーマ1では「育てる能力」の欠損を狙う)

図1.2.1 卵巣内での卵の発達の模式図

生殖細胞の発達には、元になる始原生殖細胞とそれを体内で育て上げる能力の両方が必要である。本研究においては、始原生殖細胞の生成には影響を与えず、卵細胞を体内で哺育する能力のみを欠損した不妊化魚の作製を考えている。

本研究課題で言うメス特異的不妊化遺伝子とは、FSHRやFoxL2など卵巣内での始原生殖細胞の哺育に関与するタンパク質をゲノム編集技術により機能欠損させた遺伝子のことを指し、サブテーマ1において不妊化遺伝子搭載魚の作成を進めている。想定される不妊化魚の性質としては、以下のように考えられる。

1. 始原生殖細胞の生産能力は保持している。
2. オス個体の生殖能力には影響はない。
3. 不妊化遺伝子がホモ化した場合、メスは生殖能力(卵形成能)を失う。

遺伝子制圧法においては、不妊化遺伝子を搭載したブルーギル(*Lepomis macrochirus*)を駆除水面に一定数放流し、自然交配を通じて集団中に不妊化遺伝子を浸透・拡散させることを前提としている。このことは、不妊化したはずの魚を繁殖させて、放流用として増殖させる必要があることを意味する。本研究における不妊化魚では、オスは問題なく精子を生産すると考えられるが、メス由来の卵は原理上生産されないことになり、通常の雌雄交配だけでは次世代は生産できないことになる。本研究では、放流用の不妊化魚生産におけるこの矛盾を解決するため、「借り腹」技術(surrogate production)の開発に取り組んでいる。

本研究で用いる借り腹法の概略を図1.2.2に示す。借り腹法とは不妊化遺伝子を持つオス(donor)の未熟な生殖細胞(精原細胞)を別の代理親魚个体(recipient)の腹腔内に顕微注入により移植し、生殖巣内で卵形成させる方法である²⁾。この方法ではゲノム編集技術による不妊化遺伝子搭載魚の開発に加えて、精原細胞の調整および腹腔内への顕微注入による細胞移植技術の開発が必要である。

借り腹技術による卵の生産

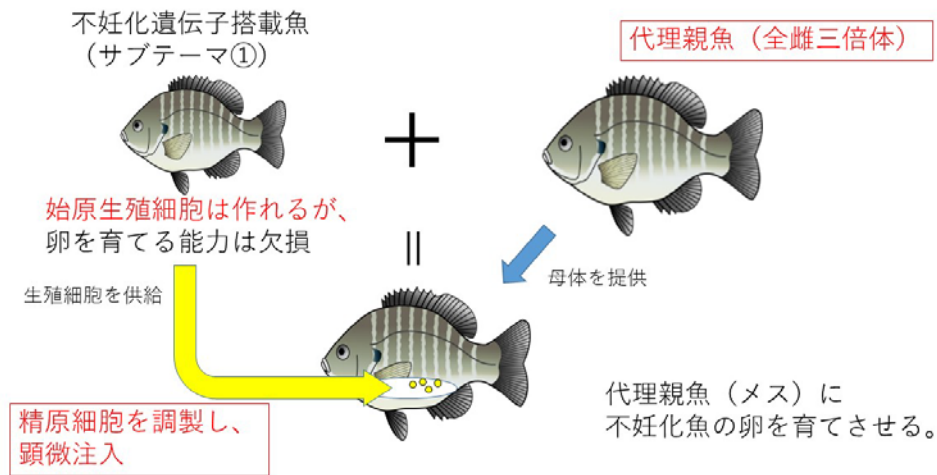


図1.2.2 借り腹技術による不妊化魚の卵の生産

不妊化魚においてもオス個体では始原生殖細胞とそれに由来する精原細胞（未熟な精子）を作ることができる。可塑性をもつ精原細胞を別個体である代理親魚（メス）に移植すると、体内環境の影響で卵原細胞に変化し、最終的には不妊化魚の卵を生産することができる。

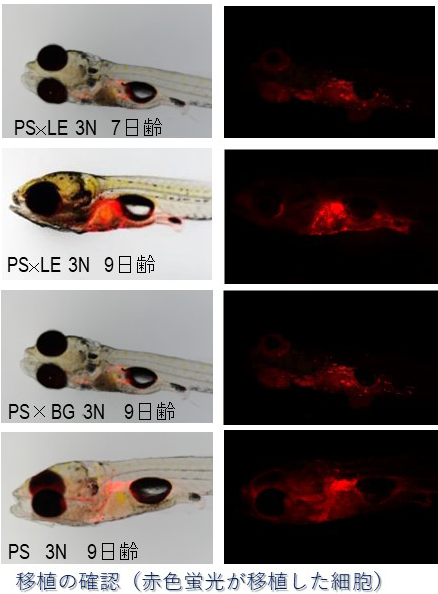
遺伝子編集魚ではない通常のブルーギル個体を用いての予備的検討ではあるが、前身のプロ研においてブルーギルからの精原細胞の調製と顕微注入による細胞移植に関してはすでに実施しており（図1.2.3）、結果を確認するため引き続き飼育・成長させているところである。

ブルーギル 生殖細胞の移植

- ・ 雑種等を親魚として使用。
- ・ 低温処理による極体放出阻止により三倍体化。
- ・ 孵化7日目または9日目に移植。

移植の様子

ガラスキャピラリー



移植の確認（赤色蛍光が移植した細胞）

図1.2.3 ブルーギル仔魚への生殖細胞の顕微注入

ブルーギルのオス幼魚より酵素消化により調製した精原細胞を、借り腹親魚（近縁種や雑種の三倍体化した仔魚）に移植した。移植細胞は背側からガラスキャピラリーで腹腔内へ注入した。この図では蛍光色素により注入箇所を見えやすくしている。

こうした精原細胞の調製や顕微注入法をはじめとして細胞移植技術の確立と併せて、母体となる親魚の選択や作製法の検討も重要な技術要素である。借り腹法の目的が卵の生産であることから移植を受ける代理親魚(recipient)は全てメスであることが望ましい。また、仔魚飼育などの効率を考えると、代理親魚は移植細胞由来の卵のみを生産する、すなわち自分自身の配偶子を生産しないことが望ましい。こうしたことを考え合わせて、顕微移植技術の開発と併せて代理親魚生産のための全雌化や三倍体化の技術開発も必要となってくる。結果の検討は本プロ内にて行ったが、受精時の低温処理（極体放出阻止）による三倍体作製はすでに一部検討を開始している（後述）。ただ、移植試験の結果、すなわち、移植細胞に由来する正常なブルーギルを産卵するかどうか、を確認するためには、魚体の成長や成熟まで相応の時間を要する。結果の成否の判定に加え、より多くの選択肢を用意する意味でも、さらなる親魚候補の検索はしておく必要がある。

借り腹法では精原細胞の母体魚への移植は仔魚期（本研究では孵化後7-9日後に実施）に行うため、その時点で外見で雌雄判別して母体を選ぶことは難しい。そのため、効率的な借り腹生産のためには、母体魚は全てメス、すなわち全雌三倍体であることが望ましい。図1.2.4に全雌三倍体作製の手順および必要な技術的要素に関して示しているが、低温処理（極体放出阻止）による非還元卵（2N）の作製に加えて、メスからオスへの性転換技術の開発も必要となってくる。

XYの場合の全雌三倍体

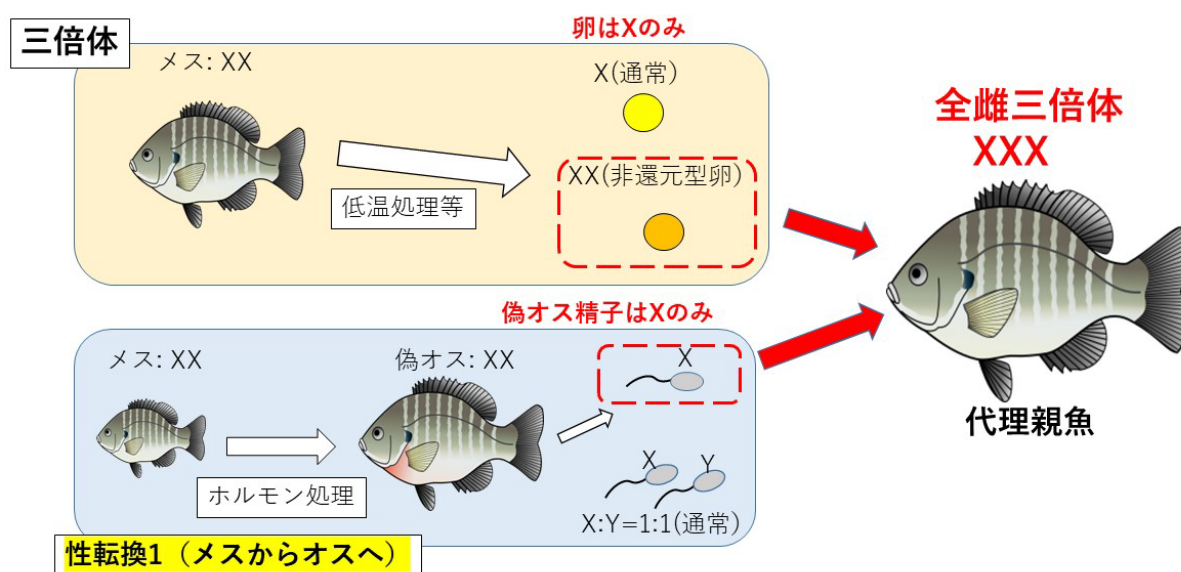
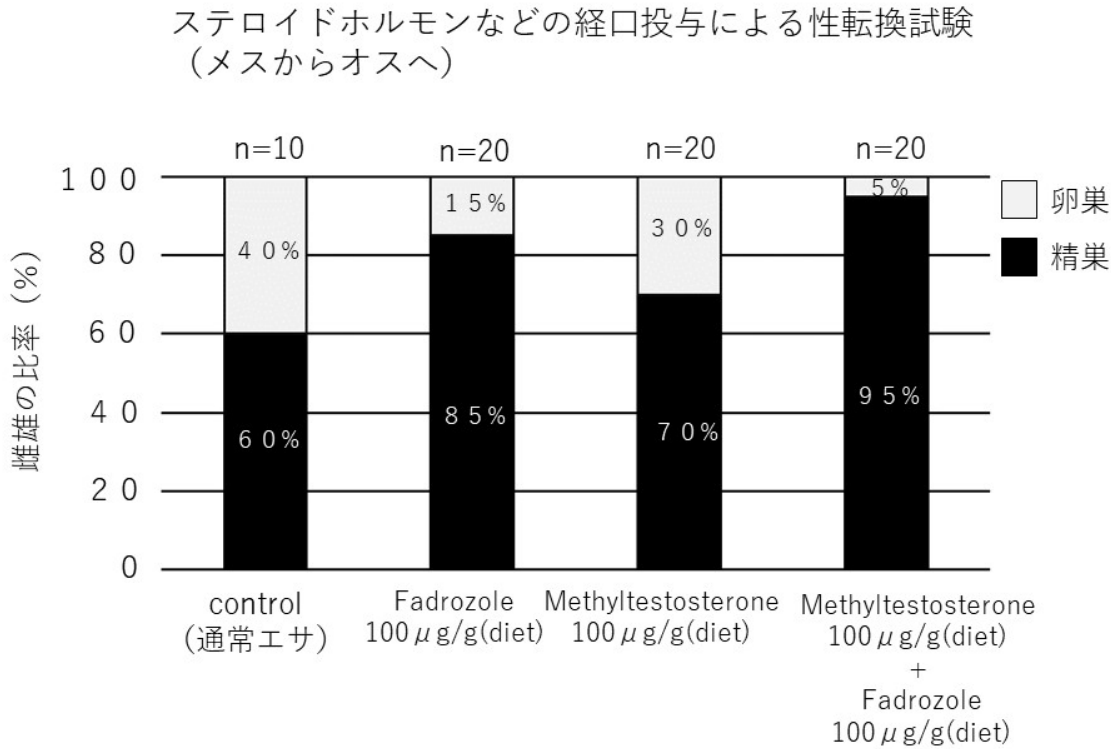


図1.2.4 全雌三倍体の作製手順

図では性決定様式をXY型と仮定している。必要な技術要素として、低温処理等による非還元卵（2N）の作製と併せて、性転換技術（メスからオスへ）も必要になる。全雌三倍体は借り腹法による効率的な卵生産のための代理親魚として使用を想定している。

メスからオスへの性転換に関しても、すでに前身のプロ内で検討しており、幼魚期（性分化期の孵化30日から100日）に雄性ホルモンであるメチルテストステロンおよびファドロゾールを単独または併用して経口投与することで可能となっている（図1.2.5）。そのため、ブルーギルの性決定様式がXYであると仮定した場合、借り腹用の母体作製に関する技術的要素は一通り検討済み、あるいは検討予定となって

いる。



メチルテストステロンとファドロゾールを併用することで精巢の割合が高くなった

図1.2.5 ブルーギルにおけるメスからオスへの性転換手法の検討

市販飼料に雄性ホルモンを添加することで経口投与した。メチルテストステロンおよびファドロゾールの併用により性比はほぼオス側に偏ったため、メスからオスへの性転換が起こったと考えられる。

移植を受ける母体親魚 (recipient) の作製だけでなく、移植する精原細胞の提供魚 (donor) についての検討も重要である。当然、ドナーに関しては、本研究において想定されるのはゲノム編集による不妊化魚であるが、それと併せ持つべき形質として、超オス (YY魚) の利用を検討している。

超オス（YY）の利用

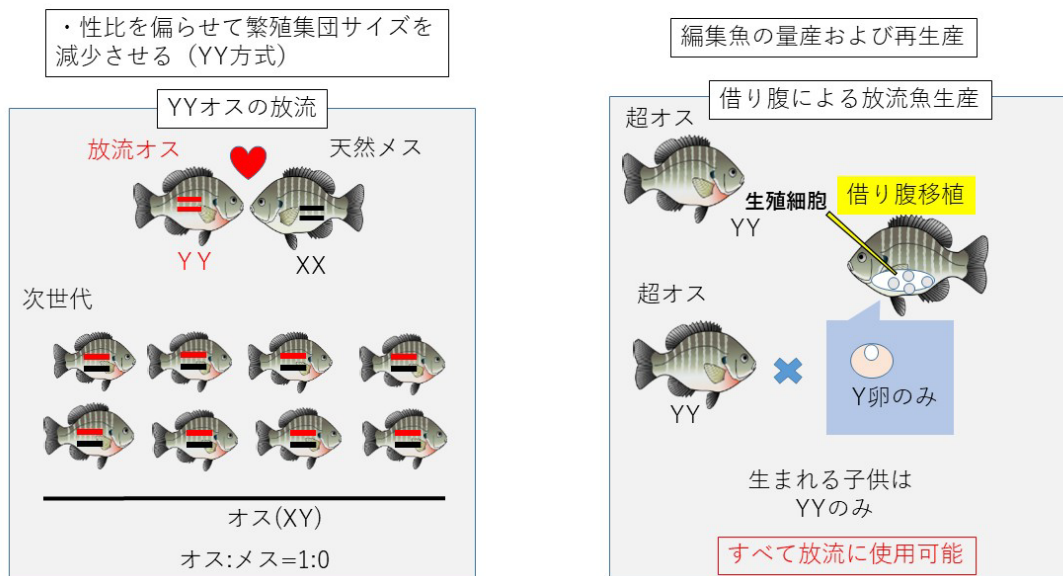


図1.2.6 遺伝子制圧法における超オス（YY魚）の利用

YY魚の利用法としては放流によって集団性比をオス側に偏らせる駆除手法（YY方式）と、借り腹生産におけるオスの選択的生産法の二通りでの利用が考えられる。

YY魚を用いるにはいくつか利点があり、図1.2.6に示した通り、一つは集団の性比をオスに偏らせ、卵を産むメスを相対的に減少させることにより集団としての繁殖力を低下させる方法（YY方式）が利用できることである^{3,4)}。遺伝子制圧法は害魚であるブルーギルを少量とはいえ野外放流するため、資源量増加に直結するメス魚の利用は環境インパクト軽減のため極力避けるのが好ましく、また後代の第一世代をすべてオス化してメス資源の増加によるリバウンドを防ぐこともできる。

もう一つの利点は不妊化魚生産の効率化である。借り腹ドナーおよび交配オス親としてともにYYを用いた場合、生まれる仔魚は全てYYオスとなり、全て放流可能となることである（図1.2.6）。借り腹を用いた放流魚の生産を想定した場合、編集魚系統に関してはYY魚のみの維持で全オス編集魚生産が可能であり、コストや労力の節約からも有効と考えられる。

YY魚の作製に関して、想定されるプロセスを図1.2.7に示す。遺伝的にはオスであるXYメスを作製し、通常のXYメスと交配することにより、YYオスは作成される（図1.2.7）。そのため、交配によりYY染色体の組み合わせを生じるための第一歩として、XYオスをXYメスに性転換（オスからメスへ）することになる。借り腹母体作製のための全オス化についてはすでに検討している（図1.2.5）が、本研究項目においては、それとは逆に、YY魚作製に向けた準備として、オスからメスへの性転換手法も必要となる。

YY魚の作製(例)

(YY方式により性比を偏らせる効果も期待できる。ただし、遺伝子制圧は通常のオスでも実施できるため、このステップは必須ではない。YYが致死性でないことが必須。)

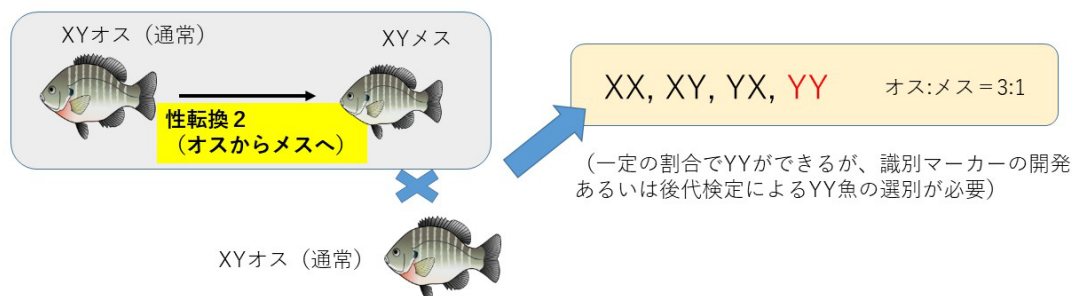


図1. 2. 7 YY魚の作製法

通常オス (XY) と性転換したXYメスとの交配によりYY魚を作製する。性比はオス：メス=3:1となり、放流であれば集団性比を偏らせる駆除効果も期待できる。YY魚は通常のXYオスとは外見的に区別できないため、後代検定または分子マーカーなど識別法の開発による選別が必要である。

2. 研究開発の目的

本サブテーマは繁殖生理学的検討を主体として、不妊化魚の再生産、量産化、放流用への至適化、など広範に取り扱うこととなる。そのため、散発的に様々なことを検討することにはなるが、上記の記述を整理すると、遺伝子制圧法のための不妊化魚生産にとって、必要な技術要素は以下ようになる。

- (1) 精原細胞の調整と借り腹母体への細胞移植
- (2) 受精時の低温処理等による三倍体の作製
- (3) メスからオスへの性転換と全雌化
- (4) オスからメスへの性転換とYY魚作製

これらの技術要素を統合して最終的には一連の技術体系を組み上げていくことになるが、(1)と(2)については図1. 2. 3に示した通り、すでに前身のプロ研で三倍体魚への細胞移植試験を開始し、継続して細胞移植魚を飼育している。本研究では、引き続き、借り腹法による生産技術の確立を目的に、移植細胞の移植母体魚の生殖腺への生着や生殖腺観察による三倍体化の成否の確認を行った。

また、(2)に関連して、条件的にバラつきが生じやすい低温処理による三倍体化の問題点を解決するため、三倍体作製の安定的生産法を追加で検討した。具体的には、

検討①：自然三倍体（低温処理によらない）の作製検討。異種間での雑種化により自然に非還元卵（減数分裂しない2N卵）が生じる可能性を検討した。

検討②：致死性雑種の利用。致死性の雑種であっても、三倍体化により生存性が回復することがある。

その現象を利用し、純度の高い三倍体集団を借り腹母体用に選別できないか。

の二通りを追加で検討し、借り腹技術の母体の関しての選択肢を広げることを試みた。

(3)に関しては図1. 2. 5に示したように、すでにメスからオスへの性転換技術は開発している。引き続き、

(4) に関してのYY魚作成のため（図1. 2. 7）、オスからメスへの逆方向への性転換技術についても検討した。

3. 研究開発の方法

(1) 借り腹親魚用の母体 (recipient) 作製と維持

数年間の長期にわたる飼育試験のため、一部以前の報告と重複するが、試験全体の理解が容易となるよう、あらためて細胞移植試験の概要について、以下に記述した。

本研究では、借り腹移植の受容親に関しては、自身の生殖細胞を作らない三倍体の利用を本研究では前提としている。が、三倍体処理は条件しだいでは結果にバラつきが生じやすいこと、三倍体化による不稔化（配偶子を作らなくする）も確実である保証はないこと、などの可能性も考えられ、親魚候補としては移植細胞由来の次世代魚（借り腹生産）と外見などで容易に判別がつくことが望ましい。そのため、本研究では、ブルーギル（BG）とは外見が異なる近縁の異種三倍体を宿主候補として検討した。



Bluegill (*Lepomis macrochirus*)



Pumpkin seed (*Lepomis gibbosus*)



Longear sunfish (*Lepomis megalotis*)

図3.2.1 ブルーギル及び近縁種パンプキンシードおよびロングイヤーサンフィッシュ
 名前の通りパンプキンシードは体表にカボチャの種のような斑紋が、ロングイヤーサンフィッシュでは青色の耳状の突起が特徴的。いずれも外見はブルーギルとは異なり、目視で識別可能である。

母体の作成に用いるブルーギル近縁種としては、北米原産のパンプキンシード（PS, *L. gibbosus*）およびロングイヤーサンフィッシュ（LE, *L. megalotis*）が国内でも入手可能であり、ブルーギル（BG, *L. macrochirus*）と併せて、三種が利用可能である（図3.2.1）。PSまたはLEを三倍体化して借り腹母体として利用する、あるいは三種から組み合わせを選び、好適な組み合わせの交雑個体から親魚候補を作製することが考えられる。三倍体化は受精卵の低温処理による第一極体放出阻止により作成⁵⁾するが、低温処理の条件に関しては、交雑種の作成と併せて前身のプロ研で検討しており、その際の結果をそれぞれ図3.2.2（三倍体化の低温処理）および図3.2.3（交雑可能な組み合わせ）に示す。

染色体操作による三倍体作出：低温処理による三倍体作出試験

プロイディアナライザー（cyFlow SL,PARTEC）を用いた倍数性の検出

		処理時間			
		10分	15分	20分	
処理水温	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

図3.2.2 受精卵の低温処理によるブルーギル三倍体化試験

受精直後の低温処理による極体放出阻止の効果。処理水温と処理時間による三倍体化の効率を示す。

近縁種雑種による三倍体作出：近縁種間の交配試験

近縁種交配試験の孵化～浮上までの観察結果のまとめ

	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

近縁種雑種孵化仔魚の写真



図3.2.3 近縁種間の交雑性の検討

ブルーギル（BG）および近縁種2種（パンプキンシード（PS）およびロングイヤーサンフィッシュ（LE））における交雑性の検討。なお、BGをメス個体とする組み合わせは、ミトコンドリア遺伝子などの分子マーカー識別法を用いた場合、移植由来の卵（BG）と母体由来の卵の区別が難しいため、本研究では借り腹移植用には用いていない。

