

第4章トラフグの育種技術 -バイオテクノロジーをフグ養殖へ利用する-

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2022-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉川, 廣幸, 吉浦, 康寿 メールアドレス: 所属: 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/104

トラフグの育種技術～バイオテクノロジーをフグ養殖へ利用する～

吉川廣幸・吉浦康寿

4.1 はじめに

近年、多くの天然の海洋生物資源が枯渇してきているということを見聞きする機会が増えている。マグロやウナギだけでなく、天然トラフグでも同様の問題があり、一昔前に比べると漁獲量が大きく減少している。このため、天然トラフグ資源の維持・増大に向けて資源管理や資源増殖の取り組みが全国で行われている。しかしこのような取り組みによりすぐにトラフグ資源が増大するか？といえば、そう簡単ではなく、息の長い取り組みとしてトラフグの天然資源を管理し、利用していく必要がある。そのような中、現在の市場で流通するトラフグの多くは養殖生産によりなされている。今後も養殖生産がトラフグ供給の大部分を担うことが予測されることから、その養殖技術の発展は重要であると考えられる。また、国内における養殖生産量は国内需要を反映して横ばいであるが、世界的にみると、魚食への需要は人口の増加や嗜好の変化により拡大してきており、世界の養殖生産量は急速に成長している。国内需要を活性化させ、世界的な魚食ニーズに応じて販路を拡大していくには、経済的に価値のある特徴（形質）をもつトラフグの作出が今後のトラフグ養殖産業にとって重要であると考えられる。最近では、他の養殖対象魚と同様に、有用な形質をもつトラフグの養殖品種をつくりだすための取り組みも各研究機関で進められ始めている。本章では、トラフグ養殖の歴史について触れるとともに、近年開発されてきているフグ養殖に関連した最新のバイオテクノロジー技術について紹介したい。

4.2 トラフグの種苗生産技術

トラフグの養殖は、昭和8年（1933年）に山口県の水産試験場で試験をしたのが初めてとされている。当初は、漁獲された小型の個体を生簀で一定期間成長させて出荷する「蓄養」であった。昭和50年代後半までには、トラフグ養殖に用いる種苗を生産するのに必要な親魚の飼育方法や人為的に成熟させる技術、生産された種苗を育成するのに必要な技術などが確立された。

トラフグの養殖開始当初、種苗生産に用いる卵は、成熟した天然の親魚を捕まえて搾出することで得ていた。しかし、天然資源の減少に伴い、良質な卵を持った天然親魚を種苗生産に安定的に利用することは難しくなってきたことから、各研究機関では養成親魚から種苗生産するための成熟誘導技術や飼育管理技術が検討されてきた。現在では日長や水温を人工的に管理すると共に、合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（LHRHa）を含むコレステロールベレットを養成親魚の体に埋め込む徐放的なホルモン投与手法により、養成親魚から良質な卵を得ることが可能となっている。また、天然でのフグの繁殖期は春であるが、日照時間や飼育水温などのコントロールによって産卵期を人工的に制御することも技術的に

可能となっている。

トラフグから産み出される卵(図1A,B)は多いもので100万粒以上の場合もあり、媒精後20°C前後の海水中で管理すると1種間程で赤ちゃんフグが大量に孵化してくる。生まれたばかりの孵化仔魚(図1C)は、体長3mm程度と小さく脆弱で、色素胞はあるものの透明でフグに特徴的な模様も観察できない。生まれた直後は体に蓄えられた卵黄成分をエネルギー源としており、孵化後5日くらいすると消化器官が形成され、徐々に摂餌を開始するようになる。生まれたての赤ちゃんフグが初めに食べる餌は動物性のプランクトンで、養殖の種苗生産現場では主にワムシやアルテミアが餌として用いられている。はじめのうちは、少しのプランクトンを摂餌するだけであるが、日を追うごとにその食欲は増していき、1ヶ月齢程度になると体長は1cm程度になり、見た目も徐々にフグらしくなってくる(図1D)。このころになるとプランクトンよりも大きい人工の配合飼料なども好んで食べるようになり、モリモリ食べて大人のフグへと成長していく。このような成熟誘導技術や飼育管理技術の確立は、安定したトラフグ種苗の供給を可能にし、養殖対象としてトラフグを扱える基盤をつくってきた。現在では、トラフグ供給量の多くを養殖魚が占めるまでに至っている。

