

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658170

研究課題名(和文) クロダイをモデルとして分離浮遊卵の減耗を解明する

研究課題名(英文) Mortality in pelagic egg stage of black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay

研究代表者

海野 徹也 (Umino, Tetsuya)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70232890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の多くは卵仔稚期の死亡率が高く、その間の生残が資源量に影響する。本研究は、これまで未知であった分離浮遊卵の減耗について知見を得ることを目的とし、広島湾のクロダイモデルとして研究を行った。その結果、広島湾のクロダイにおいて受精から孵化までの2日間で著しい減耗が生じていることが示唆された。卵の発生段階毎の出現率をベースとして減耗率を推定したところ、クロダイ卵の減耗率は0.50-0.90/dayと推定された。

研究成果の概要(英文)：The abundance of fish stock highly depends on the survival of egg and larvae during planktonic stage. The objective of this program is to estimate for mortality rate of pelagic egg stage that is most vulnerable to environmental perturbations. A case study using black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay revealed that survival rate during egg stage was estimate at 0.50-0.9/day based on frequency on each egg stage at a main spawning ground in the Bay.

研究分野：水圏生物学

キーワード：浮遊卵 減耗 クロダイ

1. 研究開始当初の背景

資源生態学分野において発育初期の海産魚の初期減耗については、仔魚期の被食、摂餌不足による飢餓の進行もしくは被食圧の増大などが主な要因とされている。この定説は20世紀初頭にHjort (1914)に提唱されたものである。しかしながら、仔魚ではなく、卵の減耗についてどうであろう。仔魚のように遊泳力が乏しく、しかも、鉛直運動能に乏しい分離浮遊卵では短期間といえども、研究者の想像を超える淘汰圧がかかっていることが予想される。広島湾はクロダイを例にすれば、本種の卵密度は30~100粒/m<sup>3</sup>に達する。その一方で、ふ化直後の仔魚の密度は0.5個体/m<sup>3</sup>以下となる。このことから、ふ化までに約2日間しか要しない本種の浮遊卵が激しい減耗に直面していることが伺える。

にもかかわらず、卵の受精からふ化までの減耗については未だに未解明である。なぜなら

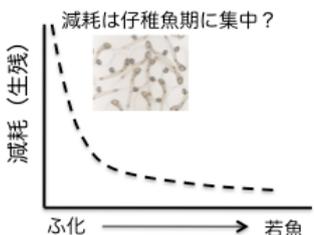
- ① 特定の魚種の大量卵の確保が困難
- ② 大量の卵の種同定は困難
- ③ 卵の発生段階がわからない

ためであった。

本研究は、これらの障壁と新たな原理への提唱に挑むべく、広島湾のクロダイをモデルとして、分離浮遊卵の胚発生段階における減耗を明らかにしようとする先導的、かつ、挑戦的萌芽研究である。

**①海産魚の生残モデル**

減耗は仔稚魚期に集中?



**②しかし・・・**

**浮遊卵の減耗過程は未知!**

- ・ 検証のための大量の卵
- ・ 種の同定ができない
- ・ 発生段階すらわからない



多くの分離浮遊卵は特徴がなく種同定が困難 (左: 受精卵, 右: 固定した卵)

**③ブレークスルー**

- ・ 広島湾のクロダイをモデル
- ・ 大量卵の採集の実績
- ・ 単抗体による大量卵の種同定
- ・ 発生段階をDNA量で調べる
- ・ 資源生態と遺伝分子の知と業

↓

**④世界に向け、新たな視点と原理**

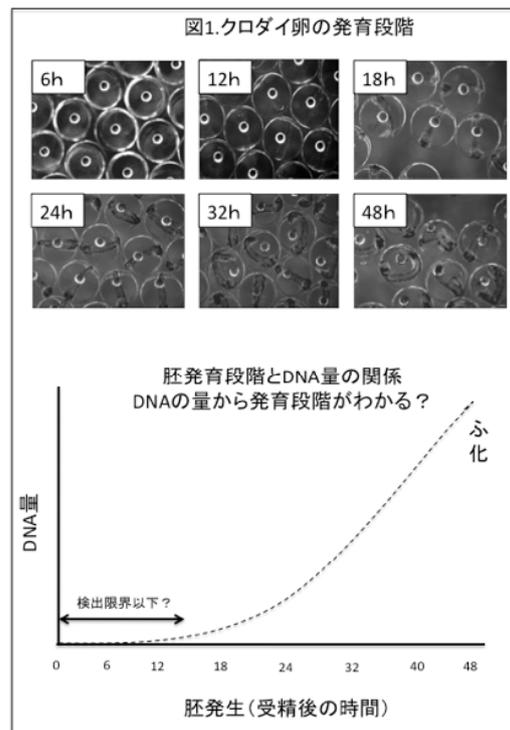
2. 研究の目的

本研究の主な目的は広島湾におけるクロダイの分離浮遊卵を実験モデルとして、これまで未知である海産魚の分離浮遊卵の減耗過程を明らかにする。そのために、大量のクロダイ分離浮遊卵の採集が可能である広島湾をフィールドとし、卵の種同定をモノクローナル抗体法で行うことを突破口にする。さらに、分子生物学的な手法により卵の胚発生段階の推定にチャレンジし、自然界における卵発生段階毎の密度から減耗(生残)を明らかにする。最終的には、広島湾におけるクロダイの分離浮遊卵を実験モデルとして、これまで未知である沿岸性海産魚の分離浮遊卵の減耗過程を明らかにすることである。

3. 研究の方法

初年度の平成24年度は発生段階の異なる授精卵を入手し、ミトコンドリアDNA分析によって卵発育段階を推定する技術を検討した。また、フィールド調査はクロダイの産卵盛期に卵採集を24時連続で行い、発生段階から産卵時間を推定した。

平成25年度にはミトコンドリアDNA分析によって卵発生段階を推定する技術を検討した。まず、各発生段階の卵のDNA量を測定し、DNA量と発生段階毎の検量線を作成する(図1)。なお、DNAの抽出はキレックス法か市販のキット(微量DNA用)を試行錯誤する。DNA定量は、ナノドロップ(テルモ社制)による260nmにおける吸収波長法、もしくは、エチジウムブロマイドによる蛍光法を用いる。次に、これらの卵のDNAを鋳型として、クロダイミトコンドリアに特異的なプライ



マーセットによる定量 PCR を行う。

授精卵のマイクロサテライト DNA マーカー分析を行い、アレル型判別時の蛍光強度で発生段階を推定する方法を検討した。方法としては、クロダイに特異的なマイクロサテライト DNA マーカー7 座 (ACS3~17) を標的とし、蛍光プライマーによる PCR を行い、PCR 産物をキャピラリーシーケンサーで電気泳動し蛍光強度を読み取る。

最終の平成 26 年は、平成 24~26 年度にかけてクロダイの主産場として知られる広島湾大黒神島より採集した卵サンプルについて、生物学的ならびに遺伝生態情報の収集を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成 24 年度

5~7 月におよぶ観察で、1 細胞期卵密度 (個/m<sup>3</sup>) は 2.3~166 と、採集日によって変動が見られた。1 細胞期の卵は日没以降増加し、深夜以降は減少する傾向が見られた。逆に、深夜以降は桑実胚などの発生が進んだ卵が多数得られ、1 細胞期卵の出現時間のピークは 20 時から 22 時にあった。

##### (2) 平成 25 年度

クロダイの産卵盛期に卵採集を 24 時連続で行い、発生段階から産卵時間を推定した。また、授精卵の発生段階の同定を顕微鏡観察およびミトコンドリア DNA の定量 PCR 法によって行った。その結果、定量 PCR 法では桑実胚から孵化までの発生段階であれば推定可能であることが判明した。また、定量 PCR 法による各発生段階の出現頻度は、顕微鏡観察結果とほぼ一致した。

一方、マイクロサテライト DNA マーカーは受精後 24 時間以上経過した卵でないとアレル型が検出できないことが明らかになったものの、卵の遺伝的多様性が精査できることが判明した。

卵の減耗を加味した卵数法による親魚数は 1.2~2.4×10<sup>7</sup> 尾となった。今後は、母系遺伝するミトコンドリア DNA マーカーのハプロタイプやマイクロサテライト DNA マーカー解析を用いることでクロダイ親魚数を推定するのも一案である。

##### (3) 平成 26 年度

平成 24~26 年度にかけて、クロダイの主要漁場より採集した卵を用いて、クロダイに特異的なプライマーセットによるミトコンドリア DNA の定量 PCR により浮遊卵の発生段階の推定を試みた。

広島湾で採集された浮遊卵の発生段階は、発生が進むにつれて密度が減少し、受精から孵化までに著しい減耗が起きていることが示唆された。減耗曲線より、広島湾全体のクロダイ卵の減耗率は 0.50-0.90/day であると

推定された。

受精直後の浮遊卵に基づく同湾におけるクロダイの産卵量は 60 個/m<sup>3</sup>/day に達し、成魚量は最大 12000 トンと推定された。広島湾のクロダイ卵密度は、宇和島湾、大阪湾、伊予灘 (0.5~11.2) と比較すると非常に高く、概ね漁獲量を反映した結果となった。さらに、授精卵とマイクロサテライト DNA マーカーを用いて有効親魚数を調べたところ、遺伝変異保有量が高く、無限值が検出された。

現在、広島湾のクロダイ漁獲量は、ピーク時の半分以下となっているものの、広島市の漁獲量を同湾全体の漁獲量と仮定すれば、漁獲圧 (漁獲量/資源量) は 0.02 となった。広島湾のクロダイは、遺伝的多様性も高く、持続的利用が可能な資源状況であると思われる。

以上、本研究では、クロダイ分離浮遊卵をモデルとして、これまで未知であった分離浮遊卵の初期減耗を明らかにした。さらに、産卵場から採取した卵の遺伝情報によって、自然界における産卵場の推定や有効親魚数までも明らかになった。これらの知見は、沿岸性魚類の産卵生態の解明のみならず、産卵場の特定や資源管理に応用できる。

今後、本研究で開発した遺伝的手法を用いて、授精卵の発育段階の同定を正確に行うことで、分離浮遊卵の発生段階にともなう卵密度や出現頻度の変化から減耗が推定できる。本研究は魚類の資源生態学、特に、分離浮遊卵を産する魚類の初期生態研究に貢献したと思われる。

#### 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 1 件)

1. 海野徹也. 生物材料 インデックス、日本人の心の魚、クロダイ. 生物工学会誌. 査読有り、91(10)588-591 (2013)

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. 河合賢太郎・赤木拓峰・笹野哲史・海野徹也. クロダイ浮遊卵の遺伝的多様性. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 平成 27 年 3 月 29 日. 東京海洋大学 (東京)

2. 奥 昂次・笹野哲史・海野徹也・辻村浩隆. 種特異的ミトコンドリア DNA マーカーによるクロダイ浮遊卵と浮遊 DNA の検出. 日本水産増殖学会第 13 回大会. 平成 26 年 10 月 18 日. 広島大学 (東広島)

3. 赤木拓峰・海野徹也. 広島湾におけるクロダイ卵の遺伝的多様性. 平成 25 年度日本水産学会中国・四国支部例会. 平成 25 年 11 月 16 日. 宇和島市総合福祉センター (宇和島市)

4. 西村翼・海野徹也. 広島湾におけるクロダイ卵の発生段階について. 平成 24 年度日本水産学会中国・四国支部例会、平成 24 年 12

月 1 日. 福山大学 (福山市)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/umino/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海野 徹也 (UMINO TETSUYA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70232890

### (3) 連携研究者

小路 淳 (SHOUJI JUN)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：10397565