これらの知見をもとに、借り腹母体様の三倍体魚を作成し、BGの精原細胞移植を行った。(図1.2.3)。移植に関してはすでに報告しているが、各仔魚とも孵化7日目および9日目に腹腔内に顕微注入することにより行った。移植は2016年8月に行い、その後、水研機構増養殖研究所玉城庁舎において飼育した。移植を実施した宿主は以下のとおりである。2Nは低温により倍数化処理を実施した卵の意であり、交雑種はメスを先に表記した。またLEに関しては通常のもの他にリミックス系統(LE2と表記)と呼ばれる系統魚も利用している。

1. PSの三倍体処理魚(PS3N)
2. PS(2N)とLEの異質三倍体処理魚(PSxLE)
3. PS(2N)とLEリミックス系統の異質三倍体魚(PSxLE2)
4. PS(2N)とBGの異質三倍体魚(PSxBG)

上記4種の宿主に孵化後7日目および9日目に顕微注入により細胞移植を実施し飼育していたが、約一年後の2017年9月に停電事故により大量の死魚が発生した。そのため、生残魚は移植成功の最終確認(BG卵の産卵と正常発生)の確認のため、飼育を継続し、死亡魚を用いて移植の成否を確認する試験を実施した。死亡魚の生殖腺は各試験区15個体分を解析し、生殖腺については一部をDNA分析に供し、残りを組織観察に供した。死亡魚の無かった試験区(PSxLE2およびPS x BGの9日目移植)に関しては、産卵確認のための飼育・成長を優先し、個体死を伴う解析は見送った。

(2) 細胞の生着の確認(PCRによる移植細胞由来遺伝子の検出)

移植したBGの細胞が宿主の生殖巣内に存在しているかどうかについては、宿主生殖巣からBG由来の遺伝子が検出できるかどうかで判定した。本研究に用いた3種のレボミス属のサンフィッシュについてはGenBankデータベース上にいずれもミトコンドリアのチトクロームb遺伝子(*Cytb*)が登録されている。その塩基配列情報をもとにそれぞれの種特異的に増幅断片が得られるようプライマーを設計し、PCR法により検出した。種特異的プライマーなどの情報は表3.2.1に示す。

表3.2.1 PCRによるチトクロームb遺伝子検出に用いた種特異的プライマー

species	Reference sequences (Genbank Accession numbers)	Primer sequences
Bluegill (<i>Lepomis machrochirus</i>)	AY828968.1 AY225667.1 AY115976.1	F: 5'-CTAGCAACCCAGATTTTA-3' R: 5'-GAGGTTTCGTAATAACTGTT-3'
Pumpkin seed (<i>Lepomis gibbosus</i>)	AY828960.1 JF742829.1	F: 5'-CTAGCCACCCAAATTCTC-3' R: 5'-GAGATTTgTAATTACAGTG-3'
Longear sunfish (<i>Lepomis megalotis</i>)	AY828977.1 AY828975.1 KF571627.1	F: 5'-CTCGCCACCCAAATTCTT-3' R: 5'-GAGGTTGTAATAACGGTA-3'
Lepomis consensus		F: 5'-CCAATTCTTATTCCTTC-3' R: 5'-TTCGTTGTTTGAGGTGT-3'

PCRは94℃ 1分間の変性後、94℃ 0.5分間、50℃ 0.5分間および72℃ 0.5分間を40サイクル繰り返しで遺伝子増幅し、その増幅産物をアガロースゲル電気泳動とサイバークリーン染色により検出した。

(3) 生殖腺の組織観察

DNA解析用にサンプル採取した残りの生殖腺はブアン固定し、常法通りパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン染色により組織切片を作成した。

（４）借り腹親魚候補の追加検討のための候補交雑魚作成と特性評価

移植用の受容親としては、上述した通り、PSを母系とする4系統を第一候補としてBG精源細胞の移植を先行実施した。その結果次第ではあるが、低温処理による三倍体化に関してはわずかな処理条件の差で結果がバラつくことも想定され、二倍体の混入や生残率の低下も懸念される。良好な結果が得られなかった場合のバックアップ実験として、以下の二つの試験も予備検討として追加で実施した。

検討①：低温処理三倍体化を用いない、種間雑種による自然三倍体作成の試み

検討②：三倍体化による致死性雑種の生存性回復現象を利用した三倍体個体選別方法

各検討内容の詳細は以下に示す。

検討①：自然三倍体について

PS x LEに関しては上述した三倍体作成試験に用いているが、低温処理（三倍体化）を施さない雑種個体（2N）を2015年8月から継続飼育していたところ、生存性を保持し、卵巢の発達が確認された。この実験は偶然の結果に起因するものであり、また一般論として、雑種が稔性を持つことは稀であるが、もしPS x LEが結果として非還元卵（2N）を産めば、極体放出阻止によらず（すなわち条件のバラつきが生じやすい低温処理を用いず）、安定して三倍体が生産できる可能性がある。そのため、卵成熟を待ってBG精子による受精を試み、その倍数性（ploidy）を調べ、自然三倍体の可能性を調べた。

検討②：致死性雑種の利用

借り腹用の三倍体による母体作成において、自身が妊性をもつ二倍体魚の混入を避けるため、高効率な選別法として致死性雑種の利用を検討した。図3. 2. 3に示したように、BG x PSの交雑個体は、受精はするものの、浮上に至るまでにすべて死亡する致死性雑種である。この雑種に関しては、受精時に低温処理することにより、一部生存性が回復する個体が出現することが明らかになった。この生存個体群について飼育・成長させ、倍数性、性分化および生殖腺発達の状況を調べ、借り腹母体としての利用可能性を検討した。

（５）YY魚作製のためのオスからメスへの性転換技術の開発

性転換に関しては、移植細胞提供用としてのYY魚作製技術の一つとして検討し、ブルーギルのオスからメスへの性転換試験を性ホルモンの経口投与により行った。

ブルーギルの性分化期⁶⁾に当たる孵化後30日から100日の間に市販飼料に100mg/kg dietのエストラジオール17 β （雌性ホルモンE2）を噴霧添加し、経口投与した。その後200日目まで通常飼料で飼育・成長させ、うち25尾の生殖腺の組織観察により性比を調べ、E2の性転換効果を検討した。組織観察は常法通りパラフィン包埋と組織切片作成およびHE染色により行った。

4. 研究結果と考察

（１）交雑魚の形態

借り腹移植の予備検討としてBG精原細胞の移植を施した魚体の外部形態を図4. 2. 1および図4. 2. 2に示す。

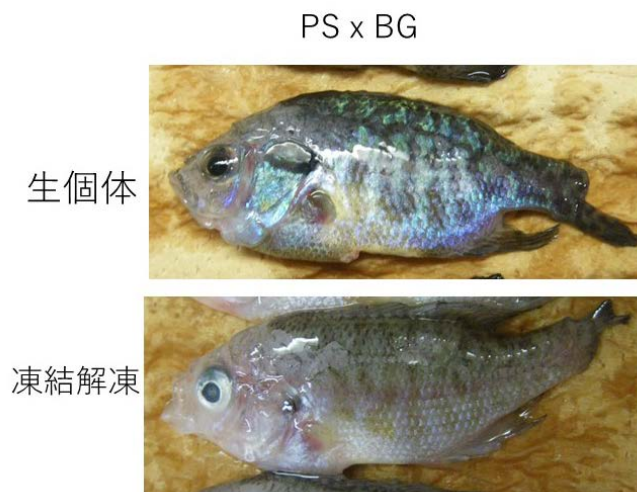


図4. 2. 1 仔稚魚の外部形態に及ぼす凍結の影響

停電事故による不測の事態から、サンプル魚は一度凍結したものを用いた。生個体と比べて形態的には全体的に色調が白変するが、斑紋は確認できる。

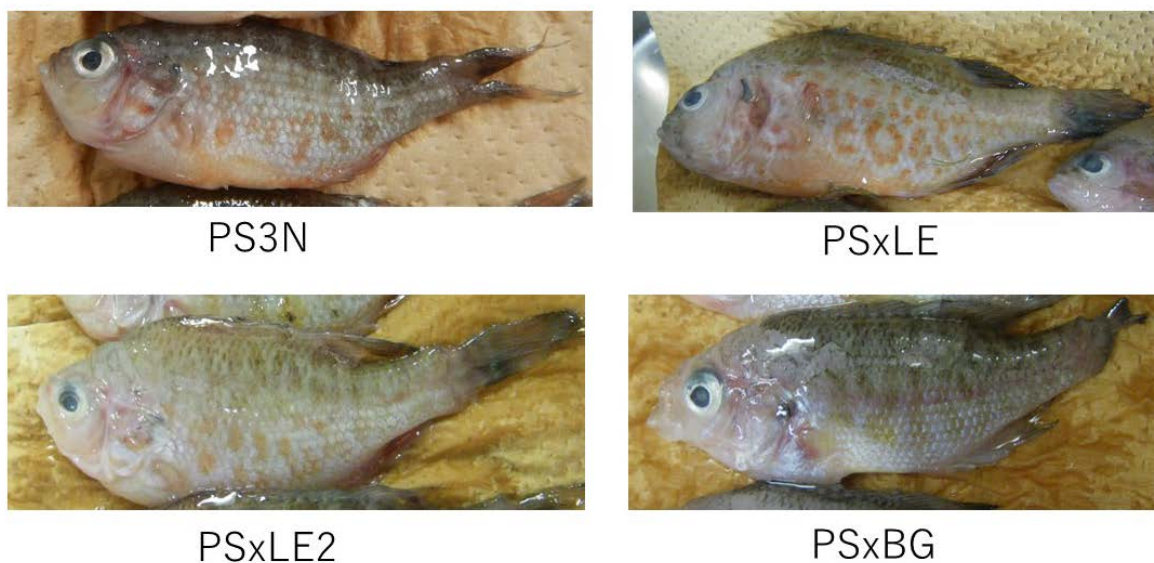


図4. 2. 2 借り腹試験に用いた近縁種および交雑魚の三倍体の形態的特徴

いずれも斑紋はPSに類似している。PS x BGでは若干斑紋の形状は他のものと異なるようにも見えるが、BGとは異なっているため、借り腹母体としては使用可能である。

「3. 研究開発の方法」に示した通り、本解析に用いた個体は移植約一年後に発生した停電事故と給水停止に伴う死亡個体を用いている。全魚体として一時的に -80°C で凍結保存後、再解凍して解剖に供している。そのため、凍結による外見上の白変が見られる（図4. 2. 1）が、形態的特徴である斑紋は確認できる（図4. 2. 2）。

今回移植に用いた借り腹母体4種類の異種または交雑種は図4. 2. 2に見られる通り、外見の斑紋としてはBGとは異なり、目視で識別可能なものとなっていた。

いずれの母体魚に関しても、移植後約一年で生殖腺は外科的に採取可能な程度に発達していることは

確認できたため(図4.2.3)、採取した生殖腺をDNA分析あるいは組織学的観察に供した。

生殖腺の発達状態 (PS3N)



図4.2.3 PS3Nの生殖腺の発達

例としてPS3N個体の生殖腺を示す。約一歳であるが、生殖腺の発達が確認できた（黄色点線で囲った部分）。

(2) 移植細胞由来のDNAの検出

移植の成否を確認するため、母体魚の生殖腺から移植細胞に由来するDNAが検出されるかどうか調べた。検出はPCRによって行い、ミトコンドリアゲノム上にあるチトクロームb遺伝子(*cytb*)を対象とした。

表3.2.1に示したように、レポミス属の種特異的に増幅できるようにプライマーを設計した。これを用いたPCRではBG、PSおよびLEはそれぞれ種特異的にミトコンドリア遺伝子*cytb*を検出可能であった(図4.2.4)。なお、交配の組み合わせとして、PS x BGの場合、生殖腺にBG由来の遺伝子を含むことになるが、ミトコンドリア遺伝子は細胞質遺伝(母系遺伝)のため、借り腹母体の*cytb*遺伝子は母系すなわちPS由来のもののみが含まれることになるため、検出に支障はない。

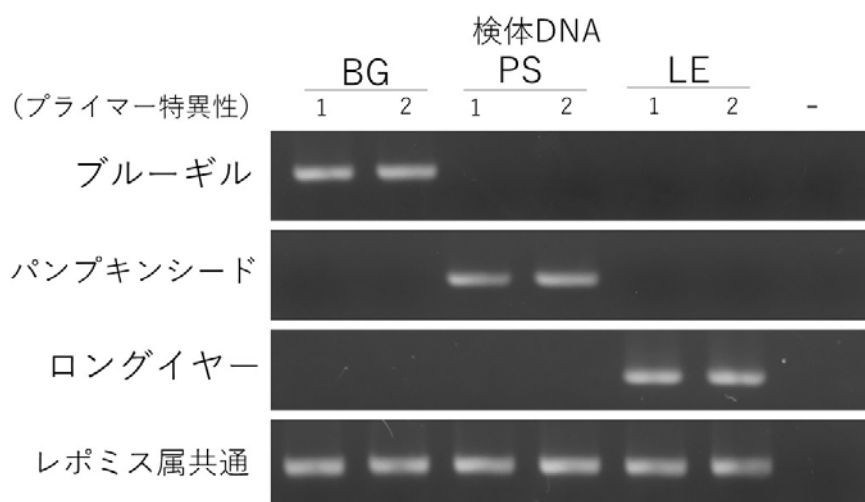


図4.2.4 各プライマーの特異性確認

各種ごとに2尾のDNAを使用した。いずれも種ごとに特異的に検出が可能であった。

図4.2.5 に典型的な検出結果を示す。図はPS受精卵に三倍体化のための低温処理を施した孵化仔魚を用い、孵化9日目にBG精原細胞の腹腔内移植を施したものの生殖腺でのPCR検出の結果である。15個体中2個体（個体7および10）で*cytb*遺伝子の増幅が確認され、このことから、この個体においては、移植一年後のPSにおいてもBG由来の細胞が存在することがわかる。

生殖腺PCR(*cytb*)によるBG遺伝子の確認（例）

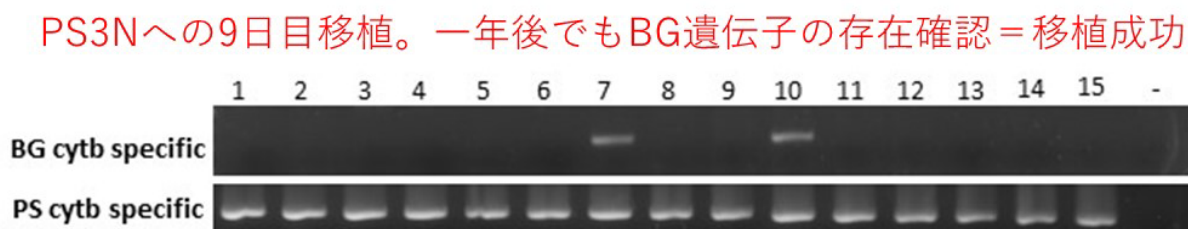


図4.2.5 移植細胞（BG）に由来する遺伝子の借り腹親魚の生殖腺における検出例。

図にはPS3Nの孵化9日目の移植サンプルを例として示す。レーン7および10の2個体でBG遺伝子が検出され、移植細胞が定着していると考えられる。

各移植魚15個体ずつのBG遺伝子検出結果を表4.2.1に示す。PS3NおよびPSxLEにおいて、少数ながら生殖腺からBG遺伝子が検出された。これらの異種または交雑系統がBG精原細胞の借り腹母体として使用可能であると考えられた。また、移植は孵化後7日目または9日目に実施しているが、PS3Nに関してみる限り、少なくとも孵化後7-9日の期間で移植可能であると示唆された。しかしながら、成功率は低く、多くても3/15=20%であったことから、今後さらなる技術向上も必要である。

表4.2.1 4種の移植系統の孵化7日目および9日目のBG遺伝子の検出数
(15個体あたりの検出数)

各 15 個体での移植の成功率		
Recipient	7dph	9dph
PS3N	1/15	2/15
PSxLE	3/15	0/15
PSxLE2	0/15	N.E.
PSxBG	0/15	N.E.
N.E.: Not examined		

（3）三倍体化处理および細胞移植を施した母体の生殖腺組織観察

PCRでの移植細胞由来の遺伝子検出に続き、借り腹母体魚の生殖腺の組織状態についてもパラフィン切片を作製して観察した。

通常の二倍体の生殖巣の場合、精巣あるいは卵巣に分化するため、検鏡上それぞれ特徴的な生殖細胞あるいは組織構造が確認できる。一方、三倍体においては、減数分裂に支障が生じるため、正常な配偶子形成能を失うため、二倍体とは異なる像になることが多い。典型的な画像を図4.2.6に示す。検鏡下では大きく分けて1. 三倍体の卵巣（ほぼ卵母細胞を含まない）、2. 二倍体の卵巣（多くの卵細胞が見られる）、3. 精巣（精小嚢内腔が多数見られる）の3通りが観察された。

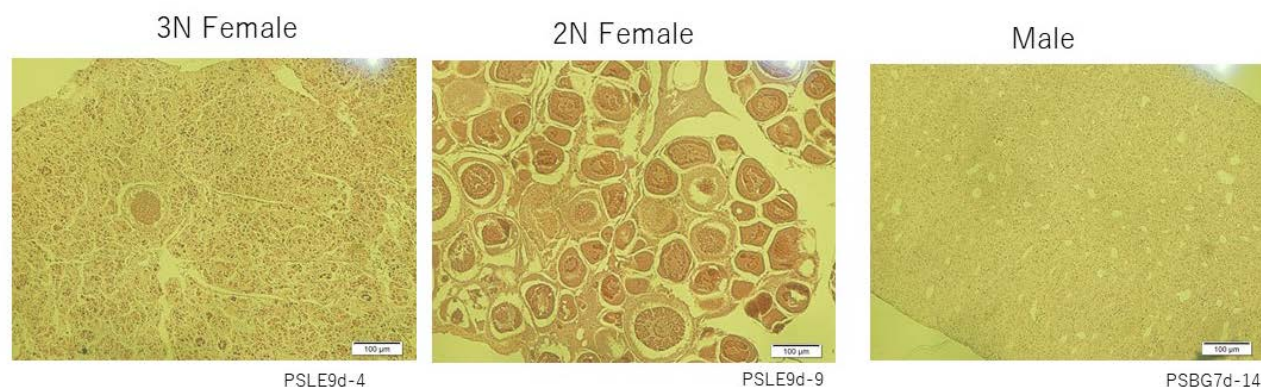


図4.2.6 移植魚の生殖腺組織

三倍体と思われるメス、二倍体と思われるメスおよびオス（倍数性不明）の3通りが確認された。典型的な組織像を示す。

表4.2.2 に生殖腺組織像を解析した結果を示す。各試験区ごとにPCRに用いた15個体すべての解析を試みたが、一部、十分な組織量が確保できず、観察像が得られていないサンプルもある。

本実験の移植母体は受精時に低温処理することにより、極体放出阻止による三倍体化を行っている。形態的には三倍体化したと思われる生殖腺が多くの個体で見られたものの、特にPS3Nの7日目移植魚やPSxLEの7日目移植魚では3分の2以上の個体で二倍体の特徴がみられた。このことから、低温処理は処理効果にバラつきが生じやすいことが示唆された。また、PS x BG以外では、精巣を持つ個体は見られず、作出系統によっては低温処理またはその後の育成過程において性比に偏りが生じることも示唆された。

表4.2.2 借り腹移植魚の生殖腺の形状三型の各個体数

	Sample Number	3N Female	2N Female	Male
PS3N -9d	10	10	0	0
-7d	15	3	12	0
PSLE -9d	12	10	2	0
-7d	13	4	9	0
PSLE2-9d	NE	-	-	-
-7d	15	15	0	0
PSBG -9d	NE	-	-	-
-7d	13	9	0	4

NE: not examined

表4.2.2 に示した通り、一連の移植試験で6個体の借り腹母体魚の生殖腺でBGの *cytb* 遺伝子の存在が

確認されている。当該個体の生殖腺の組織像を図4.2.7に示す。

PS3Nは移植7日及び9日目ともBG遺伝子の検出された個体は三倍体の卵巣様の構造を示したが、視野中に卵の存在は確認できなかった。これは生殖腺内に卵細胞が少ない、すなわち移植した精原細胞が少なかったためと思われる。また、PS x LEに関しては、いずれも多く卵細胞が確認できるが、移植由来としては過剰であり、これは三倍体処理の不良による母体魚の卵と考えられる。最終的には移植個体がBGの仔魚生産をするかどうかで移植試験の成否を判断することにはなる。ここまでの結果から、細胞移植に関する成功事例は積み上げ、方向性は示したものの、移植細胞の調製（量の増加）および母体魚の作製（完全な三倍体化）のいずれにも改良の余地があるものと考えられた。

PCRでポジティブだった個体の生殖腺

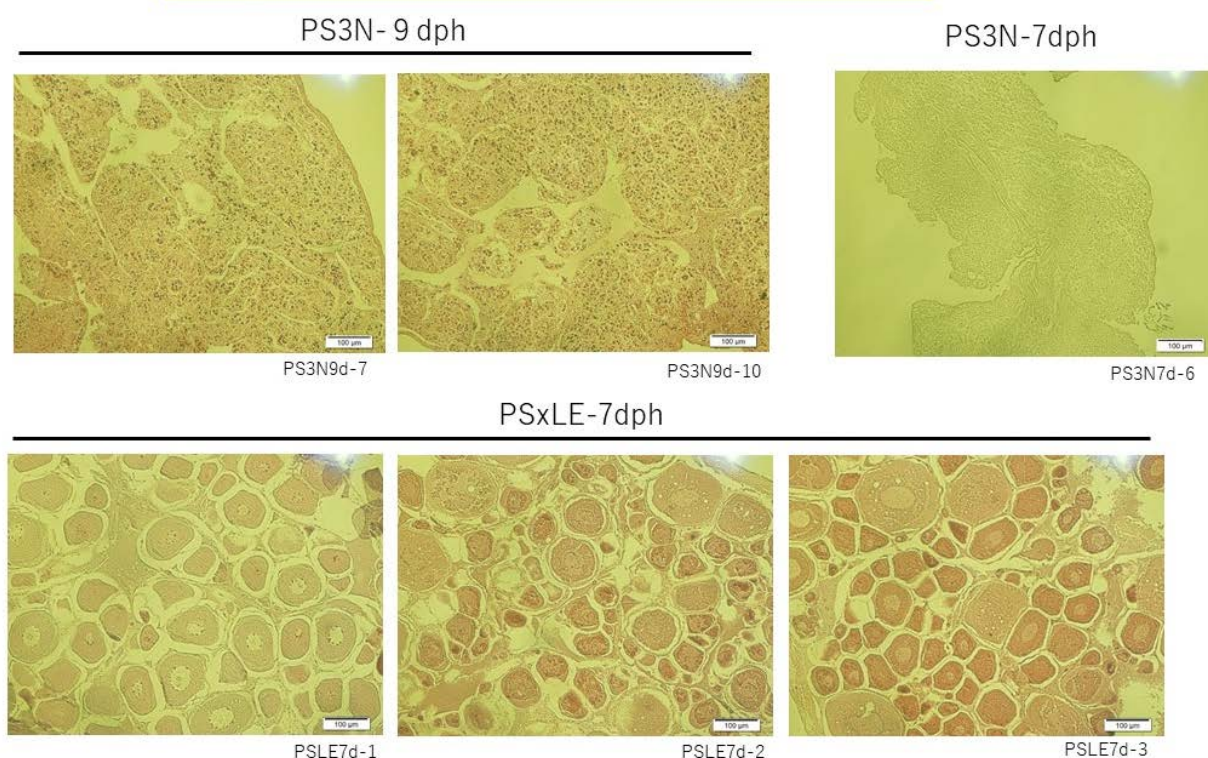


図4.2.7 PCRで移植細胞由来のBG遺伝子が確認された個体の生殖腺組織像

PS3Nは三倍体のメスの組織像であったが、PS x LEは二倍体と思われる。三倍体化の成否にかかわらず、移植細胞は定着するかもしれないが、二倍体個体は意図しない非不妊化魚（別種・雑種）の放流になりかねず、確実な三倍体化（自己の生殖細胞を作らない）技術が必要である。

