

水産庁委託事業

地球温暖化対策推進費のうち
地球温暖化による沿岸漁場環境への影響評価・適応技術開発委託事業

成果報告書

平成 26 年 3 月

「温暖化適応技術」共同研究機関

はじめに

「地球温暖化対策推進費のうち、地球温暖化による沿岸漁場環境への影響評価・適応技術開発委託事業」（略称：温暖化適応技術開発事業）（平成 21～25 年度）は、多くの成果を挙げ、無事終了いたしました。本研究に参画された各大学、県試験研究機関及び水産総合研究センター傘下の各研究所担当者の皆さまにお礼を申し上げるとともに、本事業の機会を与えて下さった水産庁増殖推進部研究指導課に感謝いたします。

本事業は、地球温暖化による水産業への影響が懸念されるなか、養殖業への影響を軽減させる目的で始まりました。水産総合研究センターは昨年、水産育種研究戦略を公表しましたが、それに先立ち、地球温暖化による海水温の上昇という環境変化に対し、育種研究による高水温耐性品種の作出、あるいは高水温耐性の指標となるマーカー等の開発を通じて養殖現場へ貢献しようとするものでした。

陸上養殖が主流であり、夏季高水温の影響を受けるヒラメ、河川水・湧水を利用した冷水性魚類を代表するニジマス、あるいは水温の低下時期の遅れから漁期の短縮が懸念されるアマノリを対象として事業を進めてきました。そして、ヒラメでは高水温耐性評価法の開発、評価法に基づいて選抜した個体と次世代の作出による遺伝性の確認、高水温に付随する低酸素耐性個体解析のための評価法の開発と解析家系の作出および QTL 解析による候補 DNA マーカーの開発、ニジマスでは冷水性魚類で高水温耐性個体を選抜する指標となるようなマーカーの開発、さらにアマノリでは自然界に存在する高水温耐性アマノリ類の特性評価や、実際に開発された高水温耐性アマノリ品種を用いた高水温時に特異的に発現するタンパク並びに高水温耐性マーカーとして有用な遺伝子等を明らかにしました。

本事業を推進した結果、特許申請にいたる成果や、高水温耐性個体作出に向けて育種素材となる候補の確保など、大きな成果を挙げつつあります。育種研究においては 5 年間という期間は短く、今後、これらの成果を生かしつつ、養殖現場に広められるような系統（品種）の作出に繋がることを念頭に、本事業の成果がさらに多くの研究・技術開発に広く資することを祈念いたします。

平成 26 年 3 月

独立行政法人 水産総合研究センター
増養殖研究所長 飯田貴次

目 次

1. ヒラメチーム課題別研究成果

- 1) 高温耐性ヒラメの評価法と探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
(増養殖研究所・日本海区水産研究所・大分県農林水産研究指導センター)
- 2) 高水温耐性を持つ天然ヒラメの探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
(日本海区水産研究所・増養殖研究所・大分県農林水産研究指導センター)
- 3) 低酸素耐性ヒラメの評価法と探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
(神奈川県水産技術センター)
- 4) ヒラメの高温耐性関連形質の評価と DNA マーカー等の探索・・・・・・・・・・・・ 19
(東京海洋大学)
- 5) ヒラメの高温耐性関連形質の評価と DNA マーカー等の探索・・・・・・・・・・・・ 22
(東京海洋大学・神奈川県水産技術センター)

2. ニジマスチーム課題別研究成果

- 1) 遺伝子マーカーの選別と高密度化および量的形質遺伝子座解析・・・・・・・・・・・・ 25
(東京大学)
- 2) ニジマス解析家系の作出および高温耐性の生物学的評価・・・・・・・・・・・・ 31
(宮崎県水産試験場)
- 3) ニジマスの高温影響を評価するバイオアッセイ系の開発・・・・・・・・・・・・ 37
(中央水産研究所)

3. アマノリチーム課題別研究成果

- 1) 南方系アマノリ類野生種等の高水温耐性に関する特性評価・・・・・・・・・・・・ 44
(西海区水産研究所)

- 2) アマノリ類の短期的高水温耐性に関与する遺伝子の探索と解析・・・・・・・・・・49
(中央水産研究所・千葉県水産総合研究センター)
- 3) アマノリ類の長期的高水温耐性及び適応に関与する遺伝子の探索・・・・・・・・・・55
(三重大学・三重県水産研究所)

1. ヒラメチーム課題別研究成果

- 1) 高温耐性ヒラメの評価法と探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4
(増養殖研究所・日本海区水産研究所・大分県農林水産研究指導センター)
- 2) 高水温耐性を持つ天然ヒラメの探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
(日本海区水産研究所・増養殖研究所・大分県農林水産研究指導センター)
- 3) 低酸素耐性ヒラメの評価法と探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
(神奈川県水産技術センター)
- 4) ヒラメの高温耐性関連形質の評価と DNA マーカー等の探索・・・・・・・・・・・・・19
(東京海洋大学)
- 5) ヒラメの高温耐性関連形質の評価とDNAマーカー等の探索・・・・・・・・・・・・・22
(東京海洋大学・神奈川県水産技術センター)

チーム名：ヒラメチーム

担当課題名：高温耐性ヒラメの評価法と探索

研究機関・担当者名：（独）水産総合研究センター増養殖研究所・名古屋博之（0972-32-2125、
hnagoya@affrc.go.jp）・岡本裕之・尾崎照遵・岡内正典、日本海区水産研究所・竹
内宏行・長副聡・高原英生・有元操、大分県農林水産研究指導センター・金澤健・
景平真明

研究期間：平成 21～25 年

ア 研究目的

ヒラメは主に陸上水槽によって養殖されている。海水温の上昇により、生産過程でいろいろな問題が起こり、対策が必要となることが考えられる。本課題では、ヒラメ養殖産業における地球温暖化による悪影響の回避策として、飼育水温上昇に耐性を持つヒラメの探索を行い、遺伝的形質評価法を開発することによって、高水温耐性のヒラメを選抜し、養殖生産の安定化に貢献することを目的とする。

イ 研究方法

高水温耐性のヒラメを作出するため高水温耐性評価法を開発し、家系間の違いや成長段階による耐性の違いを確認した後、日本各地から集めたヒラメを用いて高水温に対する耐性の違いを確認した。これらの中から、高水温に耐性のある個体を選抜し、成熟したものについて次世代を作出し、高水温耐性を調べ遺伝性について確認した。最後に高水温耐性と思われる親魚から事業規模で種苗の量産を行い、養殖試験を行った。

具体的な方法を以下に記述する。

1) 高水温耐性評価法の開発

① 60cm 水槽を用いて、ポンプで海水を循環しながら、投げ込み式ヒーター2 個を使用して 27℃から 32℃まで 1℃ずつ水温を設定した。この中にヒラメを 5 尾ずつ収容し、収容後 12 時間までの生存時間を調べた。

② 32℃まで飼育水温を上昇させる際の条件設定を決めるため、1 日に 1℃から 4℃水温を上昇させ生存時間を調べた。収容条件は①と同様に 60cm 水

槽に 10 尾のヒラメを収容し、ポンプで循環させながら、投げ込み式ヒーターで温度を設定した。実験期間中はエアレーションによる十分な曝気を行った。

③ 32℃と 33℃に上昇してからの生存時間を調べた。

2) 家系間、成長段階による高水温耐性調査

① 増養殖研究所で飼育していた 3 家系のヒラメを用いた。60cm 水槽を用いて、ポンプで海水を循環しながら、投げ込み式ヒーター2 個を使用して 22℃・4 日間、29℃・3 日間、32℃に上昇してからの死亡時間を 1 時間毎に集計した（短期間評価法）。実験期間中はエアレーションによる十分な曝気を行った。

② 増養殖研究所で飼育していた 1 家系を用いて、平均体長が 7.2±0.6cm、10.1±1.0cm、15.6±1.6cm および 23.7±2.3cm の個体をそれぞれ 19 から 21 尾を用いて、2) -①で用いた評価法で 32℃に上昇してからの死亡時間を 1 時間毎に集計した。実験期間中はエアレーションによる十分な曝気を行った。なお、実験開始時に飼育水温が 22℃を超えていた場合は、29℃・3 日間の前処理を行ってから 32℃に水温を上昇させた。

3) 6 カ所（九州 2 カ所、四国 1 カ所、本州 3 カ所）から集められたヒラメ種苗の高水温耐性調査

6 カ所から集めたヒラメ種苗は平均体長 10cm 以下の場合は、約 10cm になるまで増養殖研究所で飼育をしてから実験に供した。10cm を超えている場合は、研究所の水槽に収容後 2 週間ほど給餌をしながら飼育を行ってから実験に供した。1 時間毎に死亡数を集計し、12 時間経った段階で高水温

処理を終了し、原海水を注水した。

4) 選抜によって作出した個体から得られた次世代の高水温耐性評価試験

① H22 年度に愛媛県下で生産された種苗を用いて高水温耐性試験を行った結果、12 時間生存した 3 尾の個体の精子と日本海区水産研究所で飼育水温より 2、3℃上昇させた水槽で高成長を示したヒラメを産んだ雌親魚の卵を 1 対 1 で受精させた 3 組の家系を作出した。このうち、1 家系は疾病と思われる原因で 1 尾を残して死亡した。残りの 2 家系について体長 10cm 前後になるまで飼育を行い、実験に供した。

5) 短期間評価法と長期間評価法の比較

日本海区水産研究所で飼育している高水温期に成長の良かった子供を産んだ親魚（雌 7 尾、雄 7 尾）と大分県農林水産研究指導センターで高水温に強いと思われる親魚（雌 1 尾、雄 3 尾）をほぼ同時に受精させ、同一水槽で飼育をし、体長 10cm 前後になったときに、短期間評価法によって高水温耐性を評価した。これらの個体は親子判別手法によって親魚を特定した。また、同じ種苗を養殖現場で飼育し、夏季高水温前後でサンプリングし、親子判別手法によって親魚を特定した。両手法で特定した親魚を比較した。

6) 養殖場における種苗評価

前年度までの結果から高水温耐性ヒラメと推定された親魚（雌 3 尾、雄 3 尾）を用いて総当たり交配を行い、種苗を作出した。種苗を養殖業者に飼育して評価をおこなうとともに、体長 10cm 前後の時に短期間評価法を行い、高水温耐性について評価を行った。

ウ 研究結果

各実験に対する結果は以下の通りである。

1) 高水温耐性評価法の開発

① 27℃から 31℃に収容したヒラメは収容後 12 時間経った段階でもすべて生存した。32℃に収容したヒラメは 2 時間以内にすべて死亡した。別の家

系を用いた結果、31℃に収容したヒラメが 4 時間後に 1 尾、6 時間後に 2 尾、10 時間後に 1 尾死亡した。

② 1 日に 1℃上昇区では 7.5 日後に、1 日 2℃上昇区と 1 日 3℃上昇区では 5 日後に、1 日 4℃上昇区

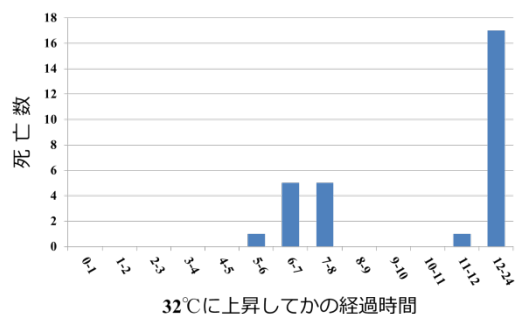


図 1. 32℃に収容したときの死亡数の変化

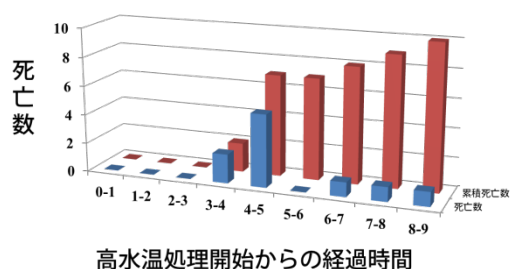


図 2. 33℃に収容したときの死亡数の変化

では 3 日後にすべての個体は死亡した。

③ 22℃・4 日間、29℃・3 日間の馴致期間を設けた後、32℃に飼育水温を上昇したときの死亡数の変化を図 1 に示す。半数以上の個体が 12 から 24 時間後に死亡した。これに対し、33℃に上昇させた場合にはすべての個体は 12 時間以内に死亡した（図 2）。

2) 家系間、成長段階による高水温耐性調査

① 家系間による高水温耐性の違いを図 3 に、成長段階による高水温耐性の違いを図 4 に示す。

図 3 で A 家系は 4～7 時間の間にすべて死亡したのに対し、B 家系では 5～9 時間、C 家系では 3～10 時間の間に死亡した。図 4 の成長に伴い高水温

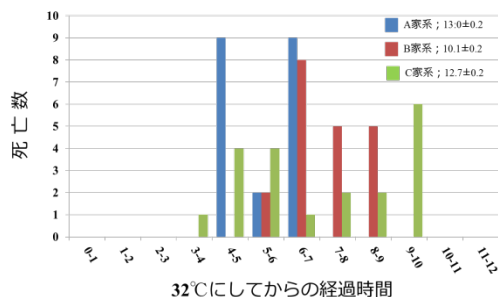


図 3. 家系の違いによる高水温耐性の変化

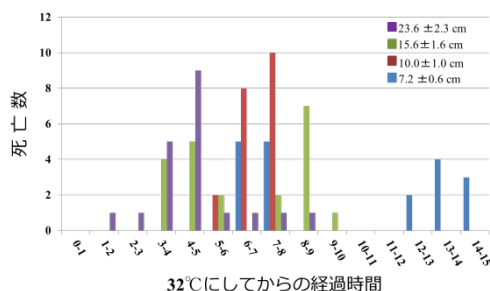


図 4. 成長に伴う高水温耐性の変化

耐性の変化では平均 7.2cm の個体では 12～15 時間まで生存した個体があったが、成長するに従い 32℃ に上昇してからの生存時間が短い傾向が認められた。

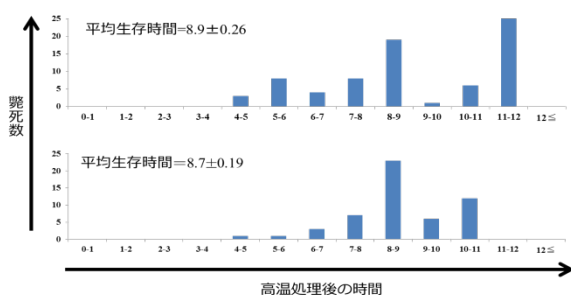


図 5. 高水温耐性選抜世代の 33℃ に上昇したときの死亡数の変化

3) 6 カ所から集めたヒラメを用いて高水温耐性試験を行った結果、それぞれの平均生存時間は 4.4±3.4 (青森)、5.9±4.0 (京都)、6.6±3.2 (三重)、

5.4±2.6 (愛媛)、7.4±3.2 (大分)、6.5±4.9 (鹿児島) となった。一番平均生存時間の短い青森産ヒラメに対して t 検定を行った結果、5% の危険率ですべて有意差があった。

4) 選抜によって作出した個体から次世代を作出し、短期間評価法によって高水温耐性を評価した結果、評価のできた 2 家系の結果を図 5 に示す。

平均生存時間はそれぞれ 8.9±0.26 と 8.7±0.19 となり、前年度、日本各地から集められて評価された集団より高い平均生存時間となり、選抜効果が認められた。

5) 短期間評価法と長期間評価法の比較

長期間評価法（自然水温より数度加温した水槽でヒラメを飼育し、成長の良い個体を産んだ親を親子判別法によって特定する評価法）で選んだ親魚から得られた子供を短期間評価法で評価をし、33℃ に上昇してから 5 時間以内、5～6 時間、6～7 時間及び 7～12 時間に死んだ個体の親を特定した結果を表 1. に示す。長期間評価法で高水温に強いと推定された m9 や f4 の子供は短期間評価法でも比較的生存時間が長かった個体の割合が高かった例もあったが、強いと推定された f8 の子供は短期間評価法では水温上昇後 7 時間以内にほとんど死亡した例もあった。

表 1. 短期間評価法で死亡した個体の親魚の割合

♂親	n	処理後の時間			
		～5	5～6	6～7	7～12
m1	9	22%	11%	11%	56%
m2	8	38%	25%	13%	25%
m3	33	30%	30%	18%	21%
m4	15	20%	20%	40%	20%
m5	2				
m6	2				
m7	2				
m8	10	20%	20%	30%	30%
m9	14	14%	21%	21%	43%
m10	0				
m11	2				
♀親	n	～5	5～6	6～7	7～12
f1	1				
f2	0				
f3	0				
f4	24	8%	17%	29%	46%
f5	15	20%	40%	7%	33%
f6	10	30%	20%	10%	40%
f7	12	33%	17%	17%	33%
f8	34	38%	26%	29%	6%
f9	1				

注；黒字太字：長期間評価法で高水温耐性と推定された親魚

6) 養殖場における種苗評価

養殖業者に種苗を渡して飼育してもらうため、長日・加温処理によって平成 25 年 3 月 2 日に長期間評価法等によって選ばれた雌 3 尾と短期間評価法によって選抜された雄 3 尾の総当たり交配によって種苗を作出した。これらの種苗を大分県内の 5 経営体に飼育してもらった結果、生存率は 70.1～96.2%であり、日間成長は 1.06～1.26mm であった。これらの種苗を体長 6.8±0.1 と 9.2±0.2cm の時、短期間評価法で評価した結果、平均生存時間は 6.8±0.1 時間であった。

エ 考 察

ヒラメの適水温は 10～25℃にあると考えられ、21℃付近で最も成長が良く、25℃を超えると死亡率が高くなる^{1, 2, 3)}。今回の結果でも 22.5～30℃までの水温では死亡魚は無く、32℃ですべての個体が死亡した。27～32℃の範囲で徐々に水温を上げた試験では 32℃で 24 時間以内にすべての個体が死亡した。そこで、22℃・4 日間、29℃・3 日間の高水温馴致機関を設けた後、32℃に水温を上昇してからの死亡時間を調べる評価法を開発したが、この試験では 32℃に上昇してから死亡する個体の多くが 12～24 時間以内に死亡した。一方、33℃に上昇させた場合には、多くの場合、すべての個体は 12 時間以内で死亡した。高水温耐性形質は量的形質であり、12 時間後や 24 時間後の死亡数を確認するだけでは解析ができず、死亡した時間を把握しなければならないことから 12 時間でほぼ全数が死亡する 33℃での死亡時間を評価することにした。

増養殖研究所で飼育していた 3 家系を用いて前述の短期間評価法で評価した結果、比較的早く全滅する家系があった(図 3)。また、成長に伴い高水温に弱くなる傾向も認められた(図 4)。

国内の 6 カ所から集められたヒラメ種苗を短期間評価法で評価した結果、北日本から集められた種苗が最も弱く、調べた集団の中で 33℃に水温を

上昇してからの死亡時間が最も早く 1～2 時間の間に 19 尾が死亡し、10 時間以内にすべての個体が死亡した。死亡平均時間は 4.4±3.4 時間となり、調査した集団の中で最も短い平均生存時間となった。これに対し、西日本から集められた集団は 2、3 時間後から死亡する個体が現れるものの 10 時間を超えても生存する個体があった。また、33℃に水温を上昇してからの平均生存時間も 5.9±4.0～7.4±3.2 時間となった。青森の種苗に対して t 検定を行った結果、危険率 5%で平均生存時間に有意差を認めた。

次世代を残すため、最終的に愛媛の種苗の中から 33℃に上昇させてから 12 時間生存した個体 5 尾が得られた。しかし、このうちの 2 尾はその後、死亡したが、3 尾の成熟個体が得られた。これらの 3 尾はすべて雄であった。

33℃で 12 時間生存した個体から得られた雄の精子と日本海区水産研究所で飼育している高水温耐性個体と思われる雌から得られた卵を人工授精して 3 組の交配を行い、うち 2 組を使って、高水温に対する評価を行った結果、それぞれの平均生存時間は 8.9±0.26 と 8.7±0.19 時間となり、これまでで一番長い平均生存時間を示した。

同じ種苗を短期間評価法と長期間評価法を使って調べた結果、長期間評価法で高水温耐性候補と推定された親魚から得られた子供が短期間評価法で比較的早く死んだ例も認められた。これは長期間評価法が高水温での子供の成長と親子判別によって推定したもので、子供の高成長は高水温に対する耐性という要因のみで、成長が良かったわけではなく、その他の要因も含まれていた可能性もあることを示唆しているものと思われる。

同様に短期間評価法で選んだ雄と長期間評価法で選んだ雌を交配して、事業規模で種苗を生産し、養殖業者に渡して養殖試験をした結果、疾病が発生したと思われた養殖場では生存率が 70%近くまで落ち、疾病が発生しなかったと思われる養殖場では 96%生存した。本事業では高水温耐性という

形質に的を絞って交配を行った。その結果、耐病性等の形質を考慮することは無かった。したがって、疾病が発生した養殖場では感染して生存率が下がり、疾病が発生せず、高水温という環境だけでは生存率を下げることは無く、96%の生存率を示した、と考えられる。

オ 今後の課題

5 年間と限られた期間で評価法の開発から始めた研究では選抜 2 世代目までを作出するまでしか世代交代ができなかった。2 世代目を評価した結果、確実に高水温耐性が増していると思われた。しかし、年度を変えた種苗では平均生存時間は既存の集団と比べると高いと思われるが、養殖場での成績は良くなかった。これは今回の選抜が高水温耐性だけを指標にして選抜をしていて、成長や耐病性に対しては着目していないので、疾病が発生した場合には今回のように 70% 近くまで生存率が下がることもあり得る問題であった。今後は高水温耐性候補親魚を増やして、元集団の数を増やすとともに、これらの中で交配を行い、高水温耐性だけをホモ化して、残りはなるべく多様性を保つような交配をしていく必要がある。そのためには DNA マーカー等を開発し、それを指標にしていくのが効率的である。また、耐病性等を持つ個体と交配して、耐病性形質も付与して利用する雑種強勢のような利用方法も考えていく必要がある。

カ 要 約

ヒラメの高水温耐性個体を作出するため評価法を開発した。22℃・4 日間、29℃・3 日間の高水温馴致をした後、33℃に水温を上昇させ、生存時間を測定する方法を開発した。最初に家系間と異なる成長段階で高水温耐性に違いがあるか検討した。その結果、家系間及び成長段階による違いが示唆された。次に国内の 6 カ所から集められた集団を

評価した結果、北日本のヒラメが高水温に弱く、西日本のヒラメが強いことが判明した。これらの集団から 33℃で 12 時間生存したヒラメを選抜した。一方、夏季高水温期に成長の良かった子供を産んだ親魚を親子判別手法によって特定し、高水温親魚候補とした。これらの親魚を交配して作出した種苗を評価した結果、平均生存時間が 8.9 ± 0.26 と 8.7 ± 0.19 時間の種苗が得られ、選抜効果があることが実証された。翌年、同様に種苗を量産し、養殖試験を行った結果、約 70~96% の生存率が得られた。生存率の低かった養殖場では疾病が発生したと思われ、高水温耐性のみで選抜した種苗が実際の養殖場で、必ずしも夏季高水温期に高い生存率を残すという結果を得られなかった。今後、高水温耐性形質に耐病性形質を付与するなどして、高水温に耐性のある個体作出を進めていく必要があると思われた。

キ 文 献

- 1) 原田輝雄 (1980) . ヒラメ養殖の現状と問題点. 養殖. 17 (4) : 48-53.
- 2) 原田輝雄 (1981) . ヒラメ養殖入門 (下) . 養殖. 18 (4) : 44-48.
- 3) 森実康男 (1984) . ヒラメの養殖に関する基礎的研究-II. 水産増殖. 32 (3) : 127-131.

