

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580209

研究課題名(和文) 種苗放流対象メバル類の遺伝的多様性評価と多様性維持をめざした人工授精技術の確立

研究課題名(英文) Evaluating genetic diversity of *Sebastes* fishes for stock enhancement project and the development of artificial fertilization technique

研究代表者

富永 修 (TOMINAGA OSAMU)

公立大学法人 福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：90264689

研究成果の概要(和文)：栽培漁業対象種の卵胎生魚であるタケノコメバル放流群の遺伝的多様性を評価した。父性解析の結果、在来集団と飼育集団の雌は、それぞれ平均で1.2個体および1.5個体の雄としか交尾成功していなかった。そこで、遺伝的多様性の低下を防ぐための手法として人工授精技術を開発した。人工授精は10月上旬から11月下旬の期間に行うと成功し、尿により精子を賦活することが必要な条件であった。人工授精は家系数を飛躍的に増加させ、遺伝的多様性の保全に非常に有効であった。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the genetic diversity of captive bamboo rockfish, *sebastes oblongus*, which was one of the target species of stock enhancement project in Seto Inland Sea. According to the paternity analysis, the number of male fish which one wild and one reared female mated was about only 1.2 and 1.5, respectively. We developed the artificial insemination of viviparous fish in this study to protect a decrease in genetic diversity of released fish. The artificial insemination was effective from early October to late November and required the urine of male fish to activate the sperm. It was effective in increase in the family numbers and conservation of the genetic diversity to conduct the artificial insemination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：タケノコメバル、マイクロサテライト DNA、父性判別、遺伝的多様性、人工授精、卵胎生魚

## 1. 研究開始当初の背景

フサカサゴ科メバル属魚類は体内受精を行い、母体内で発生・孵化が進み仔魚を出産

する胎生魚である。近年、本科魚類は種苗放流の対象種として注目され、平成17年度に

は北海道から鹿児島にいたる全国 24 の道府県でメバル・カサゴなど 7 魚種 450 万尾の稚魚が放流されている。本科の種苗生産では、親魚候補として野生の妊娠魚を用いる場合と水槽内で自然交尾した人工種苗魚を用いる場合がある。屋内水槽での自然交尾が難しい対象種では、少数の天然魚に依存しているため、安定して親魚を確保することが難しい。また、水槽内で自然交尾をする魚種でも、雌による配偶者選択がどの程度生じているかが不明のため、放流稚魚の遺伝的多様性（家系数）が十分に維持されているかどうかはわからない。このように、母親や父親の数が限られることに加えて、出産日を同調させることが難しいために放流稚魚に貢献する親魚の数はさらに限られているのが現状である。有効な親魚数が少なくなると、遺伝的浮動が生じて有効集団サイズが小さくなり、遺伝的多様性が低下する。責任ある放流を実践するためには、種苗生産に用いられる仔魚の遺伝的多様性がどの程度維持されているかを把握し、すでに進められている種苗放流が在来集団（放流海域にもともといる野生の集団）にどの程度の遺伝的影響を与えているかを評価する必要がある。その上で遺伝的多様性を確保するための技術開発に努める義務がある。体外受精を行う魚類では、放流稚魚の遺伝的多様性を確保するための人工授精技術が確立されている。しかし、胎生魚の人工授精に関しては、申請者が香川県水産試験場と連携して研究を進めているタケノコメバルで断片的な知見があるのみで、胎生魚の効率的な人工授精技術の確立にはいたっていない。責任ある放流を進めるためには、遺伝的多様性を維持させることが重要な課題となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、栽培漁業の対象になっているメバル類のうち、予備的研究をすすめているタケノコメバルを対象として、3 年間で以下の 4 点を目的として研究する。(1) マイクロサテライトを単離して、(2) 父性判別を行って親魚あたりの家系数を明らかにする。また、(3) 放流が行われていない若狭湾海域（コントロール）の野生集団と平成 14 年から放流が行われている香川県沿岸の在来集団および放流魚の比較を行うことで、遺伝的多様性の変化を推定する。さらに、(4) 遺伝的多様性を保全する手法として胎生魚における人工授精技術を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロサテライトマーカーを用いた放

### 流稚魚の親子解析

父性判別用のマイクロサテライト用プライマーを開発し、フラグメント解析による親子判別を行う。そのため、全ての雄親の鱗を採集し、放流稚魚の雄親を特定した。この結果から雌親 1 個体当たりの交尾雄数を推定するとともに、雄親サイズに対する配偶者選択が生じているかを検討した。(2) 種苗生産期間中の家系組成の変化とその要因の検討