（４）その他の借り腹母体候補の追加検討について

検討①：自然三倍体について

PS x LEの雑種個体を2015年8月から継続飼育していたところ、生存性を保持し、2歳魚までに一部個体で卵巣の発達が確認された（図4.2.8）。



PS x LE雑種（2歳魚）の卵巢
（偶然の死亡個体の解剖）

図4. 2. 8 PS x LEの雑種の生殖腺（卵巢）

PS x LEの2歳魚において、卵巢の発達を確認された。

この雑種がもし非還元卵（2N）を産めば、条件的にばらつきが生じやすい低温処理（極体放出阻止）によらず三倍体を安定的に生産することができる。本雑種の卵においてBG精子を用いた人工授精を行ったところ、仔魚の発生は認められた。孵化仔魚を用いて、プロイディーマナライザーで倍数性を確認したところ、いずれも二倍体であり、自然三倍体の発生は確認できなかった（図4. 2. 9）。PSxLEの雑種は非還元卵を生まない、すなわち本方法による借り腹親魚作成はできないことが明らかとなった。

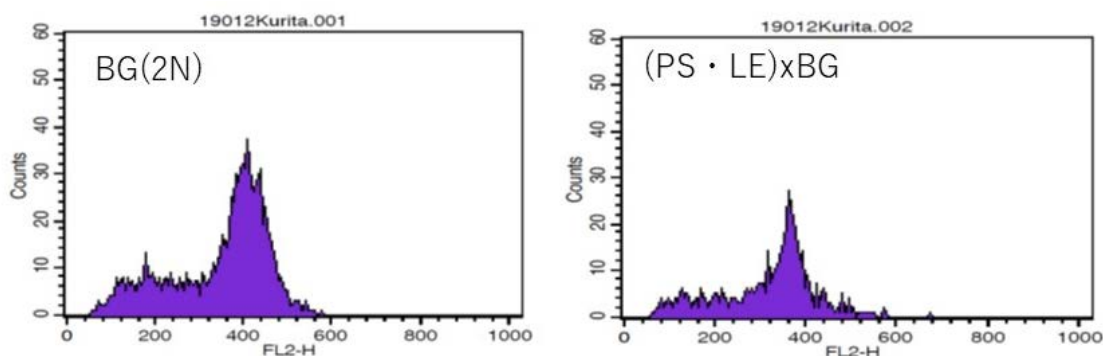


図4. 2. 9 BGと三種の雑種（（PS・LE）xBG）の倍数性解析

いずれもピークはほぼ同一（この解析では横軸の400付近）であり、いずれも同じ倍数性、すなわち三倍体ではないと考えられた。

検討②：致死性雑種の利用

借り腹用の三倍体による母体作成において、自身が妊性をもつ二倍体魚の混入を避けるため、高効率な選別法として致死性雑種の利用を検討した。図4. 2. 10に示したように、BG x PSの交雑個体は、受精はするものの、浮上に至るまでにすべて死亡する致死性雑種である。この雑種に関しては、受精時に低温

処理することにより、一部生存性が回復する個体が発現することが明らかになった。本生存魚について飼育・成長させ（図4.2.10）、倍数性、性分化および生殖腺発達の状況を調べ、借り腹母体としての利用の可能性を検討した。



図4.2.10 BG x PSの個体

通常のBGとは斑紋が若干異なる。体表の色調不良やヒレの欠損は狭小な飼育環境に起因するもの。

BG x PSの低温処理での生存性回復個体の倍数性を調べたところ、BGやPSの二倍体の約1.5倍の位置に核相が予想され、三倍体と考えられた（図4.2.11）。検体数を増やして再解析したところ、調べた12個体はいずれも三倍体と考えられたため、今回試みた致死性雑種の生存性回復原書を利用した三倍体選別方法は有望と考えられた。

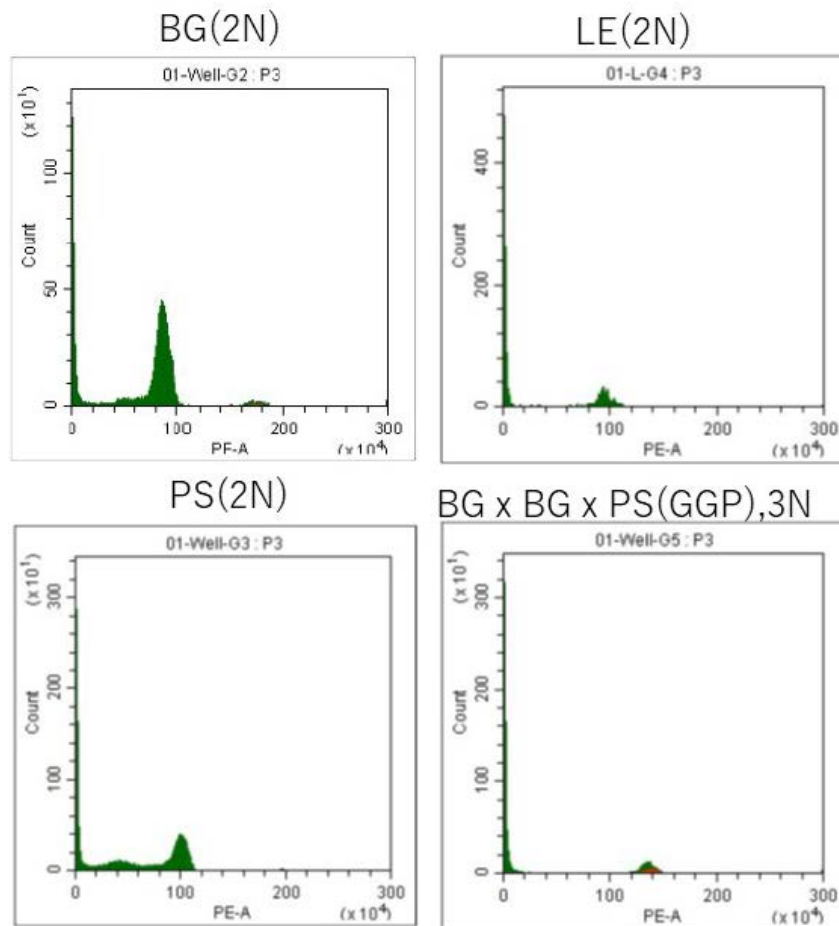


図4. 2. 11 BG x PSの致死性雑種の生存性回復個体の倍数性解析（例）

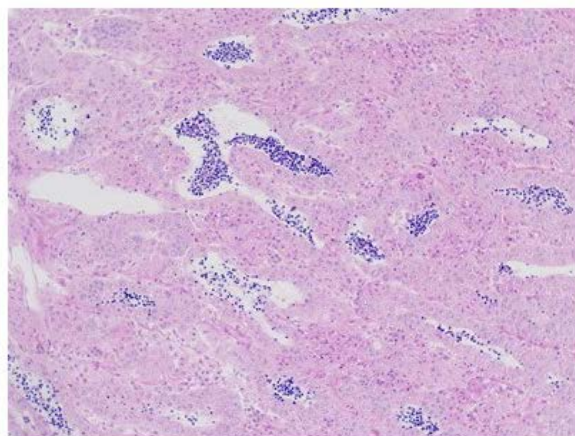
二倍体は三種とも図の横軸では90-100に位置するが、生存性回復個体（BGxBGxPS）では約1.5倍の位置になっており、三倍体化したものと考えられる。

しかし、本雑種の生殖腺を確認したところ、性比はオスに偏っており、また、受精能は不明だが精子の産生も確認された（図4. 2. 12）。これらのことから、BG x PS の致死性雑種を用いた三倍体選別は可能であるが、借り腹母体として使用するためには、オスからメスへの性転換や配偶子形成の阻害など、さらなる付随する技術の開発も必要になると考えられた。

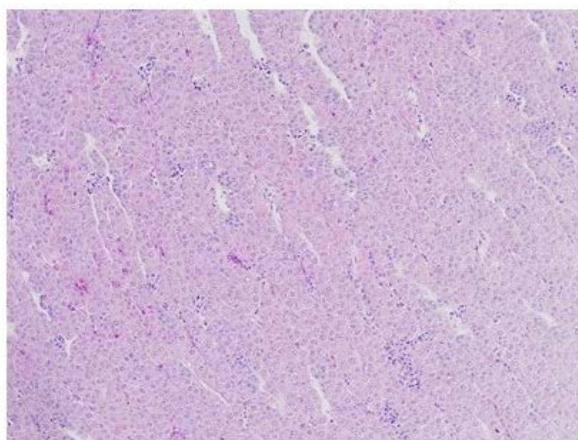
BGxPS低温処理個体の生殖腺

12個体解析したが、いずれも精巢の像（性比の偏り）

精巢（やや未発達）



生殖腺（未発達の精巢？）



精巢（発達）

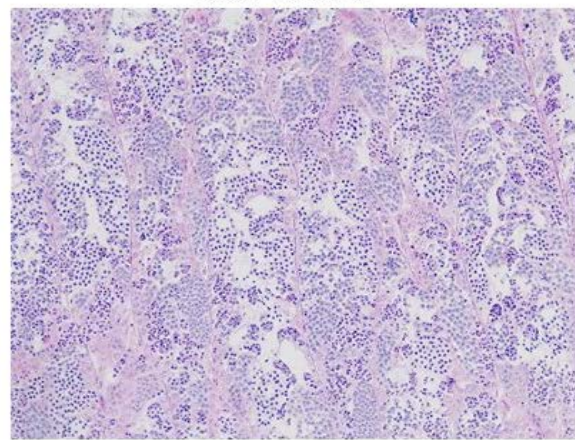


図4.2.12 BG x PSの生存性回復個体（三倍体）の生殖腺組織像

発達段階は個体ごとにバラつきがあり、ヘマトキシリン（青）で好染される精子数の過多に差はあるが、いずれもオス精巢の組織像であった。

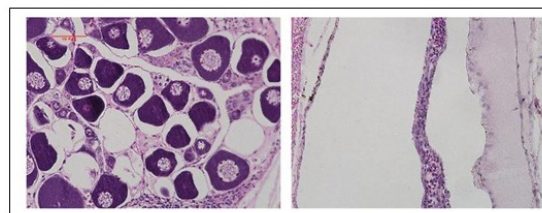
（5）オスからメスへの性転換技術の開発

借り腹の母体作製に関する検討と並行して、生殖細胞の提供魚（donor）としてのYY魚作製の検討も進めており（図3.2.6および図3.2.7）、そのための第一歩として、オスからメスへの性転換手法の開発を試みた。仔魚の性分化の時期に雌性ホルモン（E2）を経口投与し、集団性比への影響を調べた。

組織観察の結果、対照区（ホルモンを含まない溶媒のみを試験飼料に噴霧）と比べ、E2投与区では、性比はメスに偏った（図4.2.13）。解析した25尾中にオスは確認できず、おおむねオスからメスへの性転換に成功したと考えられたが、組織観察の過程で、一部生殖腺が萎縮して雌雄判別困難なものも生じた。本法に関しては、性転換手法としては有効だが、より副作用を軽減する付随技術も必要であることも示唆された。

雌性ホルモンの経口投与（30-100dph）によるオスからメスへの性転換

対照区（25尾、TL3.2-4.7cm）		E2区（25尾、TL2.8-4.2cm）	
オス	8	オス	0
メス	15	メス	20
不明	2	不明	5



正常卵巣

生殖腺萎縮

一部生殖腺の萎縮した個体も生じたが、E2投与により、性比はメスに偏り、性転換は成功したと考えられる。

図4.2.13 オスからメスへの性転換試験

飼料に添加した雌性ホルモン（E2）のブルーギル性比への影響を検討した。ホルモン添加により、ほぼメス化してオス個体は見られないため、性転換は成功したと考えられる。ただし、一部個体において生殖腺萎縮を生じ、今後は副作用軽減のための技術改良も必要と考えられた。

（6）総合考察

本研究で我々が提案している「遺伝子制圧法」においては、不妊化したはずの魚を繁殖させ、放流のために大量生産するという矛盾を解決する必要がある。また、根絶すべき害魚を、不妊化遺伝子の運び手として野外放出するという問題も含んでおり、環境へのインパクトを可能な限り軽減しつつ、最小限の放流で済むよう最大限の効果を挙げる工夫も必要である。そのための方法として、生産面では借り腹法、放流面ではYY法を視野に入れ、必要な技術要素の確立に取り組んできた。

本研究計画では、当初案として、ブルーギルの性決定様式はXY型（オスヘテロ型）であることを前提としてきた。しかし、サブテーマ1における解析では日本国内、少なくとも三重県周辺でのブルーギル集団ではZW型（メスヘテロ型）であることが示された。オスの遺伝子型がYYでもZZでも借り腹の精原細胞（YあるいはZ）から生産されるのはいずれもオスのみであり、生産上は影響ない。しかし、放流魚として性比を偏らせるYY法はメスヘテロのZW型では使用できず、放流効果のシミュレーションや放流計画に関しては修正が必要である。

借り腹親魚に関しては、現状では、近縁種PSの単独あるいはLEとの交雑魚の低温処理三倍体において移植は成功している。また、BG x PSの致死性雑種においてもオスからメスへの性転換は必要であるが、三倍体として使用可能と考えられる。将来的な大規模生産まで視野に入れると、極力、使用する系統は少ないほうがコストや労力面で有利となる。そのため、現状では、PS一系統の維持で済むPS 3Nを前提に技術改良を進めていくのが妥当と考えられる。

近縁種における性決定様式は不明であるが、仮にBG同様にZW型であると仮定すれば、借り腹用の親魚作製法は図4.2.14に示したよう変更する必要がある。その場合、雌性発生など新たな技術開発も付随することになる。

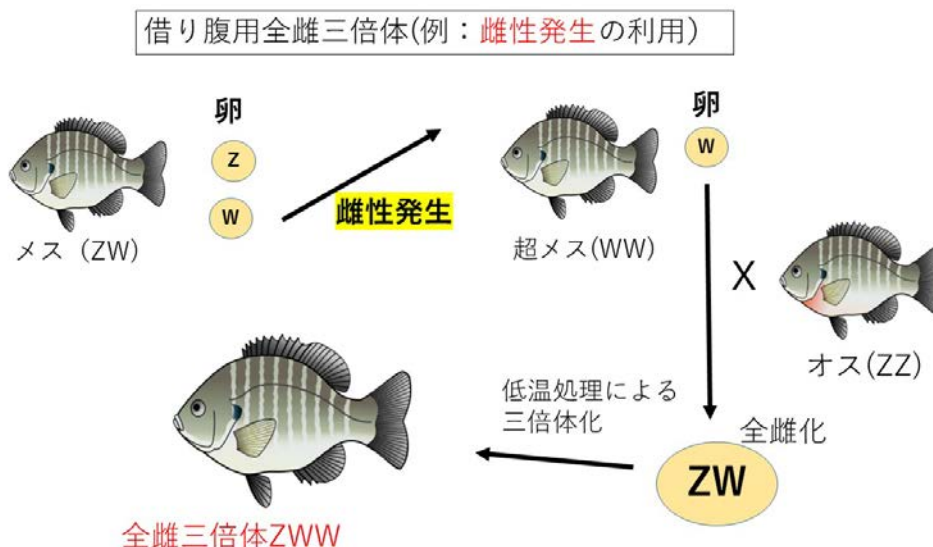


図4. 2. 14 ZW型の性決定様式を前提とした全雌三倍体の作成法

性決定方式が異なる場合、全雌化には雌性発生など新たな技術開発も必要になる。
そのため、借り腹生産においてもいくつかの技術的修正を加える必要がある。

移植効率や三倍体化に関しては高度化や再現性確認が必要であるが、PS3Nに関しては、生殖腺観察でオスが観察できず、自然にメス側に性比が偏った可能性がある。その場合、比較的簡易に、性統御技術なしで全雌化することもできるため、今後引き続き借り腹親魚としての活用検討を進めていきたい。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ブルーギルの繁殖に関しては、これまで駆除や繁殖抑制の観点から生態学的に論じられることが多かった。本研究では、交雑性、生殖腺発達および性分化など生理学的な部分においても多くの学術的な基礎的知見が得られている。これまで、淡水魚としてはメダカ目、コイ目、およびサケ目魚類がモデル生物として繁殖生理研究には用いられてきた。ブルーギルは国内では珍しく、スズキ目の淡水魚類であり、マダイやブリなどの主要な養殖魚類と同じ分類群に属している。本研究において、三倍体化や性転換の特徴など多くの養殖魚類との共通の性質が見出されており、副次的な成果ではあるが、今後はより水産業に即した基盤研究対象モデルとして利用できる可能性が考えられる。

(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>

不妊化ブルーギルの増産のために開発を進めている借り腹技術の開発において、三倍体作出や細胞移植などの個別技術の開発に一定の進展が認められた。中でも雌性発生による同質及び異質三倍体の作出においてほぼメスになるデータが示されたことは、全メス三倍体の作出技術の開発に道筋がついたといえる。現在、国内ではブルーギルの繁殖生理研究者はほとんどおらず、本データは貴重であるとともに

に、今後ブルーギルに対し、新たな繁殖抑制や防除対策を行政として検討する際に、ブルーギルの繁殖特性データとして活用されることが期待される。

6. 国際共同研究等の状況

サブテーマ1と共同で実施した（サブテーマ1の項目を参照）。

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

- 1) 山口寿哉、栗田潤、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：水産育種、49、43-52、(2020)、水産育種49、43-52 (2020).

「性ステロイドホルモンおよびアロマターゼ阻害剤経口投与によるブルーギルの性統御」

＜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) 奥宏海、栗田潤、山口寿哉、石川卓、正岡哲治、岡本裕之、河村功一、古澤昭人、河村佳正、風間崇宏、南野洋孝、横山雅仁、小川隆一：第13回外来魚情報交換会：(2018)
「遺伝子制圧法によるブルーギル駆除技術の開発とそれに対する意識調査」
- 2) 栗田潤、藤原篤志、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、岡本裕之：平成30年度日本水産学会春季大会（2018）
「遺伝子編集技術を目的としたブルーギル *foxl2* 遺伝子発現調節領域の生物間ゲノム情報比較による推定」
- 3) Oku H, Kurita J, Ishikawa T, Yamaguchi T, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Transplantation of bluegill *Lepomis macrochirus* spermatogonial cells to other kinds of genus *Lepomis*: preliminary study for surrogate production of bluegill.
- 4) Yamaguchi T, Kurita J, Ishikawa T, Oku H, Masaoka T, Okamoto H: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
Sex reversal in bluegill (*Lepomis macrochirus*) by oral administration of sex hormone.
- 5) 栗田潤、山口寿哉、石川卓、奥宏海、正岡哲治、桐生郁也、藤原篤志、岡本裕之：第13回外来魚情報交換会：(2019)
「ブルーギル初期飼育と3倍体作出技術」

（3）出願特許

サブテーマ1と共同で出願中（サブテーマ1の項目を参照）。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

サブテーマ1と共同で実施した（サブテーマ1の項目を参照）。

（5）マスコミ等への公表・報道等

サブテーマ1と共同で実施した（サブテーマ1の項目を参照）。

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Okamoto H, Ishikawa T, Oku H, Uchino T, Fujiwara A, Yamaguchi T, Masaoka T, Kawamura Y, Furusawa A, Kawamura K, Kurita J: International Symposium on Genetics in Aquaculture XIII, Cairns, Australia, 2018
(https://www.jcu.edu.au/__data/assets/pdf_file/0007/680830/Session12_EFE_Abstracts.pdf)
Generation of gene-edited bluegill *Lepomis macrochirus* for control and eradication of invasive species by gene induced suppression for alien species.
- 2) Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K: J. Sea Res., 58, 8-22 (2007)
Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes.
- 3) Hamilton WD: Science, 156, 3774, 477-488(1967)
Extraordinary sex ratios. a sex-ratio theory for linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology.
- 4) Thresher RE: Fisheries, 33, 3, 114-121 (2008)
Autocidal technology for the control of invasive fish.
- 5) Garling DL, Wilbert PD, Westmaas AR, Miller SM, Sheehan R, Wills PS, Paret JM: NCRAC culture series102, sunfish culture guide (North Central Regional Aquaculture Center) (Morris JE, Mischke CC, Garling DL Eds.), chapter8, pp33-40(2002)
Production of polyploid sunfish.
- 6) Gao Z, Wang HP, Rapp D, O'Bryant P, Wallat G, Wang W, Yao H, Tiu L, Macdonald R: Aquaculture, 294, 138-146 (2009)
Gonadal sex differentiation in bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* and its relation to fish size and age.

