

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な生産・利用に資する研究」領域)

次世代の食糧安全保障のための養殖技術研究開発

(タイ)

平成 24 年度実施報告書

代表者：岡本 信明

東京海洋大学・学長

<平成 23 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

本プロジェクトのねらいは、生産者の生産意欲向上が期待される社会ニーズの高い魚介類の産業化への応用技術（死の谷を越える技術）を確立し、世界の新たな食糧庫を東南アジアに創出することにある。本プロジェクト成果は、（１）DNA マーカーを開発することにより養殖魚として有用な形質を発現する家系の開発と維持を可能にし、（２）借り腹技術を利用することにより育種にかかる時間を大幅に短縮し、（３）養殖場で問題となる微生物感染症に対する新規ワクチンの開発により養殖生産の低下を防ぎ、（４）新たに増産される魚介類の産業化に貢献する魚粉に代わる代替飼料を開発し、さらに、（５）養殖魚介類生産過程において危惧される危害因子の簡易検出同定法の確立により増産される魚介類の品質保証を可能にする。

平成 24 年 5 月に実質的にプロジェクトが始動し、日本からは全ての研究グループのリーダーがタイを訪問し、プロジェクトを進めるための意見交換と、今後の技術移転の進め方等についての確認作業を行った。7 月末に開催した The 1st Joint Coordinating Committee Meeting において、タイ水産局、JICA および東京海洋大学の 3 者で今年度の活動を再確認し、合意文書を締結した。また、研究グループリーダーがタイを訪問した際には、技術指導を伴うセミナーをタイ現地にて開催して共同研究の展開を図るとともに、研究用試料のサンプリングも行った。タイからの研修生については、指導者クラスは 1 週間程度の短期研修とし、若手研究者は 1 から 2 ヶ月の研修として受け入れた。来日したタイ研究者は皆、熱心に且つ貪欲に新しい技術を習得しようと努力している。プロジェクト全体として順調な滑り出しをしている。

共同研究として、ハタ類、アジアズズキ、ブラックタイガー（ウシエビ）の DNA マーカーを開発し、分子育種に利用出来るマーカーの探索を開始した。借り腹技術応用にドナーとして用いるハタ（ジャイアントグルーパー）の生殖腺の発達状況を組織学的に観察したところ、移植に使いうる卵原細胞の存在が確認出来たので、精原細胞移植ではなく、卵原細胞移植を行うことが、本種では現実的な選択肢であると結論付けることができた。卵原細胞を簡便に同定単離するため、ジャイアントグルーパーの vasa cDNA のクローニングを行った。免疫応答による感染症撲滅のツールとしてクルマエビ、ブラックタイガー（ウシエビ）、ハタ類（ジャイアントグルーパー、タイガーグルーパー）において複数組織で発現している遺伝子の網羅的な解析を行った。また、タイの海面養殖で問題となっているイリドウイルスのタイプについて遺伝子レベルで解析し、日本国内のものと比較したところ同じタイプであることを明らかにし、ワクチン試験を開始した。環境への影響を配慮した養魚飼料向け代替タンパク源の開発、代替タンパク源の選定、試験飼料の組成法の解析について検討を行うとともに、給餌試験をタイで実施するための準備を整えた。ロイコマラカイトグリーン（LMG）の残留を、ELISA 法で検出するために必要な前処理法の検討を行い、数種の試料（飼育水、池の底泥、飼料、アジアズズキ、クルマエビ類）に対し、十分にバックグラウンドを抑え、低濃度での検出が可能な前処理法を確定することが出来た。

2. 研究グループ別の実施内容

(1) 分子育種のための DNA マーカー（バイオマーカーを含む）の開発研究

①研究のねらい:両国の養殖対象種であるズズキ類、ハタ類およびクルマエビ類の分子育種の基盤となる DNA マーカー（バイオマーカーを含む）を開発し、個体識別を可能にする。さらに、このマーカーを利用して養殖としての有用形質である高成長や耐病性を選抜する魚介類の分子育種技術を創出する。

②研究実施方法: 分子育種を進める上で DNA マーカーの開発は不可欠であることから、今年度はハタ類、アジアズズキおよびクルマエビ類の DNA マーカーの探索と単離を行うために、これら魚介類の既知ゲノム配列情報からマイクロサテライト配列を探索するとともに、これら魚介類のゲノムについて部