サイズ選別時および放流時に採集した稚魚のフラグメント解析により、有効集団サイズ、家系の多様性、異型接合体率を推定し、遺伝的多様性を評価した。コントロールとして若狭湾および放流海域で採集された在来野生集団の解析結果と比較した。

### (3) 人工授精技術の開発

#### ① 精子注入タイミングと精子注入量の検討

大きく 2 つの実験に分かれる。1 つは、自然交尾した雌親の生殖腺観察を行い、卵巣発達過程を調べた。2 つ目は 9 月から同一個体のメスに時期を変えて異なる雄親で人工授精を行い、孵出する仔魚の父親判別から適性時期を決定する実験を行った。また、精子注入量を変えて 1 回受精の試験を行い、必要精子量を決定した。孵出仔魚は出産後 10 日程度飼育した。

#### ② 精子賦活物質の探索

これまでの試験で精子の賦活に尿が関連している結果が得られている。交尾後の雌親の尿の成分を分析し、人工授精時の尿の役割を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) マイクラサテライトの単離

CA プローブを使用した濃縮法によってマイクロサテライト領域を単離した。ここでは、シーケンスを行った 16 クローンのうち 12 座に対してプライマーを設計でき、PCR において 9 座で特異的な増幅がみられた。このうち、ゲル上にヘテロのバンドが確認された Seob8、Seob9、Seob11、Seob12 の 4 座について詳細な解析を行った。Seob3 座でも多型が確認されたが、フラグメント解析において鮮明なピークが得られなかったため、以後の解析には用いなかった。4 座のマーカー座を使用して天然魚(n=44)の遺伝子解析を行った結果、それぞれに 4~8 個のアリルが確認され、ヘテロ接合体率は 0.45~0.80 の範囲であった(表 1)。各マーカー座の Ho/He 値は 0.9~1.2 の範囲で、Hardy-Weinberg 平衡からのずれは認められなかったため、用いた集団は自由交配に由来することが分かった。また、仔魚の解析によって各マーカー座が Mendel 遺伝に従うことが確認され

たため、これらのマイクロサテライト領域は遺伝マーカーとして適すると考えられた。

表1 フラグメント解析に用いられた4マーカー座(Seob8~Seob12)のプライマー配列繰り返しモチーフ、PCRサイズ、アニーリング温度および標識

Locus	Dye	Primer Sequence (5'-3')	Repeat Motif	Size (bp)	Ta (°C)
Seob8	6-FAM	TCACCCAGTAAACAAACACAC CTCGTCAGGAGACAGCATTC	(CA) <sub>19</sub>	118	56
Seob9	VIC	TTACGCTTCCAGACAACG CCAGCAGAGTTCTTCATTTCG	(CA) <sub>17</sub>	180	58
Seob11	NED	TAACCGCTCATCATCACGTC AGTGGTGGCGTTCCTCTTC	(TA) <sub>3</sub> T(CA) <sub>11</sub>	173	58
Seob12	PET	TATTGGGACGCCCTACTG GCACGGCAACACTAATTTCAC	(CACGCA) <sub>2</sub> (CA) <sub>9</sub>	162	58

## (2) タケノコメバルの交配様式

### ① 在来集団の交配様式

在来集団の雌は1尾の雄と交配する可能性が高く(図1)、複数の雄と交配しても一方の雄に偏っていた。香川県播磨灘における天然雌1尾あたりから産出される仔魚の家系は極めて少ないが、香川県播磨灘ではこれが一般的な交配頻度である可能性が考えられる。他のフサカサゴ科魚類においても同様の報告がされており、本種においても同様の繁殖様式を示していると考えられた。本種の繁殖行動はメバルに近く、雄の縄張りに雌が進入し、求愛行動を取ることでペアが成立するとされている。しかし、メバルでは雌が集団行動するとされているが、本種では単独行動が多く、本海域における集団サイズが小さいため、より繁殖行動と交配頻度が制限されていることが考えられる。このように、集団サイズが小さい在来集団の交配頻度が本実験の結果と同じであるとすれば、大量の近似した家系組成を持つ放流集団を放流することが問題として考えられる。

