

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04963

研究課題名(和文) 微生物ループを利用するスルメイカの初期生活史の解明

研究課題名(英文) Study on use of microbial loop by Japanese flying squid paralarvae

研究代表者

山本 潤 (YAMAMOTO, Jun)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・助教

研究者番号：10292004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、飼育実験と天然海域で得られた幼生の消化腺内容物を主に遺伝的解析によりスルメイカの初期餌料を解明することを目的に行った。大型水槽内で自然産卵させた卵塊の微生物相は、纏卵腺のそれに類似していた。LMD(Laser Micro-dissection)手法を用いて天然海域で採集された幼生の消化腺(もう嚢)切片からその内容物を精密に抽出し、C01領域と16S-rRNA領域を対象としたメタゲノム解析を行った。デトリタスの存在を示唆する数多くの原核生物および真核生物を検出することができ、幼生はデトリタスを消化腺に取り込んでいる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スルメイカの資源変動は、生活史初期の生残との関連性が指摘されている。しかしながら、初期餌料(ふ化後、初めて取り込む餌料)が不明なため飢餓状態の幼生を用いた環境と生残との関係しか調べることができない。本研究では、“微生物ループによる微細な有機物が初期餌料である”と想定し、親イカ、卵塊、幼生などの微生物相の類似、また、天然幼生の消化腺内容物の遺伝的解析を行った。その結果、親イカの纏卵腺(卵塊ゼリーを分泌する器官)と卵塊の微生物相は類似していることが明らかになった。天然海域で採集された幼生の消化腺内容物からは、多くの真核動物と原核動物で構成される微細な有機物が含まれていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study examined the first food of *Todarodes pacificus* paralarvae by assuming that the paralarvae consume microorganisms which were produced by biological loop. The bacterial profile of the egg masses which were obtained through natural spawning in a large experimental tank was similar to those of the nidamental gland (the secretory organ of adult). This result suggested that the adhering bacteria might have originated from indigenous or symbiotic bacteria of the nidamental gland. While, metagenome analysis (C11 and 16S-rRNA) on the gut contents which were extract from wild paralarvae by Laser Micro-dissection showed that the gut contents were consist of many species of eukaryote and prokaryote (the results on eukaryotic results may require additional testing). The result suggested paralarvae intake microorganism called “detritus”.

研究分野：水産海洋学

キーワード：スルメイカ 初期餌料 微生物ループ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らはスルメイカの長期飼育やスルメイカ類の人工授精法を用いた飼育実験と試験船による幼生分布調査などによりスルメイカの再生産仮説を構築し、再生産過程の成否を通じた資源変動のメカニズムを追及してきた。しかしながら、これまで飼育実験では、初期餌料が不明であるため卵黄吸収後の飢餓状態である幼生を使わざるを得ず、実際の産卵場における幼生の行動で異なる可能性があった。そのため、自然界のスルメイカ生活史初期の生残過程を明らかにするためには、幼生の初期餌料を解明して、より天然に近い状態で幼生をふ化した幼生を用いて飼育実験を行うことが必要である。

(2) 近年、新しい食物連鎖の経路として、水中の細菌を原生動物が捕食し、さらに動物プランクトンが捕食していく“微生物ループ”の存在とその重要性が注目されている。さらに、これらの原生動物や細菌は、デトリタスなどの有機懸濁体を付着基質とし、有機物濃度の高い微小環境“hot spot”を形成することが報告されている。スルメイカ類の幼生は口器内のピーク（顎板）が未発達で動物プランクトンを咀嚼できないことが考えられている。

(3) スルメイカの幼生にとっても卵塊内の親魚由来の有機物や水中のデトリタスが細菌や微生物の付着基質となり“hot spot”を形成し、これを餌料として利用している可能性は高いと考えられる。そこで、申請内容では卵塊とスルメイカ幼生の消化腺内容物の微生物相を遺伝子解析技術を用いて調べ、本種の初期餌料を特定することを目標として実施した。