分的に解読し、そこから DNA マーカー候補となるマイクロサテライト配列を単離する。タイ側で家系開発に使用する親魚や日本側でも若干では有るが開発する家系の親魚の DNA を用い、デザインした DNA マーカーが個体識別や家系識別に利用できるか、育種にそれらを利用可能かについて検討する。タイ側では、共同研究用魚介類の飼育と家系の作出を中心に実施する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況: 予定通りに進行している。進捗状況については以下に示した。

1-1. ハタ類やクルマエビ類での DNA マーカーの開発を行い、ハタ類に関しては DNA マーカーの近縁種での利用に関する解析を行った。

1-2. DNA マーカー開発用の塩基配列情報を入手し、DNA マーカーの設計及び多型性評価による DNA マーカーの開発を行った。

1-3. データベース上の既知の塩基配列情報を用いた DNA マーカーの多型性評価を行った。

1-4. タイ側においては、研究所で飼育しているハタ類、アジアズキ、ブラックタイガー(ウシエビ)およびバナマイエビについて、DNA マーカーを用いて調べた。

1-5. ワライラック大学で飼育しているブラックタイガー(ウシエビ)において、高成長家系と WSSV 耐性家系の分子遺伝学的解析に着手した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む): 分子育種を実施するための家系(ハタ類、アジアズキ、クルマエビ類)の作出方法ならびに解析手法について、タイ研究者に東京ならびにタイにて指導を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば): 特に無し。

(2) 借り腹技術を利用した育種技術基盤の構築に関する研究

①研究のねらい: 借り腹技術を利用した育種技術基盤の構築においては、成熟するまでに 7~8 年を必要とするハタ類とメコンオオナマズを対象を絞り、まず、ドナー細胞調整法の構築(精巢の成熟度、細胞分散法、標識法)、適切な宿主種の探索(宿主の発生時期の探索)ならびに移植操作及びその周辺技術の構築(移植細胞追跡法の構築)を行う。借り腹技術が養殖対象種で確立出来れば、親魚の小型化、成熟期間短縮による有用形質発現家系の選抜育種の効率化を図ることができる他、生殖細胞凍結により遺伝資源の保存にも繋がる。本国際共同研究では、借り腹が可能なドナー(移植細胞提供種、種苗生産が困難な種)とレシピエント(移植細胞受容種、種苗生産が可能な種)との範囲を明らかにする。

②研究実施方法: 借り腹技術の開発について、借り腹が可能なドナー(移植細胞提供種、種苗生産が困難な種)とレシピエント(移植細胞受容種、種苗生産が可能な種)との範囲を明らかにしなければ移植は困難であることから、まず、ドナーとレシピエントを決めるための調査、研究に取り組む。さらに、ドナー候補種の生殖腺を組織学的に観察し、移植用細胞を単離する適期の探索を行う。同様に宿主候補種の生殖腺の発生過程を明らかにし、移植適期を明らかにする。なるべく早くにタイ側研究者を日本に招き、技術指導と上記実験を進める。タイ側にとっては新規の研究であることから、本技術の習得を行う研究者を育てるとともに、対象魚種の飼育管理環境を確立する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況: 予定通りに進行している。進捗状況については以下に示した。

2-1. 借り腹実験のドナーに用いるハタ(ジャイアントグルーパー)のサンプリングを行い、その生殖腺の発達状況を組織学的に観察した。従来構築した技術では精巢に含まれている精原細胞を宿主個体へと移植する方法

がもっとも効率がよく、操作も容易であったが、ジャイアントグルーパーはタイ水産局クラブ研究所で飼育されている17kg程度の大型個体であっても、未だ雄への性転換は起きておらず、卵巢のみを保持していた。

2-2. これら供試魚の GSI(生殖腺体重比)は極めて小さく、組織学的観察によっても小型の周辺仁期の卵母細胞が卵巢の大部分を占めていた。しかし、これらの卵巢にも移植に使う卵原細胞は散在しており、今後は精原細胞移植ではなく、卵原細胞移植を行うことが、本種では現実的な選択肢であると結論付けることができた。