チーム名：ヒラメチーム

担当課題名：高温耐性ヒラメを持つ天然ヒラメの探索

研究機関・担当者名：（独）水産総合研究センター日本海区水産研究所・竹内宏行（0772-25-1306 takechan@affrc.go.jp）・町田雅春・長副 聡・中川 亨・升間主計、増養殖研究所・名古屋博之・岡内正典・原 素之・尾崎照遵・山田敏之、大分県農林水産研究指導センター・景平真明

研究期間：平成 21～23 年

ア 研究目的

地球的規模での温暖化に伴い海水温の上昇が顕著になると予測されており、海面養殖業において重要な位置を占めているヒラメ養殖業でも、疾病の増加や代謝異常による死亡など、生産性の低下が懸念されている。このような状況のなか、今後の対応策として、温暖化による海水温の上昇に対して耐性を持つ、すなわち、高い飼育水温でも成長や生残に優れた生物特性を持つヒラメ養殖家系の開発・確保が期待されている。そこで、遺伝的多様性が豊富な素材として、種苗生産施設で飼育されている多数の天然ヒラメ親魚を対象に、遺伝的形質としての高温耐性を評価する方法の検討、ならびにそれらの特性を持つ家系を探索することを目的として、養殖生産の安定化に貢献することを目指す。

イ 研究方法

【試験 1】150 日令のヒラメ種苗（放流用に用いる家系化されていない魚）を、約 100 尾ずつ、加温区と自然水温区を設定し、40 日間の飼育を行い、試験開始時と終了時における親別の成長・生残を調べた（親の判別は適切な DNA マーカーを使用）。3 歳魚を用いて、加温区と自然水温区に 40 尾ずつ収容し、同様な調査を行った。

【試験 2】既報の知見（ヒラメの飼育限界水温は 27～28℃）に基づき、当歳魚（全長 5～20cm、染色体操作によりある程度家系化した魚）を用い、以下の手順で臨界水温を詳細に求めた。22.5～32.5℃の範囲で 2.5℃ずつ温度を変え、死亡魚数を求めた。22～32℃の範囲で、1 日に 1、2、3、4℃

ずつ徐々に飼育水温を上げ、死亡魚数を求めた。27～32℃の範囲で 1℃ずつ温度を変え、死亡魚数を求めた。ヒラメ臨界水温と推察される「32℃」を、高水温馴致効果を加味して調査した。

♂が異なる 3 家系を用いて、上述の各試験を行い、31～32℃での死亡魚数に家系間差異があるかを調べた。

【試験 3】天然ヒラメ♂13 尾と♀10 尾を人工授精し得られた受精卵を同一水槽に収容し、150 日間飼育した。得られた当歳魚種苗を 180 尾ずつの 2 つの水温区（自然水温区：平均水温 24.5℃、加温区：28.0℃）に分けて、40 日間の飼育実験を行い、その間の成長と生残を調べた。

2 つの試験区の飼育開始時および終了時に鰭の一部を採集した。その中から、それぞれ 96 尾について、DNA マーカーによる親子判別を行い、親別の種苗の体重の成長率を調べた。

1 歳、2 歳および 3 歳魚を用いて、それぞれについて自然水温区と加温区を設け、60 日間飼育した。供試尾数はそれぞれ 61～82 尾とし、飼育開始時に全個体に PIT タグを装着して個体識別した。飼育開始時に鰭を採集し、親別の成長と生残を調べた。なお、2、3 歳魚は①とは異なる親魚群から生産された種苗を使用した。

【試験 4】高温耐性家系候補を含む天然ヒラメ♂11 尾と♀9 尾から人工授精によって採卵された受精卵を大分県水産試験場の同一水槽に収容し、養殖用種苗を生産した。得られた 10cm サイズの当歳魚種苗を養殖場に持ち込み、事業規模の養殖試験を行った。7 月中旬に 36 m²の養殖池に 1,500 尾の種苗を収容し、10 月まで選別を行わず養殖試

験を行い、その間の成長を調べた。

養殖試験開始時と 10 月に、それぞれ 200 尾について体サイズの測定と鰭の一部の採集を行った。DNA マーカーによる親子判別を行い、親別の種苗の成長を調べた。

21 年度に生産された高温耐性家系候補(F1)を引き続き飼育し、親魚候補として養成した。

ウ 研究結果

【試験 1】生残率では、加温区と自然水温区に差異は見られなかった。加温飼育により、♂親の違いにより成長差が大きく異なる傾向が見られた。具体的事例としては、♂親を T11 とする種苗は加温開始時および終了時ともに成長が良好であったこと、♂親を T12、T16 とする種苗は加温飼育により成長が劣ったことなどであった。♀親の違いによる種苗の成長では、加温飼育の影響は出なかった。

【試験 2】22.5～30.0℃までの水温では死亡魚はなく、32.5℃ではすべての魚が死亡した。この結果に家系間の差異はなかった。つまり、既報の知見は曖昧で、信頼性に欠けることが明らかになった。

徐々に昇温を行った飼育試験で、臨界水温は「32℃」であることが推察できた。27～32℃の範囲で 1℃ずつ飼育水温を変えた試験で、31℃区では 1～3 日の間に死亡が起こり、32℃区では 24 時間以内に全滅することが明らかになった。32℃での飼育を行う前に、22℃で 2～4 日間、29～30℃で 4 日間の馴致を行った場合、臨界水温での生存時間が延長することがわかった。

3 家系を用いて飼育試験を行い、【試験 1】と同様に♂親が異なる条件で高水温耐性に家系間の差異があることが分かった。

【試験 3】当歳魚の 2 つの水温区における飼育開始時の平均全長、平均体重はともに 163mm、45g であった。しかし、40 日間の飼育で加温区の成長は 196mm、79g と、対照とした自然水温区の 206mm、

94g と比べ劣っていた。生残率では、両者とも 97% と差がなかった。

当歳魚の自然水温区と加温区の飼育開始および終了時の親子判別率は 88～96%であった。2 つの区とも雌雄すべての親からの種苗が検出されたが、親別の種苗の個体数には偏りがあった。5 個体以上の種苗の再生産に関与した親についてのみ成長率を比較した。

当歳魚の飼育試験では、試験後すべて成長していたが、自然水温区に比べて加温区ではほとんどの親で成長率が低くなった。

1 歳魚加温区で飼育 36 日目に調温装置の故障により水温が一時的に 32℃以上にまで上昇したことで全滅したため、1 歳魚についてはその時点で比較した。1 歳魚、2 歳魚および 3 歳魚の飼育試験では、自然水温区では体重が増加した群もみられたが、加温区ではすべて体重が減少した。しかし、減少する度合いは親によって異なり、親魚によって高温耐性に差があることがうかがえた(図 2)。

【試験 4】7/12 および高水温期終了後の 10/25 に測定と鰭採集を行った。生残率は 76.9%で、10/25 における平均全長は 220(163～268)mm であった。

7/12 の 155 尾および 10/25 の 167 尾について親子判別を行い、各親別の組成を求め、成長の指標として全長を比較した(表 1、2)。親子判別率は 98%であった。各親別の組成比は均等ではなく、雄では 7 月が 1～30%、10 月が 1～22%と大きくばらついていた。雌でも同様で前者が 0～39%、後者が 0～38%であった。

高温耐性家系候補(F1)については全個体に PIT タグを装着して個体識別して飼育した。24 年春で満 3 歳となり、親魚候補として成熟養成する。現在 130 尾養成中である。

エ 考察

【試験 1】の結果から、♂親の違いにより、加温時における種苗の成長差が生じた可能性は高く、家系間に差があると推察できた。

加温区は全長が約 1mm 減少していたが、加温により死亡が起こり、大きな個体が死亡した可能性があり、本年度の試験では加温による家系間の差異を考察するには至らなかった。

【試験 2】の結果から、高水温耐性を客観的に評価する方法として次の手法が考えられた。当歳魚を 22℃で約 4 日間馴致飼育した後、29～30℃で約 4 日間馴致飼育し、最終的に 32℃で個別飼育により生存する個体数を求める。この 3 段階を異なる家系間で比較することにより、「高水温耐性家系」を作出できる可能性が高いと考えられた。

【試験 3】の結果から、当歳魚では、成長率の落ちる度合いは親によってばらつきがあり、雄の 2 尾(Jm1、3)、雌の 2 尾(Jf1、5)については、他の親に比べて高水温下でも比較的良好な成長を示し、高温耐性候補である可能性があると考えられた(図 1)。1 歳を越えた魚については、加温区は成長せず、逆に体重は減少する結果となった。このことから、1 歳魚以上の評価については、高水温環境下でも体重を維持できることを評価する必要があると考えられた。

高水温飼育における成長率を比較することによって高温耐性を持った家系候補を見付けられる可能性が示唆された。

【試験 4】の結果から、雄では 7 月は m1、m2、m11 が、越夏後の 10 月では m1、m9 の成長が平均よりも優れていた(図 3)。m9 は短期間の高温耐性評価試験においても生残成績の良かった親であり、このことは養殖現場でも m9 の性能が実証されたことを示している。また、m1 については 22 年度の加温飼育においても比較的良好な成長を示しており、高温耐性候補である可能性が高まった。雌では f8 の成長が良い傾向がみられた(図 4)。しかしいずれも有意な差は認められなかった。

オ 今後の課題

実用的な高温耐性ヒラメ家系を確保するために

は、家系ごとの成長・生残等の生産性を実際の養殖業で行われているような出荷サイズにおいて検証する必要がある。そのため、継続して事業的飼育を行い、出荷サイズでの成長と親別の成長率を調査する。

カ 要 約

150 日令のヒラメ種苗を加温区と自然水温区を設定し、40 日間の飼育を行い、親別の成長・生残を調べた結果、♂親の違いにより、加温時における種苗の成長差が生じた可能性は高く、家系間に差があると推察できた。翌年同様の試験を行った結果、雄 2 尾雌 2 尾について高温耐性候補である可能性があると考えられた。高水温飼育における成長率を比較することによって高温耐性を持った家系候補を見付けられる可能性が示唆された。

当歳魚を用いて臨界水温を詳細に求めたところ、臨界水温は「32℃」であることが推察できた。高水温耐性を客観的に評価する方法として、2 段階の水温で馴致飼育し、最終的に 32℃で個別飼育により生存する個体数を求める手法が考えられた。この 3 段階を異なる家系間で比較することにより、高水温耐性家系を作出できる可能性が高いと考えられた。

当歳魚種苗を用いて事業規模の養殖試験を行い、親別の種苗の成長を調べた結果、平均より成長の優れた親が認められた。短期間の高温耐性評価試験においても生残成績の良かった親も見付かり、このことは養殖現場でもその性能が実証されたことを示している。また、前年度の加温飼育においても比較的良好な成長を示した親については、高温耐性候補である可能性が高まった。

キ 文献

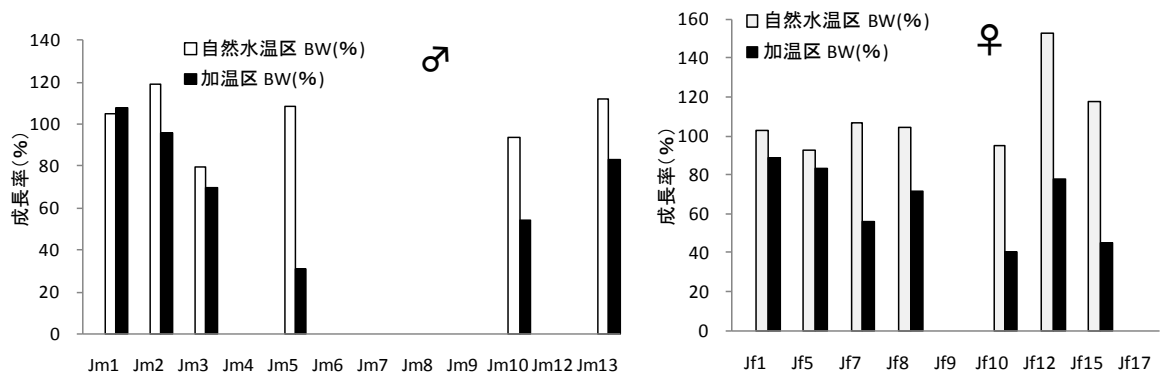


図1 当歳種苗の自然水温区と加温区における飼育開始と終了時の親別の体重の成長率

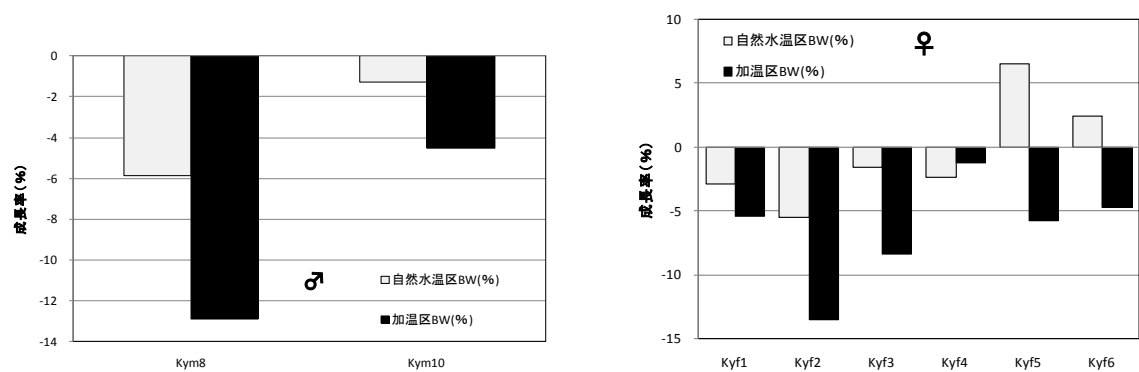


図2 3歳魚の自然水温区と加温区における飼育開始と終了時の親別の体重の成長率

表1 雄別の全長と組成

	7/12			10/25		
	n	ave.TL (mm)	組成	n	ave.TL (mm)	組成
m1	17	99.1	11%	26	223	16%
m2	15	98.1	10%	17	220	10%
m3	47	92	30%	37	218	22%
m4	22	91	14%	21	221	13%
m5	3		2%	1		1%
m6	4		3%	5	215	3%
m7	4		3%	4		2%
m8	11	89.3	7%	12	220	7%
m9	18	95.2	12%	26	224	16%
m10	1		1%	4		2%
m11	7	97.7	5%	9	212	5%
unknown	6		4%	5		3%
全数	155	93.8	100%	167	220	100%

表2 雌別の全長と組成

	7/12			10/25		
	n	ave.TL (mm)	組成	n	ave.TL (mm)	組成
f1	2		1%	0		0%
f2	1		1%	1		1%
f3	0		0%	3		2%
f4	36	92.1	23%	38	213	23%
f5	18	93.9	12%	13	214	8%
f6	14	89.9	9%	19	217	11%
f7	15	93.1	10%	23	220	14%
f8	61	95.7	39%	63	226	38%
f9	2		1%	2		1%
unknown	6		4%	5		3%
全数	155	93.8	100%	167	220	100%

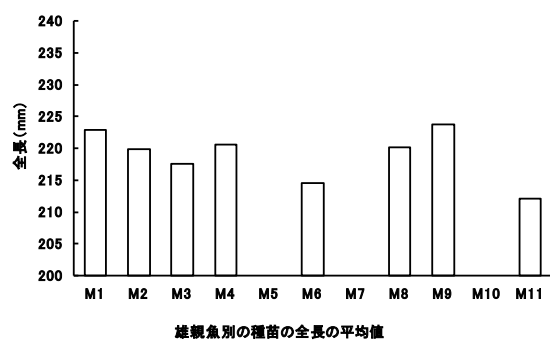


図 3 雄親魚別の種苗の全長

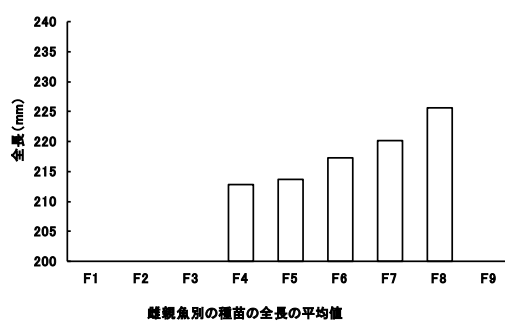


図 4 雌親魚別の種苗の全長

チーム名：ヒラメチーム

担当課題名：低酸素耐性ヒラメの評価法と探索

研究機関・担当者名：神奈川県水産技術センター栽培推進部・長谷川理

(電話番号 046-882-2314、 e-mail hasegawa.fav1@pref.kanagawa.jp)

研究期間：平成 21～23 年

ア 研究目的

近年、温暖化の影響により海水温度が上昇し、ヒラメなどの養殖業においては、夏季に飼育水温が著しく上昇するとともに、これら飼育環境の悪化に起因する斃死が多発している。このため、温暖化への適応対策として、高水温下でも生残率の高い系統魚を開発することが、斃死を軽減させるための有効な対策のひとつと考えられる。神奈川県で継代してきたヒラメ系統魚の中には、高水温期の低酸素状況下において、酸欠による斃死状況が系統間で異なっていることが知られている。

そこで、本課題においては各系統の低酸素に対する生物特性を把握するため、系統間の低酸素に対する耐性の相違を詳細に調査する。また、

低酸素耐性を選抜育種するための DNA マーカーを量的形質解析 (QTL 解析) により、開発するため、低酸素に対する耐性の強弱を数値化するための評価方法を開発する。

イ 研究方法

ア) 低酸素と水温 (25℃、28℃、30℃、32℃) の関係について

循環濾過機、エアレーション及び投げ込み式ヒーターを設置した 4 つのポリカーボネート水槽(容量100ℓ)に60ℓの海水を注水し、ふ化後約7ヶ月の稚魚を30尾ずつ収容した。それぞれの試験区の水温を25℃、28℃、30℃、32℃まで、供試魚の様子を観察しながら、一週間ほどかけて昇温し、各水温にて2日間馴致した後、循環濾過機およびエアレーションを停止した。その後、30分ごとに溶存酸素量と斃死魚数を確認し、水温と低酸素との関係を調べた。

イ) 系統間における低酸素特性の比較

・B系統（低酸素非耐性系統）とC系統（低酸素耐性系統）

試験区としては、循環濾過機、エアレーション及び投げ込み式ヒーターを設置したポリカーボネート水槽(100ℓ)に80ℓの海水を注水した試験区を設定した。これにB系統（17尾）及びC系統（15尾）の各系統魚を混合して収容し、25℃にて2日間馴致後に、循環濾過機及びエアレーションを停止し、止水状態とした後、30分毎に溶存酸素量と各系統の斃死魚を確認し、系統間の低酸素に対する生物特性を比較した。なお、供試魚にはイラストマータグを施し、外見から系統判別を行った。

・低酸素非耐性系統、低酸素耐性系統及び天然系との比較

上記試験と同様の水槽に 80ℓの海水を注水し、B系統（低酸素非耐性系統）28尾、C系統（低酸素耐性系統）34尾及び天然系魚（天然魚間の交配により作出した F1 魚）33尾を混合して収容し、25℃で一週間の馴致飼育を行った後に、水槽の循環とエアレーションを停止し、水槽を止水状態後に、30分ごとに溶存酸素量と供試魚の状況を確認し、最初に斃死魚が観察された時点からは、15分ごとに溶存酸素量と系統ごとの斃死魚数を確認し、系統間及び天然系との低酸素特性を比較した。

ウ) 低酸素耐性系統と低酸素非耐性系統との交配系統 (CB系統) と天然系との比較

・低酸素耐性系統と低酸素非耐性系統との交配系統 (CB 系統)

循環濾過機、エアレーション及び投げ込み式ヒーターを設置したポリカーボネート水槽(200ℓ)に160ℓの海水を注水した試験区を設定した。この試験区に B 系統（低酸素非耐性系統）、C 系統（低酸素耐性系統）及び両系統間の交配により作出し

た F1 魚 (CB 系統) 各 30 尾ずつを混合し、25℃ で一週間馴致飼育を行った。その後、水槽の循環とエアレーションを停止し、止水状態とした後、30 分ごとに各系統の斃死魚数と溶存酸素量を把握した。

全個体が斃死した系統が確認された時点で、試験を中止し、再び、水槽の循環とエアレーションを再開した。

(以下:前期試験)

その後、終了時点で生残した低酸素耐過魚 (生残魚) の体力を回復させるために、一週間 25℃ にて飼育し、再び、同水槽に天然系魚を加えて、前期試験と同様の低酸素耐性試験を行い、前期試験の生残魚と天然系魚との低酸素耐性を比較した。

(以下:後期試験)

エ) QTL 解析のための試験条件の検討

低酸素耐性形質に関して、QTL 解析を実施するためには、戻し交配魚の低酸素の耐性に対する強弱を個体ごとに数値化して把握することが必要である。そこで、ポリカーボネート水槽 (容量 1000 ℓ) に、500ℓ の海水を注水し、止水状態とした試験区に、養殖用として市販されている通常種苗 200 尾 (平均全長 10.9 cm) を搬入し、斃死に至るまでの時間をどの程度まで細分化して、把握することが出来るか検討した。

オ) QTL 解析家系の作出

♀F1 (♀低酸素耐性×♂低酸素非耐性) ×♂ (低酸素非耐性) 間において交配し、QTL 解析家系を作出する(図 1)。

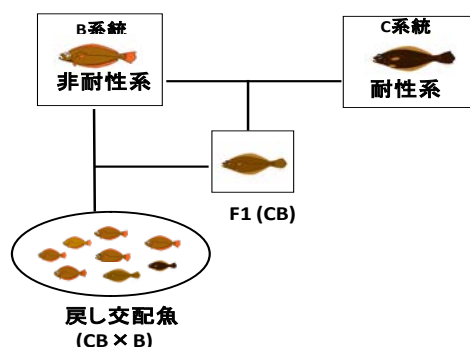


図 1 QTL 解析のための戻し交配家系

ウ 研究結果

ア) 低酸素と水温 (25℃、28℃、30℃、32℃)

との関係について

25℃、28℃、30℃の 3 試験区においては試験開始後 12 時間後にも、生残個体が存在し、終了時点の溶存酸素量は各試験区とも 2.0mg/l 前後であった。一方、32℃の試験区においては試験開始後 4 時間ですべての供試魚が斃死し、試験を終了した。終了時における溶存酸素量は 2.2mg/l であった。32℃における斃死の主要因は溶存酸素量よりも高水温が影響して、斃死に至ったことが推定された。しかし、30℃試験区では、試験終了時には生残した個体があったものの、その後、十分な溶存酸素下で飼育しても、これらは試験後、一週間以内に斃死した。このため、低酸素形質を詳細に調査するためには、28～25℃の水温帯において低酸素耐性試験を実施することが、適当と考えられた。

イ) 系統間における低酸素特性の比較

・B 系統 (低酸素非耐性系統) と C 系統 (低酸素耐性系統)

試験開始 2 時間後 (DO 3.2mg/ℓ) から B 系統の供試魚で斃死が発生し、3 時間後には、累積死亡率は 76.5% となり、試験開始 8.5 時間後 (DO 1.1mg/ℓ) には B 系統魚は、すべて斃死した。一方、C 系統は、試験開始 9 時間後 (1.1mg/ℓ) に、はじめて斃死魚が確認された。試験開始 10 時間後に溶存酸素量が平衡状態となったため、本試験を終了した。

(図 2)

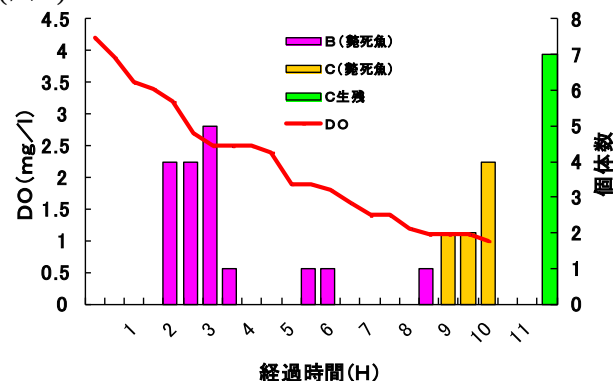


図 2 低酸素耐性(C 系統)と非低酸素耐性系統(B 系統)の低酸素に対する耐性の相違

・低酸素非耐性系統、低酸素耐性系統と天然系との比較

試験開始 2.25 時間後(DO 1.4mg/l)に B 系統及び天然系で斃死魚が確認された。3 時間後(DO 1.3mg/l)には、B 系統魚は 93.3%が斃死し、天然系においても、累積死亡率が 51.5%に達した。一方、C 系統においては、試験開始 2.75 時間後から斃死魚が出現し、3 時間後の累積死亡率は、29.4%であった。その後、溶存酸素量は平衡状態となり試験開始 3.75 時間後に、循環濾過とエアレーションを再開した。最終的な生残率は、B 系統 6.7%、C 系統 70.5%、天然系 48.5%であった。(図 3)

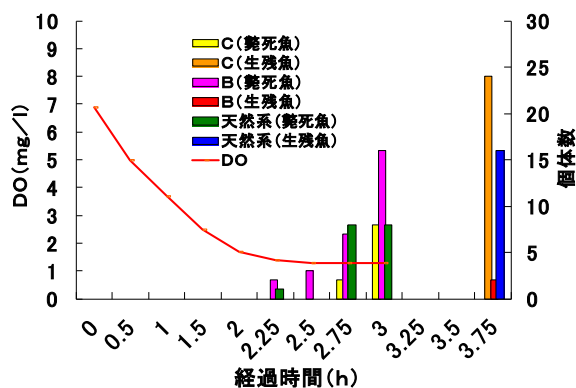


図 3 低酸素耐性(C 系統)、非低酸素耐性系統(B 系統)と天然系の低酸素に対する耐性の相違

ウ) 低酸素耐性系統、低酸素非耐性系統、両系統の交配系統 (CB系統) 及び天然系との比較 前期試験

試験開始 4.5 時間後(DO 1.3mg/l)に B 系統魚で斃死が確認され、5.75 時間後(1.1mg/l)には B 系統の供試魚はすべて斃死した。一方、C 系統、CB 系統では、B 系統がすべて死亡した時点において、両系統とも斃死したのは 1 検体のみであった(図 4)。

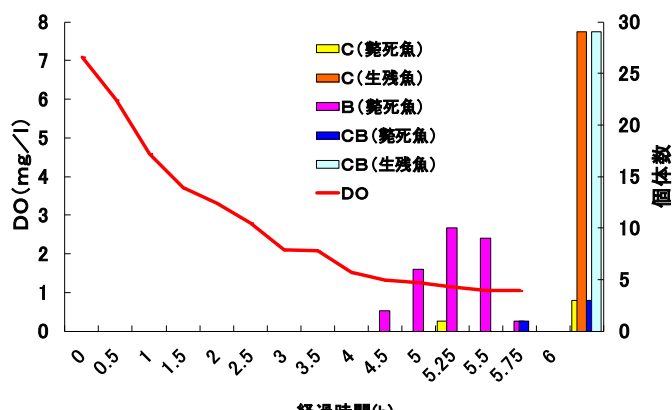


図4 低酸素耐性系統、低酸素非耐性系統および両系統の交配系統 (CB系統) の比較 (前期試験)

後期試験

前期試験終了後の馴致期間中に CB 系統で 1 検体が斃死した。その結果、後期試験においては、C 系統 29 尾、CB 系統 28 尾と新たに天然系魚 33 尾を加えて、前期試験と同様に低酸素に対する特性を比較したところ、試験開始 5 時間後(DO 1.0mg/l)に斃死魚が出現し、5.75 時間後(DO 1.1mg/l)には、天然魚の累積死亡率が 51.5%となり、溶存酸素量も平衡状態を示したために、開始 6 時間後に後期試験を終了した。終了時における各系統の生残率は C 系統 100%、CB 系統 96.4%、天然系 48.5%であった(図 5)。