Ⅱ－３ 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握と野生資源の評価

国立大学法人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29（開始年度）～令和元年度研究経費（累計額）：15,017千円（研究経費は間接経費を含む）
（平成29年度：5,005千円、平成30年度：5,005千円、令和元年度：5,007千円）

【要旨】

遺伝子編集魚を用いた外来魚駆除において遺伝子編集魚の繁殖特性の解明は重用課題である。また、遺伝子編集魚を実際に野外に放流するに当たっては、事前に自然環境に近い野外池を用いた放流試験を行い、放流効果の検証ならびに在来の生態系に与える影響評価が要求されるが、この試験に当たっては予め試験地におけるブルーギルの資源特性を把握しておくことが必要となる。このことから本サブテーマでは、1) ブルーギル遺伝子編集魚を用いた飼育環境下における繁殖行動特性の把握、2) 実証試験候補地におけるブルーギルの資源量評価を行った。また、本プロジェクトの最終目標は琵琶湖のブルーギルの駆除であることから、3) 分子マーカーを用いた琵琶湖におけるブルーギルの資源量のモニタリングも併せて行った。

実験水槽を用いた遺伝子編集魚（雄）と野生魚（雌）の配偶行動の観察において、遺伝子編集魚は営巣行動、雌の誘因、産卵行動においてほぼ正常な行動を示すと共に受精卵からは多数の正常な仔魚が孵化したことから、遺伝子編集魚は繁殖能力においてほぼ正常であることが明らかとなった。

実証試験候補地として増養殖研究所の近くに存在する勝田小池（4,731m²）と幸神池（8,729m²）の2池を選び資源量調査を行ったところ、生息個体数として勝田小池は1,400-2,500匹（0.3-0.5匹/m²）、幸神池は12,500-17,800匹（1.4-2.0匹/m²）が推定された。いずれの生息地も0-4歳の個体から構成され、繁殖は全長10cm以上の3歳魚を中心に行われるが、大半の個体は産卵後、冬期に死亡する可能性が高い事が示唆された。マイクロサテライトマーカーを用い、各池の遺伝的多様性について調べて見たところ、経年変化ならびに池間での違いは認められなかった。また、勝田小池において0歳魚に対する3-4歳魚の繁殖貢献度を調べた所、3歳魚、4歳魚は何れも1以下であった。このことから勝田小池と幸神池の生息個体数は環境収容力に達している可能性が高く、放流試験においては3歳魚以下の個体を用いる事が望ましいと考えられた。

余呉湖を含む琵琶湖10地点で遺伝的特徴を明らかにするため、マイクロサテライトマーカーを用いた資源量調査を行ったところ、遺伝的多様性において生息地間でほとんど差は見られなかったが、余呉湖、竹生島、姉川は他の生息地との間に若干の有意差が見られた。また、遺伝子頻度から分布様式について見たところ、琵琶湖の集団は大きく南北に遺伝的クラインを形成し、北湖は姉川を中心として分布するのに対し、南湖は琵琶湖大橋以南でほぼ一様に分布している可能性が窺われた。各生息地の有効集団サイズについて調べてみたところ、琵琶湖では北高南底の傾向が見られると共に、多くの生息地で6年間で減少の傾向が認められた。また、過去50年間における有効集団サイズの変化を推定したところ、何れの生息地も1990年前半頃から減少傾向が継続して認められ、この結果は、滋賀県が行っている外来魚駆除対策事業の結果とよく一致した。これらのことから、琵琶湖における遺伝子編集魚を用いたブルーギルの駆除に当たっては、分布の中心ならびに分布拡大様式を考慮した複数の地点で遺伝子編集魚の放流を行う必要があることが判った。また、琵琶湖におけるブルーギルの分布拡大については琵琶湖の環流の影響も高いと考えられることから、遺伝子編集魚の放流に当たっては、こうした要因も考慮する必要があると思われる。

【キーワード】

繁殖特性、遺伝的集団構造、分布様式、放流効果、繁殖貢献度

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*) 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で問題となっている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られたミシシッピ川産18個体が唯一の公式記録であるが（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分析により、日本各地に生息する個体はいずれもこの1960年に導入された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分析により、琵琶湖のブルーギル集団は日本の生息地の中で最も遺伝的多様性が高いだけでなく、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分布拡大の最大のソースでもあることから、琵琶湖におけるブルーギルの駆除は日本のブルーギル問題解決の要とも言うこともでき、正に喫緊の課題である。

2. 研究開発目的

外来魚駆除の実践において、生息地の集団構造と繁殖様式を中心とした生態情報の入手は必須である。この理由として、こうした生態情報は駆除技術の開発を始めとする駆除事業の効率化において重要な情報であり、こうした情報を欠く状態で外来魚の根絶は実質不可能であることが挙げられる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、滋賀県が1985年から開始した外来魚駆除事業により資源量は大幅に減少したものの、2010年頃から生息数に殆ど変化が見られないといった駆除効果の外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。

本研究は遺伝子編集魚を用い、ブルーギルの駆除を目的とするものであるが、遺伝子編集魚の実用化に当たっては、遺伝子編集魚の有効性の検証ならびに問題点の洗い出しが必要である。このため本サブテーマでは、まず飼育実験による遺伝子編集魚の繁殖特性の解明を行った。次に野外池を用いた放流試験を行うため、実験候補地におけるブルーギルの資源量ならびに年齢組成の推定を野外調査と分子マーカーを用いた集団解析により行った。また、本プロジェクトは最終目標として琵琶湖のブルーギル集団の駆除を目的としていることから、当地におけるブルーギルの集団構造の推定も合わせて行った。

3. 研究開発方法

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の繁殖行動特性の把握

行動観察実験は2018年に増養殖研究所内の屋外に設置した水深40cmの1.7t角形水槽（図3.3.1）と水中カメラ（300s-IRWA：サイエンス・アイ製）を用いて行った。行動観察装置は水槽を中央で区分けするように網を設置し、ペアリングを開始するまで雌雄の移動を制限した。更にトレイの中に砂をひき、雄のブルーギルが営巣できるようにした。実験には2016年に増養殖研究所において作出した遺伝子編集魚（雄）と通常魚（雄：通常の人工授精によるもの）に加え、2017年に五桂池（三重県多気郡多気町五桂）において採集した野生魚（雌）を用いた（表3.3.1）。

実験に用いた個体は2019年7月8日から22日までの間、行動実験用の水槽とは別の水深40cmの1.7t角形水槽を用いて水温20℃から22℃前後で一次馴致を行った。7月22日に実験個体を一次馴致用の水槽から2つ用意した実験用の水槽（tank1, 2）に移し、水温20℃から22℃前後の間で7月29日まで二次馴致を行った。tank1には生殖系列に変異導入がみられる体細胞モザイクの成熟した遺伝子編集雄2匹と2019年5月中旬に伊勢市玉城町の大池で採捕した成熟雌3匹を配置した。なお、雄はDNA切断酵素をインジェクションした遺伝子編集第1世代の個体を使用した。tank2には生殖系列に変異導入がみられる体細胞モザイク

の成熟した遺伝子編集雄3匹と2019年5月中旬から下旬にかけて同池で採捕した成熟雌3匹を配置した。同様に雄はDNA切断酵素をインジェクションした遺伝子編集第1世代目の個体を使用した。馴致後7月29日に水槽内を横断するように設置した網を撤去し、雌雄を一緒にした。撮影は8月1日まで行い、12時から14時の間に1時間行った。また、本実験の前に実験個体の全長（TL）および体重（BW）を計測した。

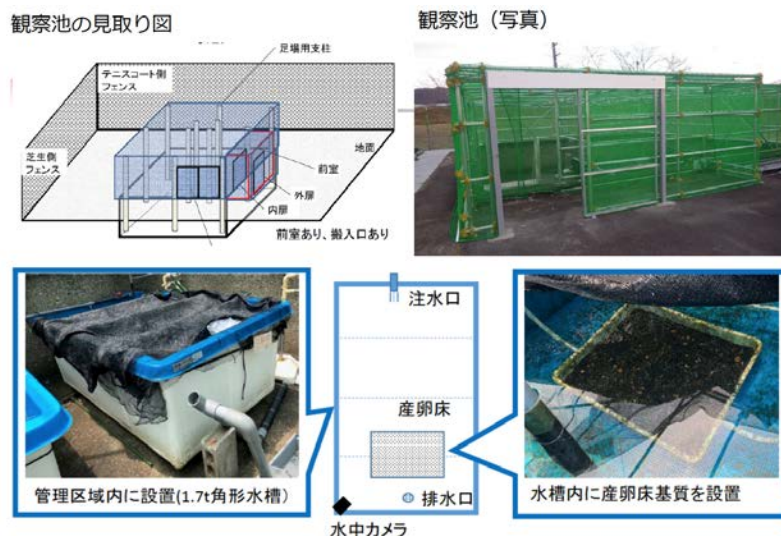


図3. 3. 1 遺伝子編集魚の行動観察装置の概要

表3. 3. 1 不妊化遺伝子搭載魚の繁殖行動観察で用いた個体

実験水槽	個体ID	全長 (mm)	体重 (g)	備考
tank 1	♂1	220	249.9	遺伝子編集魚
	♂2	210	187.0	〃
	♀1	152	97.7	野外個体（玉城町大池産）
	♀2	142	65.8	〃
	♀3	138	58.0	〃
tank 2	♂3	225	253.3	遺伝子編集魚
	♂4	220	255.0	〃
	♂5	200	162.2	〃
	♀4	132	53.4	野外個体（玉城町大池産）
	♀5	128	47.6	〃
	♀6	125	47.1	〃

（２）実証試験候補地における資源量（個体数）の推定

a. 生息個体数の推定ならびに年齢査定

調査は2017年と2018年は勝田小池（面積：4,731m²）と幸神池（面積：8,729 m²）、2019年は勝田小池のみで行った（図3.3.2）。調査は、釣り、トラップ（カゴ網、セロビン、お魚キラー）により行った（図3.3.3）。採集した個体は全長と体重を記録した。採集した個体は体長と体重を計測した後、DNA分析用に腹鰭組織の一部を切除し、100%エタノールに保存した。なお、DNA分析においては各年級から15個体をランダムに選び、分析に供した。

Petersen 法⁹⁾による個体数推定を行うため、2017年と2018年の調査で捕獲した個体については尾鰭を、2019年に捕獲した個体については腹鰭をフィンカットにより標識し、池に放流した。なお、2018年と2019年には0歳魚の捕獲を8月にタモ網により行った。個体数推定はPetersen法により行い、年齢査定は全長を基にヒストグラムを作成し、FiSAT II¹⁰⁾のBhattacharya's Methodにより年級群を分解することにより行った。

b. 各生息地における遺伝的集団構造ならびに当歳魚に対する繁殖貢献度の推定

採集した鰭組織よりDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA)を用いてDNAを抽出し、Kawamura et al.¹¹⁾により報告されているマイクロサテライトDNA (MS) 18座を用いて分析を行った。MSのPCRはKawamura et al.¹¹⁾の方法に従い、PCR産物はGeneScan 500LIZ Size Standard (Applied Biosystems, USA)

と共に HiDi Formamide (Applied Biosystems, USA) に溶かしたものを Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) 上で電気泳動を行い、GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, USA) を用いてアリの検出を行った。

遺伝的集団構造の推定として、各年級群についてヘテロ接合度の観察値 (H_O) と期待値 (H_E) を GENEPOP 4.2¹²⁾ により推定した。また、各集団のアリリッチネス (A_R) を FSTAT¹³⁾ により求めると共に有効集団サイズ (N_e) を NeEstimator¹⁴⁾ の Linkage disequilibrium (LD) 法^{15,16)} により求めた。

繁殖貢献度の推定は、0 歳魚に対する繁殖親の有効集団サイズをまず Temporal 法¹⁷⁾ により求め、この値を用いて LD 法により推定した 0 歳魚の N_e を除することにより行った。ブルーギルの最少成熟サイズは全長 100mm とされることから²⁾、全長 100mm 以上の各年級群と 0 歳魚の間で繁殖親の有効集団サイズを求めた。

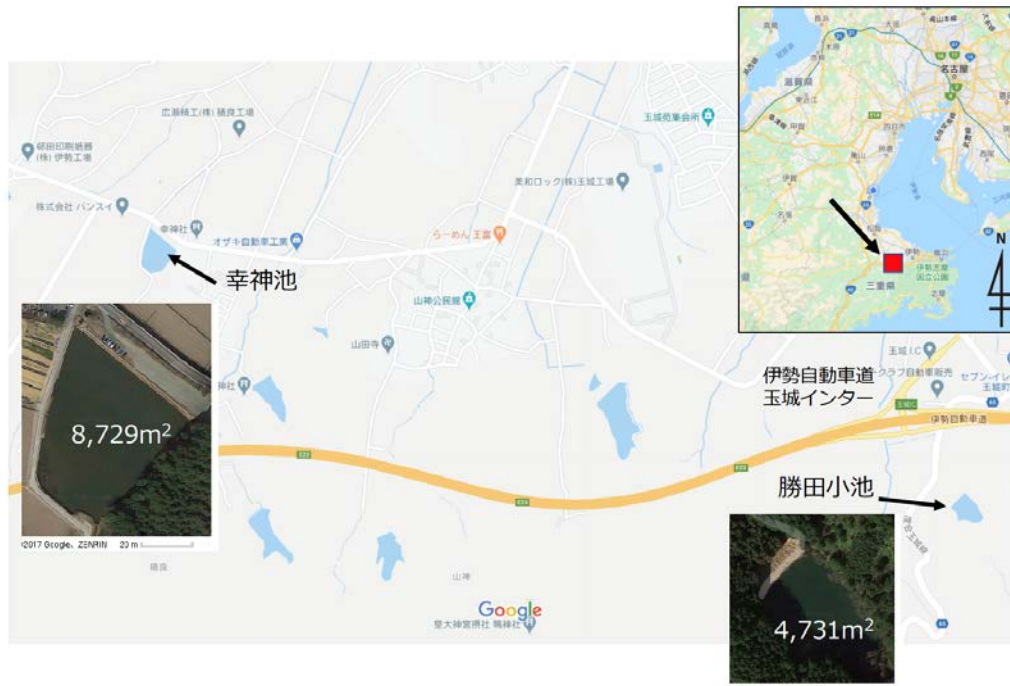


図3. 3. 2 野外放流試験候補地の所在地



図3. 3. 3 野外調査で用いた調査道具

(3) 琵琶湖における資源量のモニタリング

a. 各集団の遺伝的特徴の推定ならびに経年変化

サンプリングは2017-2019年の7-8月に余呉湖を含む琵琶湖内の10地点で釣りにより行い(図3.3.4)、実証試験候補地の集団を対象とした遺伝子分析と同様の方法により DNA 分析を行った。データ解析は2014-2016年に採集した761サンプルを併せた計1,308個体について行った(表3.3.2)。

MSの各遺伝子座におけるヌルアリの検出はソフトウェア Micro-Checker 2.2.3¹⁸⁾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 4.2¹²⁾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。各集団のアリルリッチネス(A_R)はFSTAT¹³⁾により求めた。また、生息地間における遺伝的分化の程度(F_{ST})をArlequin¹⁹⁾により推定した。

b. 生息地間における分布様式並びに個体移動の程度

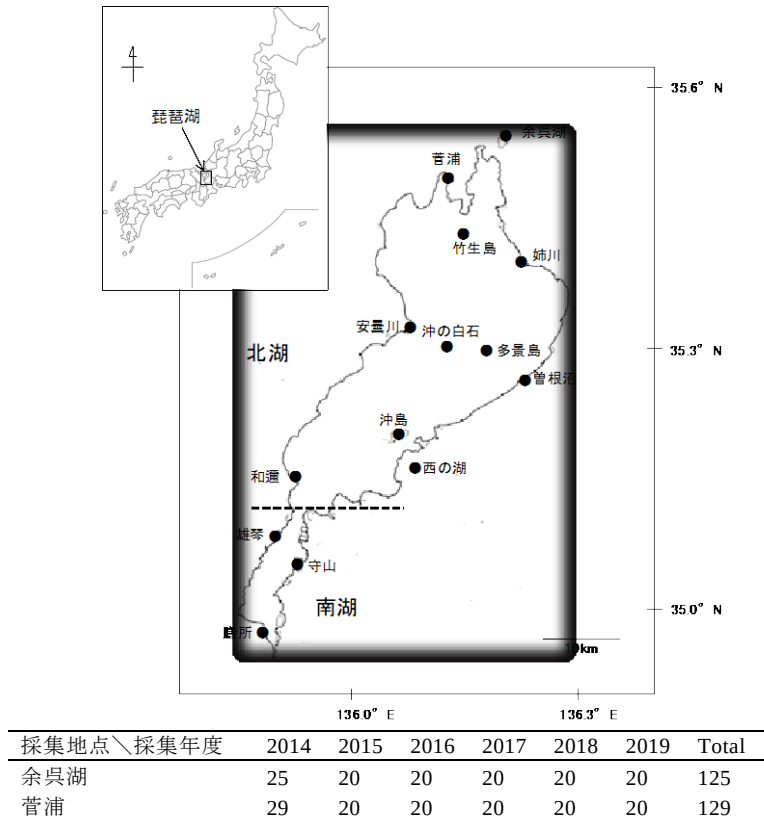
生息地間における個体移動の程度ならびに分布拡大様式を明らかにするため、BayesAss 3.0²⁰⁾とAdegenet-R^{21,22)}のsPCAを用いて推定を行った。BayesAssは過去3世代に遡り移動様式を推定するものであり、各集団における他集団からの移入個体の割合を推定した。また、sPCAは遺伝子頻度情報から分布拡大の中心を推定するものであり、2014-2019年のデータについて分布様式の経年変化を調べた。

c. 有効集団サイズを用いた各生息地の個体数ならびに経年変化の推定

2014-2019における琵琶湖の各生息地の有効集団サイズをLD法により推定すると共に2017-2019における親魚の有効集団サイズをTemporal法により推定した。実証試験候補地における年齢査定の結果からブルーギルの繁殖は3歳魚を中心とすることが推定されたことから、3年前のデータと比較することにより、親魚の有効集団サイズを推定した。なお、LD法とTemporal法の計算はNeEstimatorを用いて行った。また、ブルーギルの琵琶湖への侵入(1965年頃)から現在に至るまでの有効集団サイズの変化をVarEff 1.2²³⁾により推定し、滋賀県で行われている外来魚駆除対策事業の結果²⁴⁾との比較を行った。

図3.3.4 琵琶湖における調査地点

表3.3.2 琵琶湖における資源量のモニタリングで用いた分析個体数



竹生島		48	20		20	20	108
姉川	28	19	20	16	20	14	117
安曇川	27	20	20	20	20	20	127
多景島		34	20				54
曾根沼		24					24
沖島		32					32
西の湖	34	20	20		20	20	114
和邇	28	20	20	20	20	20	128
守山	21	20	20	22	20	15	118
雄琴		30	20	20	20	20	110
膳所	22	20	20	20	20	20	122
Total	214	327	220	158	200	189	1,308

4. 結果及び考察

(1) 不妊化遺伝子搭載魚の繁殖行動特性の把握

生殖系列に変異導入がみられる体細胞モザイクの成熟した遺伝子編集魚の雄2匹と2019年5月中下旬に玉城町の大池で採捕した成熟雌を3匹配置したtank 1において、7月24日に雄が尾鰭を底面に押し付けながら激しく左右に振り、砂礫を周囲に跳ね上げ、すり鉢状の産卵床を作る行動が確認された(図4.3.1)。雄は8月1日まで幾度か営巣行動を繰り返した後、周囲の雌を激しく追い立て、産卵床に誘い込むような行動を示すようになった。雌が産卵床に定位するようになると雄は雌の鰓蓋付近に頭部を近づけるようにして回り始めた。しばらくすると、雄が外側、雌が内側の位置を保ったまま産卵床の中を旋回し、数回旋回したところで雌の産卵行動がみられ、産卵床に産み付けられた卵が確認された。また、本実験終了後、カメラ撤去時に卵を保護している雄による撮影者への攻撃行動が確認された。一方でtank 2においてはこのような営巣行動が確認されることは無かった。なお、tank 1の実験で得られた受精卵は3日後に孵化し、正常な仔魚となった(図4.3.2)。

これら一連の行動の観察ならびに受精卵の発生状況から見て本プロジェクトにおけるブルーギル遺伝子編集魚の雄は正常な繁殖能を有していると考えられる。今後の課題として野外試験池を用いた繁殖試験が必要と思われる。



図4.3.1 遺伝子編集魚(雄)の繁殖行動



図4.3.2 遺伝子編集魚(雄)の繁殖行動

(2) 実証試験候補地における資源量(個体数)の推定

a. 生息個体数の推定ならびに年齢査定

Petersen法による推定個体数は勝田小池が1,440~2,481匹、幸神池が12,475~17,738匹となった。生息密度についてみると勝田小池が0.30~0.52匹/m²、幸神池が1.43~2.0匹/m²となり、幸神池の生息密度は勝田小池の3-6倍であることが判った(表4.3.1)。捕獲個体についてヒストグラムを作成し、年齢査定を行った所、勝田小池と幸神池は0-4歳魚で構成され、繁殖の主群は3歳魚であると共に冬期における死亡率の高さが覗われた(図4.3.3)。

b. 各生息地における遺伝的集団構造ならびに当歳魚に対する繁殖貢献度の推定

勝田小池の遺伝的多様性について見るとヘテロ接合度は観察値が0.45-0.48、期待値が0.48-0.53の間で推移し、いずれの年級群においてもヘテロ過剰の傾向が見られた（表4.3.2）。年級群間で見ると2017年の3歳魚のヘテロ接合度が最も低く、逆に2018年の3歳魚が最も高い結果となったが、年級群間で有意差は見られなかった（ F_{ST} P値 > 0.05）。有効集団サイズについて見ると0歳魚が26-49、3歳魚が21-293、4歳魚が62-67となり、0歳魚と4歳魚は比較的安定していたのに対し、3歳魚は変動が大きい結果となった。幸神池の場合、ヘテロ接合度の観察値は0.45-0.55、期待値は0.51-0.54となり、勝田小池と同様、ヘテロ過剰の傾向が見られた。年級群間で見ると2017年は3歳魚、2018年は0歳魚の遺伝的多様性が高かったが、年級群間で有意差は見られなかった（ F_{ST} P値 > 0.05）。また、勝田小池と幸神池の間に遺伝的多様性に差は認められなかった（ F_{ST} P値 > 0.05）。

0歳魚に対する各年級群の繁殖貢献度について見ると、勝田小池の場合、2018年の3歳魚は4歳魚の約2倍であったが、2019の4歳魚は3歳魚の約4倍となった。また、幸神池については0歳魚の有効集団サイズの計算が不可能（-ないしは ∞ は、推定不能のため）であったことから、繁殖貢献度の推定は不可能であった。

これらの結果から、勝田小池と幸神池は遺伝的多様性においてほぼ同程度と見なすことが出来、また年変化もほとんど見られなかったことから、これら2池は個体数において安定した状態にあると言える。また、勝田小池の1個体当たりの繁殖貢献度において各世代の値が何れの年においても1以下の値となった理由として、勝田小池のブルーギルの環境収容力が飽和状態に達している可能性が考えられる。3歳魚と4歳魚の間に繁殖貢献度にさほど違いが見られなかったことから、遺伝子編集魚の作出と維持コストを考えると遺伝子編集魚を用いた放流試験では、3歳魚の使用が望ましいと考えられる。

表4.3.1 実証試験候補地における推定個体数

1.勝田小池				
調査年度	調査日	捕獲個体数 (再捕個体数)	推定個体数 (±SD)	生息密度 (匹/m ²)
2017	10/10	126	1,470	0.31
	10/17	175 (15)	(±363)	
2018	5/22	312	2,481	0.52
	5/25	326 (41)	(±362)	
2019	7/31	283	1,440	0.30
	8/2	117 (23)	(±269)	
2.幸神池				
調査年度	調査日	捕獲個体数 (再捕個体数)	推定個体数 (±SD)	生息密度 (匹/m ²)
2017	10/10-11	145	17,738	2.03
	10/17-18	367 (3)	(±10,199)	
2018	5/23-24	289	12,475	1.43
	5/31-6/2	259 (6)	(±5,034)	