2-3. ハタ類のように性転換を行う魚種の生殖細胞移植は前例がなく、今後より詳細に卵原細胞の解析を行っていく予定である。

2-4. 卵原細胞を簡便に同定するため、ジャイアントグルーパーの vasa cDNA のクローニングを行った。現在その構造の詳細を解析中であり、次年度は卵原細胞マーカーとしての利用が可能になると期待できる。

(3) 病原微生物感染症撲滅に関する研究

①研究のねらい: 分子育種による耐病性魚介類の作出とワクチンによる感染症予防は、養殖における魚病対策の両輪である。本共同研究では、アジアズズキ、ハタ類、異体類およびクルマエビ類の免疫・生体防御について、病原微生物感染における応答やワクチンの評価等を行うために、遺伝子発現を網羅的に解析することが可能なマイクロアレイを構築し、免疫・生体防御の評価を行う手法を開発する。さらに、多様な病原微生物の抗原タンパク質を明らかにし、次世代ワクチンに利用可能な感染防御抗原を病原微生物毎にカタログ化する。これら成果を基に、主要養殖対象魚種と感染症の種類毎にワクチン評価法(感染実験、免疫応答等)を確立し、産業化するのに必要な感染防御能を付与することができるワクチンを開発する。

②研究実施方法: ワクチンの開発研究や評価等を行うためには、魚介類の免疫・生体防御の応答について網羅的に解析できる技術は不可欠である。そこで、免疫応答における遺伝子発現を網羅的に解析することが可能な技術基盤を構築するために、ハタ類、アジアズズキおよびクルマエビ類におけるマイクロアレイの構築を目指し、これら魚介類の遺伝子配列情報取得を進める。具体的にはこれら魚介類の各種臓器で発現している遺伝子 mRNA の配列情報取得と生物情報学的解析を実施する。また、病原微生物の感染防御抗原を明らかにできれば、新世代のワクチン開発も可能になることから、両国で問題となっている病原微生物の感染防御抗原遺伝子の探索を行う。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況: 予定通りに進行している。進捗状況と成果については如何に示した。

3-1. クルマエビ、ブラックタイガー(ウシエビ)の網羅的な発現遺伝子解析を実施した。

3-2. ハタ類(ジャイアントグルーパー、タイガーグルーパー)の網羅的な発現遺伝子解析を実施中である。

3-3. クルマエビの網羅的遺伝子解析用にマイクロアレイを構築し、遺伝子発現プロファイリングを可能にした。

3-4. タイで発生しているイリドウイルス感染症の原因ウイルスのタイプが日本のものと同じであることを遺伝子レベルで確認した。タイにてイリドウイルス感染症克服を目指し、2種類の DNA ワクチン試験を開始した。

3-5. タイで発生しているウイルス性神経壊死症の原因ウイルスのタイプが日本のものと同じであることを遺伝子レベルで確認した。

3-6. タイの養殖場で発生している疾病の病原菌である *Streptococcus* ならびに *Vibrio* について種を特定した。

3-7. クルマエビ、ウシエビ、ティラピアの種々抗菌タンパク質 cDNA をクローン化し、構造解析を行った。エビ類については遺伝子機能ノックダウンによる生体内での機能解析に着手した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む): タイ水産局クラブ研究所にて魚からの免疫グロブリン精製のための血液採取法、遺伝子発現解析用サンプリング法な

らびに免疫賦活剤による魚の免疫刺激法について技術指導を行った。東京ではタイ研究者に対して、組換えタンパク質精製法、遺伝子発現定量解析法、病原微生物迅速診断法等について技術指導を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):特に無し。

(4) 魚粉に替わる代替動物性タンパク質飼料の開発研究

①研究のねらい: 現在の東南アジアにおける養殖の主流は安価なティラピア、コイ、ナマズあるいはバナメイエビ等であり、これらの養殖対象種に対する飼料の開発は民間企業においても実施され、一部は産業化されている。しかし、申請者らが目指している次世代型養殖は、世界規模で嗜好性の高い、産業的価値の高い魚介類(海産魚介類)である。民間企業では大量に消費される飼料の開発は行いが、将来的に市場性が高い魚介類に対する飼料の開発は民間企業が投資するには負担が大き過ぎる。申請者らが計画している研究では、魚介類に代替飼料を給餌した際の代謝メカニズムについて分子レベルで研究し、科学的な根拠に基づいて魚粉に替わる代替タンパク質飼料開発し、産業的価値の高い魚介類養殖の産業化を図る。