4.3 トラフグの養殖品種作出

4.3.1 養殖品種作出の取り組み

近年では、天然物の代替という意味合いではなく、遺伝的な改良をはかり養殖に有利な形質を持つトラフグ品種をつくる取り組みが行われ始めている。2002年に脊椎動物ではヒトに次いで2番目にトラフグの全ゲノム配列が解読された。また、全ゲノムを覆う連鎖地図も作成されている(Kai et al., 2005)。こういった学術的知見があることは、養殖品種をつくっていく上で、非常に有利であると考えられる。ゲノム情報を利用してある特定の有用な形質をもつ魚や集団を選びだし、それらのかけあわせを繰り返して遺伝的に改良する選抜育種や、遺伝子配列に生じる突然変異を利用して遺伝的に改良する突然変異育種なども行われるようになってきた。さらに最近では、ゲノム編集技術を利用した品種作出も実施され始めている。

4.3.2 早期発達白子をもつトラフグ

選抜育種とは、有用な形質をもつ個体や集団を選び出し、それらの掛け合わせを数世代に渡り繰り返すことにより、着目する形質に対して方向性を持った変化を生じさせていく育種法のことを言う。例えば、体が大きいという特徴の一部は、遺伝的な影響を受けているので、体が大きいものを繰り返し交配させていくことで、体サイズの大きい品種をつくることができるわけだ。トラフグ養殖に関して、長崎県は全国一位の生産量を誇っている。現在、長崎県総合水産試験場では、市場価値の高い精巢(白子)が通常よりも早く発達する品種の作出に取り組んでいる(吉川, 2019)。養殖トラフグは通常1月から2月に精巢が発達するものの、同県の一部の養殖集団では、それよりも早い11月から12月の時点でよく発達

することが確認されており、これらを選抜育種に利用し、早期に精巣が発達するという形質を固定して品種化することが進められている。通常よりも早い時期から白子を提供できることから高値で取引されることが期待されている。

4.3.3 身の量が多いダブルマッスルトラフグ

突然変異育種とは、放射線や薬剤などにより高頻度に突然変異を起こさせた集団を作成し、その中から望ましい形質をもつ突然変異を探索して品種作出に利用する育種法のことをいう。低頻度に生じる自然突然変異の中から、たまたま養殖に都合がいい特徴を示す突然変異を探し出して品種作出に利用するには相当長い年月が必要で現実的には難しい。一方で、突然変異の発生率を高める本法では、自然突然変異よりも早く養殖に有用な突然変異を抽出し、品種作出に利用できるようになることが期待される。農作物では既に多くの有用な品種が国内外で作出され実用化されている。例えば、お米の品種である“ミルキークイーン”はコシヒカリへ突然変異を誘発して近年に誕生した新品種である。そのモチモチとした食感はお米の代名詞でもあるコシヒカリを超えるときえ言われている。

近年、水産研究・教育機構において、突然変異育種の一つである TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法によりトラフグの有用品種を作成する取り組みが進められている (Kuroyanagi et al., 2013)。具体的には、突然変異を誘導する ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) を雄のトラフグに投与することで、このトラフグの精子に突然変異を誘導する。そして、この精子と通常のトラフグ卵との人工授精により誕生したトラフグ (ランダムに突然変異が導入されている集団) について標的とする遺伝子に有用な変異を持つ個体を探し出し、品種作出に利用していくという取り組みである。本法により、これまでにミオスタチンという筋肉の過剰形成を抑制する遺伝子に有用変異を持つトラフグが誕生している (図 2)。牛にピエモンテ種という品種があるが、この品種は本遺伝子に変異があることで筋肉がよく発達する高産肉性の特徴を示し、通称ダブルマッスル牛とも呼ばれている。トラフグでも牛の場合と同様に産肉性が向上することが確認されており、今後このトラフグを用いて品種化を進めることで、生産性の高いダブルマッスルトラフグを養殖に利用できるようになることが期待されている。

4.3.4 ゲノム編集育種法

新たに外来の遺伝子を導入することで、対象生物に有益な形質を迅速に付加できる遺伝子導入技術は、迅速に新規の有用品種を作成できる技術として脚光をあびた。水産分野でも 1980 年代から 90 年代にかけて、ニジマス、タイヘイヨウサケ、ナマズなど様々な魚種で研究論文が報告されている。1992 年にはキングサーモン由来の成長ホルモン遺伝子を導入した劇的に成長が速いタイセヨウサケが作出され、米国食品医薬品局によって動物では初めて食品として認可されている。しかし、この技術で作成された生物“遺伝子組み換え生物 (Genetically Modified Organism: GMO)”は、食品素材としては一般に好意的には受け入