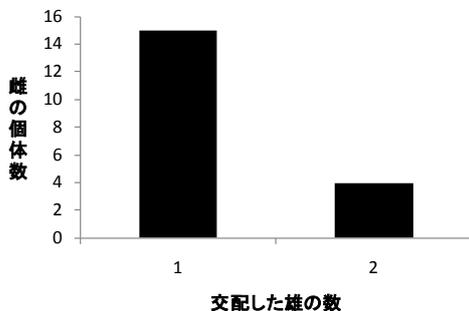


図1 在来集団の雌1個体あたり交配した雄の数の数

### ② 飼育集団の生簀内での交配様式

親魚は瀬戸内海の播磨灘で採取されたもので、これらを香川県水産試験場の海面生簀で飼育して自然交配させた。繁殖期前の9月に海面生簀2基(A群およびB群)を設置し、A群に38尾の雄(M1S~M38S)と39尾の雌(F1S~F39S)、B群に39尾の雄(M1K~M39S)と38尾の雌(F1K~F38K)を収容した。親魚は、12月20日~1月17日の期間に産仔した。自然交配の結果、A群の39尾のうち16尾、B群の38尾のうち23尾の合計39尾の雌が仔魚を産出した。腹部の肥大を判別して隔離した雌のうち、未授精卵のみを放出した親魚もいた。雌の受胎率はA群が41.0%、B群が60.5%で、平均受胎率は50.6%であった。A群、B群ともに産仔が確認された合計39尾の雌から得られた各48尾、合計1872尾の父性判別を行い、全ての雄親を決定できた。A群の雌親はそれぞれ1~4尾の雄と交配していたが、雌の交配相手は1尾であることが多かった。また、F2、35、36、38S雌はそれぞれ2~4尾の雄と交配していたが、仔魚への寄与数はそれぞれの雄で異なっていた。また、B群の雌親はそれぞれ2~3尾の雄と交配し、A群の雌親と同様に交配相手は1尾であることが多かった。こちらもF2、14、23、27、17、20、29、36K雌はそれぞれ2~3尾の雄と交配していたが、仔魚への寄与数はそれぞれの雄で異なっていた(図2)。A群の雌親からは平均1.6家系の仔魚を産出し、16尾の雌から得られた仔魚は13尾の雄に由来する25家系であった。B群の雌親からは平均1.5家系の仔魚を産出し、23尾の雌から得られた仔魚は19尾の雄に由来する35家系であった。このように、複数雄と交配した雌は確認されたが、多くが1尾の雄とのみ交配しており、産仔魚の平均家系数は全体平均で1.5家系であった。合計39尾の雌から得られた仔魚は31尾の雄に由来する60家系で、雄の寄与数が偏っていたことを考慮すると、種苗生産には限られた家系の仔魚を収容していたことが予想された。また、39尾の雌のうち、種苗生産に寄与したのは12尾の雌と14尾の雄のみであることから、自然交配では放流魚に寄与できる親魚数は限られていることが明らかになった。自然交配における雌の受胎率は平均50.6%と高くなく、安定した親魚確保には大規模な飼育設備と十分な数の親魚候補が必要と考えられた。また、産仔の同調における問題点からも放流魚に寄与できる親魚は限られ、数多くの親魚を有効に利用できていなかった。さらに、自然交配によって種苗生産が行われているものの、繁殖に関わる雄は少ない傾向にあり、なおかつ複数と

交配した場合でも 1 尾の雄に偏って仔魚が出現していたことから、産仔魚の家系は限られていた。以上の結果から、本種の種苗生産では自然交配した親魚の使用によって限られた家系の仔魚が收容され、それに由来する放流魚の遺伝的多様性は低い可能性が示唆された。