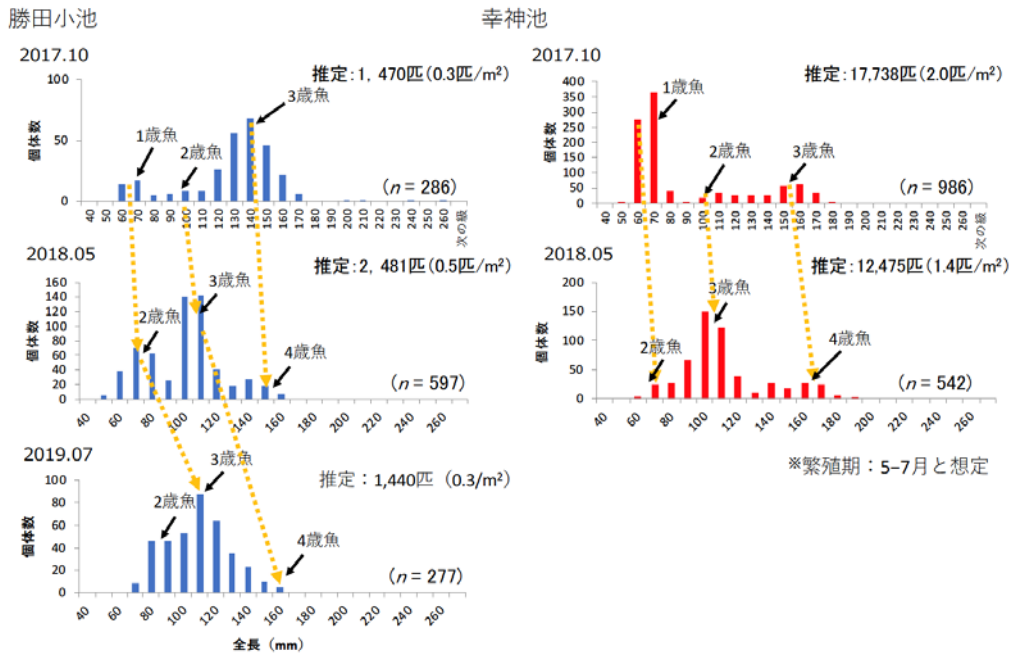


図4.3.3 実証試験候補地における捕獲個体のヒストグラム

表4.3.2 実証試験候補地の集団の遺伝的特徴

勝田小池								幸神池							
Date	Age	n	H_o	H_e	A_N	A_R	N_e	Date	Age	n	H_o	H_e	A_N	A_R	N_e
2017.10	2	15	0.459	0.503	3.167	3.167	21.6	2017.10	1	15	0.448	0.509	3.278	3.278	18.3
	3	15	0.485	0.484	2.833	2.833	293.5		2	15	0.530	0.519	3.778	3.778	10.7
									3	15	0.541	0.543	3.389	3.389	11.1
2018.05	0	15	0.467	0.485	3.111	3.111	26	2018.05	0	15	0.496	0.527	3.500	3.500	∞
	3	15	0.467	0.529	3.167	3.167	116.3		3	15	0.552	0.517	3.222	3.222	28.9
	4	15	0.485	0.508	3.111	3.111	67.4		4	15	0.526	0.520	3.222	3.222	984
2019.07	0	17	0.474	0.533	3.389	3.389	49	n , サンプル数; H_o , ヘテロ接合度 (観察値); H_e , ヘテロ接合度 (期待値); A_N , 平均アليل数; A_R , アليلリッチネス; N_e , 有効集団サイズ (LD法)							
	3	20	0.453	0.505	3.444	3.337	21								
	4	20	0.481	0.500	3.056	3.018	62.5								

表4.3.3 実証試験候補地における0歳魚に対する3歳魚と4歳魚の繁殖貢献度

勝田小池				幸神池			
調査年度	親魚の年級	0歳魚に対する親魚の数 (N_e)	繁殖貢献度	調査年度	親魚の年級	0歳魚に対する親魚の数 (N_e)	繁殖貢献度
2018	3	28.6	0.909	2018	3	-838	-*
	4	46.2	0.563		4	53.7	-*
2019	3	233.9	0.209	* 幸神池は0歳魚の N_e の推定が不可能なことによる			
	4	61.9	0.792				

(3) 琵琶湖における資源量のモニタリング

a. 各集団の遺伝的特徴の推定ならびに経年変化

2014-2019年の余呉湖を含む琵琶湖10地点においてヘテロ接合度とアليلリッチネスの値の変化を調べて見たところ、いずれの生息地もヘテロ接合度は0.5前後、アليلリッチネスは3前後を推移し、有意ではなかったものの若干、低下する傾向が見られた(表4.3.4)。また、生息地間での遺伝的分化の有無を見たところ、余呉湖、竹生島、姉川においては他地点との集団の間に僅かではあるものの差が認められた(表4.3.5)。

表4.3.4 琵琶湖の各集団における遺伝的多様性 (2014-2019)

Year		2014					2015					2016				
Population	n	H_o	H_e	A_N	A_R		n	H_o	H_e	A_N	A_R	n	H_o	H_e	A_N	A_R

余呉湖	20	0.489	0.496	53	3.290	20	0.478	0.521	55	3.332	20	0.519	0.497	49	3.048
菅浦	20	0.497	0.532	54	3.362	20	0.550	0.539	51	3.142	20	0.484	0.506	51	3.156
竹生島	-	-	-	-	-	20	0.495	0.526	54	3.294	20	0.491	0.517	51	3.159
姉川	20	0.484	0.523	54	3.353	19	0.449	0.494	53	3.256	20	0.455	0.494	52	3.223
安曇川	20	0.524	0.532	57	3.547	20	0.553	0.530	57	3.446	20	0.478	0.520	52	3.223
多景島	-	-	-	-	-	20	0.451	0.511	55	3.352	20	0.484	0.511	52	3.209
曾根沼	-	-	-	-	-	20	0.502	0.519	54	3.305	-	-	-	-	-
沖島	-	-	-	-	-	20	0.457	0.492	56	3.376	-	-	-	-	-
西の湖	20	0.571	0.543	57	3.537	20	0.442	0.524	54	3.329	20	0.500	0.508	53	3.287
和邇	20	0.494	0.541	56	3.478	20	0.533	0.542	51	3.141	20	0.486	0.478	50	3.081
守山	20	0.481	0.512	50	3.112	20	0.555	0.549	54	3.295	20	0.557	0.528	52	3.235
雄琴	-	-	-	-	-	20	0.462	0.533	55	3.365	20	0.495	0.523	49	3.040
膳所	20	0.503	0.516	52	3.228	20	0.470	0.528	52	3.197	20	0.500	0.521	49	3.055
Total	160	0.505	0.524	69	3.452	259	0.492	0.524	72	3.355	220	0.495	0.508	61	3.204

Year	2017					2018					2019				
Population	<i>n</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>A_N</i>	<i>A_R</i>	<i>n</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>A_N</i>	<i>A_R</i>	<i>n</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>A_N</i>	<i>A_R</i>
余呉湖	20	0.522	0.502	50	3.043	20	0.514	0.521	51	3.181	20	0.463	0.483	3.063	2.963
菅浦	20	0.522	0.530	50	3.060	20	0.534	0.533	53	3.294	20	0.531	0.546	3.500	3.336
竹生島	-	-	-	-	-	20	0.528	0.494	50	3.115	20	0.491	0.527	3.250	3.177
姉川	16	0.496	0.511	48	3.000	20	0.531	0.545	55	3.422	14	0.411	0.472	3.188	3.188
安曇川	20	0.525	0.511	53	3.242	20	0.534	0.519	53	3.291	20	0.516	0.507	3.438	3.305
多景島	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
曾根沼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
沖島	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
西の湖	-	-	-	-	-	20	0.494	0.493	50	3.109	20	0.522	0.532	3.188	3.081
和邇	20	0.509	0.508	49	3.017	20	0.513	0.529	51	3.178	20	0.459	0.508	3.125	2.998
守山	20	0.546	0.529	55	3.383	20	0.519	0.519	50	3.116	15	0.500	0.526	3.188	3.158
雄琴	20	0.516	0.546	53	3.263	20	0.535	0.514	56	3.478	20	0.525	0.504	3.313	3.194
膳所	20	0.531	0.532	51	3.118	20	0.500	0.513	57	3.537	20	0.491	0.506	3.313	3.219
Total	156	0.521	0.521	66	3.183	200	0.520	0.519	63	3.308	169	0.491	0.511	3.256	3.162

n, サンプル数; *H_O*, ヘテロ接合度の観察値; *H_E*, ヘテロ接合度の期待値; *A_N*, アリル数; *A_R*, アリルリッチネス

表4.3.5 琵琶湖の生息地間における遺伝的分化の程度 (F_{ST})

2017											
F_{ST}/P 値	膳所	雄琴	守山	和邇	西の湖	姉川	安曇川	竹生島	菅浦	余呉湖	
膳所		0.937	0.496	0.514	0.730	0.027	0.486	N.A.	0.252	0.225	
南湖	雄琴	-0.007	0.946	0.730	0.919	0.180	0.234	N.A.	0.721	0.378	
	守山	-0.001	-0.009	0.982	0.532	0.063	0.090	N.A.	0.468	0.297	
	和邇	-0.002	-0.003	-0.009	0.333	0.505	0.180	N.A.	0.351	0.144	
	西の湖	-0.021	-0.034	-0.008	0.007	0.261	0.144	N.A.	0.604	0.423	
	姉川	0.015	0.006	0.009	0.000	0.012	0.045	N.A.	0.072	0.027	
北湖	安曇川	0.000	0.005	0.007	0.006	0.027	0.014	N.A.	0.171	0.000	
	竹生島	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
	菅浦	0.003	-0.003	0.000	0.003	-0.011	0.015	0.005	N.A.	0.000	
	余呉湖	0.004	0.001	0.002	0.007	-0.001	0.014	0.022	N.A.	0.023	
2018											
F_{ST}/P 値	膳所	雄琴	守山	和邇	西の湖	姉川	安曇川	竹生島	菅浦	余呉湖	
膳所		0.333	0.027	0.703	0.045	0.063	0.468	0.802	0.315	0.036	
南湖	雄琴	0.002	0.928	0.477	0.514	0.856	0.369	0.234	0.396	0.018	
	守山	0.009	-0.008	0.883	0.108	0.874	0.811	0.027	0.541	0.027	
	和邇	-0.003	0.000	-0.007	0.117	0.820	0.784	0.477	0.667	0.333	
	西の湖	0.017	-0.001	0.007	0.010	0.072	0.162	0.000	0.063	0.045	
	姉川	0.012	-0.006	-0.006	-0.005	0.011	0.063	0.000	0.063	0.045	
北湖	安曇川	-0.001	0.001	-0.005	-0.005	0.006	0.008	0.910	0.793	0.396	
	竹生島	-0.005	0.003	0.010	0.000	0.015	0.018	-0.009	0.198	0.081	
	菅浦	0.002	0.001	0.000	-0.004	0.011	0.008	-0.005	0.005	0.063	
	余呉湖	0.014	0.015	0.011	0.002	0.017	0.012	0.000	0.006	0.010	
2019											
F_{ST}/P 値	膳所	雄琴	守山	和邇	西の湖	姉川	安曇川	竹生島	菅浦	余呉湖	
膳所		0.423	0.369	0.450	0.730	0.180	0.658	0.162	0.171	0.036	
南湖	雄琴	0.000	0.514	0.315	0.144	0.018	0.613	0.162	0.189	0.000	
	守山	0.000	0.000	0.892	0.333	0.171	0.261	0.577	0.396	0.108	
	和邇	0.001	0.006	-0.008	0.468	0.000	0.694	0.342	0.099	0.342	
	西の湖	-0.005	0.006	0.003	0.001	0.036	0.216	0.297	0.351	0.072	
北湖	姉川	0.009	0.027	0.014	0.022	0.017	0.000	0.009	0.153	0.000	
	安曇川	-0.004	-0.002	0.004	-0.002	0.004	0.030	0.126	0.063	0.000	
	竹生島	0.007	0.008	-0.002	0.003	0.003	0.023	0.009	0.568	0.171	

菅浦	0.006	0.006	0.004	0.008	0.003	0.009	0.008	-0.001	0.000
余呉湖	0.013	0.021	0.012	0.006	0.014	0.036	0.024	0.008	0.028

b. 生息地間における分布様式並びに個体移動の程度

生息地間における個体移動様式を見るため、2019のデータを用い、BayesAssによる移動率の推定を行った所、和邇からの移入が高い可能性が示唆された（表4.3.6）。また、6年間のデータを基にsPCA解析を行い、第一主成分の値を地図上にプロットしたところ、琵琶湖の集団は南北に遺伝的クラインを形成し、北湖は姉川付近が分布の中心であるのに対し、南湖は雄琴-草津-膳所を結ぶエリアが分布の中心である可能性が示唆された（図4.3.4）。

表4.3.6 琵琶湖の生息地間における個体移動率の推定

To / From	余呉湖	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	西の湖	和邇	守山	膳所	雄琴
余呉湖	0.678	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.233	0.011	0.011	0.011
菅浦	0.011	0.682	0.011	0.011	0.011	0.011	0.229	0.011	0.011	0.011
竹生島	0.011	0.011	0.678	0.011	0.011	0.011	0.233	0.011	0.011	0.011
姉川	0.014	0.015	0.014	0.681	0.014	0.013	0.208	0.014	0.014	0.014
安曇川	0.011	0.012	0.011	0.011	0.678	0.011	0.232	0.011	0.011	0.011
西の湖	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.678	0.234	0.011	0.011	0.011
和邇	0.011	0.013	0.011	0.012	0.011	0.012	0.896	0.011	0.011	0.012
守山	0.013	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.214	0.680	0.013	0.013
膳所	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.233	0.011	0.678	0.012
雄琴	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.233	0.011	0.011	0.678

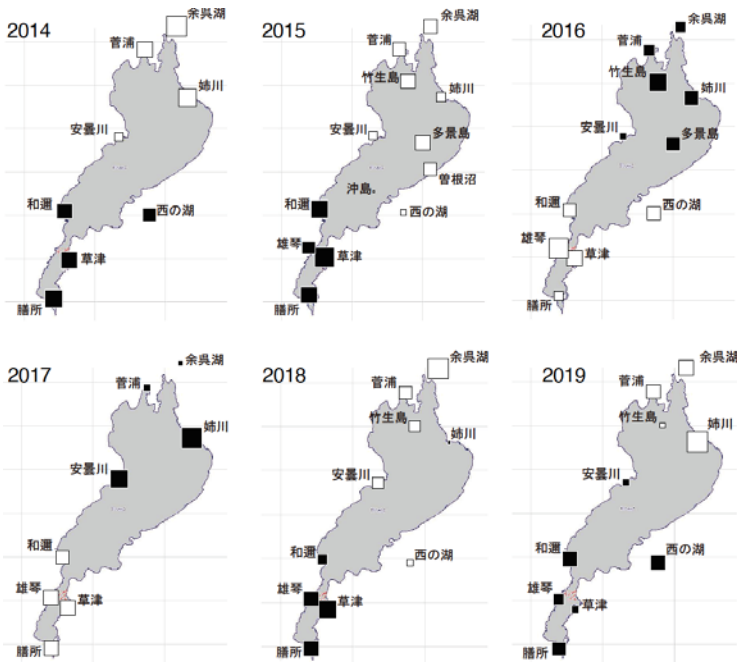


図4.3.4 sPCAによる集団解析の結果

黒と白は第一主成分における正と負の値を、四角の大きさは絶対値の大きさを表す

c. 有効集団サイズを用いた各生息地の個体数ならびに経年変化の推定

2014-2019年における琵琶湖の各生息地における有効集団サイズを推定したところ、殆どの生息地において減少傾向にあることが覗われ、特に南湖における有効集団サイズの低下は顕著であることが分かった（表4.3.7）。この理由として、琵琶湖におけるブルーギルの推定生息量は2016年以降、減少傾向が続いていることから、これに対応していることが考えられる（図4.3.5）。なお、2017-2019年における親魚の有効集団サイズについてみると余呉湖、姉川、西の湖、守山、膳所においては減少傾向が見られ、逆に竹生島、安曇川、雄琴においては増加傾向が見られた（表4.3.7）。VarEffにより過去50年間における有効集団サイズの変化を推定したところ、北湖の姉川、菅浦が高く、逆に西の湖、守山（南湖）が低い

結果となり、いずれの生息地においても1990年頃から減少傾向が認められ、滋賀県の外来魚対策事業の結果²⁴⁾とよく対応した(図4.3.6)。

今回の分析結果から、琵琶湖のブルーギルの集団構造の特徴として、1) 個体レベルでの移動能力は低い、2) 南湖と北湖で大きく2つのclusterが存在する可能性、3) 全体的な個体数の低下傾向の3点を挙げる事が出来る。1)、2)の結果は遺伝子編集魚を用いたブルーギル駆除の実施においては単一地点ではなく複数の地点で行う必要性があり、竹生島の様な独立性が高く有効集団サイズの高い離島集団においてもピンポイントで駆除が必要であることを意味している。sPCAの結果は北湖においては姉川周辺が分布の中心であることを意味し、これは北湖における環流²⁵⁾に対応したものとも考えられる(図4.3.5)。これに対し、南湖は生息地間で生息密度にさほど大きな違いは見られず、この理由として南湖における環流の不在ならびに湖岸におけるカナダマスの沈水植物群落の連続性が挙げられる。有効集団サイズの変動推定の結果が外来魚対策事業の結果とよく一致したことは、琵琶湖におけるブルーギル駆除が順調に推移していることを意味するものと見ることも出来るが、現行の方法では根絶は難しいことから、将来的には遺伝子編集魚を用い、姉川、竹生島、和邇、西の湖等の主要分布地点においてピンポイントで駆除を実施することが望ましいと言える。

表4.3.7 琵琶湖の生息地間における個体移動率の推定

集団\調査年度	有効集団サイズ*						親魚の有効集団サイズ**		
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2017	2018	2019
余呉湖	1637	35.9	188.7	∞	∞	∞	35.5	109.7	25.8
菅浦	47.7	81.8	∞	328.4	664.8	208.2	25.7	26.3	-302
竹生島	N.A.	∞	∞	N.A.	∞	476.8	N.A.	78.5	215.2
姉川	632.4	∞	∞	214	∞	152.8	36.8	106.2	25.7
安曇川	47.5	192.7	∞	251.6	∞	∞	30.8	-86.3	334.8
西の湖	227	∞	117.1	N.A.	∞	55.8	N.A.	360.6	82
和邇	∞	∞	∞	∞	546.1	54.2	-136	-77	37.3
守山	78.8	51	∞	261.8	∞	∞	623.3	142.2	63.6
雄琴	N.A.	∞	27	∞	∞	∞	N.A.	-117	6449
膳所	∞	∞	82.3	82.4	44.4	28.9	34.3	61.5	49.3

*LD法、**3歳魚を主な親魚と想定しTemporal法により推定
∞と-の値は推定不能であることを表す

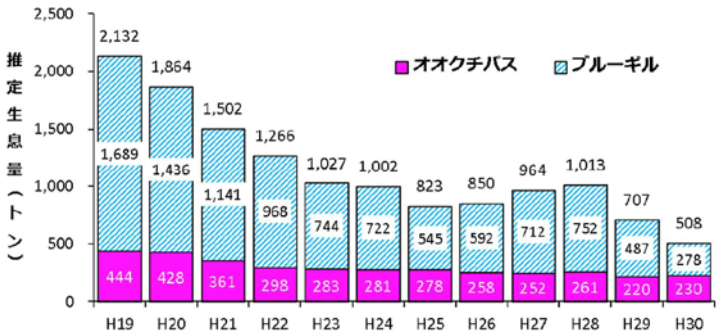


図4.3.5 琵琶湖における外来魚推定生息量の推移⁸⁾

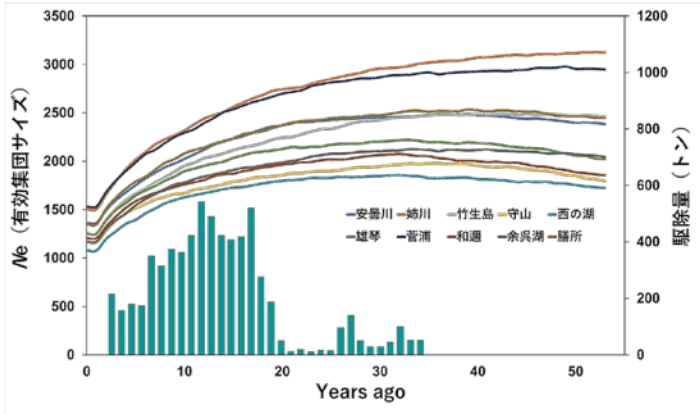


図4.3.6 琵琶湖におけるブルーギルの有効集団サイズの変化の推定と滋賀県による外来魚駆除量の推移²⁴⁾

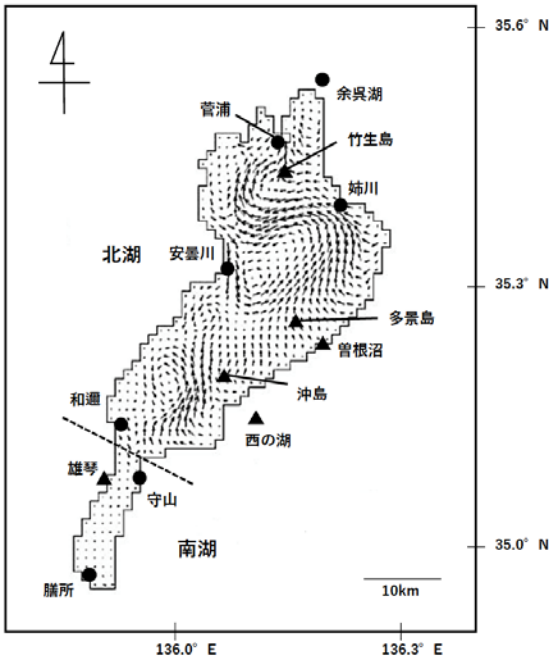


図4.3.7 琵琶湖における潮流の流れ²⁵⁾

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

飼育実験の結果から、ブルーギル遺伝子編集魚の雄は繁殖において、正常な行動能力ならびに生殖能を有する可能性が高いことが明らかになった。また、放流試験候補地の調査・分析により、ブルーギルの年齢構成並びに主となる繁殖年級群を明らかにすることができ、遺伝子編集魚の放流試験の実施に当たって貴重な知見を得ることが出来た。分子マーカーを用いた集団解析において琵琶湖の集団は南北にクラインを形成し、個体レベルでの移動能力は低いことから、遺伝子編集魚の放流においては複数の主生息地を対象に行うことの必要性が示唆された。また、有効集団サイズの推定結果から、琵琶湖のブルーギルは減少傾向にあることが示唆され、外来魚駆除の成果を支持する結果となった。

(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＞

遺伝子編集魚の実証試験候補地は一般的なため池の規模であることから、今回得られた結果（ブルーギルの年齢組成ならびに資源量）は他のため池にも当てはまる可能性が高く、駆除技術の改良において有益な知見になることが予想される。また、琵琶湖において明らかになった分布様式（複数の分布拡大の中心ならびに分布拡大パターン）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。

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。

＜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) 高山久弥・佐野菜採・河村功一・岡本裕之・栗田 潤・奥 宏海・藤原篤志：日本水産増殖学会第18 回大会・令和元年度日本水産学会近畿支部例会（2019）
「分子マーカーを用いた琵琶湖におけるブルーギルの遺伝的集団構造の把握」
- 2) 河村功一：日本生態学会第65回全国大会（2019）
「見えない外来種：淡水魚における遺伝子浸透」（企画集会：国内外来種を考える）

（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

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

- 1) 日本水産増殖学会・日本水産学会近畿支部例会：優秀ポスター賞受賞
高山久弥・佐野菜採・河村功一・岡本裕之・栗田 潤・奥 宏海・藤原篤志：日本水産増殖学会第18 回大会・令和元年度日本水産学会近畿支部例会（2019）
「分子マーカーを用いた琵琶湖におけるブルーギルの遺伝的集団構造の把握」

8. 引用文献

- 1) Froese P and Pauly D (2017) FishBase. <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) 田口貴史 (2020) 平成30年度当初の琵琶湖における外来魚生息量の推定. 平成30年度滋賀県水産試験場報告, 70.
- 9) 田中昌一 (1985) 水産学総論. 恒星社厚生閣, 東京.
- 10) Gayanilo FC, Sparre P and Pauly D (eds) (2002) FiSAT II: FAOICLARM Fish Stock Assessment Tools (version 1.1.2). FAO, Rome. Available at:
www.fao.org/fi/statist/fisofit/fisat/index.htm
- 11) 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, 637-644.
- 12) Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- 13) Goudet J (2001) FSTAT, Version 2.9.3: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- 14) 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.
- 15) Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38, 209-216.
- 16) 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.
- 17) 北田修一・北門利英・岸野洋久 (2007) 水産資源の管理と保全におけるサンプリング調査と統計遺伝. 計量生物学 28 (Special issue), S35-S55.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Wilson GA and Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.
- 21) Jombart T (2008) ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403-1405.
- 22) Jombart T, Pontier D and Dufour AB (2009) Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102, 330-341

- 23) Nikolic N and 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
- 24) 滋賀県水産課 (2019) 外来魚駆除対策事業.
<https://www.pref.shiga.lg.jp/ippan/shigotosangyou/suisan/18681.html>
- 25) 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.