れられてこなかった。この技術では、様々な形質を付与できるものの、外来遺伝子の導入先はランダムで、ゲノム上の導入部位や導入遺伝子の数を制御することが困難であるという問題点もある。

近年、ゲノム編集という技術が医学、農学、畜産など様々な分野で注目を集め、利用され始めている。水産分野でも、トラフグやマダイなどで、この技術を使って有用形質（高産肉、高成長など）を伴った養殖魚の開発が進められている（岸本・木下、2020）。この技術を利用することで、ゲノム DNA 上の任意の場所に変異を導入することが可能である。名前の雰囲気は似ているものの、従来の遺伝子組換え技術とは異なるものである。自然界では、紫外線や放射線などの様々な要因により、生物の持つゲノム DNA はランダムな位置に二重鎖切断などの損傷を生じる。このため、生物はこの損傷を修復するため大きく2つのシステムを持っている。1 つ目は無傷な姉妹染色体を利用して元通りに修復する相同組み換え修復（Homologous Recombination）であり、2 つ目は切断された DNA 末端同士を直接つなげる非相同末端接合修復（Non-Homologous End Joining, NHEJ）である。前者は正確性高く損傷を元通りに修復する一方、後者は稀に修復エラーを生じ DNA に塩基の欠失、挿入、置換といった変異を生じる。ゲノム編集では、ゲノム編集ツール（DNA 切断をする酵素として働くパーツとその塩基配列上の場所を決めるパーツを持つ）を細胞へ導入することで、ゲノム DNA 上の任意の場所に切れ込みを入れるが、その後は細胞に備わっている上記の DNA 修復機構により DNA の修復をする。その際に、NHEJ が生じると結果として修復個所に変異が導入され、ターゲットとする遺伝子の機能破壊を簡単に行うことができる。現在、最も利用されているゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9）では、ゲノム編集ツールの構成要素である crRNA（切断する塩基配列上の場所を決める役割を持つ）を変えるだけで、様々な遺伝子の編集を選択的に行っていくことが可能になる（図3）。さらに、上述の遺伝子破壊を行うだけであれば、利用されるゲノム編集ツールは RNA とタンパク質からできている複合体になるので、ゲノム DNA の任意の場所の切断に働いた後は、最終的に分解されて無くなる。2019年3月には、ゲノム編集ツールに含まれる核酸が生物内に残存していないことが確認できれば、カルタヘナ法や食品衛生法に基づく遺伝子組換え生物等や DNA 技術応用食品には該当しないとすることも日本国内の方針として整理されているため、新たな品種作出法として活用していくことが可能である。

4.4 フグの代理親魚技術

4.4.1 トラフグをクサフグに産ませる技術

トラフグ養殖では、上述の通り、様々な育種着技術を用いて有用な形質を持つ品種をつくりだす試みが進められている。一方で、いずれの育種技術であっても、品種をつくるためにはトラフグを交配させて次世代を得ることが必須である。しかしながら、トラフグは成熟するまでに約3年の養成期間が必要である。さらに、その3年間で親魚の体サイズは平均的

な養殖トラフグの販売サイズ（約1kg）よりも大型（約2-5kg、全長50cm程度）となるため、トラフグの育種には大規模な飼育スペースを確保する必要もある。時間とスペースは、言うまでもなくコストにはね返ることになる。トラフグの有用品種を確立するまでの時間とスペースを節約して、品種開発を高速化できる方法はないのか？私たちの研究室では、この問題を解決できる戦略として、「代理親魚技術」と言われる技術をトラフグ育種へ活用するための技術開発を進めている。

代理親魚技術とは、有用な形質を持つ対象魚（ドナーと言う）の生殖幹細胞（卵や精子のもとになる細胞）を、親として便利な別の魚（代理親、宿主と言う）に移植して、宿主の生殖腺内で卵や精子といったドナーの配偶子の生産を行う技術のことを言う。つまりは、この代理親魚技術で、成熟期間が短くかつ小型の魚種を代理親とすれば、育種改良のスピードを飛躍的に速め飼育スペースを狭めることも可能となり、親魚管理のコスト低減に繋がると期待される（図4）。近年では、メダカやゼブラフィッシュといった小型の実験魚のみならず、様々な水産有用魚への利用も進められている（Yoshizaki and Yazawa, 2019; Goto and Saito, 2019）。