②研究実施方法: 魚粉に替わる代替動物性タンパク質の養魚飼料を開発するためには、対象魚種の栄養要求性を明らかにすることが重要である。ハタ類、アジアズキの栄養要求性や既知の飼料成分組成等について調査し、開発した餌を用いたいくつかの給餌試験をタイで開始する。また、代替飼料投与における代謝系の遺伝子発現プロファイリング(ニュートリジェノミクス解析)を実施するための養殖漁場汚染の軽減にもつながる基盤技術を確立するために、遺伝子配列情報の収集とマイクロアレイの構築を行い、飼料効果の評価を行う手法を開発する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況: 概ね予定通りに進行している。進捗状況と成果については如何に示した。

4-1. タイ国水産局ペチャブuri県沿岸漁業研究開発センター(CFRDC)を中心に、同トラン県 CFRDC、同パンガー県 CFRDC とともに、養魚飼料向け代替タンパク源の開発の現状、代替タンパク源の選定方法、試験飼料の組成法の決定方法について検討を行った。

4-2. 試験飼料の組成を決定し、既に原料調達と試作を完了し、年度内に飼育実験を開始する見込みである。

4-3. タイではハタ類、アジアズキならびにクルマエビ類の給餌試験のための飼育準備を進め、飼育実験が可能な状態になっている。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む): 魚粉に替わる代替動物性タンパク質の養魚飼料を開発するための研究について、タイ水産局研究所(プーケット、クラビ、パンガ、チョンブuri)にて技術指導を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):特に無し。

(5) 化学物質などの検出技術の開発研究

①研究のねらい: 養殖生産物の安全性に関して、世界的に問題となっているのはマラカイトグリーンによる汚染である。タイで行われているマラカイトグリーンの残留モニタリングは LC-MS による生産物及び飼料の分析で行われ、多大なコストと時間を割いているのが実情である。本課題においては、ELISA 法による分析キットを飼料や池中の泥の分析に応用するための試料調整方法を確立し、マラカイトグリーンの経口、経鰓暴露による薬物代謝酵素遺伝子の発現変化から、暴露中に上昇する遺伝子発現を指標として用いる新たなモニタリング法を開発を行う。また、マラカイトグリーンの吸収阻害や排泄促進効果のある植物原料のスクリーニングを行い、その原料を飼料添加することで、暴露を受けた養殖魚のリスクを早期に安全なレベルに回復させるリスク管理技術を確立

する。さらに、水産物のマウス試験に抛らない貝毒モニタリング法の確立し、水産物の世界的ニーズに応える。同時に、リスク管理技術の一環として、マラカイトグリーン分解微生物の探索も行う。

②研究実施方法: 研究対象化学物質は、世界的に養殖魚の食品安全リスクとしての関心が高いマラカイトグリーンと貝毒とする。マラカイトグリーン検出用 ELISA キットを飼料あるいは池の底泥の分析に応用できるよう検出感度の検証と試料調整法の検討を行う。貝毒については検出用 ELISA キットの試作と評価を行う。また、マラカイトグリーンへの暴露経路が経口及び経鰓と想定できるので、鰓や腸管並びに薬物代謝の主要臓器である肝臓について、薬物代謝酵素遺伝子の発現変化を経時的に調べ、暴露期間中に発現上昇する薬物代謝酵素遺伝子の特定を行い、新たなモニタリング手法の指標を確立する。残留リスク管理技術の開発については、タイの薬用植物を中心に、マラカイトグリーンの排泄に関わる遺伝子の発現上昇を指標としてスクリーニングを行い、新規飼料添加物の候補物質を選定する。また、集積培養法により、マラカイトグリーン分解微生物の探索も行う。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況: 予定通りに進行している。進捗状況と成果については以下に示した。

5-1. タイにおける養殖エビからの化学物質残留事例から、飼料及び養殖池に残留したマラカイトグリーン代謝物(LMG, ロイコマラカイトグリーン)の残留リスクに対するモニタリング法の開発、残留除去技術の開発が必要であることを再確認した。

