

## 養殖ヒラメに偽オスが存在することを証明した

### 研究成果のポイント

- ・ヒラメはオスよりもメスの方が高成長を示すことから、メスのみを養殖する全雌生産が求められており、遺伝的性別判別技術の開発が急務とされている。
- ・性染色体上の一塩基多型（SNP）を使い遺伝構造を調べると、遺伝的性別を明らかにできることがわかった。
- ・同SNPを用いて養殖ヒラメの遺伝的雌雄判別を実施し、性転換した偽オス個体（遺伝的性別=XX、表現型=オス）が存在することを証明した。

### 研究成果の概要

ヒラメはオスよりもメスの方が高成長であることから、ヒラメの養殖においては全雌生産が望まれてきました。ヒラメは XY 遺伝性決定機構を持つことから、これまでに染色体操作により卵のゲノムを倍化させて全ての個体が XX となる雌性発生二倍体作出技術が開発されています。また、ステロイドホルモン投与により遺伝的メスを表現型オス（偽オス）に性転換する技術も開発され、染色体操作と組み合わせることで偽オスを作成することにより、全雌の大量生産が理論上は可能となっていました。しかし、染色体操作とホルモン処理は現場レベルでは難しく、また、消費者の安心にも繋がらないことから、代替技術の開発が求められています。

ヒラメは XY 遺伝性決定に加えて、高水温などの環境ストレスにより偽オスが生じることが知られていましたが、実際の養殖環境においてこのような性転換が起こっているかは明らかになっていませんでした。我々は養殖現場で自然発生した偽オスを見つけることができれば、染色体操作とホルモン処理を経ることなく全雌大量生産ができると考え、遺伝的性別を識別するための DNA マーカーの開発を目的として研究を進めてきました。

本研究では、ddRAD-seq というゲノム上の一塩基多型（SNP）を効率よく取得するための手法を用い、雌雄で SNP の大きく異なる染色体領域を探索しました。その結果、ヒラメの性染色体や性別と強く関連する SNP を明らかにし、それら SNP を用いた遺伝的性別判別手法の開発に成功しました。その結果、実際の養殖親魚の中に偽オスが存在することを世界に先駆けて証明しました。本研究の成果は染色体操作とホルモン処理を用いない全雌の大量生産へ道を開くものと考えられます。また、民間種苗生産会社と共同で養殖ヒラメの全雌大量生産を進めています。

## 研究成果の詳細

### (背景)

ヒラメはメスがオスよりも成長が早いことから、メスのみの集団を作り養殖する技術（全雌生産）の開発が求められている。これまでに染色体操作とホルモン処理を組み合わせることで全雌生産は可能であったが、処理が煩雑であり民間養殖会社では実用化されてこなかった。ヒラメのメスは稚魚期に高水温などに暴露されることでオスに性転換（偽オス）することが知られている。そのため、通常の養殖生産で生じた偽オスを見つけることができれば、偽オス（XX）を通常のメス（XX）と交配させることで、全雌集団を作ることができる。しかしながら、これまでに養殖集団に偽オスが存在することは証明されていなかった。そこで我々は、ヒラメの遺伝的性判別技術を開発し、養殖集団において偽オスを探索することを目的として研究を行った。

### (研究手法)

ddRAD-seq 法と呼ばれるゲノムワイド塩基多型（SNP）探索手法を用い、養殖ヒラメの雌雄各 24 匹から SNP を探索した。得られた SNP を用い、遺伝的分化指数（Fst）によるゲノムスキャンを行い、性染色体を特定した。性染色体上にある SNP のうち、性別との関連が強い上位 61 個の SNP を選び、各 SNP を増幅するプライマーを設計した。養殖ヒラメの雌雄各 40 個体について、上記プライマーをマルチプレックス増幅し、次世代シーケンサーにより塩基配列を取得し、定法に従って SNP を探索した。得られた SNP を用い、identity-by-state による遺伝距離を求め MDS 解析により集団構造を調べ、遺伝的性別と表現型性別を図示した。

### (研究成果)

24 番染色体全体で高い Fst 値が得られたことから、本染色体が性染色体であることが明らかとなった（図 1）。養殖魚の遺伝的多様性が低いことから、性染色体のどこに性決定遺伝子があるのかは絞り込むことはできなかったが、性染色体上の SNP を用いて集団遺伝解析をすることで遺伝的雌雄を判別できることが判明した（図 2）。性染色体の SNPの中から性別と特に高い関連を示した 61 個の SNP を選定し、同 SNP のジェノタイピングを実施したところ、雌雄で明瞭なクラスターが形成され、遺伝的雌雄判別が可能であることがわかった。また、遺伝的性別と表現型性別を比較したところ、11 個体の表現型オスが遺伝的メスと判断された（図 3）。以上のことから、ヒラメの遺伝的雌雄判別手法の開発に成功し、さらに養殖集団に偽オスが存在することが証明された。

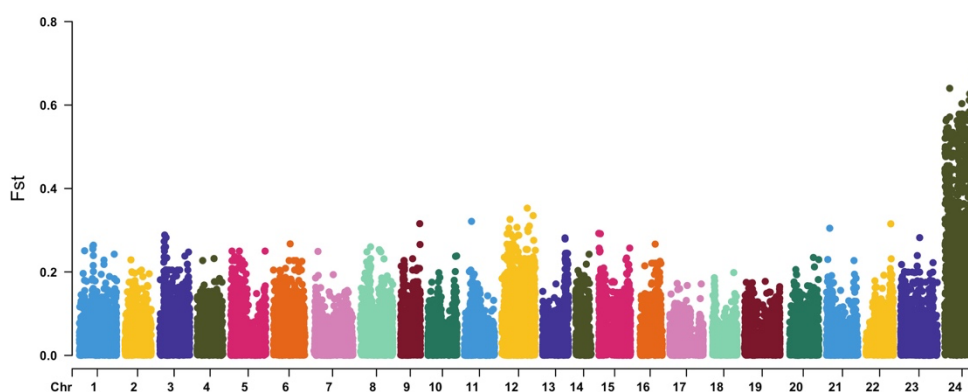


図 1. ゲノムワイド関連解析で得られた Fst 値のマンハッタンプロット。値が 1 に近いほど雌雄のアレル頻度が大きく異なることを示している。

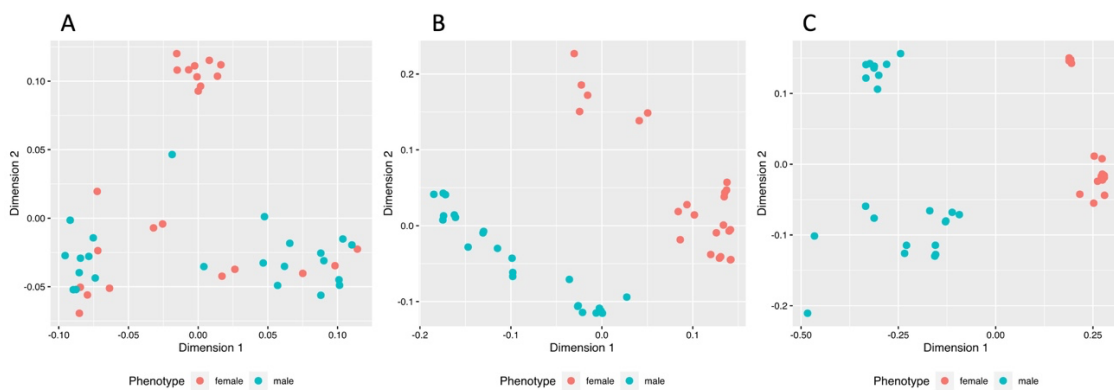


図 2. SNP を用いた雌雄判別（雌雄各 24 個体）。A. 全染色体上の SNP を用いた場合、B. 性染色体上の SNP を用いた場合、C. 性染色体上の特に強く関連する SNP を用いた場合。A では赤丸（メス）と青丸（オス）がはっきりと分かれていないが、B と C ではそれぞれの性別で集団が形成されている。

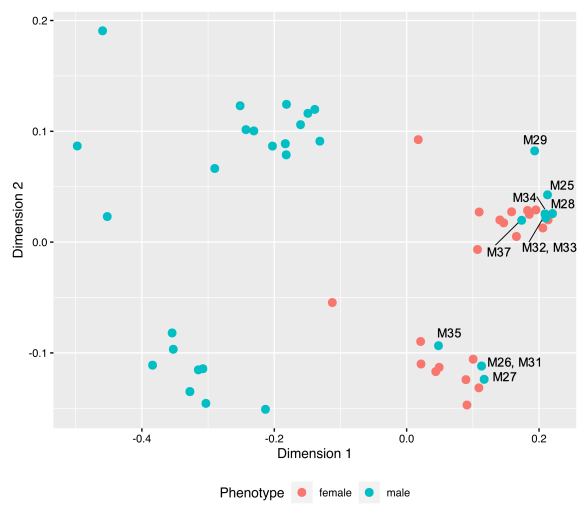


図 3. 新規に開発した SNP パネルを用いた養殖ヒラメ親魚の雌雄判別。メス集団に表現型オスが含まれていることがわかる。

**(今後の展望)**

本研究により養殖ヒラメの中に自然発生した偽オスが含まれることが証明された。この偽オスは染色体操作とステロイドホルモン処理を受けておらず、本偽オスを用いて作出された全雌ヒラメは消費者の安心にも繋がるものと考えられる。現在、養殖集団に見られる偽オス（XX オス）と通常メス（XX メス）を交配させ、全雌生産に取り掛かっている。全雌ヒラメの養殖成績が良好であれば大量生産フェーズに進む予定である。また、性転換に寄与する遺伝子の特定にも取り組んでいる。

## 発表論文の概要

### 研究論文名

Sex-associated SNP confirmation of sex-reversed male farmed Japanese flounder  
*Paralichthys olivaceus*

### 著者

前川茉莉（日本大学大学院博士前期課程 2 年（2022 年度修了））

吉井英美里（日本大学生物資源科学部 4 年（2019 年度卒業））

赤瀬友里（まる阿水産）

黄 鶴（生物技研）

吉川壮太（長崎県総合水産試験場）

松田正彦（長崎県総合水産試験場）

車 遥介（長崎県総合水産試験場、現 水産研究・教育機構、本学科 OB）

澤山英太郎（日本大学生物資源科学部海洋生物学科 准教授）

### 公表雑誌

Marine Biotechnology

<https://doi.org/10.1007/s10126-023-10235-2>

公表日：2023 年 8 月 5 日（オンライン先行公開）

### お問い合わせ先

日本大学生物資源科学部海洋生物学科 海洋生物生理学研究室

准教授 澤山英太郎（さわやま えいたろう）

TEL 0466(84)3724 E-mail: sawayama.eitaro@nihon-u.ac.jp

文責：澤山英太郎