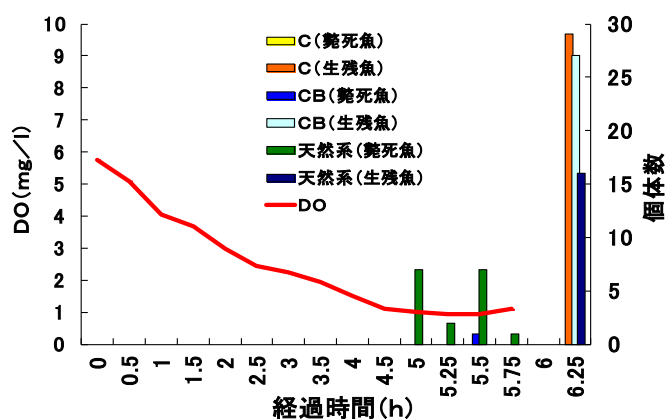


図 5 低酸素耐性系統、交配系統 (CB 系統) および天然系の低酸素に対する耐性の相違

エ) QTL解析のための試験条件の検討

試験開始 5 時間が経過した時点から斃死する個体が出現後、連続的に斃死し、1 時間後にはすべての検体が斃死した。

本試験においては、低酸素により斃死が生じている間に、各個体の斃死時間を 1 分単位で把握することが可能であった。本試験方法を用いることにより、各個体の低酸素に対する強弱を、斃死に至る時間を用いて、連続的な変異として数値化することが出来た。

オ) QTL 解析家系の作出

♀F1 (♀低酸素耐性 C 系統×♂低酸素非耐性 B 系統) × ♂ (低酸素非耐性 B 系統) 間において戻し交配魚(以下 CB×B 約 150 尾)を作出し、QTL 解析のための低酸素耐性試験を実施した(図 6)。

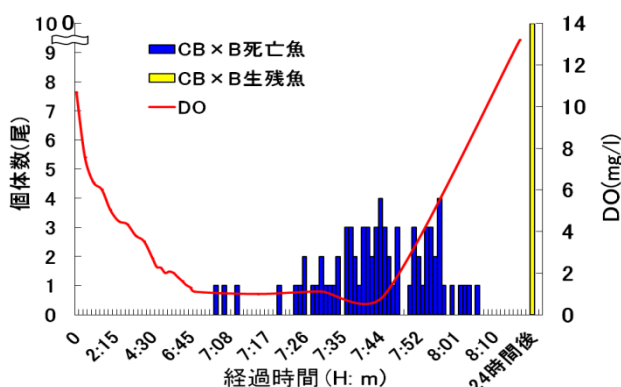


図 6 戻し交配魚(CB×B)に対する低酸素耐性試験

エ 考 察

低酸素に対する耐性は魚種ごとに異なっていること^{1), 2)}や酸素消費量と低酸素の関係^{3), 4)}については既に報告されている。しかし、同一の魚種において低酸素に対する耐性に相違があることについては 3 倍体と 2 倍体における酸素消費量の違い^{5), 6)}については報告されているが、遺伝的背景の異なる同一魚種内において低酸素耐性が異なることについて報告されている事例は少ない⁷⁾。

この原因としては、水産においては、育種の歴

史が短く、品種として確立されているものがほとんどないことが関係していると考えられる。本試験で検証したヒラメの系統についても、突発的に発生した取水事故により注水が止まり、その結果として生じた酸欠による斃死の状況が系統間で異なっていたことから、系統間による低酸素耐性の相違について、着目することになった。

本試験により、神奈川県において継代飼育してきたヒラメの系統魚は、低酸素に対する耐性が、系統間で異なっていることが明らかになった。

また、系統間の交配魚の低酸素に対する耐性も、耐性系統と同様の様相を示しており、本県の系統魚が有している低酸素耐性は、優勢形質であることが示唆された。

ヒラメの生産現場では、夏季に疾病による斃死被害が多発している。夏季の飼育水温の上昇に対する適応能力の相違が、疾病の発生を誘引している原因のひとつであることも考えられる。

また、ヒラメ養殖の多くは、陸上施設において行われている。このため、揚水ポンプを用いて海水を取水しており、台風等の自然災害により取水が困難となり、酸欠による斃死被害がしばしば生じている。

これら、ヒラメ養殖の置かれた飼育環境を考えると、低酸素に対する耐性形質はヒラメ養殖を振興する上で重要な経済形質のひとつになるものと考えられる。

オ 今後の課題

新たな戻し交配家系を作出し、これらに対しても、本課題において明らかにした試験条件により、低酸素耐性試験を実施し、戻し交配魚の低酸素に対する強弱を個体ごとに把握し、これらを QTL 解析に供する。

QTL 解析により、低酸素耐性と連鎖する DNA マーカーを開発することにより、同耐性を有する優良系統を確立する。

カ 要 約

- ・神奈川県において、継代飼育してきた2種類の系統魚の低酸素に対する耐性には、遺伝的な相違があることが明らかになった。
- ・供試魚の斃死に至るまでの時間を、1分刻みで把握するための試験条件を開発し、各検体の低酸素に対する耐性の強弱を、量的形質として捉えることが可能となった。
- ・QTL解析のための、解析用家系（戻し交配魚）を作出することが出来た。

キ 文献

- 1) 山元憲一・細木誠・上村達也(1987). 低酸素下におけるマダイ、アオハタ、カワハギ、キュウセン、ハナオコゼの酸素消費量の変化. 水産増殖. 35(3):143-146
- 2) 山元憲一・廣中孝始・山下秀幸・綿石慶太(1990). 低酸素下におけるブリ、クラカケトラギス、カサゴ、ネズミゴチ、トラフグの酸素消費量の変化. 水産増殖. 38(1):35-39
- 3) 山元憲一(1991). マアジの酸素消費に及ぼす低酸素の影響. 水産増殖. 39(4):399-402
- 4) 山元憲一(1997). イシダイの酸素飽和と低酸素の状態における呼吸. 水産増殖. 45(4):513-517
- 5) 山本淳・飯田貴次(1994). 三倍体ニジマスの酸素消費量と低酸素濃度耐性. 魚病研究. 29(4):245-251
- 6) 小林徹・堀勝利・伏木省三・中村聡一・上野絃一. 三倍体アマゴの安静時および強制運動時の酸素消費量ならびに鰓蓋運動数. 水産増殖. 43(3):395-400
- 7) 工藤飛雄馬・井ノ口伸幸・木島明博(2002). ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)における低酸素耐性形質の遺伝率の推定について. 水産増殖. 50(3):396-374.

チーム名：ヒラメチーム

担当課題名：ヒラメの高温耐性関連形質の評価と DNA マーカー等の探索

研究機関・担当者名：東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・坂本 崇（03-5463-0450, takashis@kaiyodai.ac.jp）・岡本信明

研究期間：平成 21～23 年

ア 研究目的

近年、地球温暖化が問題視され、ヒラメ養殖でも対応が求められている。その一つとして、育種により、高水温耐性家系を作出することが挙げられる。地球温暖化の影響と推察される海水温の上昇により、ヒラメ飼育水温も上昇し疾病の多発や酸素欠乏による斃死が起り、養殖生産量の低下が懸念される。その対策の一つとして、高温耐性を有する家系を探索し、確保することで、高温耐性に関する育種技術の発展が望まれる。本課題では高水温耐性を有する個体や家系を探索・確保し、DNA マーカー等を用いて、その遺伝性の評価を行うことを目的とした。

イ 研究方法

- ① 高温耐性魚の探索準備：神奈川県で漁獲された天然魚を餌付けし、栄養状態ならびに感染症罹患に注意を払いながら飼育・育成した（神奈川県と共同研究）。
- ② 天然魚から高温耐性の親魚を選抜するための形質評価法の確立：飼育試験によって水温とヒラメの動向、生死の関連を見た。飼育は人工海水（SEALIFE/MARINETECH）、エアポンプ（INNO β6000/ニッソー）、ろ過機（EHIME professional）、ヒーター（NEW IC AUTO 500）を用いて 60 L 水槽により行った。
【飼育試験 1】20℃から、2 日おきに 2.5℃ずつ水温を上昇させ、飼育限界水温を探索した。【飼育試験 2】30℃に馴致した後、6 時間おきに 1℃ずつ上昇させ、飼育限界水温を探索した。
- ③ 天然魚の親魚判別を可能にする DNA マーカーの開発：既存のマーカー（Sanchez et al.,

2010）を利用して、天然魚の親魚判別を可能にする DNA マーカーを探索した。既存の約 1000 個のマイクロサテライトマーカーより、神奈川県で放流稚魚作出用に飼育されていた親魚群を判別できるようなマーカーを探索した。

親魚から抽出したゲノムを蛍光（TET）標識プライマーで PCR し、変性アクリルアミドゲルにて電気泳動後、FLA9000（FUJIFILM）にて可視化した。

- ④ 低酸素耐性魚の探索：親魚群の判別が可能であったマーカーを用いて、神奈川県が行った酸欠耐性試験の試験区（合計 8 試験区）の個体の親魚鑑定を行った（グループ共同研究）。
- ⑤ 高温耐性魚の探索：天然魚同士の自然交配から得た魚を用い、28℃で馴致した後、6 時間おきに 1℃ずつ上昇させ、死亡個体を一尾ずつ取り上げて、死亡時水温の記録とともに鰭を保存し、親子鑑別を行った（合計 4 試験区）。

ウ 研究結果

- ① 高温耐性魚の探索準備：神奈川県で漁獲された天然魚を産卵可能な状態まで飼育・育成した（神奈川県と共同研究）。
- ② 野生魚から高温耐性の親魚を選抜するための形質評価法の確立：

【飼育試験 1】30℃以下の水温では摂餌は良好で、上層にとどまり餌を催促する個体もいたが、31.6℃に水温を上げた 6 日後から、餌に対する反応が薄くなり、上層に留まる個体もいなくなった。

【飼育試験 2】飼育試験 1 の結果より、30℃以下では正常の状態を保って飼育できると判

断したため、30℃に馴致した後、6 時間おきに 1℃ずつ上昇させ、飼育試験を続けた。その結果、31℃から死亡が確認され、試験開始から 24 時間後、33℃ですべての個体が死亡した。同時に、DO (mg/l) や呼吸回数 (秒/10 回) を測定していたが、水温の上昇、DO の低下に伴って、呼吸回数が増加する様子が確認できた。

- ③ 天然魚の親魚判別を可能にする DNA マーカーの開発：神奈川県で放流稚魚作出用に飼育されていた親魚群を判別できるようなマーカーを探索できた。
- ④ 低酸素耐性魚の探索：【酸欠試験 1 および 2】親魚判別を可能にする DNA マーカーを使って酸欠耐性試験の親魚鑑定を行った結果、供試魚には雄親魚に偏りがあることがわかった (♂No.5 ; 66.7%、50%、♂No.2 ; 14%、25%)。また、酸欠耐性を示した魚の雄親魚も明らかになり、酸欠試験 1 と酸欠試験 2 で、終了 1 時間前まで生き残った供試魚の雄親魚として、♂No.6 があげられた。また、酸欠試験 1 のみで使われた雄親魚では、♂No.14、酸欠試験 2 のみで使われた雄親魚では、♂No.11 由来の供試魚が酸欠耐性を示した。

【酸欠試験 3 および 4】酸欠試験 3、酸欠試験 4 とともに、2.1ppm の酸素濃度で供試魚の大半が死亡した。この時点で生存した個体の雌由来と雄由来を確かめたところ、試験 3 では偏りはなく、特に酸欠に強い親の存在は認められなかった。酸欠試験 4 では雌由来に偏りはなかったが、雄由来では個体 No.2878 (試験 1, No.6) が酸欠に強い傾向があった。

【酸欠試験 5 から 8】酸欠試験 5 から 8 においては、天然魚とともに神奈川県で飼育されている B 系、C 系、その F₁ である CB 系を実験に供試した。酸欠試験 5 から 8 の何れの系統においても 1.5ppm 以下の酸素濃度で死亡が始まった。C 系、CB 系は、天然魚と同等、

もしくはそれ以上に酸欠に強いことが示唆された。天然系個体の雌由来と雄由来を確かめたところ、酸欠試験 5~8 何れの試験区においても酸素耐性に偏りはなく、特に酸欠に強い親の存在は認められなかった。以上の結果より、B 系は酸素欠乏耐性が弱く、C 系は同耐性が強かった。また、その F₁ (CB 系) は C 系と同じかやや弱い程度の耐性を示した。

- ⑤ 高温耐性魚の探索：高温試験 1 では 33.4℃で死亡が始まり、34.3℃ですべてが死亡した。高温試験 2 では 29℃で死亡した一尾を除き、32.8℃で死亡が始まり、34.1℃ですべてが死亡した。両試験ともに、最初の死亡個体から最後の死亡個体まで、1℃程度しか温度差はなかった。本試験では、複数の天然親魚由来の交配個体を用いているので、ヒラメ (平均値：全長 11.1 cm、体重 11.3 g) が 33℃程度まで耐えられることが確認できたが、本試験では飛びぬけて高温耐性があると認めるに十分な個体は認められなかった。しかし、この狭い温度範囲であるが、雌親を基準にすると、継代家系である B 系と C 系の親由来の個体は両試験においてより低い温度で死亡し、個体 No.5E46 と 5C78 を雌親とする天然系個体は比較的高い温度まで生存したものが多かった。また、雄親を基準にすると、個体 No.2878 を親魚とする天然系個体がより高い温度で死亡する傾向があった。なお、個体数が少ないものの中に、より高い温度まで生存した個体があった (雌由来：個体 No.4E4E、雄由来：個体 No.3C71, No.7033)、それらの評価については個体数を増やした試験結果で判断すべきであると考えた。

高温試験 3 では 33℃で死亡が始まり、33.5℃ですべてが死亡した。高温試験 4 では 32.5℃で死亡が始まり、34.5℃ですべてが死亡した。本試験では、複数の天然親魚由来の交配個体を用いているので、ヒラメ (平均値：

全長 11.3 cm、体重 12.5 g) が 34.5℃程度まで耐えられることが確認できたが、最初の死亡個体から最後の死亡個体までの温度差が 2℃程度であり、37℃でも生存するような、飛びぬけて高温耐性がある個体は認められなかった。この狭い温度範囲であるが、雌親を基準にすると、個体 No.5C78 を雌親とする天然系個体は高い温度まで生存したものが多かった。また、雄親を基準にすると、個体 No.071F を親魚とする天然系個体がより高い温度で死亡する傾向があった。また、個体 No.5C78 と個体 No.071F を両親とする個体は最も強い高温耐性を示した。

エ 考察

酸欠試験 1 および酸欠試験 2 の二度の試験においても、個体 No.2878 を雄親とする個体はそのいずれにおいても酸欠に強い傾向が認められており、酸欠耐性に遺伝的要因の関与を疑わせるもので、興味深い結果であった。

高温耐性試験に用いたヒラメ（平均値：全長 11.1 cm、体重 11.3 g）は、おおそ 33℃程度まで耐えられることが確認できたが、飛びぬけて高温耐性があると認めるに十分な個体は認められなかった。神奈川県で継代飼育している系統において、B 系は酸素欠乏耐性が弱く、C 系は同耐性が強いことが明らかになった。また、その F₁ (CB 系) は C 系と同じかやや弱い程度の耐性を示したことから、酸素欠乏耐性形質は優性遺伝形質である可能性が考えられた。本研究期間中に作出した F₁ (CB 系) を活用し、今後、戻し交配家系を作出し分子遺伝学的解析により C 系の酸素欠乏耐性形質に関連する DNA マーカーを探索することが期待された。

オ 今後の課題

これまでのところ、飛び抜けて能力の高い高温

耐性魚および低酸素耐性魚を見いだすことはできなかったが、事業は順調に進行しており、大きな課題はない。

カ 要約

神奈川県で漁獲された天然魚を用いて、複数の天然親魚由来の交配集団を作出し、酸欠耐性試験および高温耐性試験を実施した。その後、交配集団について DNA マーカーを用いて親子鑑定を行ない、各試験で優良な成績を示した個体の由来を調べた。酸欠耐性試験および高温耐性試験ともに、遺伝的要因の関与を期待させる結果が得られたが、個体数を増やした試験結果で判断すべきであると考えた。また、神奈川県で継代飼育している系統において、B 系は酸素欠乏耐性が弱く、C 系は同耐性が強いことが明らかになった。また、その F₁ (CB 系) は C 系と同じかやや弱い程度の耐性を示したことから、酸素欠乏耐性形質は優性遺伝形質である可能性が考えられた。本研究期間中に作出した F₁ (CB 系) を活用し、今後、戻し交配家系を作出し分子遺伝学的解析により C 系の酸素欠乏耐性形質に関連する DNA マーカーを探索することが期待された。

キ 文献

- 1) C. C. Sanchez, K. Fuji, A. Ozaki, O. Hasegawa, T. Sakamoto, K. Morishima, I. Nakayama, A. Fujiwara, T. Masaoka, H. Okamoto, K. Hayashida, M. Tagami, J. Kawai, Y. Hayashizaki and N. Okamoto; A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *BMC Genomics*, 11 (554), (2010).

チーム名：ヒラメチーム

担当課題名：ヒラメの高温耐性関連形質の評価と DNA マーカー等の探索

研究機関・担当者名：東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・坂本 崇（電話：03-5463-0450, Email : takashis@kaiyodai.ac.jp）、神奈川県水産技術センター栽培推進部・長谷川理

研究期間：平成 24～25 年

ア 研究目的

近年、地球温暖化による気温および海水温度上昇が問題となり、ヒラメなどの養殖でも対応が求められている。その一つとして、育種により、高温耐性家系を作出することが挙げられる。本研究課題では、高温耐性家系の作出に貢献する DNA マーカー等を探索することを目的としている。養殖業における温暖化への対策として、高水温下での低酸素状態においても生残率の高い系統魚を開発することは、温暖化対策の一助として有効な手法であり、夏場の高水温時期への対策として必要とされている。そこで、神奈川県が維持継代している低酸素耐性形質が異なる系統を用いて、低酸素耐性形質に関連する DNA マーカーの開発を目的とする。

イ 研究方法

① 低酸素耐性形質解析家系の作出と維持管理

神奈川県水産技術センターにおいて、低酸素耐性系統（C 系統）、低酸素非耐性系統（B 系統）およびその系統間の F₁（CB 系統）を用いて、低酸素耐性形質解析家系として戻し交配家系を作出する。低酸素耐性試験で生存した個体については、将来的なマーカー選抜育種のための親魚候補として飼育する。

② DNA マーカーを用いた低酸素耐性形質の QTL 解析

神奈川県水産技術センターにおいて、これまでに確立した実験条件下で低酸素耐性試験を行い、解析家系の各個体の低酸素耐性形質を評価する。実験供試魚からヒレを採取し、分子遺伝学的解析のサンプルとする。

東京海洋大学において、低酸素耐性形質解析家

系の各個体のヒレサンプルからゲノム DNA を抽出し、分子遺伝学的解析に用いる。東京海洋大学が作成したヒラメ高密度マイクロサテライト連鎖地図（Castaño-Sánchez *et al.*, 2010）を参考に、各連鎖群から DNA マーカーを選択する。選択した各 DNA マーカーを用いて、低酸素耐性形質解析家系の各個体を解析し、マーカー型データを得る。低酸素耐性形質解析家系の各個体の低酸素耐性形質評価データとマーカー型データとの関連性について解析する（連鎖解析・QTL 解析）。

ウ 研究結果

① 低酸素耐性形質解析家系の作出と維持管理

神奈川県水産技術センターにおいて、低酸素耐性系統（C 系統）、低酸素非耐性系統（B 系統）およびその系統間の F₁（CB 系統）と低酸素耐性形質解析家系との間で戻し交配家系を作出した。解析家系は、KP-CBB 家系、KP-CBC-1 家系および KP-CBC-2 家系の 3 家系を作出した。これらに低酸素耐性試験を実施し、解析家系の各個体の低酸素耐性形質を評価した（図 1）。

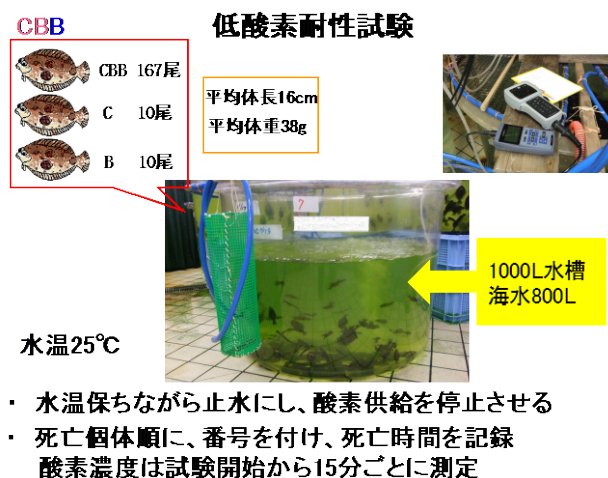


図 1 KP-CBB 家系の低酸素耐性試験

② DNA マーカーを用いた低酸素耐性形質の QTL 解析

神奈川県水産技術センターにおいて、東京海洋大学において、低酸素耐性形質解析家系の各個体のヒレサンプルからゲノム DNA を抽出し、分子遺伝学的解析に用いた。ヒラメ高密度マイクロサテライト連鎖地図を参考に、各連鎖群から DNA マーカーを選択し、各 DNA マーカーを用いて、低酸素耐性形質解析家系の各個体を解析し、マーカー型データを得た。低酸素耐性形質解析家系の各個体の低酸素耐性形質評価データとマーカー型データとの関連性について解析 (QTL 解析) した。

KP-CBB 家系における解析の結果、連鎖群 (LG) 24 上の 2 マーカー座近傍にヒラメの低酸素耐性形質を司る遺伝子座があることがわかった。

KP-CBC-1 家系および KP-CBC-2 家系における解析の結果、それぞれ 1 連鎖群 1 マーカー、2 連鎖群 4 マーカーで有意な結果が得られたが、強い関連性は見られなかった。

エ 考 察

本研究により、KP-CBB 家系における解析の結果、ヒラメの低酸素耐性遺伝子座は、連鎖群 24 上の 2 マーカー座近傍にあることが明らかになった。これらの MS マーカーは、今後のマーカー選抜育種法に利用できると期待される。近年報告された低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor, HIF)

(Nikinmaa and Rees, 2005) は、低酸素耐性の候補遺伝子として今後の解析が期待される。

KP-CBC-1 家系および KP-CBC-2 家系における解析の結果、それぞれ 1 連鎖群 1 マーカー、2 連鎖群 4 マーカーで有意な結果が得られたが、強い関連性は見られなかった。KP-CBC-1 家系および KP-CBC-2 家系で有意な結果が得られた MS マーカーは、KP-CBB 家系で関連性が見られた 2 マーカーとは異なるマーカー座位だった。これらの MS マーカーは、低酸素耐性形質と関連性を示す新規 MS マーカーの可能性があるが、他家系およ

び次世代で検討することが望ましいと考えられた。

今後、マーカー選抜育種法によって選抜された親魚候補の交配が行われれば、低酸素耐性を有する新規ヒラメ系統の開発が期待され、より安全、安心な魚の産業への利用・MAS 育種技術の開発へと前進できるものと考えられる。本研究では得られた知見は、分子遺伝育種をはじめとする様々な今後研究の推進と産業の活性化に役立つものであると考えている。

オ 今後の課題

本課題において、C 系統は低酸素状態に耐性を有することは確認するとともに、同系統由来の選抜マーカーも開発することが出来た。一方、すでに実用化されているリンホシスチス耐性系統は酸欠状態に弱い傾向が確認されている。今後は、それぞれの長所を合わせ持った新系統を開発していくことが必要である。

カ 要 約

本研究は、ヒラメ MS 連鎖地図から全連鎖群を網羅するように、マイクロサテライトマーカーを選び、戻し交配家系 KP-CBB (167 尾) を用いて解析を行った。その結果、1 連鎖群 (連鎖群 24) 2 マーカー座で低酸素耐性形質との強い関連性が示唆された。本研究により得られた低酸素耐性形質と連鎖する MS マーカーは、今後のマーカー選抜育種法に利用できると期待された。

キ 文献

- 1) Nikinmaa M and Rees BB (2005): Oxygen - dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R1079-R1090.