代理親魚は、ドナーの細胞を宿主とする魚に移植することで作成される。配偶子のもとになる生殖幹細胞は、精巣や卵巣内に存在している。移植に使うドナー細胞は、これらの臓器を酵素処理などでバラバラにすることで調整する。そして、調整された生殖幹細胞を含む細胞懸濁液を、卵から孵化した直後の時期の宿主仔魚の腹腔内に移植する（図5A, B）。一般的に、生まれて間もない時期の魚は免疫システムが完全ではないため、宿主が子供のときに移植作業をすることで、免疫拒絶によりドナー細胞を排除してしまうのを避けることが可能となる。また、孵化して間もない時期の魚は、精巣や卵巣といった生殖腺が完全には形成されていない。このため、外部から生殖腺が形成される予定の腹腔内に細胞を移植しておくことで、宿主の生殖腺が形成される際にドナー細胞が取り込まれ、最終的には、この魚が成長して成熟するとドナーの配偶子を生産できるようになるのである。2017年には長崎県総合水産試験場においてトラフグに関する代理親魚技術が開発された（Hamasaki et al., 2017）。トラフグ属の魚はいずれも遺伝的に近縁で、その中でもクサフグは一成熟までの期間が雄で1年、雌で2年であり、成熟開始時の全長が12cm程度と小型であるため、代理親魚技術によってトラフグ種苗を生産するのにうってつけの宿主である。クサフグ宿主へと移植されたトラフグ生殖幹細胞は、クサフグ生殖腺内で正常なトラフグ配偶子へと分化し、これらクサフグの交配により健全なトラフグ種苗が生まれることが明らかになっている。クサフグ宿主が成熟し、トラフグ配偶子ができるまでの期間は、通常のクサフグと同じく雄で1年、雌で2年であった。つまり、この代理親魚技術を用いてクサフグ宿主からトラフグ配偶子を生産することにより、トラフグの育種で問題となる時間とスペースを削減して品種開発を高速化できる道筋が見えてきたわけだ。現在、この代理親魚技術を利用して、実際にトラフグ有用品種を作出する取り組みを私たちの研究グループでも開始している。産肉性が高く、高成長なトラフグ品種などを生産者や消費者の方に届けることを目標に日々研究を進めて

いる。

4.4.2 代理親魚技術を利用した性統御

トラフグの精巣が白子として産業的に高い価値を持つのに対し、卵巣は猛毒を蓄積する部位として基本的には可食ではないことが知られている。つまり、養殖魚として販売するトラフグとしては、精巣を有する雄の方が利用価値は高いといえる。トラフグでは、Amhr2 という遺伝子が性決定遺伝子であることが明らかとなっている (Kamiya et al., 2012)。トラフグの Amhr2 にはその塩基配列の違いにより、X 型と Y 型のものがある。トラフグは他の多くの脊椎動物と同じく二倍体生物なので、2 つで 1 セットの性染色体上にこの遺伝子がそれぞれ存在している。通常その性染色体の組み合わせが XY の場合には雄に、XX の場合には雌になる。しかし、これらの細胞は置かれている周りの環境によって、遺伝的な性とは違う性の細胞に分化することがある。このような現象は、フグに限らず多くの魚種で見られている。近年、このような生体现象に基づき、代理親魚技術を応用した性統御技術が開発されている。通常、雌の XX の細胞から減数分裂を通して染色体数が半分になってできる卵は X を持つ。しかし、代理親魚技術を利用して、XY の生殖幹細胞を雌に移植すると、本来は精子へ分化するはずの細胞が卵へ分化し、この卵の中には X 卵以外に Y 卵ができてくる。この Y 卵と通常の精子 (Y または X を持つ) が受精すると、誕生してくる個体の中に YY の性染色体を持つものが出現してくる。このような個体を特に“超雄”と呼ぶ。超雄からは、Y 精子しかできないので、通常の雌 (X 卵をつくる) と掛け合わせると、誕生してくる種苗は全て雄になる。つまり、超雄を種苗生産に使うことで、雄のトラフグだけを効率的に生産できる性統御が可能になるわけである。近年、長崎県総合水産試験場では、このような技術を用いて全雄トラフグ種苗を供給できる生産基盤の構築が進められている。

4.4.3 代理親魚技術を利用した遺伝資源の保存管理

トラフグ有用品種をつくりだす取り組みと並行して、育種を支援する技術の整備を進めることも重要である。具体的には、開発されたトラフグ有用品種の親魚をそのまま維持し続けるにもやはり大規模なスペースが必要で、多大なコストがかかり続けてしまう。その飼育管理期間中に起こる様々なトラブルや魚病の発生などにより、予期せず魚が大量斃死することも少なくなく、苦労して作り出した有用品種が全滅してしまうリスクもある。このため、私たちの研究室では、代理親魚技術に加えて有用遺伝資源の保存管理技術の開発を進め、トラフグの配偶子のもととなる生殖幹細胞を含む精巣を液体窒素中で凍結保存する技術も開発した (Yoshikawa et al., 2018)。これにより、有用遺伝形質をもつ細胞を低コストかつ簡便に液体窒素の中で半永久的に保存できるようになったわけである。さらに、保存した細胞をトラフグの個体に再生させる場合には、代理親魚技術を使う。実際に凍結保存された細胞をクサフグ宿主へ移植したところ、クサフグ宿主から凍結保存細胞に由来したトラフグ精子と卵を生産することができ、これらを使って健全なトラフグが誕生することを確認してい

る（図6）。今後、有用品種の遺伝資源の保存管理に、この代理親魚技術を介した保存管理手法を有効利用していくことが期待される。

4.4.4 不妊化技術によるドナー配偶子生産の効率化

移植したドナー細胞をいかに高確率に機能的な配偶子へ分化できるようにするかは代理親魚技術を効果的に産業利用していく上で重要な課題である。移植されたドナー細胞は宿主の生殖腺内で配偶子へと分化するわけであるが、宿主の生殖腺内には内在性の生殖細胞が存在し、これらもまた配偶子へと分化してしまう。よって、宿主にドナー由来の配偶子を効率的に生産させるには、宿主自身の配偶子を形成させない不妊化技術が重要となってくる。

宿主の不妊化を誘導する方法の一つに、染色体操作による三倍体化があげられる。フグの仲間たちを含む多くの魚は、他の脊椎動物と同じく二倍体生物である。二倍体の生殖細胞は、減数分裂を介して半数体（一倍体）の配偶子へ分化する。一方、1セットの染色体数が3個である三倍体は、減数分裂を介してこれらの染色体をきれいに2つに分けることができないため不妊になるケースがほとんどである。トラフグ細胞を移植する宿主として用いられているクサフグでも、これまでに三倍体をつくるための染色体操作方法が検討されている（Hamasaki et al., 2013）。三倍体のクサフグをつくりだすには、精子と受精させた直後（受精後5分）の卵を低温の海水中（水温5°C）に30分間漬ける処理を施す。通常、精子と受精した卵からは極体と呼ばれる母親由来の染色体の半分を含む細胞構造体が放出される。これにより、卵は半数体に相当する染色体のみを持つことになり、精子（半数体に相当する染色体を持つ）と受精することで親と同じ二倍体として発生する。これに対し、低温の海水に受精卵を漬けた場合には、卵からの極体の放出が妨げられるため、二倍体に相当する母親由来の染色体と半数体に相当する父親由来の染色体をあわせ持つ三倍体が誕生してくる。このような染色体操作により作出されたクサフグ三倍体は、成熟したときに正常な卵や精子を形成できない。三倍体がつくる卵や精子が受精しても、これらの胚は正常に発生できない致死となった。実際、このクサフグ三倍体を宿主としてトラフグの細胞を移植したところ、クサフグ宿主の内在性配偶子に由来した子孫は生産されず、ドナー由来のトラフグ子孫のみを正常に誕生させることに成功した。

