

出國報告（出國類別：研究）

赴日研習水產養殖魚貝類之遺傳育種及分析技術

服務機關：行政院農業委員會水產試驗所

姓名職稱：黃慶輝 助理研究員

派赴國家/地區：日本

出國期間：108年9月18日至29日

報告日期：108年10月22日

「赴日研習水產養殖魚貝類之遺傳育種及分析技術」

出國報告書

摘要

近年氣候變遷造成影響及災害頻傳，常對水產養殖造成影響並阻礙產業發展，但臺灣除了吳郭魚等特定種類外，許多水產養殖動物所使用之種苗仍然為天然或未特別進行育種之種苗，爰為養殖業之未來發展，培養具有抗逆境特性或是高成長效率等優良形質種苗有其必要性。

為配合前述臺灣水產養殖未來發展目標，本次出國前往水產養殖技術十分先進之日本進行研習，期間為 108 年 9 月 18 日至 29 日，共 12 日，研習重點為參考該國近年蓬勃發展之次世代定序分析技術應用，以天然種魚介等來源進行保有優良形質之人工繁殖種苗之培育相關研究，如分子育種標記、魚介類抗病機制的解析及相關之遺傳資訊分析，並期能應用所學持續於水產遺傳育種領域發展。

目次

頁次

壹、研習目的-----	1
貳、研習內容-----	3
參、研習心得及建議-----	8
肆、研習照片-----	9

「赴日研習水產養殖魚貝類之遺傳育種及分析技術」 出國報告書

壹、研習目的

(一)前言

近年我國的水產養殖業面臨如：溫室效應等氣候變遷或病害等因素所造成的產量不穩定、進口水產品之競爭造成國內水產品價格難以提升、從業人口高齡化及年輕人從事相關產業之意願降低、能源價格及魚粉等飼料價格提高造成養殖成本上升及國民對於食品安全要求提升等情況，亟需長期規劃及有效的方法以解決前述課題，此時分子生物學及遺傳學相關研究就成為一解決問題之有效工具。

另一方面，因應分子生物學及遺傳學分析技術的發展，相關研究在水產資源管理、海洋生態、養殖育種及水產品安全等相關研究領域皆受到重視，且以往需要龐大時間與預算之全基因體定序(Whole Genome Sequencing)，因能在短時間內大量定序的次世代定序技術(Next-Generation Sequencing, NGS)的問世，大幅降低了定序成本，如此一來，水產生物之基因體研究也逐漸轉向為以大量定序資料作為研究基礎的大數據時代，水生生物為因應生存環境的多樣化適應模式，除用來發掘對於人類生活有用之新物質及促進相關新產業的發展外，亦為基因體及遺傳學等相關研究資源的寶庫。

(二)計畫目的

本出國計畫配合行政院 5+2 產業創新推動方案中「新農業」項下「建立農業新典範」原則，及 107 年第 6 次全國農業會議「安全」主軸第 5、6、10 項決議(強化疫病

監控、研發抗逆境品系、推動健康種苗等)進行規劃。

近年因氣候變遷，常對水產養殖造成極大的影響，並阻礙水產養殖產業的進展，惟近年除了吳郭魚等特定種類外，臺灣許多養殖種類所使用之種苗仍然為天然或未特別進行育種之種苗，爰為臺灣水產養殖業之未來發展，培養具有抗逆境特性或是高成長效率等優良形質種苗有其必要性；另配合具優良形質種苗的培育，減少環境負擔的友善養殖或是高效率養殖技術的開發也是極其重要的。

計畫辦理人目前執行以次世代定序於貝類基因遺傳之應用分析之相關研究，並期待未來能使用在遺傳育種上，且為配合前述臺灣水產養殖未來發展目標，規劃前往水產養殖技術十分先進之日本東京大學農學院水圈生物工學研究室進行研習，研習重點在於參考該國近年蓬勃發展之次世代定序分析技術在水產生物選種及育種上的應用，如水產生物耐熱、高成長等重要性狀基因之尋找及育種技術、運用分子標記之選種及育種技術、及後續配合之高效能養殖系統建立等，並期完成研習後續能應用所學持續於水產生物之遺傳育種領域發展。

貳、研習過程

一、行程

本次赴日本東京大學執行「赴日研習水產養殖魚貝類之遺傳育種技術」行程如下：

時間	地點	內容
9月18日	臺北松山機場→ 東京羽田機場	由臺北松山機場搭乘華航 CI 220 至東京羽田機場。
9月19日至22日	東京大學農學院 水圈生物工學研究室	研習分子育種相關實驗技術、觀念及基礎。
9月22日至28日	東京大學農學院 水圈生物工學研究室	研習次世代定序資料分析，軟體應用及實地演練。
9月29日	東京羽田機場→ 臺北松山機場	由東京羽田機場搭乘華航 CI 9223 至臺北松山機場。

二、內容重點

(一)研習對象實驗室簡介

本次研習對象實驗室東京大學農學院水圈生物工學研究室，於 1995 年 6 月開設，在 2009 年 4 月開始由淺川修一教授擔任研究室主持人(PI, principal investigator)至今，目前研究室成員包含木下滋晴副教授及吉武和敏助理教授，及包含研究員、博士後研究、博士生、碩士生、大學部等共 34 人。

其研究重心以水產生物為之基因與蛋白質研究為主，海洋是生命的故鄉，在海裡有代表不同演化階段的各種生物生活，這些生活在包含湖泊與河川的水圈環境裡的生物因演化獲得了對各種環境的適應能力並發展出了獨自的生活形態。對水產生物的生理構造與機能的基因比較分析除了分子演化機制之外，同時也暗示了人類與水圈環境間必然存在的相互關係。

水圈生物工學研究室以魚類、貝類與浮游生物為主要研究對象，對基因序列及所轉譯的機能性蛋白質進行有關發生、成長、適應、生殖與老化的生命現象的解讀，再以基因工學、生化學與細胞生物學的手法去探討、並保育作為地球上的遺傳的水圈生物的基因形質且能和諧共存為目標。本次研習仰賴淺川教授的大力支持，在水產動物次世代定序及基因分析方面百忙之中仍撥冗不遺餘力的指導，且抱持著開放的態度鼓勵本人與實驗室各成員進行學術上的討論與交流，使這次研習能夠順利完成目標。

(二)全基因組定序及關聯分析

全基因體定序(whole genome sequencing)其目標是一次解讀生物體完整的基因序

列，包含染色體序列及粒腺體完整序列，倘若定序對象為植物時，還包含葉綠體之完整序列。水產方面，目前已完成之魚類基因體定序有 22 種，除以物種分類原則外，根據完成定序物種之特性可分為三大類：a.於生態演化上具有重要地位或特殊性物種(如八目鰻、銀鮫、腔棘魚、斑點雀鱈、電鰻等)。b.生物學研究上具有重要性之模式物種(斑馬魚、青鱓魚、三刺魚等)。c.具重要經濟食用價值之種類，如大黃魚、大西洋鮭、虹鱒、鯰魚、鱈魚及虎鮐等；在甲殼類方面，已經完成全基因體定序者有水蚤、黑殼蝦及螯蝦等，貝類則相關研究更少，目前僅有牡蠣及青螺完成全基因體定序。

定序完成之全基因體資料庫其用途十分廣泛，最直接之目的為建立物種之遺傳序列資料庫，倘在近緣物種發現可供育種應用之特殊基因，可利用所建立的資料庫迅速尋找相關的基因，供後續挑選利用；除此之外，養殖時倘遭遇病害或氣候影響後，欲利用活存個體挑選相關抗逆境基因時，全基因體序列資料庫亦為重要參考之資料；近年廣泛應用於性狀選擇之方法稱為全基因組關聯分析（Genome-Wide Association Studies，GWAS）是一種對全基因組範圍內的常見遺傳變異單核苷酸多態性(Single nucleotide polymorphism，SNP)進行整體關聯分析的方法，更可尋找目標基因序列單核苷酸多形之序列特徵，或與目標基因鄰近且高度保守(conservative)之簡單序列重複作為育種之基因標記，為新一代育種研究之重要基石，其核心原理是利用全基因組範圍的連鎖不平衡(linkage disequilibrium)，即序列上點某兩個位點之非隨機關聯性來推測特定性狀的位置。隨著不同物種基因組研究以及統計方法的發展，GWAS 在疾病性狀、數量性狀研究方面發揮著重要的作用，本次研習之水圈生物工學實驗室近年來亦運用全基因組關聯分析，就虎鮐之免疫及高成長率相關基因、虹鱒之耐高溫相關基因