Ⅱ－４ 放流試験候補地の検討と生産支援体制の構築

いであ株式会社 環境創造研究所 古澤 昭人

研究協力者 横山 雅仁、風間 崇宏、南野 洋孝（平成29年度～令和元年度）、
河村 佳正（平成29～30年度）、山口 友樹（令和元年度）

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：15,012千円（研究経費は間接経費を含む）
（平成29年度：5,004千円、平成30年度：5,004千円、令和元年度：5,004円）

【要旨】

本サブテーマは「放流試験候補地の選定と地域理解の醸成」と「不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築」から構成される。

「放流試験候補地の選定と地域理解の醸成」では、まず試験地としての必要要件を検討した。多くの池沼について現地踏査、聞き取り調査等を行い、その結果を必要要件の観点から評価し、放流試験候補地を選定した。放流試験候補地について合意形成に向けたステークホルダーの洗い出しや説明の方法等について検討を行い、ステークホルダー一覧表や本研究に関するFAQを作成した。ステークホルダー一覧表は、合意形成の優先順位や、説明の時期、方法、内容（重点項目）等を検討するためのツールとして利用できる。FAQは、各ステークホルダーの全ての関心事に答え、全ての懸念を払拭するためものではなく、意見交換等の際、各ステークホルダーの意見等を掘り起こす契機とするためのものである。

「不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築」では、ブルーギルの生産システムを構築し、屋内施設における人為催熟・人工授精による再生産を可能とした。ブルーギルの飼育・生産にかかる実際の経費から生産コストを算出し、コスト削減策をとった場合約2,200円/個体であった。生産コストの内訳では電気代や労務費の割合が高く、さらなるコストの削減が必要と考えられた。ブルーギルの成長には個体によって大きな差が生じることから、体サイズによって選別し飼育する必要性も明らかとなった。

【キーワード】

放流試験、合意形成、ステークホルダー、ブルーギル生産、生産コスト

1. はじめに

遺伝子組み換え生物やゲノム編集生物の環境中への放出によるリスクは、在来種との競合、交雑、有害物質の生産等をはじめとして、多くの研究者によって議論されている^{1),2)}。また、カルタヘナ法に関して、2019年2月8日に環境省より「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物の取り扱いについて周知されたところである³⁾。しかし、遺伝子組み換え生物やゲノム編集生物について未だに社会的な受容が進んでいるとは言えず、生態系や人の健康に与える影響に対する市民の潜在的な不安や嫌悪感は根強い⁴⁾。本研究の一部として「外来魚情報交換会」で実施したアンケート調査でも、外来魚駆除を肯定する会の性格上、本研究の有効性を期待する意見がほとんどであったが、一方で予期せぬ生態系への影響を懸念する意見が多いことが示された⁵⁾。

このような状況の中、本研究では令和2年度の屋外実証試験開始を目標としてきた。放流試験の実施には地域理解の醸成が必須であるが⁶⁾、現時点で参考となるようなゲノム編集魚の放流及びそれに伴う合意形成の事例はない。放流試験の実施に向けた社会的合意形成手続きの明確化が必要である。

また、本研究の社会実装を視野に入れた場合、不妊化遺伝子を搭載したゲノム編集魚の生産についての経済性の評価は非常に重要となる。しかし、ブルーギルの生産について経済的な評価をした知見は見当たらず、本研究の実用化には生産コストの試算と、その結果を踏まえた効率的な飼育のための課題

抽出及びその解決策の検討が必要である。生産コストを計算して感度解析を行うことで、コストにクリティカルな要素、工程がわかり、コスト低減のための優先順位が明確化できる⁷⁾。

2. 研究開発目的

(1) 放流試験候補地の選定と地域理解の醸成

本サブテーマの目的の一つが、放流試験の実施のための候補地の選定である。候補地の選定には科学、法律など多方面からの検討が必要であり、主な観点としては、試験の正確性を担保するための管理上の要件、周辺環境への配慮事項等が挙げられる。ただし、一方的に放流試験候補地を選定したところで、地域の理解が得られなければ試験の実施は不可能であり、候補地の選定と並行して地域理解の醸成を進めつつ、その状況をフィードバックする必要がある。

また、現時点で参考となるようなゲノム編集魚の放流及びそれに伴う合意形成の事例がないため、本研究において社会合意形成手続きの明確化が必要となっている。これに関しては、まずステークホルダーの洗い出しを行い、それぞれのステークホルダーについて本研究との関わり方等を整理、説明の方法を検討する。ここで示すステークホルダーの整理に関する方法や考え方は、今後同様の合意形成が必要となった場合に有効なツールとなると考えられる。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築

魚類を長期間飼育していると、消毒等の対策をとっていても感染症等による大量へい死がまれに発生することがある。従来、試験等に供するブルーギルの生産・飼育は研究代表機関である国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所の1カ所で行っていたが、大量へい死等のリスクを軽減するための方策として飼育施設を複数化することが考えられる。

また、将来の本研究の実用化を見据えると、放流魚の大量生産が必須であり、社会実装には経済的な評価が重要となってくる。そこで本サブテーマでは、生産システムを構築することによって大量へい死等の危険分散を図るとともに、ブルーギルの成長把握、効率的な飼育・生産のための課題抽出、生産コストの算出等を行い、将来の放流魚大量生産に資することを目的とする。

3. 研究開発方法

(1) 放流試験候補地の選定と地域理解の醸成

放流試験候補地の選定と地域理解の醸成の検討に際し、以下を目的に本研究課題のサブテーマの枠を超えて放流試験検討ワーキンググループを組織した。

- ・科学、法律など多方面から検討を行い、実証放流試験候補地を選定する。
- ・2020年度以降に想定する実証放流試験の実施のために必要な社会合意形成手続きを明確化するとともに、地域の理解醸成を進める。

ワーキンググループでの放流試験候補地検討のため、伊豆沼（宮城県）関連の聞き取り調査及び現地踏査、三方五湖（福井県）関連の聞き取り調査、三重県度会郡玉城町周辺のため池の現地踏査を実施し（表3.4.1）、収集した情報について整理した。

表 3.4.1 放流試験候補地検討のため調査を行った湖沼・ため池等

調査地	所在地	調査方法	調査年月日	備考
伊豆沼	宮城県登米市、栗原市	聞き取り調査、現地踏査	平成29年6月21日	聞き取り先：公益財団法人 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 主任研究員 藤本泰文
三方五湖	福井県三方郡美浜町、三方上中郡若狭町	聞き取り調査(Eメールによる)	平成29年7月4日	聞き取り先：福井県内水面総合センター 根本茂企画主査(福井県立大学 富永修教授の意見を含む)
玉城町周辺のため池	三重県度会郡玉城町周辺	現地踏査	平成29年7月20日	勝田小池(車谷池)、幸神池、吠池、押野池、東浦池、汁谷池、勝田大池、ヒジヤ池、原新池、中角池、津布良神社の池

ワーキンググループでは、まず放流試験候補地としての必要要件を検討した。次に、上記の湖沼・ため池等の放流試験候補地としての適性について、収集した所在地、面積、流入・流出の状況、管理者、生物の生息状況、利用者の状況等のデータをもとに必要要件の観点から評価し、絞り込み及び選定を行った。

また、ワーキンググループでは、放流試験候補地の検討と並行して実証放流試験のための合意形成に向け、ステークホルダー洗い出しの方法、説明・理解醸成の方法について検討を行った。検討にあたっては他の合意形成に関する研究や事例^{8),9)}を参考にした。

ステークホルダーの洗い出しに関しては、無作為にリストアップするのではなく、合意すべき項目・課題、例えば許可・承認、水利用、経済的利害、水辺の利用、魚類の捕獲、安心・安全、生物多様性保全等の視点から関係者のリストアップを行った。リストアップしたステークホルダーと本研究との関わり等を想定し、ステークホルダー一覧表として整理した。説明・理解醸成の方法に関して実施方針をとりまとめた。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築

ブルーギル等の人為繁殖・飼育システムは、いであ株式会社環境創造研究所（所在地：静岡県焼津市）に構築した。いであ株式会社環境創造研究所では、環境省関東地方環境事務所に対し特定外来生物の飼養許可を申請、許可を得た。また、ゲノム編集したブルーギルの飼育・繁殖が想定されたため、自主的に研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令等に準じた拡散防止措置（P1Aレベル）をとった。

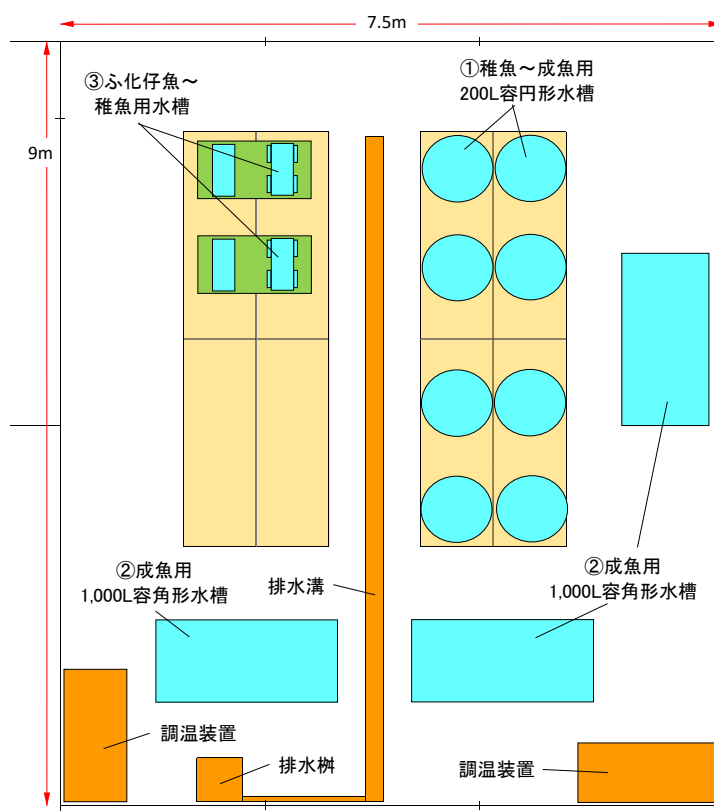


図3.4.1 水槽等の配置

約70m²の施設に、①稚魚～成魚飼育用の200L容円形水槽、②成魚用1,000L容角形水槽、③ふ化仔魚～稚魚用水槽を配置した。①円形水槽は③仔魚水槽の設置数との兼ね合いで最大24基まで、②角形水槽は最大6基まで設置可能であり、稚魚～成魚の飼育数に応じて調整した。③仔魚水槽は仔魚の生産状況によって0～4基を配置することとした（図3.4.1, 図3.4.2）。

飼育水は脱塩素した上水道水のかけ流し式で、各水槽の回転率がおおむね4回/日となるようにした。飼育水温は、空調及び調温装置により24℃で一定（人為催熟の期間以外）、照明は16h明・8h暗とした。成魚の飼育密度はおおむね50個体/200L、餌料は市販の配合飼料を2回/日、摂餌の状況を観察しながら残餌がないように与えた。ふ化仔魚～稚魚（約2カ月間）には淡水ワムシ、アルテミアを給餌した。観察は毎日行い。適宜清掃等を実施した。



図3.4.2 ブルーギルの飼育装置（左：1,000L容角形水槽、右：200L容円形水槽）

ブルーギルを飼育するとともに、親魚候補群に対して人為的に性成熟を促す催熟操作及び採卵、人工授精の処置を行った。催熟操作では水温と日長等の飼育環境をコントロールし、冬条件（水温15℃、8h明・16h暗）で飼育後、徐々に夏条件（水温24℃、16h明・8h暗）へと移行した（図3.4.3）。催熟操作を行った親魚候補個体にhCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）を腹腔内注射し、採卵及び人工授精を実施した。また、一部の受精卵に対して、成熟関連遺伝子の機能阻害を目的としたRNA等の顕微注入（ゲノム編集）を行った。

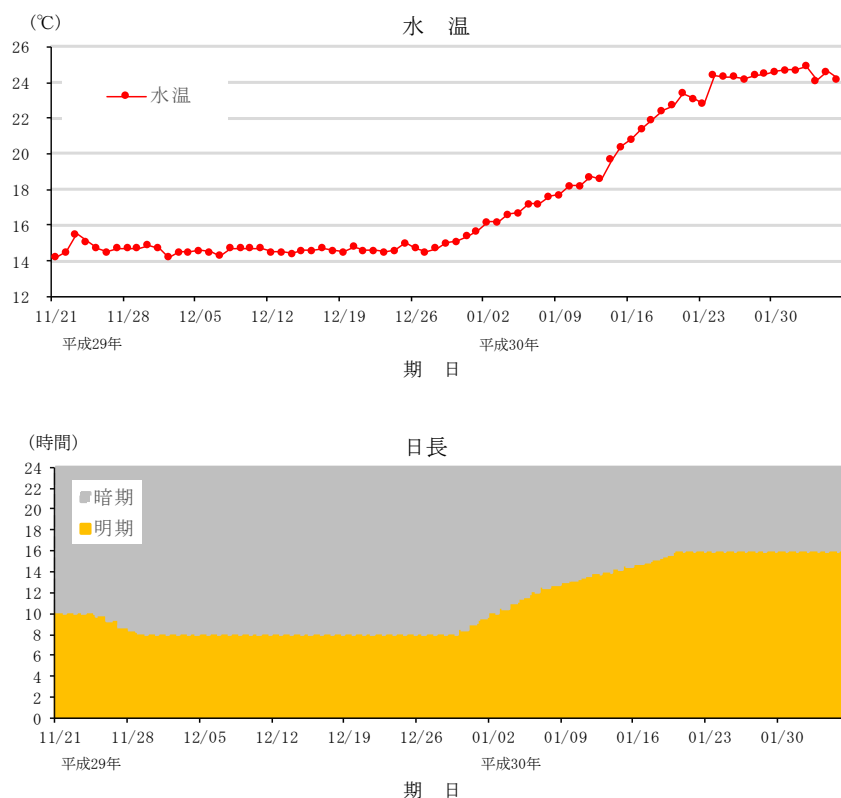


図3.4.3 親魚候補群への催熟操作（上：水温、下：日長）

催熟操作・人工授精によって得られた仔魚は、仔魚飼育水槽で50日間程度、全長20mm程度になるまで育成した。仔魚飼育に際して用いた餌料は、生物餌料として淡水ワムシ、アルテミア、配合飼料としてラブラバ2及び3（林兼産業(株)）を用いた（図3.4.4）。淡水ワムシの密度は、仔魚水槽内において20個体/mL程度を下回らないようにし、仔魚水槽内においても淡水ワムシが再生産を行うように餌として生クロレラ-V12（クロレラ工業株）を適量加えた。アルテミア及び配合飼料は3～6回/日の頻度で、仔魚の摂餌状況を観察しながら残餌が発生しないよう調節して与えた。

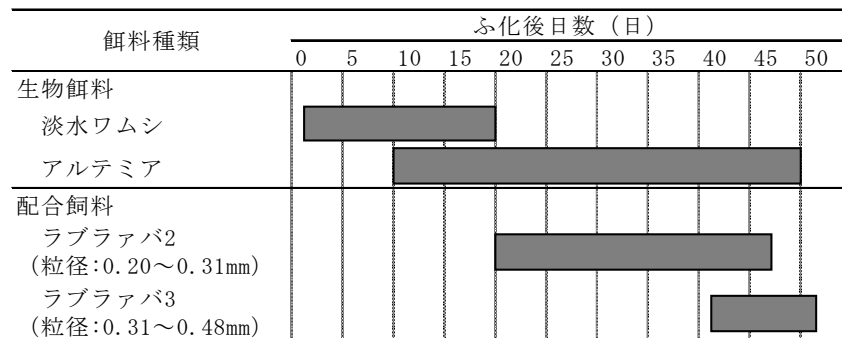


図3.4.4 仔魚飼育における餌料種類別の給餌期間

仔魚についてふ化後390日間の成長を記録した。全長、体重の計測はおおむね1回/月の頻度で、無作為に選んだ20個体について、麻酔をかけて計測を実施した。ただし、ふ化後0日、20日については麻酔をかけず1個体について計測を実施し、ふ化後50日、80日、110日については10個体について麻酔後に計測を実施した。ふ化後390日は、全個体について麻酔後に計測を実施した。

ブルーギルの生産システムの構築と並行して、生産にかかるランニングコストを試算した。飼育に係る原価を労務費、消耗品・薬品代、餌代、水道代（飼育水として使用）、電気代（照明等、空調、飼育水の調温）等の年間の実績額から推定した。飼育施設・設備・装置等のインシヤルコストは含まなかった。ランニングコスト試算に際しての主な条件は以下のとおりである。

飼育施設：いであ株式会社環境創造研究所 既存の飼育施設（専有面積：約70m²）

親魚（人工授精用）：200個体を常時飼育

親魚飼育水槽：200L容円形水槽×4（個体数密度50個体/200L）

仔魚生産個体数：1,000個体/年（年1回生産、ふ化から1年間飼育）

仔魚・稚魚飼育水槽：60cm水槽×8、サテライト水槽×16

稚魚～成魚飼育水槽：200L容円形水槽×最大20（最終的な個体数密度50個体/200L）

水温：24℃（成魚については数か月間冬条件として15℃とした）

照明：蛍光灯、16h明・8h暗（成魚については数か月間冬条件として8h明・16h暗）

飼育水：脱塩素した上水道水のかけ流し（各水槽の回転率はおおむね4回/日）

成魚の給餌：市販の配合飼料（2回/日、摂餌の状況を観察しながら残餌がないように給餌）

仔魚・稚魚の給餌：ワムシ・アルテミア（仔魚期のみ2か月間）、市販の配合飼料（3～6回/日、摂餌の状況を観察しながら残餌がないように給餌）

消耗品（餌以外）：活性炭フィルター、薬品類、その他

飼育管理：適宜清掃等を実施、給餌及び状況の観察は毎日実施

その他：

- ・施設・装置（水槽・配管を含む）の設備投資及び維持管理費は含まない。
- ・電力量は空調及び水温の調温装置には各々に電気メーターを設置し、その他の電気機器は消費電力と使用時間から電力量を求めた。
- ・給餌量は毎回の記録から算出した。

- ・生産されるブルーギルは全て雄であり、全個体を放流に使用できるものと仮定した。

4. 結果及び考察

(1) 放流試験候補地の選定と地域理解の醸成

(注) 以下に示す試験候補地名とそれに関係する自治体、管理団体、県名については、ケーススタディとして検討した一例を示したもので、放流試験の実施を前提としたものでないことに留意いただきたい。

放流試験検討ワーキンググループで検討した放流試験候補地としての必要要件を以下に示す。

<基本的な要件>

- ・ブルーギルの密度が高い・繁殖している

<正確なデータ取得及び管理上の要件>

- ・正確な個体数把握ができる適度な池の大きさである
- ・流入・流出・逸出防止管理が容易である
- ・部外者の立ち入り制限が容易である
- ・駆除事業が行われていない

<その他>

- ・ブルーギル駆除のニーズがある
- ・協力者が存在する
- ・研究拠点から地理的に近傍である
- ・希少種、貴重種等が分布していないか、生息密度が低い

放流試験検討ワーキンググループにおける検討の結果、勝田小池（車谷池）、幸神池、吠池、押野池の4カ所に絞り込んだ。その後、この4カ所について管理者及び関係者と協議を行い、勝田小池（車谷池）、幸神池の2カ所が放流試験候補地として適当であると評価、選定した（表4.4.1）。さらにこの2カ所についてブルーギルの資源量調査を実施し（サブテーマ3）、その結果を含め、放流試験の実施場所としての妥当性を検討し、候補地として勝田小池が最適であると判断した（図4.4.1）。



注：国土地理院の電子地形図(タイル)を加工して掲載

図4.4.1 放流試験候補地

放流試験候補地の選定と並行し、ステークホルダーをリストアップ、本研究との関わり等を想定してステークホルダー一覧表として整理した（表4.4.2）。

また、説明・理解醸成の方法に関しては、以下の方針をとりまとめた。

- ・説明会・意見交換会を開催
- ・既存組織（自治会等）を利用
- ・プロジェクトの段階やステークホルダーによって説明の時期（準備、計画、実施段階）・方法・内容（重点項目）を変える
- ・説明の主な内容：プロジェクトの意義、目的、目標、手法、スケジュール、安全・安心に関する事項、外来種問題、プロジェクトにより制限される行為

この方針を踏まえ、放流試験候補地として選定した勝田小池（車谷池）、幸神池の2カ所について、重要なステークホルダーである管理者等と協議し、ブルーギルの資源量調査に関する了解を得て資源量調査を実施した（サブテーマ3）。また、放流試験の実施、地域理解の醸成等の合意形成に向け、三重県農林水産部等との意見交換（令和元年10月1日）を行い、以下に関する助言を得た。

- ・放流試験候補地の希少種・重要種について
昆虫類としてベッコウトンボ、魚類としてカワバタモロコ、ウシモツゴ等の生息が考えられる。環境DNAを利用した調査が有効かも知れない。
- ・遺伝子のかく乱について
ブルーギルと交雑の可能性が考えられる魚類は三重県内にはいないと考えられる。希少種・重要種も含め、アセス的な整理が必要。
- ・特定外来生物の放流について（三重県自然環境保全条例）
三重県自然環境保全条例に努力目標であるが記載がある。
- ・ため池での魚介類採捕調査について（三重県漁業調整規則）

ため池に漁業権はないが、三重県漁業調整規則に漁具・漁法、魚種・時期・サイズ等について遵守すべき事項がある。

合意形成について意見交換や議論をする中で、ステークホルダーの一部にはゲノム編集技術に関する潜在的な不安、倫理的な意見が少なからずあることや、様々な課題が明瞭となった。片野ら(2015)¹⁰⁾による人工池におけるブルーギルのモツゴに対する長期的影響に関する研究で当初1,000個体以上いたモツゴが6～8年で絶滅したとの報告があるように、放流するブルーギルが在来生物に及ぼす影響は大きいと考えられ、本研究のアドバイザー会合であった放流試験候補地の選定に関する検討不足との指摘にも関連し、生物相の把握や生物多様性といった生態系の評価の拡充が必須であると考えられた。他の要件についても十分な情報を収集するとともに、屋外水槽（閉鎖された水域）での不妊化確認試験を実施するなどしたうえで、再検討の余地があると考えられた。

ステークホルダー一覧表に示したリストとそのニーズ等は、現時点での想定のため、多くのステークホルダーについて具体的な団体・組織・個人等までは特定していないが、実際の合意形成手続きに応じて適宜修正し、合意形成の優先順位や、説明の時期、方法、内容（重点項目）等を検討するためのツールとして利用できると考えられる。