2. ニジマスチーム課題別研究成果

- 1) ニジマス高温耐性連鎖マーカーの探索と関連遺伝子の同定・・・・・・・・・・ 25
(東京大学、宮崎県水産試験場)
- 2) ニジマス解析家系の作出および高温耐性の生物学的評価・・・・・・・・・・ 31
(宮崎県水産試験場)
- 3) ニジマスの高温影響を評価するバイオアッセイ系の開発・・・・・・・・・・ 37
(中央水産研究所)

チーム名：ニジマスチーム

担当課題名：ニジマス高温耐性連鎖マーカーの探索と関連遺伝子の同定

研究機関・担当者名：東京大学大学院農学生命科学研究科・渡部 終五（042-778-9094、awatabe@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）・浅川 修一・木下 滋晴・宮崎県水産試験場・稲野 俊直・山田 和也・田牧 幸一・毛良 明夫

研究期間：平成 21～25 年

ア 研究目的

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は水産上重要なサケ科魚類の一種であるが、冷水性であるため温暖な気候での養殖には限界がある。また 21 世紀後半から顕在化した地球温暖化は冷水性魚の育種環境に大きな影響を与える可能性が懸念される。宮崎県では 1966 年から開始した選抜育種により、比較的高い水温でも養殖できるニジマス系統（高温耐性系）を作出している。当該系統は、通常のニジマス（標準系）に対し、半数致死温度、孵化率、摂餌率に有意な高温耐性が認められる。^{1,2)} また、高温耐性系では高温暴露による組織の損傷が少ないことも明らかになっている。³⁾ 本担当課題は、この高温耐性系ニジマスを対象に、遺伝子発現解析やゲノムシーケンシングによって高温耐性に関わる遺伝子を探索し、冷水性魚が高温耐性を獲得するメカニズムの解明を目指した。

イ 研究方法

標準系の検討と解析家系の作出

高温耐性系ニジマスの対照となる標準系候補として、中央水産研究所日光支所（日光系）および青森県内水面研究所（青森系）のドナルドソン系ニジマスを検討した。各系統の幼魚を 15℃あるいは 20℃に馴致し、5℃/時間の昇温速度で加温し、平衡喪失温度（臨界最高温度、CTM）と死亡温度（DT）を測定した。家系作出は、高温耐性系および標準系の雌雄各 5 個体を用いて、雌雄各 1 個体あるいは雌雄 5 個体ずつを混合することで行った。

解析家系として、日光系雌雄 5 個体と高温耐性系雌雄 5 個体と総当たり交配して計 40 家系を作出した。交雑群（F1）の中、順調に成育・成熟した

個体から採卵を行い、同胞（両親が同じ）および半同胞（両親の一方が同じ）の F2 を作出した。

臨界最大温度と死亡温度による高温耐性評価

供試魚を 2 週間以上 20℃に馴致後、1 時間あたり 5℃の昇温により、魚が平衡喪失する水温（臨界最高温度、CTM）と鰓蓋運動を停止する水温（死亡温度、DT）を測定した。

平衡喪失までの時間による高温耐性評価

供試魚を 2 週間以上 20℃に馴致後、水温 28℃に保った水槽に収容し、平衡喪失するまでの時間を計測するとともに、平衡喪失後に元の水温に戻して生残率を調べた。

また、平衡喪失時間を表現型として 4 階級に区分し、1 か月後に再度同条件で平衡喪失時間を測定し再現性を調べた。

COXII mRNA 量の定量

高温耐性系ニジマスと標準系ニジマス（長野系および日光系）を用いた。各系統の幼魚 5 個体から脳、心臓、肝臓、筋肉、鰭の各組織を採取し、全 RNA を抽出した。定量的 real-time PCR により、EF-1 α 遺伝子を内部標準として各組織におけるチトクローム c オキシダーゼサブユニット II (COXII) mRNA 量を定量し、両系統間で比較した。

トランスクリプトーム解析

高温耐性系 5 個体および標準系（日光系）5 個体を用い、26℃の高温暴露前後で脳、筋肉、肝臓、鰓を採取し RNA 抽出用試料とした。各組織から得られた全 RNA から cDNA ライブラリーを構築

し、Illumina GA を用いたペアエンドシーケンスに供した。得られたシーケンスデータは Velvet および Oases を用いてアセンブルした。得られた contig は Blast によりアノテーションするとともに、各 contig に高温耐性系および標準系のリードをマップし、リードの発現頻度解析から高温耐性系に特徴的な遺伝子群を探索した。高温耐性系と標準系で発現量に顕著な違いがみられた遺伝子については、定量的 real-time PCR によって発現量を検証した。

リファレンスゲノムの構築

高温耐性系ニジマスの尾鰭からゲノム DNA を抽出した。RNase 処理により混入した RNA を除去後、定量的 real-time PCR により、予め定量した COXII 遺伝子(COXII)の PCR 産物から作成した検量線を基に COXII のコピー数を算出し、ミトコンドリアゲノムの混入量を推定した。得られたゲノム DNA からライブラリーを調製し、GS FLX454 シーケンサによるショットガンシーケンシングを行った。

また、宮崎県水産試験場で、高温耐性系雌の卵から作成された第一卵割阻止型雌性発生 2 倍体の稚魚からゲノム DNA を抽出し、Illumina GA を用いて平均 400bp と 700bp のペアエンドシーケンシングおよび平均 2kb と 5kb のメートペアシーケンシングを行った。得られた塩基配列から、Soapdenovo を用いて *de novo* アセンブリを行った。

F2 のゲノムシーケンシングと SNP タイピングおよび HSP70b の発現量解析

F2 の高温耐性群と非耐性群につき、各群それぞれ 32 尾の鰭から抽出した DNA でゲノムライブラリーを調製し、Illumina Hiseq2000 を用いてマルチプレックスシーケンシングを行った。CLC genomic workbench を用いて、各個体のリードを高温耐性系由来雌性発生 2 倍体から構築したリファレンスゲノムにマッピングし、UNIX コマンド等でデータ

を加工後、最終的に Excel ベースで両群間で多型の頻度差のある SNP サイトを抽出した。

また、高温耐性群および非耐性群各 32 尾の鰭の Total RNA を抽出し、cDNA を作成後、定量的 real time PCR により HSP70b 遺伝子の発現量を定量した。

2012 年度産高温耐性系ニジマスにおける HSP70b の発現量解析

2012 年度産高温耐性系ニジマスにつき、28℃高温暴露で平衡喪失するまでの時間が 80 分以上の高温耐性群と 20 分以下の非耐性群を選別し、各群 5 尾の鰭の Total RNA を抽出した。Total RNA から cDNA を作成し、定量的 real time PCR により HSP70b 遺伝子の発現量を解析した。

ウ 研究結果

標準系の検討と解析家系の作出

20℃で馴致した供試魚の CTM は、高温耐性系と日光系間で有意差が認められた ($P<0.05$)。したがって日光系を標準系として解析家系を作出することとした。

交雑群 (F1) のメス 137 尾、オス 72 尾を用いて採卵を行い、66,388 粒の発眼卵 (F2) を得た。用いた F1 は 13 家系で日光系のメス親由来の F1 が 5 家系、宮崎系のメス親由来の F1 が 8 家系であった。

高温耐性系と標準系間の COXII mRNA 蓄積量の比較

先行研究で、高温耐性系ニジマスの未受精卵および初期胚では、COXII などのミトコンドリア DNA にコードされるエネルギー産生関連遺伝子群の mRNA 蓄積量が増加していることが明らかになっている。⁴⁾ しかしながら、定量的 real-time PCR で幼魚の各組織における発現量を定量した結果、日光系統と比較すると、脳を除く 4 組織で高温耐性系の方が COXII mRNA の蓄積量が高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、長

野系統に対しては、高温耐性系の鰭で、COXII mRNA の蓄積量が高い傾向を示したが、筋肉と肝臓ではむしろ低く、いずれも有意差は認められなかった。初期胚と違って幼魚では COXII 遺伝子の発現上昇が起きていない可能性が考えられる。少なくとも今回用いた系統について、COXII 遺伝子はニジマス的高温耐性の選別マーカーとしては有用といえないと判断した。

F1 の高温耐性評価

高温耐性系と F1 の平衡喪失温度に差は認められなかったが、日光系と F1 の間には有意な差が認められた。また、F1 同士の比較では同じ系統で雄由来、雌由来の差は認められなかった。

高温耐性評価法の検討

水温 28℃ でニジマスを保持した場合、平衡喪失時間は 18~55 分と幅広く、温度耐性の違いを容易に検出できることが期待できた。また、実験後の生残率は 100% であり遺伝子発現解析等、他の実験にも使用可能であった。したがって F2 の高温耐性評価には本評価法を用いることとした。

F2 の高温耐性評価と高温耐性群、非耐性群の選別

1 回目の 28℃ 高温暴露による平衡喪失時間をもとに F2 稚魚を 0~30 分未満、30~45 分未満、45~60 分未満および 60 分以上の 4 階級に分類した (図 1)。1 か月後に同様の条件で平衡喪失時間を測定しところ、高温耐性群 (60 分以上) と非耐性群 (30 分未満) の階級で、結果の再現性が認められた。

トランスクリプトーム解析

高温耐性系および標準系 (日光系) それぞれ 1 個体につき、熱ストレス付加前後の各組織から、

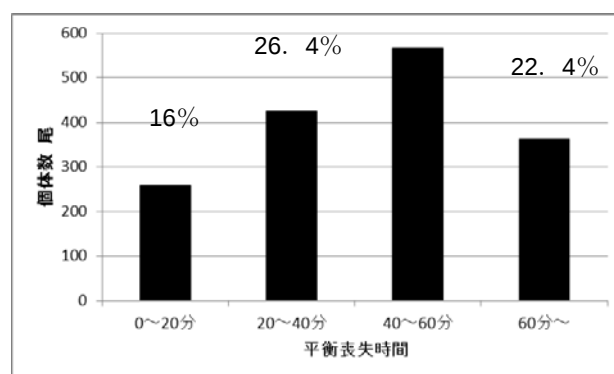


図 1. F2 の 28℃ 暴露による高温耐性評価試験。平衡喪失までの時間で 4 つの階級に分類することで、再現性の高い評価方法を確立した。

それぞれ 100M リード以上のシーケンスデータを得た。これらの一部 (50M、または各条件 12.5M のミックス) を用いてアセンブルを行い、遺伝子モデルを構築した。このうち、鰭で発現しており、1 kb 以上の 13,736 種類の遺伝子の発現量を両系統で比較した結果、高温耐性系で標準系より発現が多い遺伝子が多数同定され (図 2)、ここには複数の熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) 遺伝子が含まれていた (表 1)。⁵⁾ 特に HSP70b については、標準系に対し高温耐性系で 2000 倍以上上昇しており、定量的 real-time PCR でも同様の結果が確認された。また、c-fos およびその関連遺伝子の発現も高温耐性系で恒常的に上昇していた (表 1)。

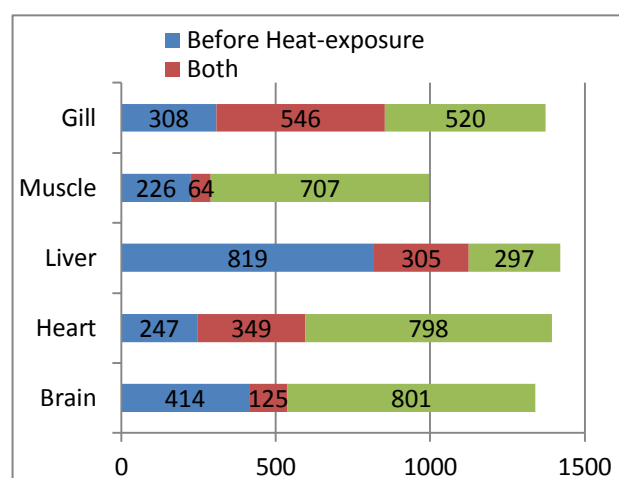


図 2. 高温耐性系ニジマスで標準系に対して発現量の多い遺伝子の数 (青: 高温曝露前、赤: 高温曝露前後、緑: 高温曝露後)

表 1. 高温耐性系で顕著に発現量が増大していた遺伝子の標準系に対する発現量比

遺伝子*		脳 (付加前/後)	心臓 (付加前/後)	肝臓 (付加前/後)	筋肉 (付加前/後)	鰓 (付加前/後)
HSP 関連	heat shock protein 70kDa isoform b	460.6/335.5	1670.9/1078.9	2719.6/253.7	1332.6/383.6	2414.6/2174.3
	dnaj (HSP40)	1.6/2	4.1/2.7	2/3.2	1.3/0.9	3.2/3.1
	heat shock protein 47	10.7/28.2	15/20	66.4/41.8	7/11.3	6.4/7.4
c-fos 関連	c-fos protein	2.4/5	156/118.5	45/147	8/9	39/51.2
	Junb	2/3.5	24.6/19.4	24.9/20.3	6.1/6	9/6.2

発現量の値は標準系に対する高温耐性系の発現量の比率、
heat shock protein 70kDa isoform b: HSP70b.
付加前/後: 高温暴露前/高温暴露後

脳、心臓、肝臓および筋肉についても同様に解析したところ、それぞれの組織で高温耐性系で発現量が上昇している遺伝子が多数同定され(図 2)、鰓と同様に、ここには複数の HSP 遺伝子および c-fos 関連遺伝子が含まれており、特に HSP70b の発現上昇が顕著であった(表 1)。本結果から、高温耐性系の組織全体で HSP の恒常的な発現上昇が起きていることが示された。

レファレンスゲノムの構築

抽出したゲノム DNA につき、ミトコンドリアゲノムにコードされる COXII 遺伝子を指標に定量 PCR 法でミトコンドリア DNA の含有量を定量した結果、5%以下と見積もられたため、そのままシーケンシングの出発材料として使用することとした。GS-FLX454 シーケンサにより、高温耐性系のゲノムから 4,634,401 リード、1,531,336,345bp の配列情報を取得した。また、ここから 193,432 のマイクロサテライト遺伝子座が検出された。

さらに、リピートの多いニジマスゲノムからより正確に、かつより多く配列情報を得るため、全遺伝子座がホモ接合していることが期待される

第一卵割阻止型雌性発生 2 倍体の DNA をソースに、Illumina GA を用いてシーケンシングを行い、60×ゲノム相当のシーケンスデータが得られた。これを用い、k-mer 値の設定を様々に変更し *de novo* アセンブリを行った結果、k-mer 値を 59 bp 前後に設定することで、良好な結果が得られた。この時、アセンブルで得られたゲノムのサイズは 2.2Gb で、N50 値は 15,046b、推定ゲノム被覆度は 0.92 倍であった。

F2 高温耐性群と非耐性群の SNP タイピングによる Genome Wide Association Study (GWAS)

F2 につき、28℃暴露による平衡喪失までの時間から分類した高温耐性群 32 尾と非耐性群 32 尾からそれぞれ 56.4Gb と 89.9Gb のデータを得た。全ゲノムのドラフト配列 (2.32Gb) に対する被覆度はそれぞれ 24.3 倍および 38.8 倍であった。全ゲノムのドラフト配列をレファレンスに SNP 解析した結果、13,595,569 カ所の SNP サイト候補が得られ、出現頻度は 1 サイト/170bp であった。このうち高温耐性群と非耐性群間で多型構成の差が特に大きな SNP サイトを 5907 個抽出した。さらにこれらの中で特定のゲノム領域に集中してクラスターを

形成する SNP、695 個（34 クラスター）を抽出した。さらに当該領域から有力遺伝子を見いだした。

また、この F2 高温耐性群および非耐性群につき、各 32 個体の HSP70b mRNA 量を定量したところ、高温耐性群で HSP70b の発現が亢進している個体は検出されなかった。

2012 年度産高温耐性系ニジマスにおける HSP70b の発現量解析

高温耐性群 5 個体および非耐性群 5 個体を解析したが、いずれにおいても HSP70b を高発現している個体はみられなかった。

一方、この 2012 年度産高温耐性系を用いて、28℃暴露による平衡喪失時間で階級分類を行ったところ、0～20 分未満が 8%、60 分以上が 49%であった。上述の F2 の階級分類結果では 0～20 分未満が 16%、60 分以上が 22%であったことから、HSP70b の高発現がないにもかかわらず、当該高温耐性系が高水温に強いことが確認された。

エ 考 察

変性タンパク質の修復や除去を行う HSP は個体のストレス耐性に直接的に寄与し、HSP の強制発現は生体のストレス耐性を向上させる。トランスクリプトーム解析では、真核生物の代表的な HSP である HSP70b の発現が、高温ストレスの有無に関わらず、高温耐性系で恒常的に発現が亢進しており、それは組織によっては mRNA レベルで標準系の数千倍に達した。なぜ HSP の発現量が上昇しているかは不明であるが、c-fos およびその関連遺伝子の発現も同様に高温耐性系で恒常的に上昇しており、ほ乳類では HSP 遺伝子プロモーターに存在し、そのストレス依存的な発現に関わるヒートショックエレメント（heat shock element, HSE）が c-fos 遺伝子のプロモーターにも含まれ、*in vivo* で機能していることが示されている。したがって、高温耐性系では HSE をプロモーターに有する遺伝子の発現が活性化しているのかもしれない。いずれにせよ、HSP の恒常的な

発現上昇がニジマスに高温耐性を付与したと考えることは蓋然性が高く、今後ニジマスや他の魚種で高温耐性個体を選別する際に、HSP の発現レベルが有効な指標になると考える。

また、先行研究では高温耐性系の未受精卵および初期胚で、COXII などミトコンドリアでの ATP 産生に関わる一群の遺伝子の発現量が上昇していることが報告されているが、³⁾ HSP は変性タンパク質の修復時に ATP を消費することから、HSP の発現上昇との関連に興味を持たれる。ただし、本課題において高温耐性系の幼魚で COXII の発現上昇は確認できなかった。

一方、高温耐性系の一部に HSP の高発現を示さない個体が存在することは以前から判明しており、HSP の発現上昇とは別の高温耐性獲得メカニズムもあると考えられる。実際に、本課題で解析した 2012 年度産の高温耐性系および F2 の高温耐性群については HSP70b の発現上昇がみられなかった。これら供試魚の家系は、トランスクリプトーム解析に用いた集団と同祖であるが、その祖先集団の一部を 2008 年度に海水飼育して生き残ったものを F0 として作出している。海水飼育の段階で HSP 高発現型個体が淘汰された可能性が大きい。したがって、この F2 集団の SNP 解析からは、HSP70b には依存しない新たな高温耐性関連遺伝子が同定されるものと期待できる。現在、F2 高温耐性群および非耐性群間で特定のゲノム領域にクラスターを形成する SNPs が多数検出されており、これらは高温耐性の表現型と直接関連する多型、あるいはそれらの連鎖している多型と考えられ、高温耐性の表現型を追跡するマーカーとして使用できる。今後の解析で、これらのクラスター領域から高温耐性獲得の原因遺伝子が同定されるものと期待する。

オ 今後の課題

海水飼育を通していない高温耐性系から HSP70b の高発現個体を選別し、HSP70b の高発現

と高温耐性との関連を遺伝学的に調べることが必要である。また、SNP 解析に用いた F2 および 2012 年度産高温耐性系におけるトランスクリプトーム等の遺伝子発現解析を行い、HSP70b を高発現していない高温耐性個体で、どのような遺伝子の発現変化が高温耐性を付与しているかを検討することも望まれる。F2 の高温耐性群と非耐性群間の多型解析からは、特定のゲノム領域に高温耐性群と非耐性群間で多型頻度に大きな差のある SNP がクラスターを形成して検出された。これら領域には高温耐性の表現型と関連する遺伝子（多型）の存在が見込まれるため、その同定のためには、さらなる個体の解析が望まれる。

カ 要 約

宮崎県で作出された高温耐性ニジマス系統（高温耐性系）を対象に、遺伝子の発現解析とゲノムシーケンシングによって、高温耐性獲得の原因となった遺伝子の探索を行った。高温耐性系と標準系の様々な組織につき、次世代シーケンサによるトランスクリプトーム解析を行った結果、高温耐性系では熱ストレス応答に関わる HSP の発現量が恒常的に上昇しており、これにより宮崎系は高温耐性を獲得していること、HSP がニジマスの高温耐性のマーカーとして利用できることが考えられた。一方、高温耐性系の一部個体は HSP の恒常的な発現上昇を示さないこと、本検討課題で解析した F2 の高温耐性群では HSP の発現上昇が認められなかったことから、HSP の高発現とは別の高温耐性のメカニズムもあると考えられる。F2 の高温耐性群および非耐性群を用いたゲノムシーケンシング／SNP タイピングによる GWAS では、特定のゲノム領域に両者間で多型頻度に大きな差がある SNP を 695 個（34 クラスター）抽出することができた。またそれらのクラスター領域から高温耐性と関連する有力な候補遺伝子を見いだすことができた。これら SNP は有力な高温耐性マーカー

であり、当該領域から高温耐性の原因遺伝子の同定が期待される。本成果は活用可能なゲノムシーケンスデータが存在しない段階から研究を開始し、ヒト以外で GWAS を行って有力遺伝子の同定に至った先駆的な研究成果であり、いち早く各種水産生物で同様の手法の応用が望まれる。

キ 文 献

- 1) Ineno T, Tsuchida S, Kanda M, Watabe S. (2005). Thermal tolerance of a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* strain selected by high-temperature breeding. Fish. Sci., 71:767-775.
- 2) Ineno T, Endo M, Watabe S. (2008). Differences in self-feeding activity between thermally selected and normal strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at high temperatures. Fish. Sci., 74:372-379.
- 3) Itoi S, Ineno T, Kinoshita S, Hirayama Y, Nakaya M, Kakinuma M, Watabe S. (2001). Analysis on serum proteins from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to high temperature. Fish. Sci., 67:191-193.
- 4) Ikeguchi K, Ineno T, Itoi S, Kondo H, Kinoshita S, Watabe S. (2006). Increased levels of mitochondrial gene transcripts in the thermally selected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strain during embryonic development. Mar. Biotechnol., 8:178-188.
- 5) Tang E, Wongwarangkana C, Kinoshita S, Suzuki Y, Oshima K, Hattori M, Ineno T, Tamaki K, Kera A, Muto K, Yada T, Kitamura S, Asakawa S, Watabe S. (2012). Global gene expression analysis of gill tissues from normal and thermally selected strains of rainbow trout. Fish. Sci., 78:1041-1049

チーム名：ニジマスチーム

担当課題名：ニジマス解析家系の作出および高温耐性の生物学的評価

研究機関・担当者名：宮崎県水産試験場生物利用部小林分場・稲野俊直（0984-23-3358、
ineno-toshinao@pref.miyazaki.lg.jp）田牧幸一・山田和也・毛良明夫

研究期間：平成 21～23 年

ア 研究目的

地球温暖化の進行は、産業的に重要な冷水性魚類のニジマス生産に大きな影響を与えることが懸念される。宮崎県では 1966 年から開始した選抜飼育実験により、高い水温でも養殖できるニジマスの系統（高温耐性系）を作出している。本研究では、この系統を対象に、生物学的な高温耐性の評価手法を開発するとともに量的形質遺伝子座（quantitative trait loci, QTL）解析に用いるニジマス家系を確立し、高温耐性関連遺伝子の同定とその機構解明の一助とすることを目指す。

イ 研究方法

（1）対照系統の高温耐性の評価

供試魚は、尾叉長 50 mm 前後（約 10 g）の水産総合研究センター中央水産研究所日光支所で生産されたドナルドソン系ニジマス（以下「日光系」という。）、青森県内水面研究所で生産されたドナルドソン系ニジマス（以下「青森系」という。）および宮崎県水産試験場で生産された高温耐性系ニジマス（以下「高温耐性系」という。）をそれぞれ 50 尾程度用いた。これらの供試魚は、実験前 2 週間以上、15℃ および 20℃ に馴致した。実験水槽には 1 水槽につき日光系または青森系を 3 尾と宮崎系を 2 尾収容し、1 時間あたり 5℃ の昇温速度で加温し、供試魚が平衡喪失する水温（臨界最高温度、CTM）と鰓蓋運動を停止する水温（死亡温度、DT）を測定して、高温耐性系と交配する対照系統を選択した。更に、選択した対照系統の発眼卵を宮崎県水産試験場小林分場でふ化させ、高温耐性系と同一飼育条件で育成した後に CTM を測定し比較した。

（2）解析家系 F1 の作出及び育成

9 尾の高温耐性系の精液を人工精しょうで 10 倍に希釈し、円筒形の浅型蓋付き容器に 10ml ずつ収容し、氷冷して水産総合研究センター中央水産研究所日光支所に運搬した。この内、採卵時に顕微鏡下で活発な運動性が確認された 5 尾分の精液を授精に用いた。日光系のメス 5 尾を用い、1 尾ずつ採卵した卵を重量割りで 5 等分し、それぞれに異なるオスの精液を媒精した。受精卵は、25 通りの家系を個別に発眼期まで管理し、その後、宮崎県水産試験場小林分場に移送してふ化させた。同様に日光支所で採精した 9 尾分の精液を宮崎県水産試験場小林分場に運搬し、高温耐性系のメス 5 尾の卵と日光系のオス 5 尾の精液を用いて 25 通りの交配を行った。

正常ふ化した 40 通りの F1 を群別の水槽で飼育した。飼育水は周年 17℃ 程度の湧水を用い、給餌率はライトリッツの給餌率表に従った。なお、魚体重 50g 程度に成長した時点で群識別のため蛍光色素により標識を施し一部は混合飼育を行った。

（3）解析家系 F1 の高温耐性評価

供試魚は、高温耐性系メス×日光系オスの F1 が平均体長 101 mm、平均体重 18g、日光系メス×高温耐性系オスの F1 が平均体長 108mm、平均体重 23g であった。それぞれ 30 尾用いて実験前 2 週間以上、20℃ に馴致した。実験水槽には 1 水槽につき 6～10 尾収容し、1 時間あたり 5℃ の昇温速度で加温し、供試魚が平衡喪失する水温（臨界最高温度、CTM）と鰓蓋運動を停止する水温（死亡温度、DT）を測定した。

（4）解析家系 F2 の作出

平成 21 年に高温耐性系の雌雄 5 個体と日光系の雌雄 5 個体を総当たり交配して得た 40 通りの交雑群（F1）の中で順調に成育・成熟した個体から採

卵を行い、同胞（両親が同じ）および半同胞（両親の一方が同じ）の F2 を作出した。

（５）表現型としての高温耐性評価手法の検討

量的形質を比較する手法を検討するため、平成 20 年度に作出した高温耐性系メスと長野県産オスの交雑群 F1 の雌雄 3 尾ずつの同胞による交配で作出した F2 の平衡喪失時間を調べた。すなわち 17℃ で飼育していた供試魚を 6 尾ずつ水温 28℃ に保った水槽に収容して平衡喪失するまでの時間を計測した。

同様に水温 28℃ に保った水槽に高温耐性系(F0)を収容し、平衡喪失するまでの時間を計測して、平衡喪失した個体を個別に元の飼育水温の水槽に戻して生残率を調べた。さらに平衡喪失時間を表現型として 4 階級に区分し、再度 28℃ で平衡喪失時間を測定して再現性を調べた。

（６）F2 の高温耐性評価

高温耐性系と日光系を交配して得た交雑群（F1）の同胞（両親が同じ）から作出した F2 の 2 群と日光系を用いた。それぞれの平均体重は 4.1g、6.2g、4.7g であった。各群 32～33 尾用いて実験前 2 週間以上、20℃ に馴致した。実験水槽には 1 水槽につき 6～10 尾収容し、CTM と DT を測定した。

（７）表現型の分類と再現性の確認

投込み式ヒーターを設置し通気しながら 28℃ に保った 60cm 水槽に上記と同じ F2 を 50 個体ずつ収容して、平衡喪失した個体を順次取り出し平衡喪失までの時間を個体毎に調べ、0～20 分未満、20～40 分未満、40～60 分未満、60 分以上に 4 分類した。次に 4 分類した群毎に再度同じ方法で平衡喪失時間を調べた。さらに平衡喪失時間 0～20 分未満と 60 分以上の群は、再度（3 回目）同じ方法で平衡喪失時間を調べた。

ウ 研究結果

（１）対照系統の高温耐性の評価

20℃ で馴致した供試魚の平衡喪失温度（臨界最高温度、CTM）は、高温耐性系（30.0℃±0.3047）と日光系（29.7℃±0.4791）の間に有意な差が認め

られた（ $P<0.05$ 、 t -test、ANOVA）（図 1）。しかし、20℃ で馴致した供試魚の鰓蓋運動停止温度（死亡温度、DT）は、系統間で差が認められなかった。

また、15℃ で馴致した供試魚は、CTM および DT の系統間の差は認められなかった。

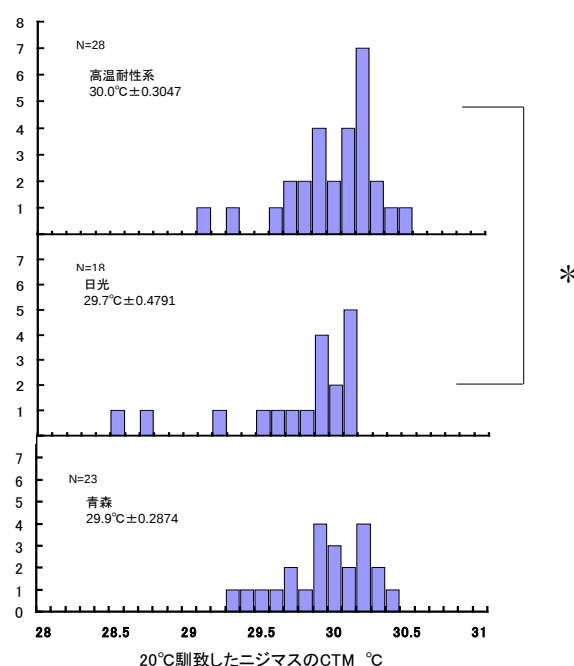


図 1 高温耐性系と対照系の CTM の比較

（２）解析家系 F1 の作出及び育成

対照系統の高温耐性の評価結果を踏まえて、日光系を対照系統とし、高温耐性系メスと日光系オスを 5 尾ずつ用いて 25 通りの家系を作出した。また、日光系メスと高温耐性系オスを 5 尾ずつ用いて 25 通りの交配を行い、うち 15 通りの交配から発眼卵が得られた(表 1、2)。

得られた 40 交雑群の F1 の内、36 群が順調に成長した。

表 1 解析家系の作出結果

(交配の組合せと発眼卵数及び発眼率)

		高温耐性系♀6	高温耐性系♀7	高温耐性系♀8	高温耐性系♀9	高温耐性系♀10
		0201 T06	0217 T07	0250 T08	0214 T09	0243 T10
トナリツナ♀6	D06	214 (70.2%)	438 (93.0%)	111 (18.4%)	170 (43.6%)	283 (74.7%)
トナリツナ♀7	D07	225 (75.0%)	434 (93.1%)	109 (18.5%)	200 (50.9%)	311 (79.9%)
トナリツナ♀8	D08	218 (76.2%)	435 (91.6%)	84 (14.6%)	178 (46.4%)	291 (78.6%)
トナリツナ♀9	D09	225 (74.8%)	404 (87.3%)	86 (14.7%)	126 (32.9%)	319 (83.7%)
トナリツナ♀10	D10	205 (69.0%)	205 (42.1%)	50 (8.7%)	127 (32.1%)	182 (46.7%)

表 2 解析家系の作出結果

(交配の組合せと発眼卵数及び発眼率)

		トナリツナ♀1	トナリツナ♀2	トナリツナ♀3	トナリツナ♀4	トナリツナ♀5
		0271 D01	0242 D02	0253 D03	0270 D04	0226 D05
高温耐性系♂1	T01	176 (19.0%)	27 (2.3%)	638 (82.3%)	0	0
高温耐性系♂2	T02	107 (10.7%)	20 (2.0%)	626 (82.0%)	0	0
高温耐性系♂3	T03	233 (17.6%)	20 (1.6%)	648 (88.7%)	0	0
高温耐性系♂4	T04	218 (23.5%)	18 (1.8%)	653 (89.1%)	0	0
高温耐性系♂5	T05	162 (21.2%)	8 (0.8%)	646 (88.5%)	0	0

(3) 解析家系 F1 の高温耐性評価

高温耐性系と F1 の平衡喪失温度を比較すると、両者に差は認められなかった。

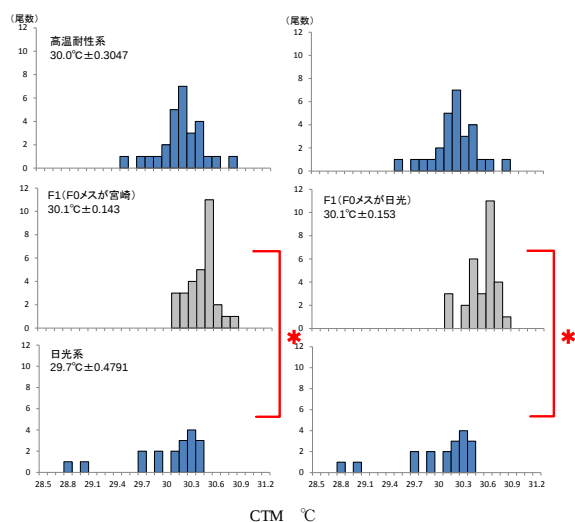


図 2 解析家系 F1 とその親系統 F0 の CTM の比較

しかし、日光系 (29.7°C) と F1 (30.1°C) の間には平衡喪失温度に有意な差が認められた。また、F1 同士の比較では両親(F0)の系統の違いによる差

は認められなかった (図 2)。

(4) 解析家系 F2 の作出

F1 のメス 137 尾、オス 72 尾を用いて採卵を行い、66,388 粒の発眼卵を得た。用いた F1 は 13 群であり、日光系 (F0) のメス親由来の F1 が 5 群、高温耐性系(F0)のメス親由来の F1 が 8 群であった。F1 の同胞及び半同胞の組み合わせであった。

(5) 表現型としての高温耐性の評価法の検討

F2 の平衡喪失時間の分布(図 3)を高温耐性系(図 4)と比較した。F2 の平衡喪失時間は、高温耐性系に比べて長い個体が多く、分布域が広がった。

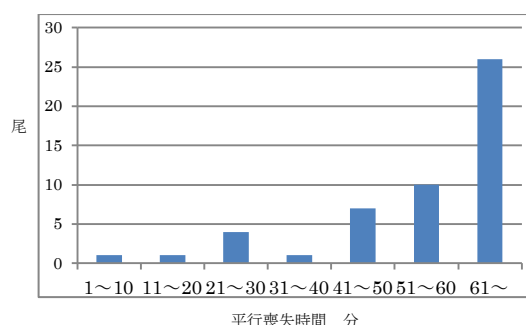


図 3 F2 の平衡喪失時間の分布

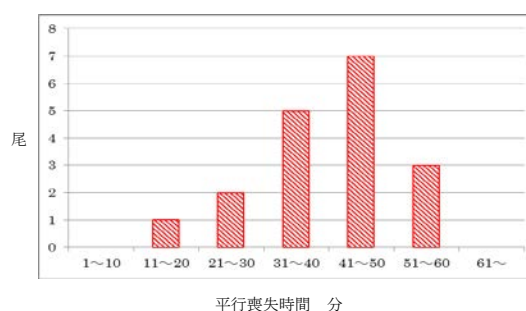


図 4 高温耐性系の平衡喪失時間の分布

高温耐性系(F0)の 1 回目の高温暴露による平衡喪失時間をもとに 30 分未満、30~45 分未満、45~60 分未満、60 分以上の 4 階級に分類し、1 か月後に同様の条件で階級別に 2 回目の平衡喪失時間を測定した。60 分以上の階級では 71%が 1 回目と同じ階級であったが、30 分未満階級では 17%、30~45 分未満階級では 50%、45~60 分未満階級では 29%が 1 回目と同じ階級となり、60 分未満の 3 階級は 2 回目の高温暴露で平衡喪失時間が長くなる傾向を示した(表 3)。

表3 高温暴露による平衡喪失時間の再現性

1回目	平行喪失時間	30分未満	30～45分未満	45～60分未満	60分以上
2回目	1回目と同階級	17%(1/6)	50%(3/6)	29%(2/7)	71%(5/7)
2回目	1回目より早く平行喪失	—	17%(1/6)	14%(1/7)	29%(2/7)
2回目	1回目より遅く平衡喪失	83%(5/6)	33%(2/6)	57%(4/7)	—

(6) F2 の高温耐性評価

図5に示すとおりCTMはF2の2群で日光系より高い個体が現れ、F2のNo.15群では日光系より低い個体が現れた。2群のF2のCTMは、30.2及び30.1℃であった。しかし、各群の間でCTMに差は認められなかった(t検定、 $p>0.05$)

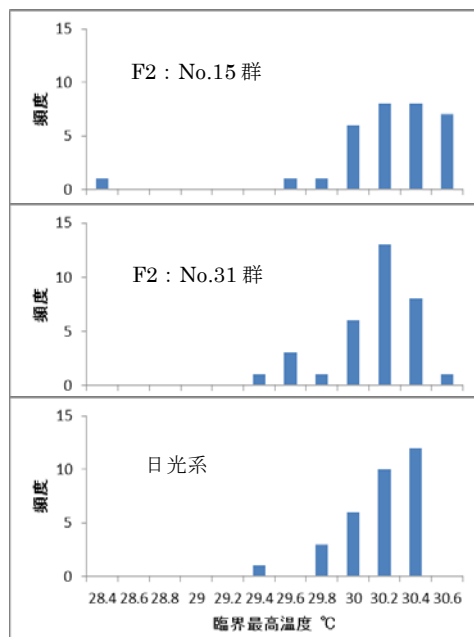


図5 CTMの分布の比較

臨界最高温度はF2の2群で日光系より高い個体が現れ、F2のNo.15群では日光系より低い個体

(7) 表現型の分類と再現性の確認

F2を1,614尾用いて図6のとおり4分類した。0～20分未満が269尾(16%)、20～40分未満が426尾(26.4%)、40～60分未満が567尾(35.1%)、60分以上が362尾(22.4%)であった。

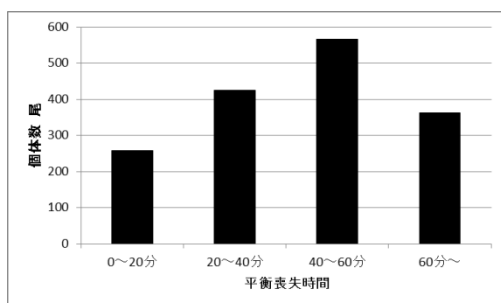


図6 F2の28℃における平衡喪失時間の分布

平衡喪失時間0～20分未満の群を再度高温暴露(2回目)したところ処理後へい死した個体を除いて207尾中118尾(57%)で再現性が確認された(図7)。

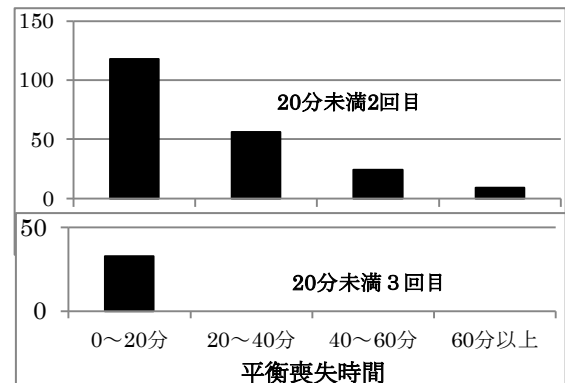


図7 平衡喪失時間20分未満の個体の再現性の確認

再現性があった群の33尾を用いて再々度高温暴露したところ、平衡喪失時間は全個体が0～20分未満であり、再現性(100%)が認められた(図7下)。

また、平衡喪失時間60分以上の群を再度高温暴露すると142尾中124尾(85.5%)が60分以上の平衡喪失時間を示し、高い再現性が認められた(図8)。

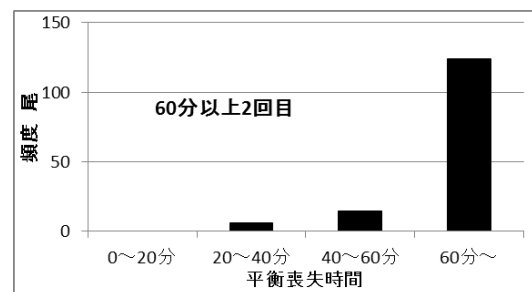


図8 平衡喪失時間60分以上の個体の再現性の確認

エ 考 察

かつて宮崎県で系統保存していたドナルドソン系ニジマスは、29.9℃であった¹⁾ことから、日光系は高温耐性系の比較対象として遜色ないと考えられた。また、15℃で馴致した場合には系統間で差が認められなくなることも過去の実験結果と一致しており、CTMおよびDTによる高温耐性を評価する場合には、供試魚を20℃で馴致する条件で実験を行うことが望ましいと考えられた。

遺伝的に分離した世代を養成するため、高温耐

性を示す高温耐性系と高温に対する耐性が低い日光系を交配して F1 世代を作出した。この F1 の表現型が高温耐性系と日光系の間間的な表現型を示すと予想したが、図 3 に示すように CTM は日光系より高いものの間間的な分布を示さなかった。しかし、CTM の範囲は、F1 で 29.5~30.4℃ であり高温耐性系の 29.1~30.4℃ より狭く、表現型の変異の幅が小さくなったと考えられた。

分離世代には F1 にその親世代 F0 を交配する戻し交配を作出する方法も考えられるが、F1 が成熟し交配に供することができるまでに 2 年を要することから、F0 を確実に保存できないため、兄弟交配(full-sib)及び半兄弟交配(half-sib)²⁾ の F2 を作出した。

2 群の F2 の CTM は、30.2 及び 30.1℃ であり高温耐性系 F0 と同程度であったが、CTM の範囲は 28.3~30.6℃ で高温耐性系 F0 より幅が広がった。これは F2 で表現型の変異が大きくなったためと考えられた。

これまでに高温耐性の評価手法として CTM を用いてきたが、CTM では表現型の差が小さいため分類が難しいことから、平衡喪失時間の長短による分類を行ったところ、凡そ 10~60 分の範囲で個体別に平衡喪失時間を計測できた。また、平衡喪失した個体は速やかに取り上げて飼育水に戻すことで生残するため、28℃ の高温暴露により平衡喪失時間 20 分毎に 4 分類とし、各階級別に再度同じ方法で 4 分類すると非常に高い再現性を示す表現型に分類できた。さらに、表現型の階級分類を行った個体を継続飼育し、次世代を得ることができれば、平衡喪失時間の遺伝率を調べる手法や選抜手法としても利用可能と考えられた。

オ 今後の課題

分離世代として養成した F2 について、QTL 解析を実施するにあたり複数得られた F2 の何れの群を用いるかによって解析の効率が左右されると

考えられる。

CTM の低い系統のニジマスに高温耐性系ニジマスと交配することで、CTM が上昇することが F1 の作出によって分かった。しかし、実際の養殖現場において CTM の差がどの程度高温耐性に反映するか不明である。同様に平衡喪失時間による階級分類についても、この手法により得られた表現型が養殖環境下でも有用な高温耐性の形質となるか検証する必要がある。

カ 要 約

- 1 QTL 解析に用いる解析家系を作出するため水産総合研究センター中央水産研究所日光支所で生産されたドナルドソン系ニジマス（以下「日光系」という。）と青森県内水面研究所で生産されたドナルドソン系ニジマス（以下「青森系」という。）の臨界最高温度（CTM）を比較し、 $29.7 \pm 0.4791^{\circ}\text{C}$ の日光系を対照系群に選んだ。
- 2 高温耐性系と日光系の雌雄 5 尾ずつを総当たり交配し、40 通りの F1 が得られた。
- 3 F1 の CTM は 30.1℃ で日光系 F0 の 29.7℃ より有意に高かった。
- 4 F2 作出に用いた F1 は 13 群であり、日光系(F0)のメス親由来の F1 が 5 群、高温耐性系(F0)のメス親由来の F1 が 8 群であった。
- 5 28℃ の高温暴露による平衡喪失時間をもとに 30 分未満、30~45 分未満、45~60 分未満、60 分以上の 4 階級に分類し、再現性を調べたところ 2 回目の高温暴露では平衡喪失時間が長くなる傾向を示した。
- 6 CTM の範囲は 28.3~30.6℃ で高温耐性系 F0 より幅が広がった。これは F2 で表現型の変異が大きくなったためと考えられた。
- 7 28℃ の高温暴露による平衡喪失時間で 4 分類した群れを再度階級毎に同じ方法で 4 分類すると 0~20 分未満では再現性(100%)が認められ

た。また、60 分以上の群でも 85.5%の高い再現性が認められた。

キ 文献

- 1) Ineno T, Tsuchida S, Kanda M, Watabe S (2005)
High temperature tolerance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* selected by high temperature breeding. *Fish. Sci.* **71**: 767-775.
- 2) 鵜飼保雄 (2001) ゲノムレベルの遺伝解析
MAP と QTL 原著第 2 版. 東京大学出版会.
45-50.

チーム名：ニジマスチーム

担当課題名：ニジマスの高温影響を評価するバイオアッセイ系の開発

研究機関・担当者名：（独）水産総合研究センター中央水産研究所・尾島信彦（045-788-7640、
ojima@affrc.go.jp）・馬久地みゆき・大原一郎

研究期間：平成 21～25 年

ア 研究目的

内水面の主要な養殖対象種であるニジマスは、通常 10～24℃付近の淡水に生息する冷水性魚である。そのため、もし地球温暖化により環境水温が上昇すれば、その成長・繁殖などに影響が及び、生産量が減少する可能性がある。このような背景の下、高水温耐性を有するニジマス系統の作出が望まれている。これまで宮崎県ではニジマスの高水温飼育実験により比較的高水温で養殖できるニジマス系統（高温耐性系）を生産できることを明らかにし^{1, 2)}、東京大学では高温耐性系でミトコンドリアの電子伝達系に関連する遺伝子が特異的に発現していることを見いだしている³⁾。一方、その他の遺伝子の発現特性については未だ不明な点が多く、選抜効果を評価するためには高温耐性系の遺伝的特性を多面的に分析する必要がある。そこで本課題では高水温によって発現が誘導されるニジマス遺伝子に着目し、それら遺伝子産物を特異的に検出・定量できるバイオアッセイ系を開発する。これにより、高温耐性系と標準系ニジマス間で高水温による遺伝子発現変化を比較し、選抜育種の効果を検証することを目的とする。

イ 研究方法

本課題では高温影響を評価するためのマーカー候補遺伝子として、分子シャペロン機能を持ち生物の高水温耐性に関与する熱ショックタンパク質（Heat Shock Proteins、HSP）遺伝子に着目した。最初に、これら遺伝子の翻訳産物であるタンパク質群を特異的に検出可能とするため、ニジマス Hsp70、Hsc70、Hsp47、Hsp27 の演繹アミノ酸配列に基づき、抗原として用いるペプチドを設計した。これらペプチドを化学合成してキャリアタン

パク質（ヘモシアニン）に結合させ、それぞれウサギに免疫して抗血清を得た。また、その他の HSP や分子シャペロンも検出して分析するため、主に哺乳類の分析用に市販されている抗体（抗 Hsp90、Hsp60、Hsp47、Hsp40、Hsp30、Hsp25、Hsp10、Grp94、Grp78、Grp75 抗体）を入手した。各抗血清や抗体の目的遺伝子産物に対する結合特異性はウェスタンブロット法により評価した。分析用の試料として、ニジマス RTgill-W1 培養細胞から抽出した総タンパク質を用いた。RTgill-W1 細胞は 18℃で培養し、高温処理（28℃、1 時間→18℃、5 時間）を行った。また、ヒト HeLa 細胞から抽出した総タンパク質を比較用として用いた。市販の抗体で検出できなかった HSP については、上述の方法により新規に抗体を作製した。

次に、培養細胞を用いてバイオアッセイ系の構築と最適化を試みた。18℃で培養したニジマス RTgill-W1 細胞を異なる温度（21、24、28、32℃）に 1 時間曝露したのち、18℃に戻して 5 時間培養した。これらの細胞から総タンパク質を抽出し、高温処理により顕著な発現誘導が観察された Hsp70、Hsp40 および Hsp30 を中心に 7 種類の HSP 蓄積量をウェスタンブロット法により分析した。28℃に 24 時間曝露し、経時的にサンプリングした RTgill-W1 細胞においても、同様に HSP の検出を行った。

続いて、培養細胞を用いて構築したアッセイ系の個体への適用可能性について検討した。水温 17℃で飼育された宮崎系♀×長野系♂の F2 稚魚（宮崎県で作出）を 28℃の高温接触試験に供し、平衡喪失までの時間が 30 分未満の個体群（低耐性群）と 60 分以上の個体群（高耐性群）の 2 群に分けた。両群の個体とも水温 17℃で 1 週間以上飼育して定

常状態に回復させた後、26℃の水温に3時間接触させ、尾鰭の一部を切除して Allprotect Tissue Reagent (キアゲン社) に浸漬した。尾鰭の採取は各群からそれぞれ6個体ずつ(対照3個体、高温接触3個体)の計12個体から行った。これらの尾鰭試料から総タンパク質を抽出し、抗 HSP 抗体を用いてウェスタンブロット法により各タンパク質を検出した。

宮崎県水産試験場小林分場において水温 17℃で飼育されたドナルドソン系ニジマスと高温耐性系ニジマス各 10 個体から尾鰭の一部を切除して Allprotect Tissue Reagent (キアゲン社) に浸漬した。これら尾鰭から総タンパク質および全 RNA を抽出した。先の実験において高水温耐性をもつ F2 稚魚で発現量が多かった HSP70、HSP60、HSP40 および定常的発現型 HSP である HSC70 の発現量をウェスタンブロット法により分析した。また、全 RNA を DNase 処理した後 cDNA を合成し、これを鋳型としてリアルタイム PCR 法により7種類の遺伝子(ATPase 6、COX II、HSC70、HSP70、HSP60-1、HSP60-2、HSP40)の転写産物(mRNA)量を定量した。その際、 β -アクチン遺伝子を内部標準として用いた。

最後に、尾鰭試料と抗 HSP70 抗体を用いたアッセイの妥当性について確認実験を行った。先に実施したバイオアッセイの結果に基づき、定常温度下で飼育された高温耐性(宮崎)系ニジマスの尾鰭において HSP70 の検出量が多い個体と少ない個体を選定した。これらの尾鰭から全 RNA を抽出し、GeneRacer キット(ライフテクノロジーズ社)を用いて完全長 cDNA を合成した。本 cDNA を鋳型とし、高正確性 PCR 酵素 KOD -Plus- Neo (東洋紡)を用いて 3'-RACE 法により HSP70 遺伝子断片を増幅した。これら断片をプラスミドベクターにサブクローニングした後、各個体からそれぞれ 24 クローン(計 48 クローン)を単離し、各塩基配列をサンガー法により決定した。得られた cDNA 配列に基づいて HSP70 のアミノ酸配列を

演繹し、HSP70 の検出量が多かった個体と少なかった個体との間でアミノ酸配列を比較した。

高温耐性系ニジマスをおイゲノール(FA100)麻酔下で解剖して脳、鰓、心臓、肝臓、筋肉(普通筋)および尾鰭の各組織を採取し、直ちに Allprotect Tissue Reagent(キアゲン社)に浸漬した。また、宮崎県水産試験場小林分場から、高温耐性系 30 個体の尾鰭[RNAlater(ライフテクノロジーズ社)浸漬]試料の供与を受けた。これら試料から AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit(キアゲン社)および NucleoSpin TriPrep(マッハライ・ナーゲル社)を用いてタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により HSP70 および HSC70 を検出した。

ウ 研究結果

ウェスタンブロット分析の結果、新たに作製した4種類の抗血清のうち、抗 HSP70 および抗 HSC70 抗血清において分子量約 70 kDa の特異的なバンドが検出された(図1)。市販の抗 HSP70/HSC70 抗体(HSP70 と HSC70 を区別できない抗体)と比較した結果、今回新たに作製した抗血清2種は HSP70 と HSC70 を区別して検出できることが示唆された(図1)。

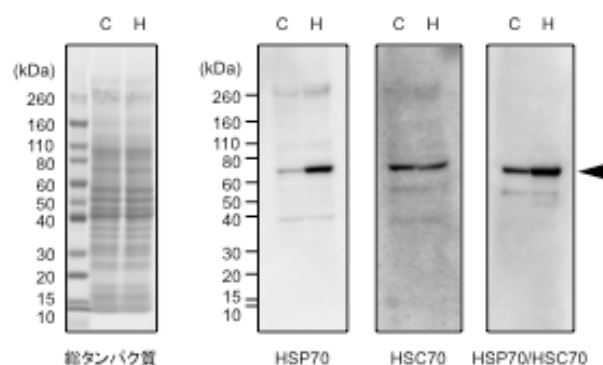


図1 ニジマス HSP70 および HSC70 の検出

C : 対照(18℃)、H : 高温処理(28℃、1時間→18℃、5時間)

市販抗体の結合特異性をウェスタンブロット法で分析した結果、ニジマス試料で HSP40 の特異的なバンドが検出され、その発現は高温で顕著に誘

導されることがわかった（図 2）。HSP90 については、新規に入手した抗体のうちの一種類で強いシグナルが検出された（図 2）。また、サケ科の HSP70 を特異的に検出可能とされている市販抗体では、対照群でも HSC70 と考えられるバンドが検出され、本抗体は真に HSP70 特異的な抗体ではないことが示唆された（図 2）。新規に作製した抗血清により、Grp75、Hsp47 のバンドが新たに検出され、また市販の抗体で Hsp30 のシグナルも検出された（データ未掲載）。

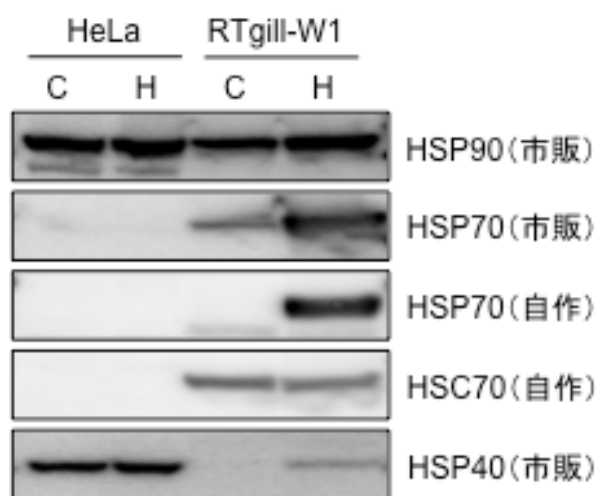


図 2 市販および自作抗体を用いた HSP の検出
C : 対照 (18℃)、H : 高温処理 (28℃、1 時間→18℃、5 時間)

以上の結果、ニジマスにおいて Hsp90、Grp75、Hsp70、Hsc70、Hsp60、Hsp47、Hsp40、Hsp30 の 8 種類のタンパク質を個別に検出することが可能となった。

ニジマス RTgill-W1 細胞を異なる温度に曝露した結果、28℃において Hsp70、Hsp40、Hsp30 の顕著な蓄積が観察された（図 3A）。蓄積量が特に顕著であった Hsp70 と Hsp30 を 28℃に曝露した RTgill-W1 細胞で経時的に検出したところ、いずれも曝露 3 時間後から蓄積が観察され、その量は次第に増加する傾向が見られた（図 3B）。これらのモデルアッセイ系による結果と宮崎県で行われた予備実験の結果に基づき、個体レベルでのアッ

セイ系では 26℃の水温に 3 時間接触させる条件を選定した。また、Allprotect Tissue Reagent（キアゲン社）に浸漬した尾鰭サンプルから特に問題なく総タンパク質を抽出することができたため、本タンパク質を用いて個体レベルのアッセイを行った。

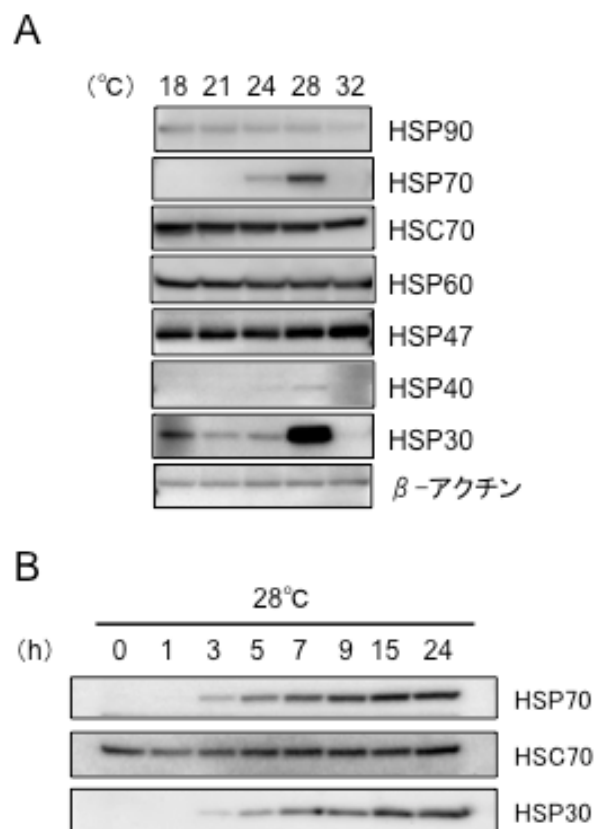


図 3 曝露温度 (A) および時間 (B) の変化に伴う HSP 蓄積量の変化

高温耐性（宮崎）系♀×標準（長野）系♂の F2 稚魚のうち、高水温に対する低耐性群と高耐性群との間で定常状態（17℃）における HSP 量を比較したところ、高耐性群にのみ HSP70 の蓄積が検出された（図 4）。また、HSP60 と HSP40 の蓄積量にも統計的に有意な差 ($P < 0.05$) が認められた。一方、高温接触後における HSP 量を同様に 2 群間で比較したところ、HSC70 の蓄積量に有意な差 ($P < 0.05$) がみられ、高耐性群における HSC70 の蓄積量は低耐性群よりも少ないことが示唆された。上記以外の HSP の蓄積量は個体によるばらつきがあり、統計的に有意な差は検出されなかった。

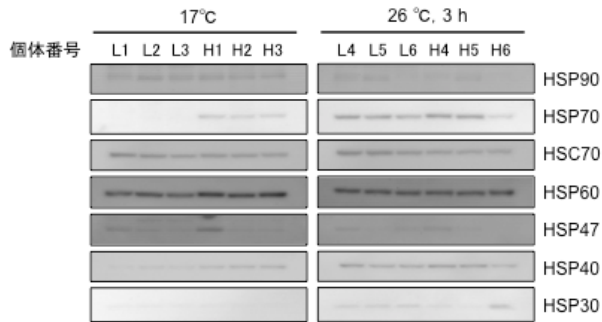


図4 F2 稚魚の尾鰭における HSP 蓄積量の分析
L1-6：低耐性個体、H1-6：高耐性個体

定常飼育温度（17℃）下のドナルドソン系 5 個体および高温耐性（宮崎）系 5 個体の尾鰭における HSP 量をウェスタンブロット分析により比較したところ、HSP70 の蓄積がドナルドソン系では全く検出されず、高温耐性系では 4 個体で検出された（図 5）。この結果は、先の結果（宮崎系♀×長野系♂の F2 稚魚における高水温に対する低耐性群と高耐性群との比較結果）と類似していた。HSC70 と HSP60 の蓄積量については個体間でばらつきが観察されたものの、両系統間では明瞭な違いは見出されなかった（図 5）。HSP40 については高温耐性系において 2 つのバンドが検出され、うち高分子量側のバンドはドナルドソン系では検出されなかった（図 5）。

ドナルドソン系 6 個体と高温耐性系 6 個体の尾鰭における遺伝子 7 種類の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により定量比較したところ、高温耐性系における HSP70 の mRNA 量はドナルドソン系の約 1.8 倍であり、統計的にも有意な差であった（ $P < 0.05$ ；図 6）。同様に、高温耐性系における HSP60-1 と HSP60-2 の mRNA 量はそれぞれドナルドソン系の約 2.1 倍と約 2.0 倍であり、統計的に有意な差であった（ $P < 0.05$ ；図 6）。一方、ATPase 6、COX II、HSC70、HSP40 については両系統間で有意な差は検出されなかった（図 6）。

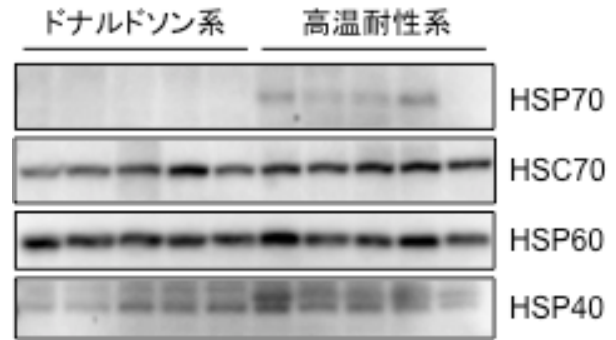


図5 ドナルドソン系と高温耐性系における HSP 蓄積量の比較

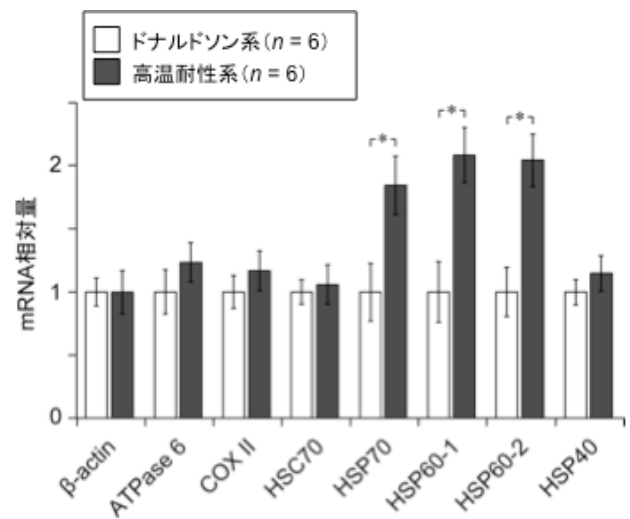


図6 尾鰭における HSP mRNA の相対定量
内部標準遺伝子：β-アクチン。ドナルドソン系における各遺伝子 mRNA 量を 1 とし、平均値±標準誤差で表示。

高温耐性系のうち HSP70 の検出量が多い個体と少ない個体とで同タンパク質の演繹アミノ酸配列を比較した結果、本課題の自作抗体が認識する部位のアミノ酸配列は、配列が確定された両個体由来の 46 クローンで全て同一であった（データ未掲載）。このことから、本課題のアッセイ系による HSP70 検出量の多寡は、アミノ酸配列多型による抗体結合能の違いではなく、HSP70 蓄積量の違いを反映しているものと考えられた。この結果を受け、宮崎県水産試験場から供与を受けた高温耐性系 10 個体の尾鰭でアッセイを行ったところ、全

ての個体で定常飼育温度下における HSP70 の蓄積が検出されたが、その蓄積量は個体によって顕著に異なっていた (図 7A)。また、高温耐性系ニジマスから採取した 6 組織のウェスタンブロット分析を行った結果、尾鰭以外の組織でも定常飼育温度下で HSP70 の蓄積が検出された (図 7B)。その蓄積量は組織間で顕著に異なっていたが、尾鰭組織には検出に十分な量の HSP70 が蓄積していた (図 7B)。

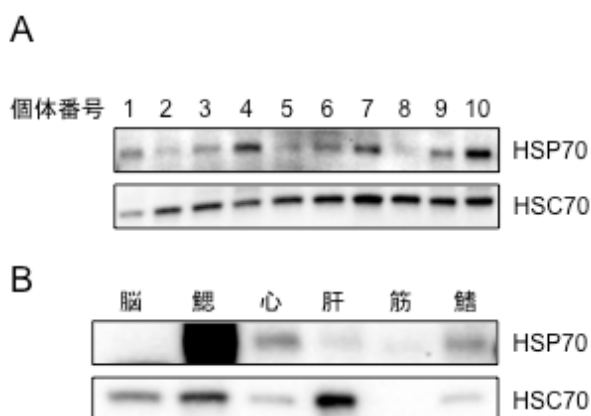


図 7 高温耐性系における HSP70 および HSC70 蓄積量の個体間差 (A) および組織間差 (B)

一方、2012 年度産の高温耐性系 30 個体では HSC70 のバンドは検出されたが、HSP70 の明瞭なバンドは検出されなかった (図 8)。この結果は、ドナルドソン系♀×高温耐性系♂の F2 の一群で得られた結果と類似していた (データ未掲載)。

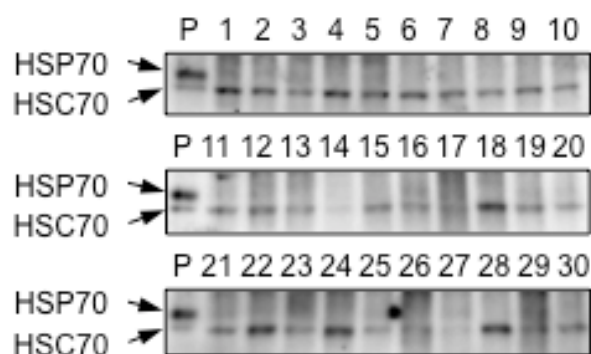


図 8 高温耐性系 (2012 年度産) 尾鰭における HSP70 および HSC70 の検出
P : 陽性対照 (HSP70 恒常発現型の高温耐性系尾鰭)。数字は個体番号。

エ 考 察

本課題の成果として、ニジマスの尾鰭試料を用いて高温影響を評価するバイオアッセイ系が確立された。また、本アッセイ系を活用し、HSP70 の恒常的発現を指標とすることによって高温耐性 (宮崎) 系の選抜効果が確認された。

本課題の結果から、高温耐性を有するニジマス個体においては HSP70 が恒常的に発現していることが示唆された。また、高温耐性 (宮崎) 系♀×標準 (長野) 系♂の F2 稚魚のうち、高温に対する高耐性個体においては、低耐性個体よりも HSP60 および HSP40 蓄積量の増加が認められた⁴⁾。同様に、鰓組織における HSP70 と HSP40 の mRNA 蓄積量 (特に HSP70 mRNA の蓄積量) がドナルドソン系よりも高温耐性系で顕著に多いことが東京大学の成果として明らかになっている⁵⁾。HSP70、HSP60、HSP40 は HSP ファミリーの中でタンパク質の高次構造形成の介助に最も関与することが知られている⁶⁾ことから、高温耐性個体ではこれら HSP の蓄積量を恒常的に増大させることにより、細胞内タンパク質の熱変性を抑制したり修復したりする能力が通常個体より高まっていると考えられる。また、高温耐性系と F2 稚魚 (高耐性個体) で HSP70 の恒常的発現が共通に観察されたことから、F2 稚魚の高耐性個体は高温耐性系の形質を遺伝的に受け継いだことが示唆される。

一方、尾鰭においては HSP70 の mRNA 量はタンパク質量ほど顕著な差異が検出されなかったことから、HSP70 を高水温耐性の分子マーカーとして利用する際にはその mRNA よりもタンパク質を検出する方がより適切であると考えられる。また、高温耐性系から採取された尾鰭組織には検出に十分な量の HSP70 が蓄積していたことから、尾鰭片を用いた HSP70 蓄積量の分析が有効であることが確認された。このように尾鰭試料を用いることにより個体を殺さずに HSP 蓄積量を分析可能であることから、本課題で構築したアッセイ系は高温耐性をもつ個体の選抜に有用であると考え

られる。

オ 今後の課題

高温耐性形質は複数の遺伝子が関与する量的形質であると考えられることから、生物の高温耐性を向上させる機構は複数存在する可能性がある。ニジマスにおいても HSP70 の恒常発現以外に高温耐性を向上させる機構が存在する可能性が本課題の結果から示唆されている。

育種においては形質間のトレードオフ（ある形質を向上させると別の形質が低下する）が問題となることがしばしばあるため、複数の異なる系統を準備するという意味で、別の高温耐性機構についても今後の研究の進展が望まれる。

カ 要 約

本課題の目的は、分子シャペロン HSP を特異的に検出・定量できるバイオアッセイ系を開発し、高温耐性系ニジマスの選抜効果を検証することである。そこで、各種 HSP を特異的に検出できる抗体を作製あるいは入手し、ニジマス培養細胞を用いてアッセイ系の構築と最適化を行った。さらに尾鰭試料を用いた個体のアッセイ系を確立した。その結果、高温耐性系における HSP70 の恒常的発現を見出し、その選抜効果が確認された。個体を殺さずに HSP 量を分析できる本アッセイ系は、高温耐性ニジマスの選抜に有用であると考えられる。

キ 文献

- 1) Ineno T, Tsuchida S, Kanda M, Watabe S. (2005). Thermal tolerance of a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* strain selected by high-temperature breeding. Fish. Sci., 71:767–775.
- 2) Ineno T, Endo M, Watabe S. (2008). Differences in self-feeding activity between thermally selected and normal strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at high temperatures. Fish. Sci., 74:372–379.
- 3) Ikeguchi K, Ineno T, Itoi S, Kondo H, Kinoshita S, Watabe S. (2006). Increased levels of mitochondrial gene transcripts in the thermally selected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strain during embryonic development. Mar. Biotechnol., 8:178–188.
- 4) Ojima N, Mekuchi M, Ineno T, Tamaki K, Kera A, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S. (2012). Differential expression of heat-shock proteins in F2 offspring from F1 hybrids produced between thermally selected and normal rainbow trout strains. Fish. Sci., 78:1051–1057.
- 5) Tan E, Wongwarangkana C, Kinoshita S, Suzuki Y, Oshima K, Hattori M, Ineno T, Tamaki K, Kera A, Muto K, Yada T, Kitamura S, Asakawa S, Watabe S. (2012). Global gene expression analysis of gill tissues from normal and thermally selected strains of rainbow trout. Fish Sci., 78:1041–1049.
- 6) Fink A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev., 79:425–449.

3. アマノリチーム課題別研究成果

- 1) 南方系アマノリ類野生種等の高水温耐性に関する特性評価・・・・・・・・・・・・・・ 44
(西海区水産研究所)
- 2) アマノリ類の短期的高水温耐性に関与する遺伝子の探索と解析・・・・・・・・・・・・ 49
(中央水産研究所・千葉県水産総合研究センター)
- 3) アマノリ類の長期的高水温耐性及び適応に関与する遺伝子の探索・・・・・・・・・・・・ 55
(三重大学・三重県水産研究所)

チーム名：ノリチーム

担当課題名：南方系アマノリ類野生種等の高水温耐性に関する特性評価

研究機関・担当者名：（独）水産総合研究センター西海区水産研究所・資源生産部・藻類グループ・玉城泉也（095-860-1600, tama242@affrc.go.jp）・藤吉栄次、中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・機能研究グループ・小林正裕

研究期間：平成 21～23 年

ア 研究目的

地球温暖化の進行が予測される中、海洋環境等への深刻な影響が懸念されている。ノリ養殖業においても平成 19 年度漁期当初の高水温の影響で漁期開始が一ヶ月近く遅れた事例があり、温暖化の進行に伴う今後の影響が懸念されている。このため、DNA マーカー等のゲノム情報を活用して短期間で効率的に高水温耐性等の優良な形質を評価し、選抜や交雑等によりこれらの影響を回避できる養殖品種を開発することで養殖業への影響を最小限に止めることが必要である。しかし現在のノリ養殖品種は長年の選抜により遺伝的多様性が減少しているとみられており、高水温耐性を有する養殖品種は開発途上である。そこで、遺伝的多様性と高水温耐性をともに有していることが期待される南方系アマノリ類野生種を用いて高水温耐性の特性評価試験を行った。

イ 研究方法

平成 21 年度は、本州から沖縄諸島の岩礁域等に広く生育し、同一種内での生息地による高水温耐性の差異を比較する上で適切と考えられたマルバアマノリについて、国内 4 産地（岩手、長崎、鹿児島および沖縄県）由来の各株の培養を行った。平成 22 年度は、九州西岸から南西諸島に至る西日本各地に生育し、マルバアマノリより高水温耐性を有することが期待されるツクシアマノリについて、国内 4 産地（石川、山口、鹿児島および沖縄県）由来の各株の培養を行った。平成 23 年度は、マルバアマノリやツクシアマノリと同様に九州西岸から南西諸島に至る西日本各地に生育し、高水温耐性を有することが期待されるタネガシマアマ

ノリについて、国内 3 産地（島根、長崎および鹿

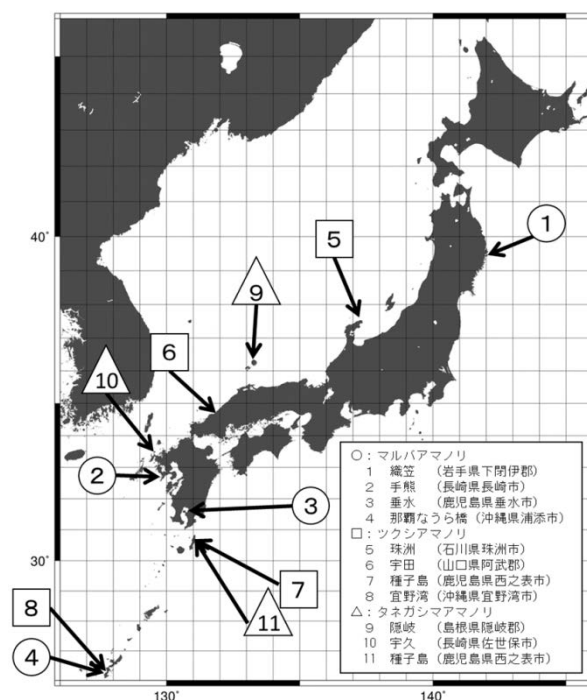


図 1 供試株の採集場所

児島県）由来の各株の培養を行った。各株の採集場所を図 1 に記す。これらの場所で採集し、冷凍保存した葉状体を解凍後、培養し、単胞子をビニロン単系に採苗して以下の培養試験に供した。

培養試験は、各株とも 15℃、20℃、25℃および 30℃の 4 水温区で実施し、各株の生長と単胞子放出の有無を調べ、生育適水温及び高水温耐性の差異について確認した。生育の指標として葉長を用い、1 週間毎の培養液の換水時にあわせて葉長の計測を実施した。培養液は塩分 30 psu に調整した 1/10 SWM-III¹⁾ 海水補強培地を用い、光量 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、短日条件（10 時間明期：14 時間暗期）で 63～84 日間の培養を行った。

表 1 PCR およびシーケンシングに使用したプライマーの配列

#は PCR に、*はシーケンシングに使用した

プライマー名	塩基配列 (5'側から 3'側に向けて表記)	出典
F-50 *#	AATGGTATAAACAACGCAAAAGA	樽田ほか(2007) ²⁾
F495 *	ATGGACAAATTTGGCAGACC	玉城ほか(2012) ³⁾
F963 *	GCGTATGGCAGGTGTTGAC	玉城ほか(2012)
R297 *	ATCAGCAACATTTGGCACTG	玉城ほか(2012)
R753 *	GCTCTTTCATACATATCTTCC	Hommersand et al. (1994) ⁴⁾
R1172 *	TGCATTTGACCAGCATGAAT	玉城ほか(2012)
R1938 #	CTAGCTCCTTCAGGCTT	樽田ほか(2007)

これらと併せて、実験に供試した 3 種計 11 株について、葉緑体 DNA の RuBisCO 領域 L サブユニットの塩基配列を調べ、それぞれの種に属することを確認した。各株の葉状体（湿重量約 100 mg）から ISOPLANT II（（株）ニッポンジーン）を用いて DNA を抽出し、玉城ほか（2012）³⁾に従い TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ（株））と表 1 に示す F-50 および R1938 の 2 本のプライマーを用いて PCR を行い、RuBisCO 領域の増幅を行うとともに、表 1 に示したシーケンシング用プライマーを用いて RuBisCO 領域 L サブユニットのシーケンシング反応を行い、マルバアマノリおよびタネガシマアマノリについては 1467 塩基、ツクシアマノリについては 1461 塩基の配列を決定した。

また、GenBank 上に存在するアマノリ属の情報のうち、rbcL 先端部からの配列情報が揃っているマルバアマノリ、スサビノリ、アサクサノリ、カイガラアマノリ、ソメワケアマノリ、ウップルイノリ、ダンシサイ、オニアマノリ、*Porphyra purpurea* および *Porphyra umbilicalis* の計 10 種の RuBisCO 領域 L サブユニットの塩基配列情報も合わせ、MEGA 5⁵⁾ を用いて各塩基配列のアラインメントを行った。塩基欠失箇所を取り除いた後、Maximum Composite Likelihood Method⁶⁾により遺伝学的距離を求め、近隣結合法⁷⁾による分子系統樹の作成を行った。枝の信頼性の検定には、ブー

トストラップ法⁸⁾ (1000 回) を用いた。

ウ 研究結果

マルバアマノリについては、織笠（岩手県）及び手熊（長崎県）両株については、15℃区で最も生長が良く、20℃区はその次に良好であったが、25℃以上では葉体縁辺部から単胞子の放出（図 2 右）がみられ、葉体はほとんど生長しなかった（図 1）。これに対し垂水（鹿児島県）株は 15℃・20℃で順調に生育、25℃区はその半分程度の生長を示し、30℃でほとんど生長しなかった。供試株中最も南方由来の那覇なうら橋（沖縄県）株は 15℃・20℃・25℃区で順調に生育し、30℃ではほとんど生長しないことを確認した。

ツクシアマノリについては、珠洲（石川県）から宜野湾（沖縄県）の国内 4 産地由来の各株の 15℃～25℃における最大葉長は 25℃≥20℃≥15℃の順となり、高水温ほど良好に生長した（図 2）。また 30℃区では珠洲（石川県）株は単胞子放出が著しくほとんど生長しなかったのに対して、宇田（山口県）株は約 20 mm、種子島（鹿児島県）及び宜野湾（沖縄県）両株は約 50 mm まで生長した。ツクシアマノリは、25℃区において株間で差異が見られたマルバアマノリよりも高い、30℃区において株間で生長に差異がみられた。