染色体操作による三倍体化は宿主として用いるクサフグを不妊化できることが明らかとなった。一方で、クサフグ生殖腺内に三倍体の生殖細胞が存在する状況は、通常二倍体と同様である。このことは、移植された後のトラフグのドナー生殖細胞とクサフグの内在性生殖細胞が、配偶子分化のプロセスにおいて、分化に必要な環境を奪い合うことを意味している。仮に、クサフグの内在性生殖細胞が完全に無い環境を提供できれば、ドナー細胞は競合することなく効率的にトラフグ配偶子を生産できる可能性が考えられる。そこで、クサフグ宿主の生殖細胞を欠損させるために、遺伝子ノックダウンという手法を用いた不妊化を検討した（Yoshikawa et al., 2020）。遺伝子の中には生殖細胞が生存していくのに必須なもの

がある。一般的に、遺伝子は、その配列情報を mRNA へと転写し、この mRNA からタンパク質が正常に翻訳され働くことで機能している。遺伝子ノックダウンは、遺伝子自体を破壊するのではなく、タンパク質の翻訳を阻害して遺伝子を機能させなくする手法である。生殖細胞の生存に必要な遺伝子の1つに Dead end という遺伝子があるが、この遺伝子の翻訳を阻害するためにモルフォリノオリゴという物質を細胞に導入したところ、正常に卵巣や精巣は形成されるものの、生殖細胞を欠くクサフグを作出することに成功した。さらに、この生殖細胞を欠損しているクサフグを宿主としてトラフグ細胞を移植したところ、三倍体クサフグを宿主として用いるよりも高効率にトラフグ配偶子を生産できることが分かってきた。現在は、トラフグの代理親生産に有効な生殖細胞欠損宿主をより簡便に供給できるようにするための研究開発も進めている。

4.5 おわりに

本章では、近年取り組まれているフグの養殖品種作出に向けた話題を紹介させて頂いた。これらの取り組みにより、将来、農作物や畜産物のように有用な品種がたくさん産み出されていくことを期待している。また、トラフグの配偶子を小型の近縁種であるクサフグの体を借りて生産する代理親魚技術は、これまでに研究レベルでは一応の成果が出てきている。上述の通り、代理親魚技術は育種の加速や作出された品種の遺伝資源の保存・管理に有効であると考えられる。今後は、この技術のさらなる改良を進めつつ、トラフグ育種へ実際に活用していければと考えている。有用な形質を伴った養殖品種をつくりだしていくことを通し、この取り組みがひいてはフグの食材としての魅力を消費者に伝え、フグの消費拡大に少しでも貢献できる一助となっていくことを望んでいる。

【参考文献】

- Goto R, Saito T (2019) A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. *Theriogenology*, 133, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.032>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9470-3>.
- Hamasaki M, Takeuchi Y, Yazawa R, Yoshikawa S, Kadomura K., Yamada T, Miyaki K, Kikuchi K, Yoshizaki G (2017) Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* offspring from triploid grass puffer *Takifugu niphobles* parents. *Mar Biotechnol*, 19, 579–591. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9777-1>.
- Kai W, Kikuchi K, Fujita M, Suetake H, Fujiwara A, Yoshiura Y, Ototake M, Venkatesh B, Miyaki K, Suzuki Y (2005) A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, 171(1), 227–238.

- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, Tohari S, Brenner S, Miyadai T, Venkatesh B, Suzuki Y, Kikuchi K (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genet*, 8(7), e1002798.
- 岸本謙太・木下政人 (2020) ゲノム編育種を活用した養殖魚の品種改良. *食品と容器*, 61(1), 12-20.
- Kuroyanagi M, Katayama T, Imai T, Yamamoto Y, Chisada SI, Yoshiura Y, Ushijima T, Matsushita T, Fujita M, Nozawa A, Suzuki Y, Kikuchi K, Okamoto H (2013) New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: establishment of TILLING method in fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis. *BMC Genomics*, 14, 786. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-786>.
- 吉川壮太 (2019) トラフグ—高成長白子早熟系統の探索と固定. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 85(2), 212.
- Yoshikawa H, Ino Y, Kishimoto K, Koyakumar H, Saito T, Kinoshita M, Yoshiura Y (2020) Induction of germ cell-deficiency in grass puffer by dead end 1 gene knockdown for use as a recipient in surrogate production of tiger puffer. *Aquaculture*, 735385.
- Yoshikawa H, Ino Y, Shigenaga K, Katayama T, Kuroyanagi M, Yoshiura Y (2018) Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology. *Aquaculture*, 493, 302-313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.016>.
- Yoshizaki G, Yazawa R (2019) Application of surrogate broodstock technology in aquaculture. *Fish Sci*, 85, 429-437. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01299-y>.