5-2. ELISA 法による飼料、飼育水、底泥及び稚エビから LMG を検出するための分析法開発に着手。分析法の開発は 80%程度終了し、分析法の検証中である。また、養殖池等の堆積物を用い、マラカイトグリーン分解微生物の探索を開始した。

5-3. 魚類をモデルにした生物濃縮係数を明らかにし、ELISA 法による検出感度の設定を行った。

5-4. タイをはじめとする東南アジア沿岸に生息する有毒プランクトンの分布状況を取り纏め、特に人命に影響を及ぼす麻痺性貝毒の原因となる有毒渦鞭毛藻の分布が東南アジア域において広がりつつあることを確認した。

5-5. 利用予定の ELISA 法による各種麻痺性貝毒成分に対する反応曲線と既報の ELISA 法の反応曲線を比較し、利用予定 ELISA の有用性を確認した。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む): 危害物質検出キットの使用法ならび結果の解析方法についてタイ水産局研究所にて指導を行った。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば): 特に無し。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 4 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、国際 4 件)

1. Hamasaki M, Takeuchi Y, Miyaki K, Yoshizaki G. (2013) Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment. *Mar Biotechnol.* 15, 133-144.
2. Seelaudom M, Krongpong L, Futami K, Gonçalves AT, Katagiri T, Arechon N, Endo M, Maita M. (2013) Toxicity and absorption of dietary leucomalachite green in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science* 79, 119-127
3. Kato G, Goto K, Akune I, Aoka S, Kondo H, Hirono I. (2013) CD4 and CD8 homologues in Japanese

flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . Dev Comp Immunol. 39, 293-301

4. Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. (2012) A novel immune-related gene, microtubule aggregate protein homologue, is up-regulated during IFN- γ -related immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Dev Comp Immunol. 36, 349-358.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 分子育種のための DNA マーカー (バイオマーカーを含む) の開発研究グループ

① グループリーダー: 坂本 崇 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・准教授)

② 研究項目

- 1-1 分子育種を行なうための優れた分子マーカーを探索する。
- 1-2 分子マーカーの評価を実施する。
- 1-3 目的形質の評価に基づく魚とエビの優良個体(家系)を作出する。
- 1-4 連鎖地図を作成する。
- 1-5. 上記結果に基づき、分子育種を実施する。

(2) 借り腹技術を利用した育種技術基盤の構築に関する研究グループ

① グループリーダー: 吉崎 悟朗 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・教授)

② 研究項目

- 2-1 借り腹が可能なドナーとレシピエントの範囲を明らかにする。
- 2-2 ドナー細胞調整法(精巢の成熟度、細胞分散法、標識法)を構築する。
- 2-3 レシピエントとなる種を探索する。

(3) 病原微生物感染症撲滅に関する研究グループ

① グループリーダー: 廣野 育生 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・教授)

② 研究項目

- 3-1 遺伝子発現を網羅的に解析が可能なマイクロアレイを構築する。
- 3-2 研究対象魚介類の免疫・生体防御機構に関する分子生物学的研究を行なう。
- 3-3 病原微生物のワクチン抗原を探索する。
- 3-4 ワクチン試験・評価を行なう。
- 3-5 魚介類の疾病防除管理の実践的方法を開発する。

(4) 魚粉に替わる代替動物性タンパク質飼料の開発研究グループ

① グループリーダー: 佐藤 秀一 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・教授)

②研究項目

- 4-1 フィッシュミールの代替飼料となる物質を探索し、試作飼料を開発する。
- 4-2 環境への影響を配慮した代替飼料を給餌した魚介類の栄養学的・分子生物学的手法による評価を行ない、漁場汚染撲滅につなげる。
- 4-3 親魚用の最適な調合飼料を開発する。

(5) 化学物質などの検出技術の開発研究グループ

①グループリーダー：舞田 正志（東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・教授）

②研究項目

- 5-1 養殖生産物の危害因子の検出法を開発する。
- 5-2 毒性試験、薬物動態学的研究を行ない、毒性学的評価データを蓄積する。
- 5-3 危害因子評価法を実際の養殖生産物で検証する。
- 5-4 研究対象魚介類で品質と安全性を向上のために天然保存剤技術を開発する。

以上