タネガシマアマノリについては、国内3産地（隠岐（島根県）、宇久（長崎県）及び種子島（鹿児島県））由来の各株について生長性を比較した結果、隠岐（島根県）及び宇久（長崎県）両株は30℃区では葉体縁辺部から大量の単胞子を放出し、葉長1mm未満でほとんど生長しなかったのに対して、種子島（鹿児島県）株は同様に単胞子を放出したものの、約20mmまで生長し（図2）、ツクシアマノリと同様に30℃区において株間で生長に差異がみられることが明らかになった。

また、これらの供試株について葉緑体DNA RuBisCO領域Lサブユニットの塩基配列を調べた結果、マルバアマノリ織笠（岩手県）、手熊（長崎県）、垂水（鹿児島県）および那覇なうら橋（沖縄県）の4株については既往のマルバアマノリと、ツクシアマノリ珠洲（石川県）、宇田（山口県）、種子島（鹿児島県）および宜野湾（沖縄県）の4株はツクシアマノリ副基準標本の配列と相同性が高く、樹形図においても他種とは離れた位置にそれぞれ単一の群を形成し、株間の違いが小さかった。また、タネガシマアマノリ隠岐（島根県）、宇久（長崎県）および種子島（鹿児島県）の3株については、マルバアマノリよりツクシアマノリにやや近い位置に3株が単一の群を形成し、株間の違いが小さかった（図3）。これらのことから、今回使用した各株はそれぞれマルバアマノリ、ツクシアマノリおよびタネガシマアマノリに属することを確認した。

エ 考 察

異なる産地由来のアマノリ葉状体を室内培養し生育的水温を調べた例としては、Monotilla and Notoya (2004)⁹⁾による国内外5産地のマルバアマノリの培養試験が挙げられる。韓国統営市産株は10℃と15℃で、神奈川県産および鹿児島県産の株は10℃、15℃および20℃でそれぞれ良好に生長し、葉長約50mmの葉状体となることを明らかにしている。また、中国汕尾市産およびフィリピン産株

は20℃と25℃で30~50mmの葉状体となり、30℃でも葉長3~4mmに達することを示している。本事業において試験したマルバアマノリについても、株により生長に違いがみられたことから、生育適水温が異なることが示唆された。

また、ツクシアマノリとタネガシマアマノリは25℃でも良好に生長し、30℃でも株によってはマルバアマノリより大型の20~50mmまで生長したことから、これらの2種はマルバアマノリと比較して高水温への耐性がより強いものと考えられる。

以上より、本事業で培養試験を実施した南方系アマノリ類3種は、南方由来の株ほど高水温耐性を有していることから、野生株の遺伝資源としての重要性が示された。

オ 今後の課題

今回研究対象とした野生種3種だけでなく、スサビノリについても同様に、産地によって高水温耐性等の特性に差異がみられる可能性が考えられることから、野生株の採集と培養試験による特性評価を今後行う必要がある。

カ 要 約

高水温耐性を有することが期待される南方系アマノリ類野生種としてマルバアマノリ、ツクシアマノリおよびタネガシマアマノリ葉状体の培養試験を行い、既存のスサビノリ養殖品種が正常に生長しない25℃においても一部の株は良好に生長した。また、マルバアマノリは25℃で、ツクシアマノリおよびタネガシマアマノリは30℃において株により生長に違いがみられたことから、生育適水温が株によって異なる可能性が示唆され、野生株の遺伝資源としての重要性が示された。

キ 文献

- 1) Fujiyoshi E and Kikuchi N (2006) Growth of excised pieces containing elongated denticles from the lower marginal parts of *Porphyra tanegashimensis* and *P. haitanensis* gametophytes. *Bull. Fish. Res. Agen.* 16: 9-13.
- 2) 樽田真依ら (2007) アマノリ属植物の SSU rRNA 遺伝子と RuBisCO 遺伝子領域の解析による類縁関係の推定と種同定法の開発. 海苔と海藻 73: 1-42.
- 3) 玉城泉也ら (2012) 沖縄県宜野湾市にて採集したツクシアマノリ葉状体の形態的特徴と分子生物学的解析. 沖縄生物学会誌 50: 1-15.
- 4) Hommersand MH et al. (1994) Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinales (Gigartinales, Rhodophyta) based on sequence analysis of rbcL. *Bot. Mar.* 37: 193-203.
- 5) Tamura K et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- 6) Tamura K et al. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 11030-11035.
- 7) Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighborjoining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 8) Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- 9) Monotilla DW and Notoya M (2004) Morphological and physiological responses of

Porphyra suborbiculata Kjellman (Bangiales, Rhodophyta) blades from five localities. *Bot. Mar.* 47: 323-334.

チーム名：アマノリチーム

担当課題名：アマノリ類の短期的高水温耐性に関与する遺伝子の探索と解析

研究機関・担当者名：（独）水産総合研究センター中央水産研究所・尾島信彦（045-788-7640、ojima@affrc.go.jp）、馬久地みゆき、小林正裕、千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所・島田裕至、林俊裕、鳥羽光晴

研究期間：平成 21～25 年

ア 研究目的

アマノリ類は、通常、水温 11～21℃付近の水域に分布しており、もし地球温暖化により海水温が上昇すれば、その生育・収穫等に影響が及び、ノリの生産量が減少するおそれがある。近年、ノリ養殖の現場では水温の上昇による養殖漁期の短縮化が実際に問題となっており、高水温に対して耐性を有するアマノリ類の作出が望まれている。一方、生物の高水温耐性を評価するためには、持続的な水温（週・月単位）に対する耐性と、一過的な高水温（時間・日単位）に対する耐性の二つの観点からアプローチする必要がある。そこで本研究では後者の観点からアマノリ類の高水温耐性に関与する遺伝子を探索し、その候補遺伝子の構造等を解明する。これによりノリが高水温耐性の遺伝的形質をもつのかを明らかにし、高水温耐性を有するノリの育種に有用な遺伝子情報を得ることを目的とする。

イ 研究方法

本課題の開始時点では、ノリが高水温に対する何らかの防御機構を遺伝的にもつのか自体が不明であった。もしノリがそのような機構をもっていれば、高水温下で誘導的に発現するタンパク質（遺伝子）が存在することが予想される。そこで、まずは高水温処理したノリ葉状体において蓄積量が増大するタンパク質が存在するか否かを調べた。室内培養したスサビノリ U-51 株の葉状体を液体窒素で凍結させ、3 種類の方法（乳鉢あるいは凍結粉碎器具（SK ミル）による粉碎法、およびホモジナイザーによる破碎法）によりタンパク質を抽出した。本タンパク質を SDS-PAGE 法により分析

した。17℃で培養した U-51 株の葉状体を水温 27℃に曝露して 24 時間まで経時的にサンプリングし、液体窒素で急速凍結した。凍結したサンプルを SK ミルで粉碎し、0.05 M トリス塩酸バッファー（pH7.5）でタンパク質を抽出した。本タンパク質を SDS-PAGE 法により分析した。

次に、遠隔地から輸送されたノリからでも安定的に RNA 等を抽出可能とするため、葉状体のサンプリング方法について検討した。17℃で培養した U-51 株を対照群とし、27℃で 24 時間培養した同株を高水温曝露群としてノリ葉状体試料が西海区水産研究所で調製された。葉状体は RNeasy（ライフテクノロジーズ社）に浸漬後、RNA 等の抽出まで 4℃で保存した。本葉状体から polyA RNA を抽出して cDNA を合成した後、高水温曝露群で特異的に発現する遺伝子を濃縮する目的でサブトラクト cDNA ライブラリーを作製した。国際塩基配列データベースに登録されているノリ EST 配列等に基づいてプライマーを設計し、作製した cDNA を鋳型として PCR 法により Actin、GAPDH、Hsp70、Hsp20 各遺伝子ホモログ断片の増幅を試みた。また増幅された断片の塩基配列を決定した。RNeasy に浸漬された葉状体のタンパク質分析を行うため、タンパク質抽出法の改良を試みた。タンパク質抽出試薬（P-PER；サーモフィッシャー社）を用いて葉状体からタンパク質を抽出し、2-D Clean-Up キット（GE ヘルスケア社）で不純物を除去したのち超遠心によりタンパク質サンプルを調製した。本サンプルを二次元電気泳動法により分析した。

高水温耐性のマーカー候補遺伝子を探索するため、本課題で作製したサブトラクト cDNA ライブ

ラリーからランダムに 102 個のクローンを選択し、5'末端側から部分塩基配列を決定した。これらの配列をクエリーとし、NCBI の BLAST 検索により各クローンがコードする遺伝子の同定を試みた。17℃で培養したスサビノリ U-51（対照株）および MCF1（高水温選抜株；千葉県で作出）を 27℃の水温に 24 時間曝露した。各葉状体から全 RNA を抽出し、DNase 処理したのち cDNA を合成した。Hsp20 ホモログおよび内部標準遺伝子 GAPDH を含む 12 種類の遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計し、合成した cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR 法により各遺伝子 mRNA の相対量を測定した。供試株の高水温耐性を調べるため、U-51 および MCF1 を水温 18、22、24 および 26℃の 4 区で 14 日間培養し、高水温障害（多層化）が生じた葉状体の発生率を指標にして高水温耐性を評価した。水温以外の培養条件は全ての試験区で同一とした。

続いて、高水温曝露からの回復培養前後における遺伝子発現変化を分析した。千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所において、スサビノリ U-51 および MCF1 を 17℃で培養した後 27℃で 24 時間処理（高水温曝露）し、17℃に戻して 13 日間回復培養した。得られた葉状体を RNeasy に浸漬し、本サンプルから全 RNA を抽出して DNase 処理した後 cDNA を合成した。本 cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR 法により 4 種類の遺伝子（遺伝子 H、I、Hsp20、フィコエリトリン）の mRNA 量を定量した。その際 GAPDH 遺伝子を内部標準として用いた。また、高水温曝露直後および回復培養後における葉状体の多層化状態や生長等について株間で比較した。

最終的に、スサビノリ U-51 および MCF1 における遺伝子発現データを総合的に再検討し、高水温耐性マーカー候補となる遺伝子を追加探索した。高水温耐性が異なることが報告されている養殖ノリ品種 6 種類を千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所において室内培養し、高水温に曝露

する実験を行った。これらの葉状体から全 RNA を抽出し、高水温耐性マーカー候補遺伝子の発現量を定量して品種間で比較した。また、高水温曝露後の各品種の死細胞数を計測した。

ウ 研究結果

ノリ葉状体からのタンパク質抽出法として 3 種類の方法を試みた結果、いずれの方法でも SDS-PAGE 法で分析可能な品質のタンパク質が抽出できた。水温 27℃に曝露した U-51 葉状体のタンパク質を SDS-PAGE 法で分析した結果、時間の経過に伴い、分子量 90 kDa 付近、70 kDa 付近および 38 kDa 付近のタンパク質など、複数種のタンパク質蓄積量が増加した（図 1）。増加したタンパク質のバンドは高水温曝露後 9 時間以降に強く検出された（図 1）。

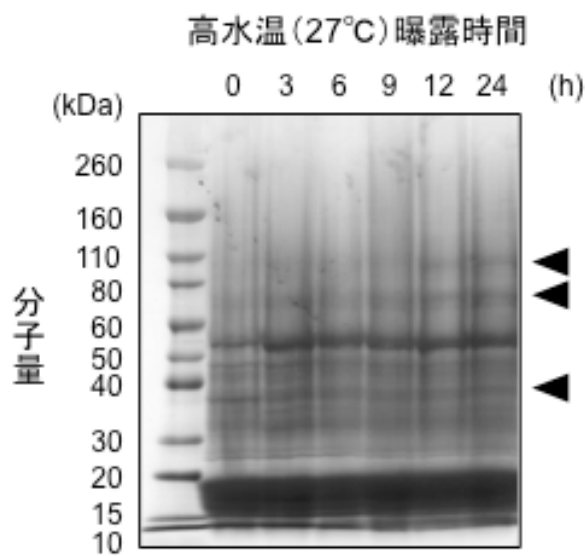


図 1 ノリ葉状体の高水温曝露に伴うタンパク質発現パターン変化

西海区水産研究所より供与された U-51 株から調製した cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、Actin、GAPDH、Hsp70、Hsp20 各遺伝子ホモログ断片の増幅が認められた（図 2）。増幅断片の DNA 塩基配列を決定した結果、間違いなく各遺伝子のホモログであることが確認された。Hsp20 ホモログ遺伝子については、高水温曝露群 cDNA とサブ

トラクト cDNA のみで増幅断片が検出された（図 2）。このことから、サブトラクト cDNA ライブラリーの品質が良好であることが確認された。RNAlater に浸漬された葉状体から上述の方法でタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法により分析を行った結果、特段の問題なくタンパク質の分析を行うことが可能であった（図 3）。また、タンパク質調製の過程で超遠心の工程を追加することにより、鮮明な電気泳動像を取得することができた（図 3）。

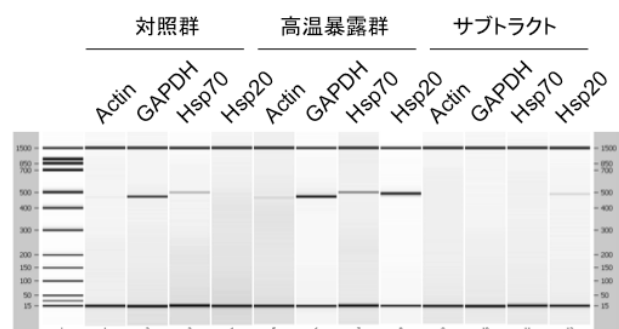


図 2 PCR 法によるサブトラクト cDNA ライブラリーの品質確認

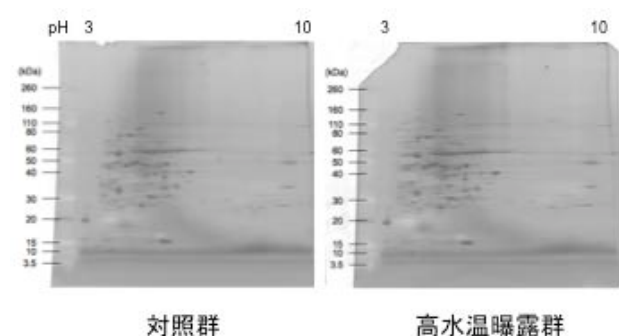


図 3 葉状体（RNAlater 浸漬）から抽出したタンパク質の二次元電気泳動分析

高水温誘導性遺伝子と予想される cDNA クローン 102 個の部分塩基配列を決定したところ、同じ配列をもつ重複クローンが 13 組（計 76 個）、単一クローンが 26 個得られたことから、計 39 種類の遺伝子が単離されたことが推定された。顕著に重複して検出された遺伝子を中心に 11 種類の遺伝子（仮に遺伝子 A～K とした）の mRNA 相対量

をリアルタイム PCR 法で測定した結果、17℃の培養温度において、遺伝子 I の mRNA 量が MCF1 で約 31 倍、U-51 よりも多かった（図 4）。また、MCF1 における遺伝子 B、C および H の mRNA 量は、U-51 のそれぞれ約 0.008 倍、0.02 倍および 0.1 倍であった（図 4）。一方、27℃に 24 時間曝露した後では、MCF1 において遺伝子 H の mRNA 量が顕著に多く、U-51 の約 17 倍であった（図 4）。MCF1 と U-51 において高水温障害（多層化）が生じた葉状体の発生率を調べたところ、培養温度 18℃では両株とも 0%、26℃では両株とも 100%となり、両水温区で株間の差は生じなかった（表 1）。一方、培養温度 22℃では若干ながら株間で発生率に差が生じ、24℃では MCF1 における発生率が 31.7%であったのに対して U-51 では 100%となった（表 1）。

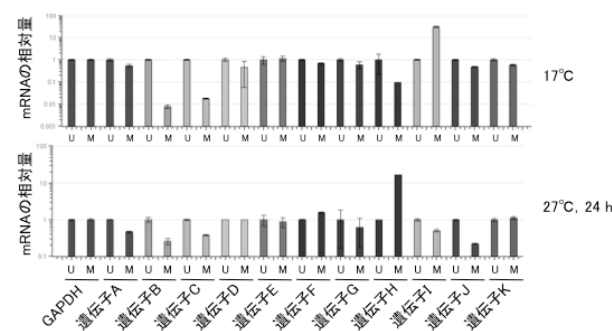


図 4 U-51 (U) および MCF1 (M) 間における mRNA 蓄積量の相対比較

表 1 MCF1 と U-51 の高水温障害発生率 (%)

	18℃	22℃	24℃	26℃
MCF1	0	0	31.7	100
U-51	0	3.8	100	100

MCF1 で特徴的な mRNA 蓄積量の変化を示した遺伝子 H と I を中心にして回復培養後の mRNA 量を調べたところ、U-51 では遺伝子 H の mRNA 量はほぼ高水温曝露前のレベルまで回復した（図 5）。回復培養後の遺伝子 I と Hsp20 の mRNA 量は高水温曝露直後よりも減少したが、元のレベルまでは

回復していなかった（図 5）。フィコエリトリンの mRNA 量は高水温曝露前後で特に変化しなかった（図 5）。一方、MCF1 では遺伝子 I の mRNA 量は高水温曝露前から U-51 の約 120 倍あり、回復培養後には約 230 倍に増加していた（図 5）。その他の遺伝子の mRNA 量変化は U-51 とほぼ同様の傾向を示した（図 5）。また、同実験で葉状体の高水温障害（多層化）について観察したところ、回復培養後の多層化発生数は U-51 が平均 2.5 カ所/mm²であったのに対し、MCF1 は 1.6 カ所/mm²であった（図 5）。回復培養後には葉状体全体に多数のシワが生じたものの、その生じ方に株間の違いは見られなかった。一方、回復培養後の生長率は MCF1 で高い傾向が見られた（データ省略）。

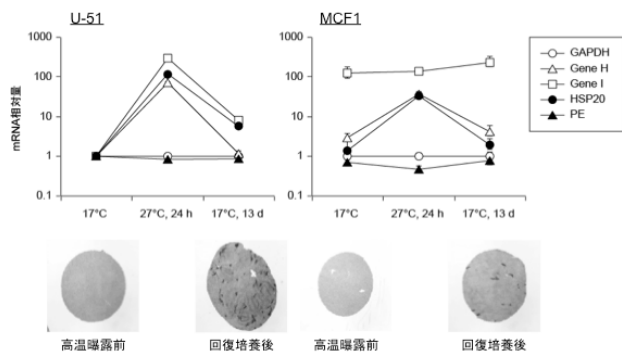


図 5 回復培養前後における mRNA 量の変化（グラフ）と多層化発生数（写真）の株間比較
内部標準遺伝子：GAPDH。17°C 培養下の U-51 における各遺伝子の mRNA 量を 1 とし、 $n=3$ の平均値±標準誤差で表示。PE：フィコエリトリン。

本課題で得られたノリの遺伝子発現データを総合的に再検討したところ、高水温耐性マーカー候補となりうる遺伝子は最終的に 5 種類となった。これら遺伝子の発現量を養殖ノリ 6 品種間で比較したところ、2 種類の遺伝子の発現量と多層化耐性との間に正の相関が認められた。中でも未知遺伝子 A の発現量と多層化耐性との間には特に強い相関があった（図 6）。一方、6 品種を 27°C の高水温に曝露すると、その直後には全ての品種

で死細胞が発生していた。各品種の死細胞数を計測した結果、品種 2 と品種 3 は他の品種よりも有意に死細胞数が多かった（ $p<0.01$ 、Tukey 多重比較）が、それ以外の品種間では有意差はなかった（図 7）。

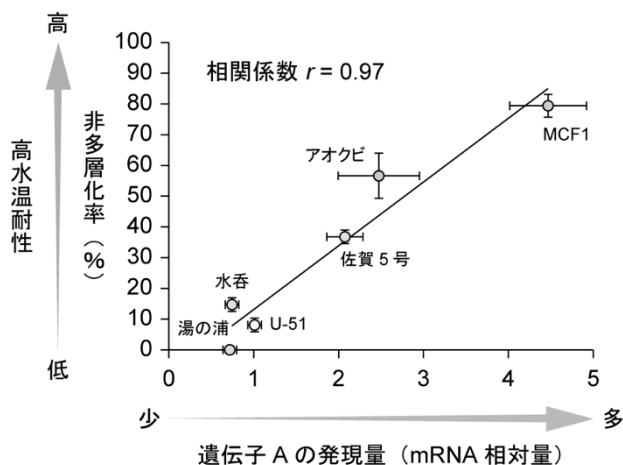


図 6 24°C 培養下における未知遺伝子 A の発現量と多層化耐性との相関分析結果

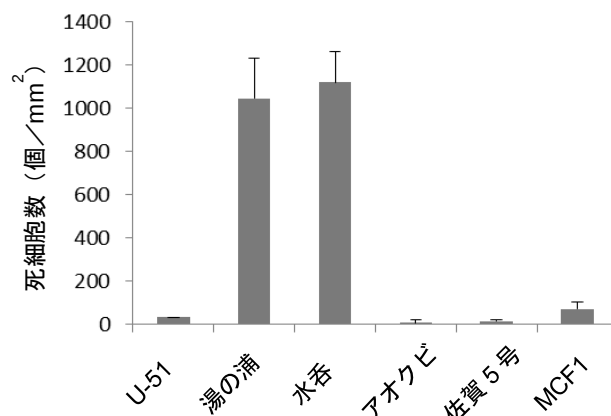


図 7 27°C 曝露直後の葉状体死細胞数

エ 考 察

本課題の成果として、ノリが高水温に対する適応応答機構を遺伝的にもつことが明らかとなった。また、ノリの高水温耐性マーカーとして有用な遺伝子の同定に成功した（特許出願中）。

本課題の結果から、スサビノリ葉状体は短期的な高水温に対する防御機構として熱ショック応答現象を示し、複数種のタンパク質の蓄積量を増加させることによって高水温に対する抵抗性を高め

ていることが示唆された。それらタンパク質のうちの一つと考えられる Hsp20 をコードする遺伝子の発現が高水温により誘導されることが本課題の結果から示唆されている。この結果は高温誘導性の Hsp20 ファミリー遺伝子が植物の高温耐性に関与する有力な候補遺伝子であるとの従来の報告¹⁾と整合する。このように、ノリが遺伝的に高水温に対する防御機構をもつことが初めて明らかになったことから、この機構に優れた株を選抜することにより、高水温耐性を向上させたノリ品種の作出が可能であると考えられる。実際、高水温選抜により作出された千葉県ノリ株で高水温耐性が向上したことが本課題の結果から示されている。

また、本課題において RNAlater に浸漬されたノリ葉状体から RNA とタンパク質を安定的に回収できることが明らかになったことにより、遠隔地から供与された試料でも再現性良く遺伝子発現を分析することが可能となった。このようなサンプリング法を活用した結果、異なるノリ株間で一部の高水温誘導性遺伝子の mRNA 量に違いがあることが初めて示唆された。このように再現性の高い遺伝子発現分析を実施できたことが、最終的にノリの高水温耐性に関与する遺伝子の同定につながったと考えられる。

また、ノリの短期的高水温耐性を評価する方法の一つとして葉状体死細胞数を指標とする方法について検討したところ、死細胞数は、本課題で高水温耐性形質とした高水温障害（多層化）の各品種における程度とは相関しなかった。スサビノリ U-51 と MCF1 においては、高水温曝露後に定常温度に戻して培養すると死細胞が脱落し、脱落部位を周囲の生細胞が修復することが観察されている（データ省略）。このことから、短期的高水温による葉状体死細胞の発生は、ノリの高水温耐性形質を必ずしも反映していないことが示唆される。このため、ノリの高水温耐性形質評価法としては、多層化発生率を指標した方法が現時点では最も有用であると考えられる。

オ 今後の課題

本課題の結果から、選抜育種によってノリの高水温耐性を向上させることができる可能性が開かれた。その一方、ノリは複雑な生活史をもつため、選抜された形質が各生活史段階でも同様に観察されるのか、あるいは形質が何世代まで保持されるのかなど未解明の課題が残されている。また、本課題において一部のノリ遺伝子で高水温による誘導発現が観察されたが、このような遺伝子の発現調節機構についても現時点では不明のままとなっている。

これらの課題を解明するため、今後は既報のノリゲノム情報²⁾等の活用により、各生活史段階における遺伝子の発現解析や、ノリの遺伝子プロモーターの解析等の研究の進展が望まれる。

カ 要約

本課題の目的は、ノリが高水温耐性の遺伝的形質をもつのかを明らかにし、ノリの高水温耐性育種に有用な遺伝子情報を得ることである。そこで、ノリからのタンパク質抽出法を確立し、高水温曝露による葉状体タンパク質の発現パターン変化を調べた。また、高水温誘導性遺伝子の発現と高水温耐性形質との相関を分析した。その結果、ノリが高水温に対する防御機構を遺伝的にもつことが明らかとなり、ノリの高水温耐性マーカーとして有用な遺伝子の同定に成功した。これにより、ノリの高水温耐性を向上させる選抜育種への可能性が開かれた。

キ 文献

- 1) Waters E.R. (2013). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.*, 64:391–403.
- 2) Nakamura Y, Sasaki N, Kobayashi M, Ojima N, Yasuike M, Shigenobu Y, Satomi M, Fukuma Y, Shiwaku K, Tsujimoto A, Kobayashi T, Nakayama I, Ito F, Nakajima K, Sano M, Wada T, Kuhara S,

Inouye K, Gojobori T, Ikeo K. (2013). The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). PLoS One, 8(3).