2. 研究の目的

本研究では未だに明らかになっていないスルメイカ幼生の初期餌料を微生物ループに注目して解明することを最終的な目的として行った。本研究では、親イカ由来の有機物（卵塊を構成するゼリー状物質）および微生物が初期餌料として利用される（図1）、もしくは、海水に存在する有機懸濁物とこれに付着する微生物が初期餌料として利用される（図1）と想定して飼育実験を行い、さらに、天然海域で採集された幼生の消化腺内容物を遺伝的解析により調べた（図1）。

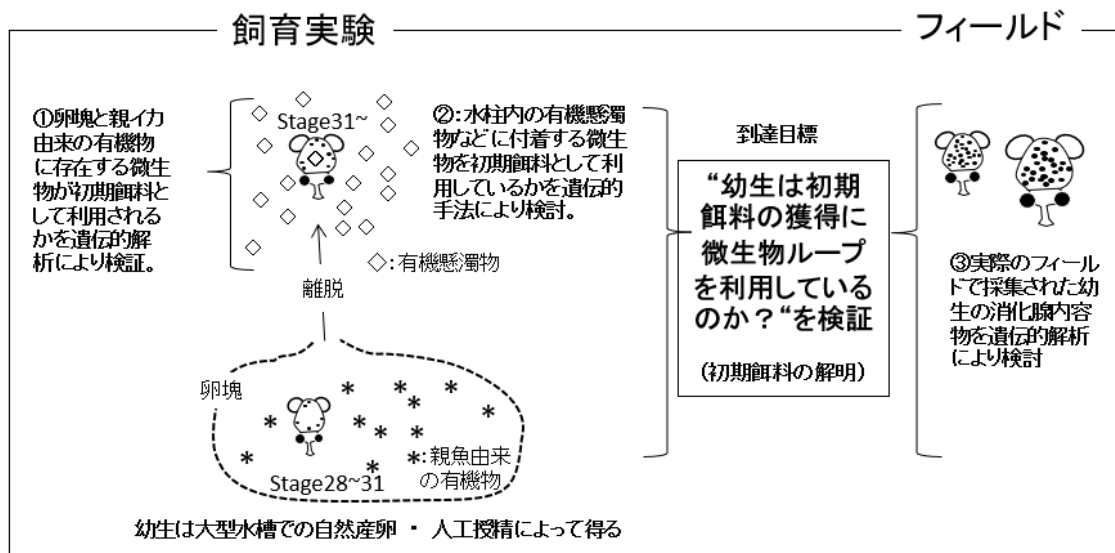


図1 本研究の研究目的と想定

3. 研究の方法

(1) 北海道津軽海峡周辺で採集した成熟途中のスルメイカを水槽内で8-10月の間、函館市国際水産・海洋総合研究センター内の10トン水槽で給餌飼育し成熟させた。9月中旬もしくは下旬から10月中旬にかけて、予め自然海水を流入させて天然の有機懸濁物、バクテリア、原生生物を取り込んでおいた同センターの大型水槽（150トン）に成熟メスを移し、自然産卵された卵塊を安定的に得た。これらをふ化させて大型水槽内で遊泳させ何らかの餌料を取り込み成長した幼生を採集した。

(2) 上記の大型水槽内で自然産卵させた卵塊、卵塊からふ化し自由に遊泳させた幼生、飼育水、親イカの排泄物、同纏卵腺さらにアオリイカの副纏卵腺内の菌相のメタゲノム解析（16S rDNAのv4領域を増幅）を行った。これに加え天然海域で採集された天然スルメイカ幼生について同

様にメタゲノム解析を行った。

(3) Laser Micro-dissection 手法を用いて天然海域で採集された幼生の消化腺(もう嚢)切片からその内容物を精密に抽出し,CO1 領域と 16S-rRNA 領域を対象としたメタゲノム解析を行った。

(4) 上記(1)で成熟したメス個体を用いて人工授精を行い幼生を得,この幼生に無脊椎動物用の市販の餌料などを与え給餌を試みた。

4. 研究成果

(1) スルメイカの消化腺の内容物を遺伝的手法を用いて解析する際に,ホスト(スルメイカ)自身の DNA の増幅をブロックするプライマーを開発した。

(2) “3. 研究の方法(2)”から,属レベルでは卵塊に付着していた細菌相は,主にビブリオナエ属,オセアノスピリア属,およびフラボバクテリア属であり,卵塊によって差異は認められるが,これらの細菌相は,海水,糞よりも纏卵腺のバクテリア相に類似していた。これらの結果から卵塊内の細菌は,纏卵腺を起源とすることを強く示唆していた。