事前に全てのステークホルダーとそのニーズ等を想定することは困難であり、既知のステークホルダーへの説明や聞き取りを通してフィードバックすることが効果的であると考えられる。

ステークホルダーへの説明に関しては、各ステークホルダーのニーズ、規模、権限や影響の強さ等から優先順位を決め、効率的に合意形成手続きを進めることや、各ステークホルダーに応じて説明の時期や方法・内容（重点項目）を変え、丁寧な説明を行うことが重要である。

円滑に理解醸成を図るには、既存の組織を活用し、支援を求めることは有効な手段である。具体的には宮川用水土地改良区や玉城町自治区（勝田区、積良区等）に協力を求め、当該組織やその集会の場を活用すべきと考えられる。

以下に、本研究に対する影響、潜在する問題とも大きいと考えられるステークホルダーについて、取り組むべき課題や合意形成を進める上での留意点等を示す。

<管理者等>

- ・管理団体、自治体：これらは最も重要なステークホルダーの一つであるため、協力が必須であり、丁寧できめ細やかな説明により良好な関係を保っていくことが重要である。農業用水及び池・施設の管理上の課題を抽出し、解決の方法を検討する必要があると考えられる。

<行政等>

- ・文部科学省、環境省、農林水産省、都道府県：利害関係を伴う一般的な合意形成とはやや異なり、法令等に基づく手続きが中心となる。遺伝子組換え生物等を規制する法律において、ゲノム編集技術により作出された生物の取り扱い方針が示されたところであり、また、魚類でのゲノム編集個体の放流は前例がないことから、関連情報を収集するとともに関係諸機関との意見交換を行う必要がある。

<漁業関係者等>

- ・近傍の内水面関連の漁業協同組合：放流試験においては、他魚種への食害が懸念されるブルーギルを放流し、一時的に個体数を増加させることになる。放流試験候補地として選定した勝田小池（車谷池）や幸神池に漁業権はないが、逸出による宮川への影響の懸念を払拭する必要がある。試験魚の逸出による生態系、特に有用種への影響や、本研究の意義、技術の安全性について説明する必要がある。

<一般利用者等>

- ・近隣住民、遊漁：ゲノム編集技術に対する不安の解消や安全・安心に関する説明など感情面に配慮した対応が求められると考えられ、慎重かつ柔軟に対応する必要がある。技術の安全性に重点を置いた説明を行い、あわせて池の使用の制限、本研究の意義や外来種問題等について説明する。

ステークホルダーへの説明の際、各ステークホルダーに合わせた説明方法・内容にすることの重要性は先述のとおりであるが、特に本研究のようにゲノム編集生物を環境中へ放出する場合、地域社会が「科学的ではない」不安や嫌悪感を抱くことが危惧され、より慎重な対応が求められる。合意形成を進めるうえで地域社会と信頼関係を構築することが最も重要であり、説明に先立ち、まずは各ステークホルダーのニーズを詳細に把握する必要がある。そのためのコミュニケーションツールとして、本研究・技術に関するQ&Aを検討、FAQを作成した（表4.4.3）。この資料は、各ステークホルダーの全ての関心事に答え、全ての懸念を払拭するためものではなく、意見交換等の際、各ステークホルダーの意見等を掘り起こす契機とするためのものである。

表4.4.1(1) 放流試験候補地の整理結果（注）

No.	池名	所在地	緯度経度		対象の池の情報			
			北緯	東経	面積	主な流入	主な流出	その他情報
1	吠池 [かますいけ]	三重県 度会郡 玉城町 原	34.466355	136.586902	約 7,000m ²	確認できず (地図、航空写真 による判別)	確認できず (地図、航空写真 による判別)	-
2	幸神池 [さいのかみいけ]	三重県 度会郡 玉城町 積良	34.471308	136.595678	約 10,000m ²	1カ所 (地図、航空写真 による判別)	1カ所 (地図、航空写真 による判別)	ヒシが多く調査等が困難かもしれない。
3	勝田大池 (大池)	三重県 度会郡 玉城町 勝田	34.473407	136.619908	約 79,000m ²	3カ所 (地図、航空写真 による判別)	4カ所 (地図、航空写真 による判別)	周辺にソーラーパネルが今後設置され るとの情報あった(日本野鳥の会三重 2017/12/24の記事より)
4	勝田小池 (車谷池)	三重県 度会郡 玉城町 勝田	34.464537	136.621460	約 4,700m ²	山からの湧水	1カ所	外周を徒歩で回ることができる。
5	押野池	三重県 度会郡 玉城町 勝田	34.477415	136.631974	約 35,000m ²	2カ所 (宮川用水2号幹 線水路より)	3カ所 (宮川用水)	水面へのアクセスは堰堤部と堰堤の対岸 の一部のみ。池は住宅地と学校に囲まれ ている。駐車スペースは1台程度。
6	東浦池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	34.470344	136.635718	約 6,000m ²	確認できず	1カ所 (汁谷川に流入)	・水生植物に覆われる部分が多く、半分 以上は立入が困難。 ・大きな流入は未確認。在来種(モロコ 類、スジエビ)が生息。ウシガエルのお タマジヤクシが多く生息。
7	汁谷池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	34.459605	136.628251	約 70,000m ²	確認できず	2カ所 (汁谷川に流入)	池は大きく、水面へのアクセスが可能な のは堰堤など一部のみ。資源量調査等 には船が必要。サニーロード沿いの農地と 山間部の間。
8	伊豆沼	宮城県 登米 市、栗 原市			3.69km ²	複数あり	複数あり	水深：最大1.6m、概ね1m前後
9	三方五湖	福井県 三方郡 美浜 町、三 方上中 郡若狭 町			3.58 km ² (三方 湖)	・各湖は水路等で つながっている ・鱚川(はす)、 他多数	早瀬川、堀切(日 向湖との運河)	水深：5.8m
評価内容					放流試験候補地として管理が容易な適当な大きさである場合、個体の流出が少ない流出力 所数が少ない場合、池の周辺にアクセスしやすく調査や管理がしやすい場合はプラス評価 とし、逆の場合はマイナス評価とした。			

注. 候補地として、**プラス評価は青字**、**マイナス評価は赤字**で示した。

表4.4.1(2) 放流試験候補地の整理結果（注）

No.	池名	所在地	管理状況			魚類等の生息状況		
			管理者	所有者・地権者	漁協（漁業権）の指定状況	ブルーギル	オオクチバス	その他魚類
1	吹池 [かますいけ]	三重県 度会郡 玉城町 原	町管理	-	なし	○ 生息密度 は高い	不明	-
2	幸神池 [さいのかみいけ]	三重県 度会郡 玉城町 積良	積良区	積良区	なし	○ 三重大学による研究 事例有（詳細は特記 事項参照）	不明	-
3	勝田大池 （大池）	三重県 度会郡 玉城町 勝田	宮川用水？	宮川用水？	なし	○ 生息密度 は高い	○	カムルチー、タイワンシ ジミ（宮川用水管内）
4	勝田小池 （車谷池）	三重県 度会郡 玉城町 勝田	宮川用水	勝田区	なし	○ 生息密度 は高い、三重大学が 過去に調査を実施	○	ニシキゴイ、在来種は未 確認
5	押野池	三重県 度会郡 玉城町 勝田	宮川用水	-	なし	○ 釣り人への 聞き取り	○ 釣り人への 聞き取り	-
6	東浦池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	-	-	なし	- 未確認	- 未確認	コイ科（モツゴ・モロコ 類？）、スジエビ
7	汁谷池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	-	-	なし	- 未確認	○	ニゴイ
8	伊豆沼	宮城県 登米 市、栗 原市			伊豆沼漁業共同組合	○ 生息密度 は低い	○	カムルチー、アメリカザ リガニ、ゼニタナゴ（環 境省レッドリスト： CR）、メダカ、ジュズカ ケハゼ
9	三方五湖	福井県 三方郡 美浜 町、三 方上中 郡若狭 町			鳥浜漁業共同組合	○	○	
評価内容			管理者、所有者、地権者、漁協（漁業権）の指定状況がはっきりしている場合をプラス評価とし、逆の場合はマイナス評価とした。			ブルーギルの生息が確認されている場合をプラス評価とし、逆の場合をマイナス評価とした。		

注．候補地として、**プラス評価は青字**、**マイナス評価は赤字**で示した。

表4.4.1(3) 放流試験候補地の整理結果（注）

No.	池名	所在地	利用者情報		特記事項	放流試験候補地としての適性 （評価）
			釣り	その他		
1	吠池 [かますいけ]	三重県 度会郡 玉城町 原	釣り禁止	・農産物即売所と温泉施設が隣接しており、コイを放流するなど散策のための利用者が多い。 ・管理者から部外者の立ち入りは困るという意見がある	-	ブルーギルの生息密度が高く、池の大きさも適切ではあるが、管理者から部外者の立ち入りは困るという意見があることから、候補地としては不適切と判断した。
2	幸神池 [さいのかみいけ]	三重県 度会郡 玉城町 積良	-	-	三重大学で過去に調査を実施したことがある。 （三重県幸神池におけるブルーギルの繁殖に関する行動生態学的研究）、池田裕司、淀太我、吉岡基、2009	ブルーギルの生息が確認された研究事例もあり、池の大きさも適した大きさである。ヒシが多いため調査のやりづらさはあるが、管理者による制限等もなく、候補地としては適切と判断した。
3	勝田大池 （大池）	三重県 度会郡 玉城町 勝田	バス釣りポイントとしての紹介があり	バードウォッチングの利用が有る（2011/3/6に日本野鳥の会の探鳥会が行われた記録）。	-	ブルーギルの生息密度は高いが、池からの流出も多い。さらにバス釣りやバードウォッチングなどの利用者が多く、ブルーギルの移住などの恐れが高いことから、候補地として不適切と判断した。
4	勝田小池 （車谷池）	三重県 度会郡 玉城町 勝田	-	-	-	ブルーギルの生息が確認された調査事例もあり、池の大きさも適した大きさである。管理者による制限等もなく、候補地としては適切と判断した。
5	押野池	三重県 度会郡 玉城町 勝田	-	宮川用水の灌漑の中核池であり、影響を受ける下流の水田が多いため、管理者からは不可との返答があった。	-	ブルーギルは確認されているが、池も大きく流出が多いなど池として扱いづらく、管理者からの許可が得られる可能性が低いから、候補地としては不適切と判断した。
6	東浦池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	-	-	-	池のサイズは適切で流出も少ない点は良いが、ブルーギルが確認されておらず調査の立入が難しいことから、候補地としては不適切と判断した。
7	汁谷池	三重県 度会郡 玉城町 宮古	-	-	-	ブルーギルが確認されておらず、池が大きく水面へのアクセスも限定されることから、候補地としては不適切と判断した。
8	伊豆沼	宮城県 登米市、栗原市	釣り客あり	・伊豆沼・内沼自然再生協議会 ・公益財団法人 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 ・ハス観光、バードウォッチング	・冬鳥渡来の湿地帯としてラムサール条約に登録 ・生物多様性保全や漁業資源保護のため、ラムサール条約登録湿地の伊豆沼・内沼（天然湖沼）におけるオオクチバス等防除事業を平成16年度より実施 ・水質は悪い（ハスが多い）。底質は悪い。	駆除事業が成功しており、本研究のニーズは低い。
9	三方五湖	福井県 三方郡 美浜町、三方上中郡若狭町		・三方湖再生協議会 ・福井県立大学海洋資源学部	・ラムサール条約の登録地 ・若狭湾国定公園 ・福井県外来魚調査事業、経営・生産振興グループによる駆除活動 ・富栄養湖、淡水（塩分の影響あり）	本研究のニーズは低い（福井県では九頭龍ダム湖でのコクチバス駆逐に関心が大きい）。
評価内容		池に他の利用者が多いとみられる場合は、マイナス評価とした。			-	-

注. 候補地として、**プラス評価**は青字、**マイナス評価**は赤字で示した。

表4. 4. 2(1) ステークホルダー一覧表 (注)

分類	ステークホルダー名	プロジェクトとの関わり		
		立場	関心事項（関与・要求）、ニーズ、見解	想定される関わり方
プロジェクト実施の許可・承認者	環境省、環境再生保全機構	・外来生物の放流に対する許可 ・プロジェクトへの出資、評価	・試験魚の逸出による生態系への影響 ・近隣住民の安全・安心への配慮 ・プロジェクトの進捗（出資者として評価する立場）	・申請に対する許可 ・プロジェクトの進捗報告
	文部科学省、農林水産省消費・安全局	・遺伝子組換え生物の放流に対する許可（遺伝子組換え生物等の第一種使用の承認）	・試験魚の逸出による生態系への影響 ・近隣住民の安全・安心への配慮	・申請に対する許可
	水産庁	・魚類の放流、採捕に対して意見、許可	・試験魚の逸出による生態系（特に水産有用種）への影響	・実施に対して意見
	全国内水面漁業協同組合連合会	・魚類の放流、採捕に対して意見、許可	・試験魚の逸出による生態系（特に水産有用種）への影響	・実施に対して意見
対象水域の使用の許可・承認者	農林水産省 東海農政局	・宮川用水の管理	・水の管理する上での、問題が発生しないか	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
	三重県（行政）の関連部署	・宮川用水の管理 ・池の管理 ・調査時の特別採捕許可	・水の管理する上での、問題が発生しないか ・池の管理する上での、問題が発生しないか ・調査時の特別採捕許可	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
	玉城町（行政）の関連部署	・池の管理	・池の管理する上での、問題が発生しないか ・近隣住民の安全・安心への配慮 ・プロジェクトが町の行政に影響がないか	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
	宮川用水土地改良区	・宮川用水の管理	・水の管理する上での、問題が発生しないか	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
	池の管理者	・池の管理	・池の管理する上での、問題が発生しないか	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
	地権者	・土地の所有権	・土地の立ち入りの許可 ・池の使用の許可	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告
経済的利用者（直接）	対象水域の内水面関連漁業協同組合	・魚類の放流、採捕に対して意見、許可	・試験魚の逸出による生態系（特に有用種）への影響 ・調査時の特別採捕許可（同意を得る必要がある）	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告 ・魚類採捕の禁止
	農業関係者（水利権者）	・水の使用	・水を使用する上での、問題が発生しないか 所定の時期に水を利用する（水位が下がる） 今までの水の利用の仕方を変更しなくても良いか など	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告 ・水利利用の制限
一般的利用者	近隣住民	・水辺をリクリエーション、憩いの場として利用	・立ち入り制限は困る ・ゲノム編集魚（技術）そのものに不安 ・生態系に悪影響があるのでは？ ・釣り禁止で、迷惑駐車やゴミが減ることは喜ばしい	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告 ・立ち入りの制限
	自治会	・水辺をリクリエーション、憩いの場として利用	・立ち入り制限は困る	・実施に向けて説明 ・実施状況の報告 ・立ち入りの制限
	遊漁（バス・ギル）	・池の遊漁利用 ・ブルーギル、オオクチバスの釣獲	・外来種駆除に対する生理的な反感を持っている ・釣り禁止になるのは困る	・釣りの禁止 ・制限を破っての侵入 ・試験魚の釣獲
	遊漁（ヘラ・その他）	・池の遊漁利用 ・ヘラブナ等の釣獲	・釣りの対象としていないブルーギルは駆除して欲しい ・釣り禁止になるのは困る	・釣りの禁止 ・制限を破っての侵入 ・試験魚の釣獲
その他利用者	大学の研究者	・研究フィールドとして利用	・研究フィールドなので、プロジェクトの実行は困る ・立ち入り制限は困る	・実施に向けて説明 ・立ち入りの制限
	外来魚駆除のNPO	・活動場所として利用	・活動場所なので、プロジェクトの実行は困る ・立ち入り制限は困る	・実施に向けて説明 ・立ち入りの制限

表4.4.2(2) ステークホルダー一覧表 (注)

分類	ステークホルダー名	説明時の重点説明項目					説明の方向性
		外来種問題	ブルーギルの生態系に及ぼす影響・駆除の意義	遺伝子制御法・ゲノム編集の技術の安全性について	実施により制限される行為について	プロジェクトの全体像	
プロジェクト実施の許可・承認者	環境省、環境再生保全機構					○	対象種についての基本情報は理解しているとみられる。 そのため、本プロジェクトの意義や具体的な実施手順、方法など、全体像についての説明を行う。
	文部科学省、農林水産省消費・安全局					○	
	水産庁			○			対象種についての基本情報は理解しているとみられる。 特に、他の水産有用種への影響についての関心が高いとみられるため、技術の安全性について詳細な説明が必要とみられる。
	全国内水面漁業協同組合連合会			○			
対象水域の使用の許可・承認者	農林水産省 東海農政局		○	○			対象水域の使用許可の判断をするためにも、駆除の意義について説明し、理解してもらう必要があるとみられる。 また、地域住民からの問い合わせ等がある可能性もあるため、近隣住民の最も関心が高い技術の安全性について、十分な説明が必要と考えられる。
	三重県（行政）の関連部署		○	○			
	玉城町（行政）の関連部署		○	○			
	宮川用水土地改良区	○	○	○	○		対象水域の使用の許可・承認者であり、利用者でもある。 本プロジェクトを実施することにより制限させる行為について、説明が必要であると考えられる。 また、外来種問題などの基本的な事項についても十分な知識がない可能性も考えられるため、基礎的事項から丁寧な説明が必要である。
	池の管理者	○	○	○	○		
	地権者	○	○	○	○		
経済的利用者（直接）	対象水域の内水面関連漁業協同組合	○	○	○	○		
	農業関係者（水利権者）	○	○	○	○		
一般的利用者	近隣住民	○	○	○	○		
	自治会	○	○	○	○		
	遊漁（バス・ギル）	○	○		○		本プロジェクトを実施することにより制限させる行為について、外来種問題や駆除の意義なども入れながら、丁寧に説明していく必要があると考えられる。
	遊漁（ヘラ・その他）	○	○		○		
その他利用者	大学の研究者				○		本プロジェクトを実施することにより制限させる行為について、丁寧に説明していく必要があると考えられる。
	外来魚駆除のNPO				○		

(注) ここで示した試験候補地名とそれに関係する自治体、管理団体、県名については、ケーススタディの一例として示したもので、放流試験の実施を前提としたものでないことに留意。

表4.4.3(1) FAQ「遺伝子制圧技術」の実証放流試験について

Q 人が遺伝子を操作することについて	A 人は生物を自分達の食料として都合の良い性質、人が望む優良な性質を持つよう遺伝的に改良して農作物や家畜を作ってきました。これらは偶然によるものですが、優良な性質を持つよう生物のDNA(遺伝子)の情報を変えた、とも言えます。このような生物の改良(育種)のおかげで食料が増産でき、人は繁栄してきました。 近年は、遺伝子に關与するDNAの情報が増えたため、これをもとに生物の性質を把握したり、改良したりする研究が増えています。ゲノム編集技術を利用した生物の改良もこのような研究の一部です。これまではDNA(遺伝子)の情報の変化(塩基配列の変化)を偶然に頼っていましたが、ゲノム編集技術の利用でかなり計画的に塩基配列を変化させることができるようになりました。 遺伝子(DNA)を直接操作するゲノム編集技術は新しい技術であり、倫理的、社会文化的な観点から懸念が示されている他、生態系への影響も危惧されています。しかし、この技術は、食糧の安定供給や、病気の治療、石油に代わる燃料の生産など様々な分野に応用できる可能性があり、人の未来にとって非常に有望な技術です。 本研究では将来的に編集魚の屋外への放流を想定していますが、本研究の中で十分な安全性の検証をします。
Q 外来魚ブルーギルの駆除について	A 外来生物と言えど、在来の生物と同じ命を持つ生き物です。しかし、外来生物が野外で繁殖すると、生物多様性に与える影響が大きくなり、在来の野生生物の減少や絶滅、農林水産業への影響が懸念されます。外来生物が在来種を捕食したり、在来種の生息場所や餌を奪ったり、在来種と交雑して雑種を作ったりするためです。 特に、ブラックバスやブルーギルについてはこれまでに多くの研究がなされ、生態系へ大きな影響を与えることが科学的に示されています。 その地域の在来種が失われるということは、その地域における生物の進化や、生物とともにある文化がなくなってしまうことです。在来の種や遺伝子の多様性は私たちの財産であり、私たちにそれを将来に引き継いでいく責任があります。
Q ゲノム編集とは？遺伝子組換えとはどう違う？	A 「遺伝子組換え」技術とは、別の生物の遺伝子を導入して、元の生物が本来持っていない性質を持たせる技術です。例としては、害虫を駆除できる「Btコーン」が有名で、ガ等の虫を殺す毒素を作る微生物の遺伝子を組み込んだトウモロコシです。なお、このような遺伝子組換え生物は、食品としての安全性や生態系への影響(生物多様性影響)等について、法律に沿って確認(安全性確認)をした上で利用されています。この虫を殺す毒素についても、人には害を与えないと考えられています。 「Btコーン」以外にも、農業分野では除草剤耐性を持つダイズや、医療分野では大腸菌によるトインスリンの生産が実用化されています。 ただし、遺伝子組換えは遺伝子の導入を偶然に頼る面があり、効率性の悪い技術です。

FAQ

「遺伝子制圧技術」の実証放流試験について

本研究・技術に關して、皆様がお持ちになるであろう疑問等についてQ&A形式でまとめました。ただし、この資料だけで皆様の全ての関心事にお答えし、全ての懸念を払拭できるとは考えていません。意見交換の際、皆様のご意見等を掘り起こすきっかけになればと考えて作成した資料です。

この研究の目的・概要など

Q 研究の名称

A 環境研究総合推進費「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」

【目的】

侵略的外来魚による生物多様性の損失を止めるため、その根絶を目的として「遺伝子制圧法」を開発し、技術の確立を目指しています。この技術は、従来の物理的駆除(捕獲、池干し等)が難しい場所にも適用できる利点があります。また、現在は、外来魚としてブルーギルを対象とした研究を行っています。この技術はブラックバスやスモールマウス等にも汎用できるため大きな波及効果が期待できます。

【概要】

ゲノム編集技術を用い、編集魚「卵を作れない遺伝子を持つオスのブルーギル」(精子は作れます)を作出、放流します。放流されたそのオス(編集魚)は野生のメスと交配し、仔魚が産まれます。産まれた仔魚のうち、メスは成長しても不妊のため産卵しません。オスは「卵を作れない遺伝子」を持って成長、精子を形成、交配に参加し、再び「卵を作れない遺伝子」を持った仔魚が産まれます。これが繰り返されることによって「卵を作れない遺伝子」が個体群に広がり、いずれ根絶に至ります。もちろん、この研究の中で、様々な観点から編集魚の特性や安全性等について確認・検証します。