チーム名：アマノリチーム

担当課題名：アマノリ類の長期的高水温耐性及び適応に関する遺伝子の探索

研究機関・担当者名：三重大学大学院生物資源学研究科・柿沼 誠（059-231-09558、
kakinuma@bio.mie-u.ac.jp）・秋山敏男、三重県水産研究所・岩出将英
（059-386-0163、iwades00@pref.mie.jp）

研究期間：平成 21～25 年

ア 研究目的

我が国において産業上、最も重要なスサビノリ葉状体は、低水温・短日域に養殖されているが、近年の海水温の上昇傾向により採苗、育苗、秋芽網栽培が特に大きな影響を受け、生産量や品質の低下、病障害の発生が懸念されている。このため、高水温耐性品種の選抜育種やその効率化が急務となっているが、スサビノリを含むアマノリ類の高水温耐性・適応に関する分子についての基礎的知見はほとんどなく、選抜された高水温耐性品種の特性評価基準も確立されていない。そこで本課題では、以下の2つの小課題研究に取り組んだ。

I) 三重県が開発した高水温耐性品種の室内培養試験による特性評価

高水温耐性品種の特性評価基準を確立するための基礎情報を得るために、スサビノリ基準品種 (U51) と養殖品種の選抜育種により三重県が開発した高水温耐性品種 (みえのあかり ; MET11) の室内培養試験を行い、高水温環境下における MET11 葉状体の生長特性を調べた。

II) アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する遺伝子の探索

アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関わる分子情報を得るために、U51、MET11、広温性マルバアマノリ岩手株 (PSI) と沖縄株 (PSO) の葉状体を主対象として発現遺伝子の比較解析を行い、長期的高水温耐性・適応に関する候補遺伝子の単離・同定を試みた。また、MET11 葉状体における候補遺伝子の発現特性を調べ、候補遺伝子の選抜育種用分子マーカーとしての有効性を評価した。

イ 研究方法

I) 三重県が開発した高水温耐性品種の室内培養試験による特性評価

1) 高水温降下培養試験による特性評価

供試品種 U51 および MET11 を採苗後、18℃で6時間通気培養した。芽立を確認後、高水温 (24℃) から両品種の培養を開始し、3.5 日で 0.5℃ずつ水温を降下させながら 21 日間培養した。培養期間中、葉状体の生長と形態を指標として両品種の特性評価を行った。なお、水温以外の培養条件は、1 L 枝付球形フラスコ、1/2 SWM-III 改変培地、明期 11 時間・暗期 13 時間 (11L/13D) の光周期、光量子密度 60μmol/m²/s とした。

2) 長期的高水温培養試験による特性評価

採苗した U51 および MET11 を 24℃で 14 日間通気培養し、両葉状体における高水温障害 (多層化) 発生率と生長を指標として、MET11 葉状体の長期的高水温耐性能を評価した。なお、多層化の有無は顕微鏡観察で判別し、多層化が 1 箇所以上みられた葉状体は多層化発生葉状体とし、1 試験あたりの計測数を 100 葉状体以上として 3 反復行った。水温以外は 1) と同条件とした。

3) 短期的高水温培養試験による特性評価

採苗した U51 および MET11 を 17℃で 21 日間通気培養後に 27℃で 24 時間処理 (高水温暴露) し、17℃に戻して 13 日間回復培養した。回復培養後、葉状体上の単位面積当たりの多層化発生箇所数 (箇所/mm²) を指標として短期的高水温耐性能を評価した。なお、試験は 3 反復行い、水温以外は 1) と同条件とした。

II) アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する遺伝子の探索

1) スサビノリ基準品種とマルバアマノリ分離株

の室内培養試験

水温変化がU51葉状体と糸状体の生長や形態などに与える影響を調べるために室内培養試験を行った。葉状体については、Provasoli 栄養補強海水 (PES) 培地を用いて 10~25℃、光周期 10L/14D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で 14 日間通気培養した。培養期間中、24 時間毎に葉長と細胞状態を調べ、培養終了時に色彩色差計による色調測定を行った。糸状体については、PES 培地を用いて 5~30℃、光周期 13L/11D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で 14 日間静置培養した。培養期間中、48 時間毎に細胞状態を調べた。

広温性マルバアマノリ PSI および PSO 葉状体については先ず、PES 培地を用いて最も生長が良い水温 (PSI は 15℃、PSO は 20℃)、光周期 10L/14D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で通気培養した。葉長 1~2 cm となった時点で 5~30℃に移して 14 日間通気培養し、24 時間毎に葉長と細胞状態を調べた。

2) cDNA ライブラリーの作製

U51 葉状体については、PES 培地を用いて高水温 (20℃) または低水温 (10℃)、光周期 10L/14D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で 14 日間通気培養した後に回収した。U51 糸状体については、PES 培地を用いて 18℃、光周期 13L/11D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で静置培養して増枝後、高水温 (30℃) または低水温 (10℃) に移して 14 日間静置培養した後に回収した。PSI および PSO 葉状体については、PES 培地を用いて高水温 (PSI は 20℃、PSO は 25℃) または低水温 (PSI は 10℃、PSO は 15℃)、光周期 10L/14D、光量子密度 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で 14 日間通気培養した後に回収した。MET11 葉状体については、I-1) の室内培養試験後に回収した。なお、比較対照となる U51 葉状体も同時に回収した。

培養調製した葉状体および糸状体から mRNA を抽出・精製 (DNase 処理) し、これらを鋳型として高水温または低水温培養した U51 葉状体 (U51-20 と U51-10)、U51 糸状体 (U51C-30 と U51C-10)、PSI 葉状体 (PSI-20 と PSI-10)、PSO 葉状体 (PSO-25 と PSO-15)、高水温培養した MET11 葉状体 (MET-H)

および U51 葉状体 (U51-H) の cDNA ライブラリーを作製した。

3) cDNA サブトラクション

計 10 種の cDNA ライブラリーと PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用いて、計 6 区 (U51-20 と U51-10、U51C-30 と U51C-10、PSI-20 と PSI-10、PSO-25 と PSO-15、PSO-25 と PSI-20、MET-H と U51-H) の cDNA サブトラクションを行い、各サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で発現差のある遺伝子の cDNA プールを作製した。

4) サブトラクション cDNA の発現・配列解析

cDNA サブトラクションによって得られた各 cDNA プールをプラスミドベクターにサブクローン化後、大腸菌を形質転換させた。形質転換後の大腸菌を LB 寒天培地に塗布後、cDNA が挿入されたプラスミドを含む大腸菌コロニーをランダムに選抜し、コロニーPCR により挿入 cDNA を増幅した。増幅 cDNA をナイロンメンブレンに転写後、DIG 標識した cDNA プローブをハイブリダイズさせ、各 cDNA の発現解析 (ドットプロット解析) を行った。なお、プローブの検出・定量には ECF と蛍光イメージスキャナ (Typhoon 8600、GE Healthcare) を利用した。

各 cDNA プールのドットプロット解析結果から、U51 葉状体および糸状体、PSI および PSO 葉状体、MET11 葉状体の長期的高水温耐性・適応に関与する候補遺伝子群の cDNA を特定し、それらの塩基配列を決定後、CAP3 プログラムを利用して塩基配列データのアセンブルを行った。得られたコンティグ配列データにつき Blast2GO プログラムを利用した配列解析を行い、長期的高水温耐性・適応に関与する候補遺伝子群を同定した。

5) 候補遺伝子の分子マーカー評価

各 cDNA プールのドットプロット解析データと cDNA 配列データを整理・統合し、アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関与する候補遺伝子 29 種類を選定した。各候補遺伝子の発現解析には、リアルタイム PCR (プローブ法) を用いた。なお、スサビノリ (U51、MET11) から選定された候補遺伝子に

については、cDNA 配列情報を基にプライマー・プローブセットを設計した。一方、マルバアマノリ (PSI、PSO) から選定された候補遺伝子については、スサビノリ EST データベースから対応する cDNA の配列情報を取得し、それらを基にプライマー・プローブセットを設計した。

解析試料には MET11 および U51 を用い、採苗後 24℃で 14 日間培養 (24T/14D)、採苗後 18℃で葉長数 cm まで培養 (18T)、さらに 24℃で 14 日間培養 (18-24T/14D) した。各葉状体から全 RNA を抽出・精製 (DNase 処理) し、これを鋳型としてリアルタイム PCR 用 cDNA を合成した。各葉状体 cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR (7300 Real-Time PCR System、Applied Biosystems) により、各候補遺伝子の相対定量解析を行った (内部標準 18S rRNA、検量線法)。

ウ 研究結果

I) 三重県が開発した高水温耐性品種の室内培養試験による特性評価

1) 高水温降下培養試験による特性評価

U51 葉状体の培養 4 日後の平均細胞分裂数は 4.1、培養 7、14、21 日後の平均葉長はそれぞれ 157 μ m、1.9 mm、7.2 mm であった。一方、MET11 葉状体の培養 4 日後の平均細胞分裂数は 8.8、培養 7、14、21 日後の平均葉長はそれぞれ 253 μ m、3.6 mm、11.8 mm であり、いずれの値も MET11 葉状体で有意に大きかった (表 1)。また、U51 葉状体では培養初期から芽落ちなどの著しい形態異常が認められたのに対して、MET11 葉状体に形態異常はほとんどみられなかった (図 1)。

2) 長期的高水温培養試験による特性評価

長期的高水温培養した時の高水温障害 (多層化) 発生率は、U51 葉状体で 98.9%、MET11 葉状体で 61.3%であり (表 2)、葉状体の形態にも明瞭な差が認められた (図 2)。培養 14 日後の平均葉長は U51 葉状体で 1.7 mm、MET11 葉状体で 3.7 mm であった (表 2)。

3) 短期的高水温培養試験による特性評価

高水温暴露した時の多層化発生箇所数は、U51 葉状体で 10.4 箇所/mm²、MET11 葉状体で 2.1 箇所/mm² であった (表 3)。なお、高水温暴露後の回復培養 4～7 日目で両葉状体に多層化が確認された。回復培養 13 日目の U51 葉状体では、多層化発生箇所が癒着してシワが生じていたが、MET11 葉状体では癒着は観察されず生長にも顕著な違いが現れた (図 3)。

II) アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する遺伝子の探索

1) スサビノリ基準品種とマルバアマノリ分離株の室内培養試験

U51 葉状体については、10～25℃、14 日間の通気培養で栄養細胞の生殖細胞への分化は認められなかったが、水温の違いは生長率に大きく影響した。また、25℃培養葉状体では培養 10 日目以降に明らかな生長異常 (ちじれ、脆弱化、色調変化) が認められた。U51 系状体については、5～30℃の静置培養で生長率に差が認められたが、10～30℃で正常に生長することが分かった。PSI と PSO 葉状体についてはそれぞれ、10～20℃と 15～25℃で良好な生長が認められた。

以上の結果から、高水温および低水温培養条件を U51 葉状体と PSI 葉状体では 20℃と 10℃、PSO 葉状体では 25℃と 15℃、U51 系状体では 30℃と 10℃に設定した。培養試料の回収は、水温以外の培養条件 (光周期や光強度) が遺伝子発現に及ぼす影響を最小限に抑えるために暗期終了時とした。

2) cDNA サブトラクション

培養調製した各試料 (湿重約 0.5～1.0 g) から約 30～50 μ g の精製 mRNA が得られ、これを鋳型として計 10 種類の cDNA ライブラリー (U51-20、U51-10、U51C-30、U51C-10、PSI-20、PSI-10、PSO-25、PSO-15、MET-H、U51-H) を作製した。次に計 6 区の cDNA サブトラクションを行い、U51-20 と U51-10 から高水温および低水温培養 U51 葉状体の高発現遺伝子 cDNA プール (U51-FS および U51-RS)、U51C-30 と U51C-10 から高水温および低水温培養 U51 系状体

の高発現遺伝子 cDNA プール (U51C-FS および U51C-RS)、PSI-20 と PSI-10 から高水温および低水温培養 PSI 葉状体の高発現遺伝子 cDNA プール (PSI-FS および PSI-RS)、PSO-25 と PSO-15 から高水温および低水温培養 PSO 葉状体の高発現遺伝子 cDNA プール (PSO-FS および PSO-RS)、PSO-25 と PSI-20 から高水温培養 PSO および PSI 葉状体の高発現遺伝子 cDNA プール (PSO/I-FS および PSO/I-RS)、MET-H と U51-H から高水温培養 MET11 および U51 葉状体の高発現遺伝子 cDNA プール (MET/U51-FS および MET/U51-RS) を作製した。

3) サブトラクション cDNA の発現・配列解析
計 12 種の cDNA プールを各々プラスミドベクターにサブクローン化後、大腸菌を形質転換させた。U51-FS/RS、PSI-FS/RS については、各 cDNA が挿入されたプラスミドを含む大腸菌コロニーを 1152 個ずつ選抜した。U51C-FS/RS、PSO-FS/RS、PSO/I-FS/RS、MET/U51-FS/RS については、各 FS で 864 個ずつ、各 RS で 576 個ずつ大腸菌コロニーを選抜した (表 4)。各 cDNA のドットプロット解析により、U51 葉状体および糸状体、PSI および PSO 葉状体、MET11 葉状体の長期的高水温耐性・適応に関する候補遺伝子群 (FS cDNA については約 520～690 個、RS cDNA については約 320～900 個) を特定した。

特定された cDNA (U51-FS/RS、PSI-FS/RS については各 288 個ずつ) の塩基配列を決定し、CAP3 プログラムによるアセンブルを行ったところ、各 FS/RS cDNA から約 60～300 種類の配列データが得られた (表 4)。各配列データについて Blast2GO プログラムによる配列解析を行ったところ、各 FS/RS cDNA において 35～171 種類については既知遺伝子との類似性が認められた (表 4)。

4) 候補遺伝子の分子マーカー評価

サブトラクション cDNA のドットプロット解析データと配列解析データを基に、アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する候補遺伝子として、heat shock protein 70 (Hsp70-1、Hsp70-3)、Hsp90 (Hsp90-1、

Hsp90-2)、calmodulin (CaM-1、CaM-2)、small GTPase (Ran、Rab1、Rab11、Sar)、superoxide dismutase (SOD)、thioredoxin (Trx)、ubiquitin ligase (UbiE3)、senescence-associated protein (SAP)、vacuolar-ATPase (vATPase)、multiprotein binding factor 1 (MBF1)、protein phosphatase 2A (PP2A)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、Snf1 protein kinase (Snf1)、TonB-dependent outer membrane receptor protein (TonB)、hypothetical protein (HyP-14、15、19)、unknown (UnG-9、26、36、37、41、42) 遺伝子を選定した。

選定候補遺伝子の相対定量解析の結果、Hsp70-1、Hsp70-3、Hsp90-1、Hsp90-2、CaM-1、Ran、Rab1、Rab11、Sar、SOD、Trx、vATPase、MBF1、PP2A、MAPK、Snf1、UnG-26、UnG-36、UnG-37 遺伝子については、18T 葉状体や 18-24T/14D 葉状体よりも 24T/14D 葉状体で高発現している傾向が認められた。一方、18T 葉状体や 24T/14D 葉状体よりも 18-24T/14D 葉状体で高発現が認められたのは UnG-42 遺伝子のみであった。MET11 について 18T 葉状体の発現量を基準とした 24T/14D 葉状体の相対発現量をみると、Hsp70-3、Hsp90-1、Hsp90-2 遺伝子で約 53～81 倍の著しい発現差が、Hsp70-1、Ran、Rab1、Rab11、Sar、SOD、Trx、MBF1、PP2A、UnG-26、UnG-36、UnG-37 遺伝子で約 2～4 倍の有意な発現差が認められた。これらのうち、Hsp70-1、Hsp90-2、Ran、Rab1、Rab11、Sar、SOD、Trx、MBF1、PP2A、UnG-36、UnG-37 遺伝子は、U51 の 24T/14D 葉状体よりも MET11 の 24T/14D 葉状体で高発現していた。

エ 考 察

I) 三重県が開発した高水温耐性品種の室内培養試験による特性評価

U51 葉状体を比較対照とした MET11 葉状体の室内培養試験により、MET11 葉状体は長期的高水温のみならず短期的高水温に対しても高い障害 (多層化) 耐性と高生長を示すこと (表 1～3)、MET11 葉状体の長期的高水温耐性能は採苗後から生長初期の生

長特性と関係していることが明らかとなった（図 1、2）。実際の海苔漁場での高水温障害には、多層化の他に生長低下や芽落ちなどがある。本課題研究により、これまで高水温耐性・適応能の評価指標とされていた多層化に加え、生長性や形態も有用な評価指標候補となることが示された。

II) アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する遺伝子の探索

一般的な条件下で培養調製されたスサビノリ葉状体と糸状体の EST データベースが既に整備されているが、アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する候補遺伝子の単離・同定には、養殖品種のみならず広温性品種や高水温耐性品種などを対象とした発現遺伝子解析が必要と考えられる。このような背景のもと本課題研究では、スサビノリ基準品種 U51 と高水温耐性品種 MET11 に加え、広温性マルバアマノリ分離株 PSI と PSO を対象とした発現遺伝子の比較解析結果を基に（表 4）、アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関わる分子情報を整備し、品種間での遺伝的特性の差異や、生息地域の異なる同一種間での遺伝的特性の差異を調べた。その結果、長期的高水温培養したアマノリ類葉状体では、分子シャペロン、シグナル伝達系、酸化還元系、転写制御系遺伝子などが高発現していることが分かった。また、アマノリ類の長期的高水温耐性・適応に関する候補遺伝子の一部につき、高水温耐性品種 MET11 葉状体における発現特性を調べたところ、Hsp70、Hsp90、Ran、Rab1、Rab11、Sar、SOD、Trx、MBF1、PP2A、UnG-36、UnG-37 遺伝子が長期的高水温処理した生長初期 MET11 葉状体で高発現していた。長期的高水温処理した MET11 葉状体は、同処理 U51 葉状体よりも高耐性・高生長を示すことから（表 1、2）、MET11 葉状体の長期的高水温耐性・適応には、分子シャペロン、シグナル伝達系、抗酸化系、転写制御系の活性化に関わるこれら候補遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられる。Hsp70/90 は細胞内で分子シャペロンとして機能し、タンパク質のフォールディング、輸送、凝集抑制や

分解などに関与する¹⁾。SOD は生体成分の酸化的損傷の抑制、Trx は同機能に加え細胞内シグナル伝達分子や転写因子の活性制御に関与する^{2, 3)}。転写制御因子として機能する MBF1 や細胞内シグナル制御に関わる PP2A は、陸上植物の温度ストレス応答・適応機構において重要な役割を果たす^{4, 5)}。長期的高水温環境下の生長初期 MET11 葉状体における候補遺伝子の発現特性と生体内機能から、Hsp70/90、SOD、Trx、MBF1、PP2A 遺伝子が生長初期葉状体の長期的高水温耐性評価に有効な分子マーカー候補と考えられる。

オ 今後の課題

本課題研究により、MET11 葉状体は生長初期で長期・短期的高水温に対して高耐性・高生長を示すこと、この生長特性の一部に Hsp70/90、SOD、Trx、MBF1、PP2A 遺伝子などが関与している可能性が示唆された。各候補遺伝子の発現定量解析は長期的高水温処理した U51 および MET11 葉状体に限定されたため、今後は他の高水温耐性品種を解析対象に含め、且つ長期・短期的高水温処理に対する発現特性を明らかにする必要がある。

マルバアマノリ葉状体の cDNA サブトラクション区から単離された候補遺伝子の中には、スサビノリ EST データベースに対応する配列情報が見出せなかったため、発現定量解析を断念したものがあつた。高水温耐性能が明らかに異なる広温性マルバアマノリ岩手・沖縄株間の遺伝的特性の差異を明らかにするためには、マルバアマノリ葉状体の遺伝子解析を進めていく必要がある。

長期的高水温環境における MET11 葉状体の生長特性と候補遺伝子の発現特性から、生長初期葉状体の長期的高水温耐性・適応能が高水温耐性品種の重要形質の一つと考えられる。本課題研究では、ある程度まで生長させた葉状体を対象に候補遺伝子群の探索を進めてきたが、生長初期 MET11 葉状体を解析対象とすることで、長期・短期的高水温耐性・適

応に関与する新規遺伝子や高水温耐性評価に有効な新規分子マーカーを同定できる可能性がある。

カ 要 約

室内培養試験により、スサビノリ高水温耐性品種 (MET11) は長期・短期的高水温に対する耐性を有し高水温環境下でも高生長を示すこと、生長初期葉状体の生長特性が高水温耐性能に大きく影響することが明らかとなった。また、スサビノリ基準品種 (U51)、広温性マルバアマノリ岩手株 (PSI) と沖縄株 (PSO)、スサビノリ高水温耐性品種 (MET11) の葉状体を主対象として、長期的高水温処理により発現変動する遺伝子を調べ、分子シャペロン、シグナル伝達系、抗酸化系、転写制御系の活性化が長期的高水温耐性・適応に関与していることを明らかにした。各遺伝子の発現特性解析により、一部遺伝子の選抜育種用分子マーカーとして有用性が示唆された。

キ 文 献

- 1) Boston RS, Viitanen PV, Vierling E (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 191-222.
- 2) Davison IR, Pearson GA (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32: 197-211.
- 3) Santos CVDS, Rey P (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *TRENDS Plant Sci.* 11: 329-334.
- 4) Suzuki N, Sejima H, Tam R, Schlauch K, Mittler R (2011). Identification of the MBF1 heat-response regulon of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 66: 844-851.
- 5) Yu RMK, Zhou Y, Xu ZF, Chye ML, Kong RYCK (2003). Two genes encoding protein phosphatase 2A catalytic subunits are differentially expressed in rice. *Plant Mol. Biol.* 51: 295-311.

表 1 細胞分裂数と生長の比較 (高水温降下培養)

試験品種	細胞分裂数	葉長		
	4日後	7日後 (μm)	14日後 (mm)	21日後 (mm)
U51 (比較対照)	4.08 ± 0.21	156.9 ± 9.90	1.87 ± 0.07	7.24 ± 0.46
MET11	8.81 ± 0.40	252.6 ± 11.4	3.61 ± 0.14	11.78 ± 0.68

表 2 多層化発生率と生長の比較 (長期的高水温培養)

試験数	多層化発生率 (%)		14日後の葉長 (mm)	
	U51	MET11	U51	MET11
反復 (1)	100.0	59.8	1.71	4.14
反復 (2)	96.6	64.0	1.15	2.17
反復 (3)	100.0	60.0	2.15	4.91
平均	98.9	61.3	1.67	3.74

表 3 多層化発生箇所数の比較 (短期的高水温培養)

試験数	多層化発生箇所数 (箇所/mm ²)	
	U51	MET11
反復 (1)	10.5	1.9
反復 (2)	10.4	2.2
反復 (3)	10.3	2.1
平均	10.4	2.1

表 4 サブトラクション cDNA の解析結果

サブトラクション区 (高) 高水温培養 (低) 低水温培養	cDNA プール	cDNA 数			cDNA の種類	
		選抜	配列決定	アセンブル	既知遺伝子との類似性 あり (GO +/-)	なし
U51葉状体 (高)	U51-FS	1152	288	61	35 (27/8)	26
⇔ U51葉状体 (低)	U51-RS	1152	288	59	47 (41/6)	12
PSI葉状体 (高)	PSI-FS	1152	288	107	80 (75/5)	27
⇔ PSI葉状体 (低)	PSI-RS	1152	288	63	43 (35/8)	20
PSO葉状体 (高)	PSO-FS	864	665	303	171 (162/9)	132
⇔ PSO葉状体 (低)	PSO-RS	576	371	196	95 (85/10)	101
PSO葉状体 (高)	PSO/I-FS	864	658	236	160 (154/6)	76
⇔ PSI葉状体 (高)	PSO/I-RS	576	317	162	74 (60/14)	88
MET11葉状体 (高)	MET/U51-FS	864	688	233	147 (138/9)	86
⇔ U51葉状体 (高)	MET/U51-RS	576	386	226	136 (127/9)	90
U51糸状体 (高)	U51C-FS	864	521	202	114 (100/14)	88
⇔ U51糸状体 (低)	U51C-RS	576	378	212	120 (109/11)	92

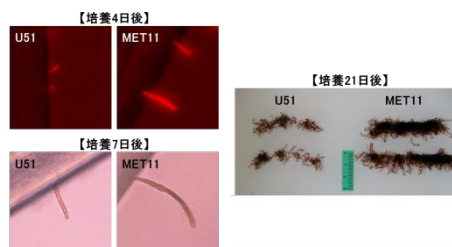


図 1 高水温降下培養した葉状体の形態

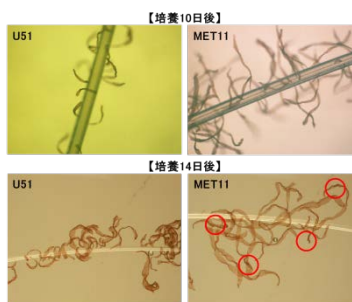


図 2 長期的高水温培養した葉状体の形態

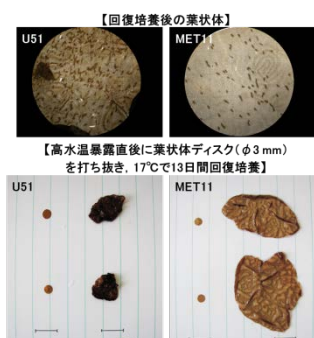


図3 短期的高水温培養した葉状体の形態

地球温暖化対策推進費のうち

地球温暖化による沿岸漁場環境への影響評価・適応技術開発委託事業
成果報告書

平成 26 年 3 月 印刷・発行

編集兼 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1

発行者 独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所

印刷 〒876-0832 大分県佐伯市船頭町 2-52

(有) 勉強堂美術精版社