(3) “3. 研究の方法(3)”から,デトリタスの存在を示唆する数多くの原核生物および真核生物を検出することができ,幼生はデトリタスを消化腺に取り込んでいる可能性が示された。しかしながら真核生物の結果においては実験結果の再考が必要な場合もあると見込んでいる。また,一方で,幼生はこれらデトリタスを積極的に取り込み栄養としているのか,機械的に消化腺内に取り込まれているのかは判断できておらず,これを解決するには,安定同位体による栄養段階の解析など,別の解析手法を用いる必要があると考えられた。

(4) “3. 研究の方法(4)”から,幼生は,融合触腕以外の腕を活発に動かすが口器内の顎板はほとんど動かさず,積極的な咀嚼を示唆する行動は認められなかった。これらのことから,ふ化直後の幼生は,細菌類などを消化してエネルギーを得るのではなく,細菌などとの共生によってエネルギーを得ている可能性が考えられた。

(5) 研究期間3年の成果を国際頭足類学会(米国フロリダ州 St. Petersburg, 2018年11月12-16日)にて公表した。

(6) 本研究の成果により,スルメイカ幼生は微生物ループを利用して栄養を得ることが強く示唆された。一方で,ふ化直後の幼生は卵塊由来の細菌との共生の可能性を示唆していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Puneeta P, Vijai D, Yamamoto J, Sakurai Y. Orientation patterns of Japanese flying squid *Todarodes pacificus* embryos within egg masses and responses of paralarvae to light. *Zoological Science*, 査読有, Vol.35, 2018, 293-299, DOI: 10.2108/zs17019

Puneeta P, Vijai D, Yamamoto J, Adachi K, Kato Y and Sakurai Y. Structure and properties of the egg mass of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*. *PLOS ONE*, 査読有, 2017, DOI: 10.1371/journal.pone.0182261

若林敏江, 柳本卓. ミトコンドリアDNA塩基配列分析によるスルメイカの遺伝的集団構造, DNA多型, 査読有, 24巻, 2016, 27-29

Puneeta P, Vijai D, Yamamoto J and Sakurai Y. Male copulatory behavior interrupts Japanese flying squid *Todarodes pacificus* female spawning activity. *Marine Ecology Progress Series*, 査読有, Vol. 551, 2016, 277-281, DOI:10.3354/meps011776.

[学会発表](計3件)

Adachi K, Nakaya M, Yanagimoto T, Goto T, Takahara H, Morioka K, Yamamoto J and Sakurai Y. The links between the bacterial profiles of seawater, feces, and egg masses of *Todarodes pacificus* in an aquarium. *Cephalopod International Advisory Council Conference 2018*.

柳本卓, 若林敏江, 桜井泰憲, 山本潤, 斎藤和敬. スルメイカのマイクロサテライト DNA

マーカーの開発と msDNA 分析により推測された集団構造. 日本 DNA 多型学会, 2017.

時岡駿, 柳本 卓, 山本潤, 桜井泰憲. マイクロサテライトマーカーを用いたヤリイカの卵
嚢内における父性の推定. 日本 DNA 多型学会, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 足立 亨介

ローマ字氏名: (ADACHI, Kohsuke)

所属研究機関名: 高知大学

部局名: 教育研究部自然科学系農学部門

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 00399114

研究分担者氏名: 柳本 卓

ローマ字氏名: (YANAGIMOTO, Takashi)

所属研究機関名: 国立研究開発法人水産研究・教育機構

部局名: 中央水産研究所

職名: 主任研究員

研究者番号 (8 桁): 30443386

研究分担者氏名: 中屋 光裕

ローマ字氏名: (NAKAYA, Mitsuo)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 水産科学研究院

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 80604313

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 桜井 泰憲

ローマ字氏名: (SAKURAI, Yasunori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。