遺伝子制圧法

「メスの卵を作る遺伝子の働きを抑え、それを集団内に広め、集団を小さくする」

卵を作れない遺伝子 (メス特異的不妊化遺伝子) を持つオスのブルーギル

野生の外來魚メス

放流

自然交配

繰り返し交配

子供メス

子供オス

卵を作れない

増殖不可

妊娠 精子は作れる

表4.4.3(2) FAQ「遺伝子制圧技術」の実証放流試験について

一方、「ゲノム編集」技術は、「遺伝子組換え」技術に比べ遺伝子操作の精度と効率が格段に高い技術であり、狙った遺伝子の場所での切断、編集、導入が可能です。特に、「ゲノム編集」技術のうち本研究で用いる技術は、狙った遺伝子を切断後、自然修復の際に起こる変異を利用するもので、自然界でも起こりうるものです。他の生物の遺伝子を導入するような改変ではありません。	Q ゲノム編集が既に利用されている生物、事例はある？ A アメリカでは、トランス脂肪酸を作らないようにゲノム編集された大豆からとった油の流通が始まっています。また、酸化による黒ずみを抑えたマッシュルームや、筋肉量の多い魚などへの応用が研究されています。
Q あえてこの方法をとる必要があるのか？従来の駆除方法ではダメなのか？ A 従来の駆除方法としては、網やガゴでの捕獲、池干し、産卵床の破壊などが実施されており、一定の効果があがっています。しかし、その駆除作業には多大な労力と費用が必要です。しかも、ほとんどの個体が駆除できたとしても、交配可能な個体が数匹でも残ると、数年後には再び増殖します。池干しは効果が高い方法ですが、河川や大型湖沼、希少種の生息地では実施が困難です。この研究の技術は、河川や大型湖沼にも適応可能であり、従来の方法と組み合わせることによって効率的な駆除が可能になります。	Q 本研究と同様の放流事例はあるか？ A 魚類では、屋外の池等にゲノム編集個体を放流した事例はありません。類似した事例としては、沖縄地方での不妊ウリミハエの放虫が挙げられます。
Q ゲノム編集生物の使用に関する法的な規制はあるか？ A 遺伝子組換え生物、ゲノム編集生物はいわゆるカルタヘナ法や食品衛生法などによって規制されています。本研究で用いる「ゲノム編集」技術は、狙った遺伝子を切断後、自然修復の際に起こる変異を利用するもので、自然界でも起こりうるものです。他の生物の遺伝子を導入するような改変ではありません。上記の遺伝子組換え生物等を規制する法律においても、このようなゲノム編集技術により作出した生物の取扱い方針が示されました。今後は、関係行政への情報提供や関係行政からの指導を通じて適切に使用されることとなります。	Q 特定外来生物であるブルーギルを放流してもいいのか？ A 放流の目的が防除のための研究であり、外来生物法にある所定の手続きをふめば可能です。

Q 放流試験の候補地は？選定の理由は？ A 勝田小池がこの研究に最適な場所と考え、ブルーギル生息数の調査をさせていただいています。候補地選定に際し、主以下の事項について検討を行いました。 ・ブルーギルが繁殖している ・適度な大きさ ・流入・流出の管理が容易 ・部外者の立ち入り制限が容易 ・現在、駆除事業が行われていない ・増養殖研究所の近傍である	Q ゲノム編集魚を食べても安全か？ A ゲノム編集した生物によっては、体内で新たなタンパクが生産される場合がありますので、これらに有害性がないかを検証します。
Q 環境に対する影響はないか？生物多様性を損なう恐れはないか？他の種へ編集された遺伝子が伝播することはないか？ A 遺伝子組換え生物等が環境に与える影響として、一般的には①競合における優位性(生態系へ侵入して周辺の野生種を駆逐しないか)、②交雑性(交雑によって近縁野生種が組換え遺伝子を持ったものに置き換わらないか)、③有害物質の産生性(有害物質を産生するようになり、周辺の野生生物を減少または消失させないか)等を調べます。本研究においても、様々な観点から安全性の検証を行うとともに、放流試験に先立ち、逸出防止策を講じます。なお、ブルーギルと交配する在来種はいないため、他の種へ編集された遺伝子が伝播することはないと考えられます。	Q 逃げ出したらどうなる？逸出防止策は？ A ブルーギルを根絶するには、ある程度の個体数の編集魚を定期的・継続的に放流する必要があります。従って、逃げ出した編集魚が僅かなら、編集された遺伝子は野生のブルーギル個体群に広がらず、いずれ消滅します。 逸出防止策については、外来生物法の関連法令に準じ、容易に逃げ出せない策を講じます。
Q この研究・技術のリスクは？不妊化ブルーギル(編集魚)の特性は？ A 放流した池からの逸出による生態系への影響、下流河川での漁業への影響等が考えられますが、この研究の中で、様々な観点から放流する編集魚の安全性や特性について検証します。	

表4.4.3(3) FAQ「遺伝子制圧技術」の実証放流試験について

Q 作出するゲノム編集魚は本当に不妊か？	A 放流試験に先立ち、この研究の中で不妊であることを確認します。ただし、対照試験として不妊でない個体を放流する場合があります。
Q 池の水の使用に支障は出ないか？	A 池を干すといったこと以外は、例年同様の使用をしていただいて構いません。また、関係者以外の立ち入りを制限するためのフェンスや、排水口の逸出防止ネット等は設置しますが、池の使用に支障をきたすような変更はいたしません。
Q 実験が終了するのは、ブルーギルが権絶された場合か？途中で終了することもあるのか？実験終了時は、池干してブルーギルを全部取り上げるのか？	A 実験終了時には、ブルーギルを回収する必要があると考えます。回収の方法としては池干し等が考えられますが、池の管理者等とご相談しながら検討します。

(2) 不妊化遺伝子搭載魚の大量生産支援体制の構築

催熟操作では、一部の個体から搾出法により成熟した卵ないし精子が得られ、人為的に成熟をコントロールすることができた。これらの卵と精子を用いて人工授精させ、受精卵を得た。ふ出した仔魚を飼育し、約18カ月後にはその個体を用いて人為催熟、人工採卵・授精を行い、再び仔魚の生産をすることができた。

ふ化仔魚の生残については、ふ化後20日までに大きく減耗し、ふ化後50日で生残率約50%であった。その後、徐々に生残率は下がっていったが、大きく減耗することはなかった（図4.4.2）。

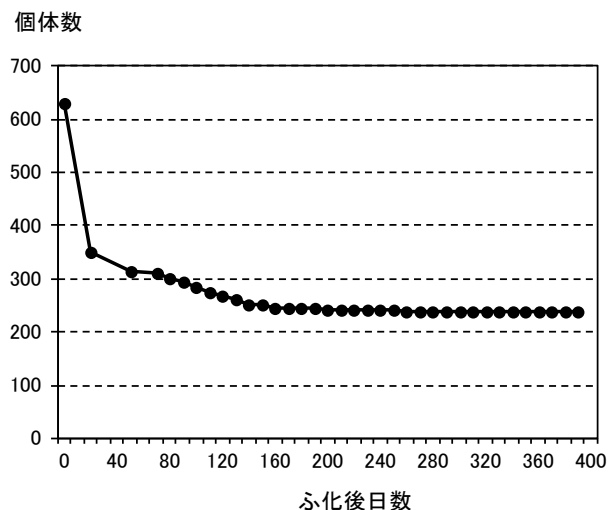


図 4.4.2 生産したブルーギルの生残

仔魚の成長については、ふ化後360日で全長112.1mm、体重24.86g（20個体の平均値）であった。横川ら（1986）¹¹⁾による香川県満濃池における野生個体での報告では、6月上旬～7月下旬に生まれた個体が翌年の夏に79mm、3年目の夏に109mmになるとしており、それと比較すると成長はかなり良いと考えられた。ふ化後330日から360日にかけて全長、体重とも低減しているように見える。飼育日数とともに成長に個体による大きな差が生じており、計測の際に小さな個体を採捕できなかったサンプリングの偏りによるものと考えられた（図4.4.3）。

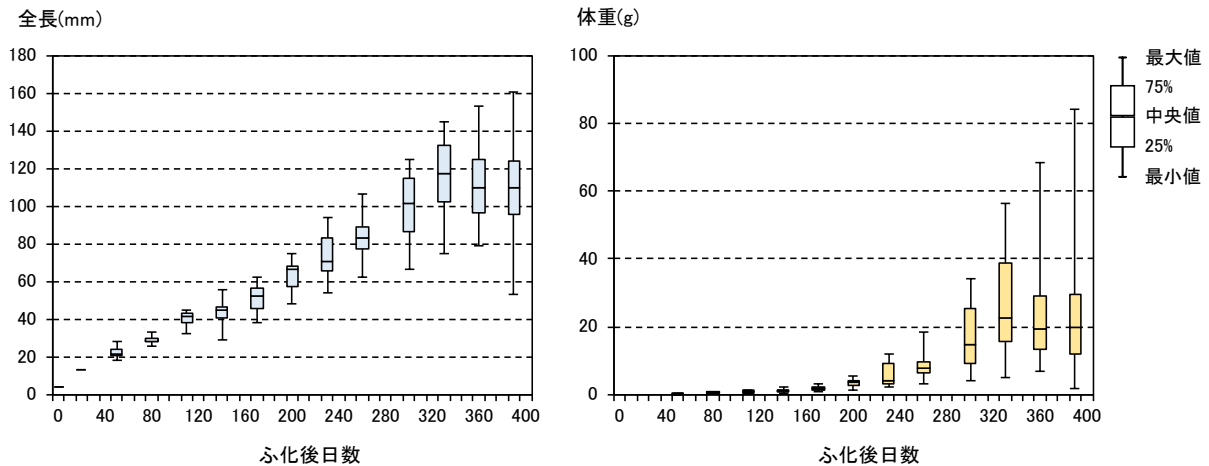


図 4.4.3 生産したブルーギルの成長（左：全長、右：体重）

全長と体重の関係では多くの魚類と同じくべき乗式で表され、べき乗回帰式における全長の乗数は3を上回っており、横川ら（1986）¹¹⁾やSpotte（2007）¹²⁾の報告とほぼ同様であった（図4.4.4）。

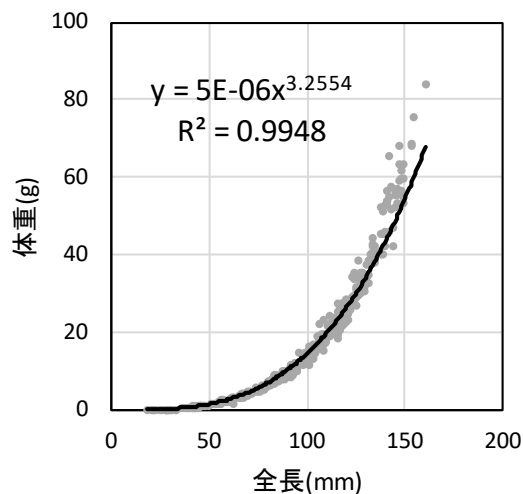


図 4.4.4 生産したブルーギルの全長と体重の関係

今回、いであ株式会社環境創造研究所において、ブルーギルの飼育、人為催熟、採卵、人工授精等を実施し、受精卵及び仔魚を得ることができた。仔魚については成魚まで飼育し、再び仔魚を得ることができており、基本的な生産システムは構築できたものと考えられた。ブルーギルの飼育・繁殖が水産研究・教育機構増養殖研究所といであ株式会社環境創造研究所の2カ所で可能となったことで、感染症による試験魚へい死等のリスクの分散が図られた。

初回の試験魚導入直後に多くの死亡がみられた。原因は確認できなかったが、輸送によるストレス等により弱った個体で何らかの疾病が発症、蔓延したものと考えられた。導入直後の薬浴、水槽間で飼

育器具を共有しない、器具類の洗浄及びアルコール消毒等を徹底した結果、その後疾病等による大量への死は発生しなかった。ブルーギルの飼育はさほど困難ではないものの、疾病予防には慎重な対応が必要であると考えられた。

ふ化仔魚の成長をみると、雌雄の判別はしていないが1年で全長100mm程度に成長しており（図4.4.3）、放流時期によっては放流個体が野生環境での交配に参加できる可能性が示された。一方で、個体によって成長に大きな差が生じることがわかり、体サイズ差に起因する攻撃行動やつつき行動¹³⁾等による死亡、成長阻害を抑制し、放流魚を効率的に生産するため体サイズによって選別し飼育することの必要性が示唆された。

また、人工授精により得られた個体は野生個体に比べて体色異常（主に頭部白斑）、体型異常（額部陥没）、吻部の奇形、腹鰭欠損、尾鰭鰭条欠損、眼球突出（ポップアイ）等がみられることが多い。餌料や添加する栄養素等を工夫することによって異常のない個体の生産手法の確立が必要と考えられた。

生産コストの試算では、本サブテーマと同じ条件（観察・清掃等の頻度、飼育密度、餌料、飼育水等）でふ化から1年間飼育し、1,000個体（研究開発方法で示した条件下での最大生産数として設定）を生産した場合、約5,700円/個体であり、主に毎日の飼育管理にかかる労務費の割合が高く、次いで上水道代であった（図4.4.5（左）、表4.4.4（左））。

本サブテーマと同じ条件でふ化から1年間飼育し、1,000個体を生産した場合のコストを基本に、ランニングコストの削減を検討した。コスト削減策として検討した事項は以下であり、一部は仔魚～成魚の飼育の中で検証した。

- ・飼育密度：本サブテーマでは成魚は約50個体/200Lで飼育したが、一部の個体について約100個体/200Lで飼育しところ、特に問題はなく、現状の2倍の密度でも飼育が可能であり、仔魚生産に十分な成長であった。
- ・餌料：本サブテーマでは、当初、人為催熟期間中に栄養価の高い高価な餌料を与えていたが、安価な餌料（通常時の餌料）のみでも問題なく人工授精による仔魚の生産が可能であった。
- ・人為催熟：催熟操作（水温、日長のコントロール）なしでも、hCGの投与のみで人工授精による仔魚の生産ができた。
- ・水槽数（飼育面積）：本サブテーマでブルーギルの飼育・生産に使用した施設はもともと毒性試験用の施設であり、様々な試験操作のための十分なスペースを考慮した水槽の配置となっている。ブルーギルの飼育・生産に特化した水槽等の配置を検討すれば、約2倍の水槽が設置可能（約2倍の飼育面積が確保可能）であると考えられた。
- ・その他：飼育・観察の簡素化・省力化、地下水の利用（本サブテーマでは水道水を使用）

コスト削減の検討の結果、現状と同じ施設規模（飼育に係る面積）で年間4,000個体が生産可能であり（ふ化から1年間飼育）、その生産コストは約2,200円/個体と試算された。内訳としては、労務費と調温に係る電力の比率が高かった（図4.4.5（右）、表4.4.4（右））。マグロ、ブリ類、マダイ等の海産魚類養殖業における原価構成では餌料費が最も高くなっており^{14), 15), 16)}、コストの構造が大きく異なっていた。これら海産魚類養殖業では種苗を購入し成魚まで育てる場合が多く、本研究のように仔魚生産から行う場合とは単純な比較は難しいが、実用化には商業ベースにある既存の養殖業や種苗生産を参考に、スケールメリットを活かした労務費の削減や、調温をしない屋外での生産を検討するなど、さらなるコスト削減が必要と考えられた。

また、ここで算出した金額は、放流後の生残の観点から放流時の体サイズをなるべく大きくすることと力点を置き、ふ化から1年間飼育する想定（年1回の生産）のものである。飼育期間を短くすれば、生産できる個体数（期間当たり、面積当たりとも）が大きくなり、1個体あたりの価格（単価）は低くできる。体サイズが小さい分、放流後の生残率は下がると考えられるが、一方で、年間の放流個体数が多くなれば、生残できる絶対数も多くなる可能性があり、その妥協点の検討が重要であると考えられ

た。

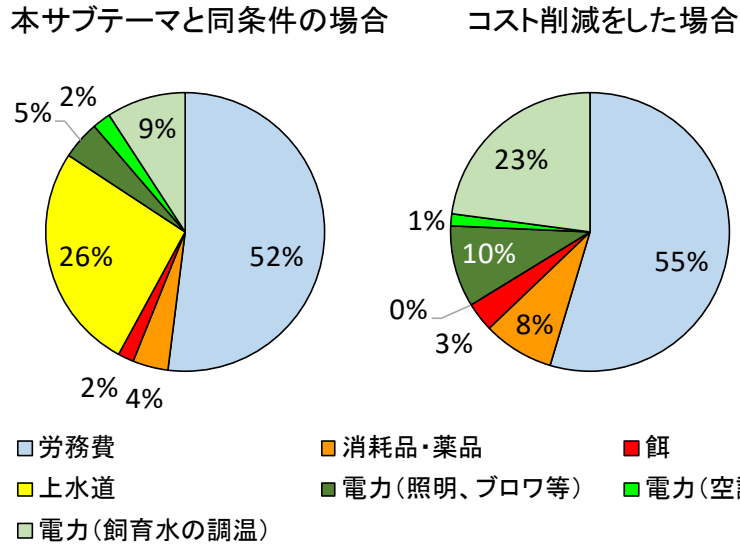


図 4. 4. 5 ブルーギルの生産コスト

表 4. 4. 4 ブルーギルの生産コストの内訳

	本サブテーマと同条件の場合(円/個体)	コスト削減をした場合(円/個体)
労務費	2,962	1,185
消耗品・薬品	234	179
餌	105	73
上水道	1,500	0
電力(照明、ブロワ等)	254	205
電力(空調)	120	30
電力(飼育水の調温)	523	497
合計	5,698	2,169

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

現時点でゲノム編集魚の放流及びそれに伴う合意形成の先行事例はなく、本研究により、理解醸成にあたっての問題点及びその解決に必要な課題等を検討することで、合意形成に向けた手続きの方向性を示すことができた。

また、ブルーギルの生産について経済的な評価あるいは生産コストを算出した知見は見当たらず、ここで示すことのできた原価構造及び生産コスト削減や効率的な飼育のための課題等は、将来、同様の研究、あるいはその実用化における大量生産技術開発の一助となると考えられる。

(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>

- ・合意形成に向けたステークホルダー一覧表を作成した。ここで作成したステークホルダー一覧表は、本研究の合意形成に限定されるものではなく、ステークホルダー洗い出しの方法、合意形成の優先順位、説明の時期・方法・内容（重点項目）等を検討するための普遍的なツールとして利用が期待できる。
- ・合意形成を進めるうえで地域社会と信頼関係を構築することは非常に重要であり、まずは意見の掘り起こしが必要と考え、そのためのコミュニケーションツールとして本研究に関するFAQを作成した。ここで作成したFAQは、各ステークホルダーの全ての関心事に答え、全ての懸念を払拭するためものではなく、また、内容も本研究に限ったものであるが、その考え方や方針は、今後類似した合意形成が必要となった場合に利用が期待できる。
- ・現在、ブルーギルの生産コストに関する知見はなく、ここで試算された生産コストは今後同様の研究において比較可能な経済的な指標となり得る。

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。

<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）

特に記載すべき事項はない。

(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) 道越祐一・松田裕之(2016) 遺伝子組換え生物に対する生態リスク評価の現状と課題. 日本生態学会誌 66, 309-318.
- 2) 水口亜樹・永井孝志・浅井元朗・池田浩明(2011) 農業に由来する生態リスクの統合的評価に向けて：農薬・遺伝子組換え作物・雑草防除の生態リスク評価から全体のつながりを意識する. 日本生態学会誌61, 133-153.
- 3) 平成31年2月8日環自野発第1902081号環境省自然環境局長通知
- 4) 蔵田伸雄(2006) 遺伝子組換え技術に関する「科学の外側」の問題. 化学と生物44(7), 481-485.

- 5) 奥宏海・栗田潤・山口寿哉・石川卓・正岡哲治・藤原篤志・岡本裕之・河村功一・古澤昭人・河村佳正・風間崇宏・南野洋孝・横山雅仁・小川隆一(2018) 遺伝子制圧法によるブルーギル駆除技術の開発とそれに対する意識調査. 第十三回外来魚情報交換会発表要旨, 29-30.
- 6) 石井哲也(2014) ゲノム編集技術と克服すべき重要課題. 化学と生物52(12), 836-840.
- 7) 片倉啓雄(2015) 研究者に必要な生産コストの知識. 生物工学93(11), 687-692.
- 8) 浜田百合・庄司裕子(2017) 合意形成プロセスの成功パターンの特徴分析に関する研究. 日本感性工学会論文誌16(1), 43-50.
- 9) 国土交通省国土技術政策総合研究所(2011) 低頻度メガリスク型の沿岸域災害に対する多様な効用を持つ対策の評価に関する研究. 国総研プロジェクト研究報告34, 133-140.
- 10) 片野修・小川拓・中村智幸・山本祥一郎(2015) 人工池においてブルーギルが2種の淡水魚の個体数に及ぼした長期的影響. 魚類学雑誌62(2), 169-175.
- 11) 横川浩治(1986) 香川県の湖沼におけるブルーギルの生態. 香川県水産試験場研究報告2, 47-74.
- 12) Spotte, S. (2007) Bluegills: Biology and Behavior. American Fisheries Society, Maryland, USA. 214pp.
- 13) 橋本博・林知宏・浜崎活幸・甲斐勲・外薗博人・中村章彦・岩崎隆志・照屋和久・浜田和久・虫明敬一(2014) カンパチ種苗生産における仔稚魚の体サイズ差と攻撃行動および共食いの関連. 水産増殖62, 259-271.
- 14) 小野征一郎・中原尚知(2009) 魚類養殖業の現状と課題. 水産増殖57(1), 149-164.
- 15) 小野征一郎(2010) 魚類養殖業—ブリ類およびマダイ—の経営分析. 近畿大学水産研究所報告12, 131-144.
- 16) 水産庁(2013) 平成25年度水産白書. 26-35.

III. 英文Abstract

Development of Verification Test Fish of a New Eradication Method, Gene-Induced Suppression for Alien Population (GSAP)

Principal Investigator: Hiroyuki OKAMOTO

Institution: Japan Fisheries Research and Education Agency (FRA)

422-1 Nakatsuhamaura, Minami-Ise, Mie 516-0193, JAPAN

Tel: +81-599-66-1830 / Fax: +81-599-66-1962

E-mail: hiokamot@affrc.go.jp

Cooperated by: Mie University, IDEA Consultants Inc.

[Abstract]

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

Our research group is developing the gene-induced suppression for alien population (GSAP) method to eliminate the invasive alien fish bluegill (*Lepomis macrochirus*). We are working on the development of a gene suppression method that releases males with sterilization genes whose functions are deficient in female-specific reproduction-related genes.

The strategy of GSAP involves reduction of reproductive population size by introducing sterilization genes, which are produced by knocking out the genes for germ cell maturation in the gonads (e.g., *foxl2* and *fshr*). The sterilization genes are supplied to natural populations by the continuous release of career fish.

At first, we have developed whole-genome information necessary to produce males with the sterilization genes, and have developed fundamental technologies for the basic breeding of bluegill and microinjection required for gene editing in bluegill. Next, we aimed to create gene-edited F_0 individuals as the founders of demonstration fish to acquire biological characteristic data of males carrying the sterilization genes. To inhibit the functions of *fshr*, *foxl2* and some candidate genes which are expressed in the female gonads and are important for sexual differentiation and maintenance of ovarian function, gene-edited F_0 individuals were produced using the CRISPR/Cas system. These F_0 edited individuals are currently being developed as parent fish for the creation of F_1 individuals.

For the mass production of sterilized fish lacking germ cell maturation ability, primordial germ cells (PGCs) or immature germ cells derived from the sterilized fish (donor) should be nursed in the ovaries of normal fish (recipients) by a surrogate broodstock production. In this work, as a preliminary study for the surrogate production of bluegill, we examined the transplantation of immature germ cells into the gonads of other *Lepomis* species.

The cytochrome b gene of bluegill (donor) was detected in the gonads of recipient fish at 1 year after transplantation: Recipients 1 and 2 transplanted at 7 and/or 9 days post-hatching (dph) showed positive signals in PCR, indicating that the donor cells survived at least 1 year in the recipient gonads. However, the rate of successful transplantation was less than 20%. Our results strongly suggest the potential for surrogate production of bluegill, but the methods for surrogate production require further improvement.