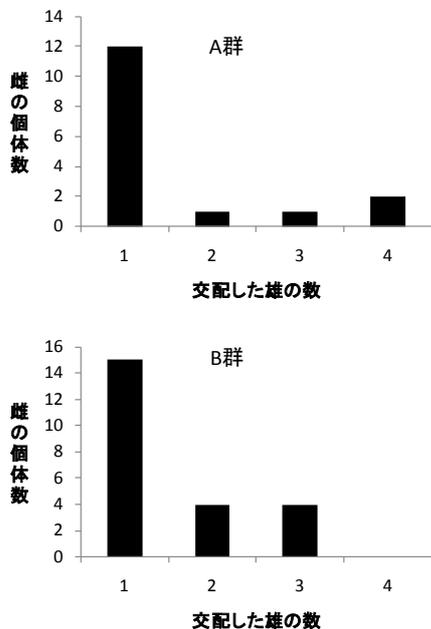


図2 飼育集団の雌 1 個体あたり交配した雄の数  
上: A群 下: B群

受胎していなかった原因としては、雌の生殖口が交尾をできる状態になく、卵巣腔内に適切に注入されていなかったこと、雌の卵巣の成熟段階が個体ごとに異なり、精子を注入する時期が適切でなかったことが考えられた。また、父性判別の結果、それぞれの雌の産仔魚に少なくとも 4~8 尾の雄が寄与し、判別可能であった仔魚は平均 6.5 家系であった (図 3)。ただ、重複していたアリルが多かったことから、実際には用いた 10 尾全ての雄が産仔魚に寄与している可能性があり、候補親魚を含めた家系は平均 8.1 家系、全体では 220 家系を生産したと推定された。人工授精では、27 尾の雌から少なくとも 175 家系の仔魚が得られており、これは自然交配区の 3 倍近くで、人工授精によって仔魚の家系数は大幅に増加していた。

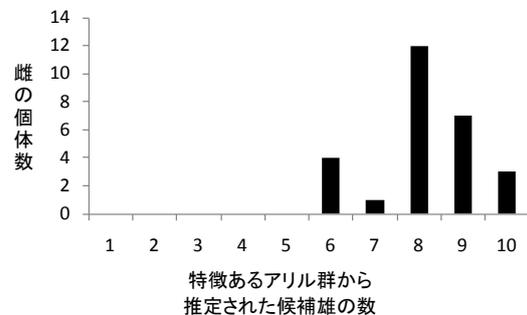


図3 10 個体分の精子を混合して人工授精した雌から出産された仔魚の候補雄の推定尾数

### (3)人工授精技術の開発

#### ①人工授精方法

人工授精は交尾期に香川県水産試験場で行った。それぞれの雄の全長・体長・体重を測定し、鱗を 99%エタノールに保存した。雄を開腹してシリンジを用いて膀胱から尿を採取し、同時に精巣を摘出して尿重量および精巣重量を測定した。シャーレ上で精巣を細切し、これに尿を加えて精子懸濁液(精子液)を作成した。それぞれの精子液の一部をスライドガラスに取り、検鏡下で精子活性を確認した。続いて、10 尾の精子液を混合してピペットを用いて 100  $\mu$ l ずつ雌の生殖口に注入した。

②人工授精による受胎率と家系数人工授精による雌の受胎率は 81.4%と高く、自然交配区における 50.6%と比較し大幅に向上していた。自然交配では繁殖行動の影響によって雌の交尾は制限されるが、人工授精では強制的な精子の注入によって高い確率で受精が成功すると考えられる。受胎を不明とした雌の中には既に産仔した可能性があるものも存在し、実際の受胎率はさらに高かったと思われる。一部の雌が

#### ③人工授精適正時期

実験 1 では 10 月 31 日~12 月 10 日の期間に、10 日毎に 2~5 回 12 尾の雌に対して香川県水産試験場にて、また、実験 2 は 3 尾の雌に対し、11 月 16 日、11 月 25 日、12 月 2 日に堅海臨海研究センターにて人工授精を行った。受精の翌年に出生した仔魚の父性判別を行い、人工授精の適正期間を調べた。実験 1 に用いた 12 尾の雌全てにおいて受胎が確認され仔魚を得ることが出来た。それに対して、実験 2 では 3 尾の雌中 1 尾の雌のみから仔魚が得られた。これは 2008 年実験区に用いた雄は実験 1 に用いた雄よりも精巣が小さかった点から、雄の精巣が既に衰退しており、精子を放出した後の雄であった可能性が考えられた。また、実験 1 の雌親はそれぞれ 10 月 31 日、11 月 10 日、11 月 20 日、11 月 30 日に人工授精した 2~4 尾の雄由来の仔魚が確認された (図 4) が、実験 2 の雌親は 11 月 16 日、11 月 25 日に人工授精した 2 尾の雄由来の仔魚が確認されたものの、12 月 2 日の雄由来の仔魚はみられな