及魚類其性別決定基因進行研討及相關研究，本次研習亦就相關之細部技術層面進行探討。

(三)轉錄體分析及相關應用

廣義之轉錄體(Transcriptome)係指一固定生理條件下，細胞內所有轉錄產物的總和，狹義係指細胞內所有 mRNA 的總和，過去常以微晶片陣列(microarray) 來進行功能性基因的定量熱點分析 (hot spot analysis)，近年對轉錄體使用次世代定序法分析時，可擴展為進行全面的功能性基因比對研究，並針對同一種類在不同生理階段、不同組織或不同生存環境取樣，觀察整體功能性基因的表現差別性，惟必須注意取樣時期的代表性、差異處理與試驗重複數的適宜性、樣品間比較分析前須進行常態化的步驟(normalization)等。

因轉錄體分析需定序的序列數量較全基因組定序為少，相對較省時間與成本，且因目標為轉錄產物，可有效針對功能性基因進行研究，爰目前廣泛用於各種生物體之功能性基因研究，於水產研究上亦已應用於多種魚類、蝦類及幾種貝類，如吳郭魚、石斑魚及白蝦之育種頂基因標記等；水圈生物工學實驗室近年亦運用相關技術分析櫻鱒面臨高溫環境之基因表現變化、虎鮪對於河豚毒素之偵測及神經系統反應、及竹筴之免疫 MHC 分子之表現量等研究。

(四)分析軟體之應用

一個完整的次世代定序流程包含核酸樣本的取得與製備、定序及資料分析三大

過程，由次世代定序技術所得的大量序列資訊，必須經過後續生物資訊處理過程，才能獲得可進行應用的資料，此過程一般包含：a.將獲得的序列資料進行品質管控篩選獲得正確序列資料。b. 將序列資料進行比對(alignment)、組裝(assembly)與獲得序列次數計算 (read count)。c. 將組裝好的序列與現有之序列資料庫比對，確認其完整性及正確性；d. 基因功能性註解(gene annotation)，對照現有之功能性基因資料以推測該序列為何基因之可能性最高。e. 後續證實及相關試驗分析等。

著眼於大量定序數據結果後續分析之重要性，本次研習行程亦特地請教水圈生物工程研究室的吉武和敏助理教授，吉武老師其專長在於序列分析，且自行編寫次世代定序分析用之軟體 **Portable Pipeline**，該軟體之最大特性為，只要記憶體足夠，一般工作用的電腦即可執行該程式進行分析，且不僅是一般定序數據分析不論是一般廣泛商用化之 **Windows** 或 **MacOS** 皆可以使用，大大地增加了數據分析之便利性，也降低了分析電腦配備要求之門檻，是非常具有前瞻應用性之軟體。在研習過程中亦非常幸運能接受吉武老師的指導，經討論後以目前已有之牡蠣 RNA 定序數據(RNA-seq)進行分析，並練習以不同條件下個體 RNA 表現量之比較分析及數據格式轉換等軟體應用要點，獲益良多並期待往後能善加運用，更感謝吉武老師直接無私的使 **Portable Pipeline** 成為開源式軟體，造福世界各地進行序列分析之研究者。

三、研習心得及建議事項

- (一)經由本次研習再次瞭解到日本其對於水產相關研究的資源投入以及專注是十分值得，尤其在於如東京大學等頂尖大學，其為培育未來水產養殖育種人才所投入的資源量亦是目前學界及政府研究單位值得效法的。
- (二)本次研習之水圈生物工學研究室其國際化程度相當高，學生有一半以上為日本籍以外之學生，並以英文作為該研究室進行研究及學術討論之主要語言，已與以往日本學界以日本學生為主的情形有所改變，建議我國學界及政府研究單位可考量再強化與外國留學生及研究者之交流。
- (三)為達到充分研習效果，本次研習相較於一般參訪式行程已延長一定日數，但在研習過程中仍發現以學習新技術而言，12 天仍有點短暫，較難就研習內容作一全面性及通盤性的檢視與瞭解，建議往後出國計畫是否能開放較長如 1 個月至 3 個月之較長期的國外研修，並同意研修者自行部分負擔出國費用，以有效運用相關計畫經費，使更多研究人員能出國研習。
- (四)本次研習亦利用空檔時間前往東京大學綜合研究博物館參觀其豐富的館藏魚類標本，獲益良多，建議國內學界及政府研究單位是否亦能將目前國內相關水產標本進行整合，並進行整理與展示，以充分運用標本資源。
- (五)我國農林水產業未來朝向分子及基因育種發展時，序列分析等資訊分析技術及人才已成為不可或缺之一部份，建議農委會內研究單位可再強化與資訊相關政府單位及學術單位之技術交流及培養資訊分析人才，使未來進行相關研究時能順利推動。

四、研習照片



圖一、東京大學農學院水圈生物工學研究室其以英文進行書報討論之情形。



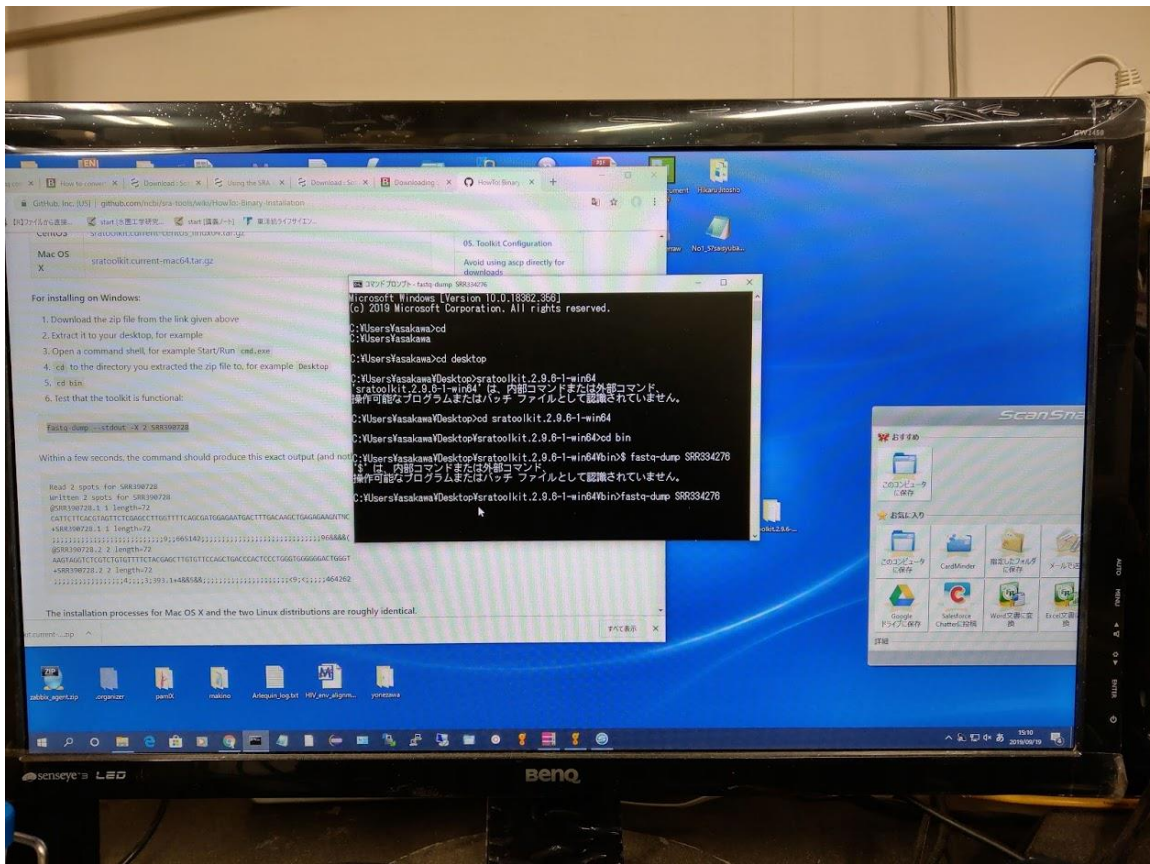
圖二、東京大學綜合研究博物館之魚類標本。



圖三、東京大學綜合研究博物館之魚類標本，這些標本已經系統化之分門別類整理。



圖四、計畫執行人與東京大學地標安田講堂合影。



圖五、計畫執行人研習水圈生物工學實驗室自行開發之序列分析軟體 Portable Pipeline 一景。



圖六、參觀水圈生物工學實驗室其實驗動物飼養水槽。



圖七、目前正進行斑馬魚耐溫基因相關測試之實驗，並期待後續能應用於其它經濟水產。



圖八、完成共 12 日之研習，與研究室負責人淺川老師餐敘。