かった。これらの産仔魚では実験 1、実験 2 とも最も早い時期に人工授精した雄の頻度が高くみられた。

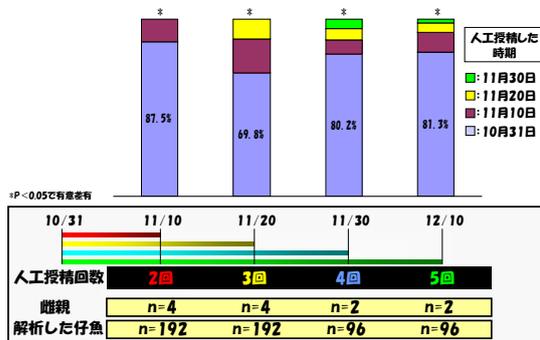


図 4 実験 1 で複数回人工授精した雌から出産された仔魚の交配雄の個体数

上：人工授精した日別の雄親の組成  
下：人工授精の回数と解析した仔魚数

#### ④精子賦活の必要性

尿の pH とイオン濃度は時期によって異なり、特に pH と  $K^+$ 濃度に差が認められた。尿では 11 月 16 日のみ高い精子活性を示し、他の時期では精子活性が認められなかった。また、pH、 $K^+$ 濃度の高い賦活剤では精子活性が認められ、低い賦活剤では認められなかった。5 種類の賦活剤で人工授精を行った結果、海水、1/3 海水、卵巣腔液では精子活性が認められず、仔魚も得られなかった。一方、pH とイオン濃度が近似していた Control と精漿では精子活性が認められ、仔魚を得ることができた。これらの結果から、人工授精には精子を賦活させることが必要であり、賦活には適切な pH、 $K^+$ 濃度が必要と考えられた。

本研究では、在来および飼育下での繁殖による集団の家系は少なく、人工授精によって家系の増大が可能となり、人工授精が遺伝的多様性を保持するための効果的な手法であることを明らかにした。また、人工授精の成功には pH と  $K^+$ 濃度が関連することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①K. Nohara, T. Kokita, O. Tominaga and T. Seikai: Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in the whitegirdled goby (*Pterogobius zonoleucus*) and cross-species

amplification in the serpentine goby (*P. elapoides*), *Molecular Ecology Resources*, 9, 610–612, 2009. 査読有  
②Osamu Tominaga, Yusuke Ogura and Yosuke Mizuno: Diel Pattern of Activity of Two Different Habitat-types of Mysids, Sand-burrowing *Archaeomysis japonica* and Epibenthic *Nipponomysis imparis*, and Feeding Selectivity of Japanese flounder Juveniles in Wada Beach, Wakasa Bay, Central Japan. Proceeding of the 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress, CD, 1d-0184–241, 2008. 査読無

[学会発表] (計 7 件)

①富永 修・栩野元秀・三木勝洋・宮内大種苗生産対象メバル属で人工授精技術を生かす～遺伝的多様性維持と異種間交雑。平成 22 年度稚魚研究会、2010 年 11 月 27 日、福岡県 九州大学

②富永 修・栩野元秀・三木勝洋・宮内大 卵胎生魚タケノコメバルの人工授精において精子賦活は受精成功に関係するか? 平成 21 年度日本水産学会中部支部大会、2009 年 11 月 14 日、福井県立大学小浜キャンパス

③富永 修・栩野元秀・三木勝洋・宮内大 瀬戸内海東部で採集された在来および放流タケノコメバル集団の遺伝的差異。2009 年度日本魚類学会年会、2009 年 10 月 10 日、東京海洋大学

④富永 修 生物多様性を考える～水圏生態系から生物多様性を理解しよう～。大学連携リーグ企画講座、2009 年 7 月 25 日、福井市

⑤佐藤直希・栩野元秀・三木勝洋・小北智之・富永 修 在来集団および放流集団の卵胎生タケノコメバルの父性判別。稚魚研究会、2008 年 12 月 6 日、東北大学

⑥佐藤直希・栩野元秀・三木勝洋・宮内大・富永 修 在来集団および放流集団の卵胎生タケノコメバルの父性判別と人工授精による家系増大の試み。日本水産学会大会、2008 年 3 月 28 日、東京海洋大学

⑦栩野元秀・富永 修・佐藤直希・山本昌幸 人工授精によるメバル・カサゴ類の異種間交配。日本水産学会大会、2008 年 3 月 28 日、東京海洋大学

[図書] (計 2 件)

①富永 修・牧田智弥: 沿岸域の底生生物生産への陸上有機物の貢献. 森川海のつながりと河口・沿岸域の生物生産 (山下洋・

田中克編), 厚生社恒星閣, 東京, 46-58, 2008.

②高井則之・富永 修: 1. 安定同位体分析を始める人たちへ. 安定同位体スコープで覗く海洋生物の生態 (富永 修・高井則之編), 厚生社恒星閣, 東京, 9-30, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://tomiytomiy.web.fc2.com/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富永 修 (Tominaga Osamu)

公立大学法人 福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号: 90264689

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: