

令和 5 年 6 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：2020～2022

課題番号：20H03055

研究課題名(和文) 母子間の細菌の伝搬に着目したスルメイカ初期餌料の解明

研究課題名(英文) Study on the first food of *Todarodes pacificus* paralarvae focus on bacterial transmission between and mother-to-paralarvae

研究代表者

山本 潤 (Jun, Yamamoto)

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：大型水槽で自然産卵させる多数の親イカを確保できなかったが、小型水槽で産卵を誘発する方法を開発した。微細な有機物が多い環境は、幼生の生存にとって不適で、体表に付着した微細な有機物を索餌する行動も示さなかった。平衡石の分析により卵黄吸収後、しばらくして栄養転換など、その後の生残に影響するイベントが起こる可能性が示された。また、天然海域で採集された胃内容物からカイアシ類などが検出されたが、量が少なく資料の保存等の改良が必要であることが示唆された。天然スルメイカの付着微生物から候補因子を分解するグラム陰性菌が入手され、同菌は飼育水槽のものと同属であり本種の母子伝播に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、本種の幼生は、口器が機能していない可能性が高く、さらに、微細な有機物に対して索餌行動を示さないことが明らかとなった。本種をはじめとするアカイカ科の幼生は、微細な有機物を経口で取り込む前提で仮説が立てられているが、本研究により、幼生は経口ではない別の経路で、かつ積極的な索餌行動を取らなくても栄養を獲得できる可能性が示された。この可能性は、従来の仮説とは異なり、未だに解明されていないアカイカ科幼生の初期餌料の解明に別の視点を与えるものである。また、小型水槽内で温度刺激による産卵誘発は、大きな施設を持たなくとも自然産卵による本種の受精卵を得る方法として有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although we were unable to collect enough numbers of adult squid to spawn naturally in a large tank, we developed a method to induce spawning in a small tank. The environment with a lot of fine organic matter was not suitable for the survival of the larvae, and they did not show any behavior to forage for the fine organic matter attached to their body surface. Analysis of equilibrium stones indicated that events that may affect subsequent survival, such as trophic conversion, may occur some time after egg yolk absorption. In addition, caecilians and other organisms were detected in stomach contents collected in natural waters, but in small quantities, suggesting the need for improvements such as preservation of materials. Gram-negative bacteria that degrade candidate factors were obtained from microorganisms attached to natural squid, and these bacteria were of the same genus as those in the breeding tanks, indicating that they may be involved in mother-to-child transmission.

研究分野：海洋生態学

キーワード：スルメイカ 幼生 初期餌量

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本周辺のスルメイカ資源量は近年、激減しているが、この現象を現行のモデルで説明することができない。その理由として、本種の資源変動は物理環境に加え、初期生態、特に初期飼料(エネルギー・栄養の入手法)に未解明な点が多いことが挙げられる。

(2) スルメイカを含むアカイカ科の幼生の初期飼料の有力な仮説として“幼生は遊泳中に環境中に分布する微細な有機物を外套膜に付着させ、水流や融合触腕を使って口器へと運ぶ”がある。しかしながら、幼生の分布する外洋域の表層は有機懸濁物が希薄で、表層に滞留しつつ成長するためのエネルギーと栄養を環境中の有機物のみから確保するのは困難である可能性が高い。

(3) これまでの成果から、親イカが卵塊を形成するゼリー状物質を分泌する器官である纏卵腺、卵塊そして幼生に共通して存在する細菌を確認している。そこで、本研究では、幼生が確保できる有機物の由来として、親イカから産出卵塊を経由して幼生へと伝搬する細菌に着目した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、スルメイカ幼生の初期飼料を解明することを目的とする。

(2) 本研究では、「幼生が初期飼料とする有機物は親イカの持つ細菌由来である」との仮説をたて、「親イカ纏卵腺に起源を持つ細菌が卵塊を介し幼生外套膜で有機懸濁物となり」「繊毛・融合触腕の動きで口器へ輸送」「消化管で栄養・エネルギーになる」という過程を想定した。本研究では、これを飼育実験で検証する。

3. 研究の方法

(1) 初夏から冬季に北海道津軽海峡周辺で成熟途中のスルメイカを採集し、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。成熟したメスを同センターの大型水槽(150トン)に移し、自然産卵を誘発させ、卵塊からふ化した幼生の採集を試みた。

(2) 上記、成熟したメス個体を用いて人工授精を行い、ふ化幼生を得た。ふ化後数日経過した卵黄を吸収し尽くす直前(摂餌を開始する時期)の幼生の摂餌行動を観察した(有機懸濁物、微小動植物プランクトンを用いた摂餌行動を観察するための実験、融合触腕を用いた摂餌行動の観察、顕微鏡下による口器の詳細観察)。これら行動観察に加え、幼生の平衡石に1日1輪のペースで刻まれた日周輪の観察を行い、成長パターンを調べた。

(3) 幼生の組織を含む微細なゲノム解析を行う際に、幼生本体のDNAが相対的に多く増幅されるため、これを阻害するブロッキングプライマーをCOI領域に設計、作成しその阻害性を検証した。分析方法を確立させて、その方法で天然海域で採集されたスルメイカ幼生について、実際に分析を行い、餌生物を調べた。

(4) 天然海域、および実験水槽スルメイカを採取し、16S rRNAを指標として付着微生物の解析を行った。天然試料は、手袋を装着し人間の手を触れない状態で採取した。スルメイカおよびアオリイカの纏卵腺、輸卵管腺由来 Rna-seq 情報および電気泳動後などから、初期飼料の有機懸濁物の主成分となる候補因子とその生化学的な特性を考察した。

4. 研究成果

(1) スルメイカの不漁に加え研究期間全般における新型コロナ感染症の拡大により、実験に供するに十分な数のスルメイカを確保することは難しかった。特に、多数の状態の良い成熟イカを必要とする大型水槽内で産卵に必要な数を確保することができず、大型水槽内で卵塊を得ることはできなかった。その代わりとして、水量0.5トンほど小型水槽に成熟メスを収容し、温度刺激による産卵誘発を行い、卵塊を得た。

(2) 外套膜上の微細な有機物の挙動を追跡するために、幼生の飼育水にさまざまな微細有機物(微小動植物プランクトン、市販の無脊椎動物用の飼料など)を加えた。その結果、幼生はすべてパニック状態となり、飼育水に何も添加していない無給餌の方が生残時間は長くなった。

これら結果から、微細な懸濁物が海水中に多く存在する環境は、幼生にとって不適であることが示唆された。また、餌料の候補となりうる微細な有機物を幼生がパニックにならない低濃度で飼育水に添加し、成長と生残を調べたが、無給餌環境下で生残した個体（コントロール）と明らかな違いは認められなかった。

(3) これまでの研究で、幼生は外套膜上の細菌塊を始めとする微細な有機物を、融合触腕を用いて口器へと運ぶことが予想されている。そこで、卵黄吸収前後の幼生の行動について、特に融合触腕の動きを観察した。その結果、融合触腕を伸ばす行動は観察されたが、外膜上に腕を伸ばして索餌する個体は認められなかった。また、生物顕微鏡下で幼生の口器について詳しく調べた結果、卵黄を吸収完了直前（摂餌を開始する時期と考えられる時期）の幼生の口器は機能していない可能性が示された。

(4) 上記の結果から、幼生は卵黄を吸収した後、一定期間摂餌しないことが予想された。そこで成長や体の生理的な変化を反映する平衡石上に形成される輪紋構造について、卵黄吸収完了後に衰弱して死亡した人工授精による幼生（飼育個体）と稚イカまで生残した個体（天然個体）の平衡石上に形成された輪紋構造を比較した。その結果、天然個体には飼育個体にはない特徴的な輪紋が卵黄吸収完了後しばらくしてから形成されていることが確認された。本研究により、卵黄吸収完了後しばらくの間に栄養の転換など、その後の生残を決定づけるイベントの存在が示唆された。

(5) スルメイカの mtDNA COI 領域について、DNA データベースから既存の塩基配列を元に、ブロッキングプライマーとして、3 末端にスペーサーを付着したもの、Locked Nucleic Acid (LNA)、ペプチド核酸 (PNA) などを作成した。これらの分量と PCR の条件を細かく検討した。これらにより、スルメイカの DNA の増幅が抑えられる PCR システムを開発した。天然海域で採集されたスルメイカ幼生として持ち込まれたサンプルについて、mtDNA の COI 領域の塩基配列分析を行ったところ、66 個体中 24 個体が異なるイカ類であった。天然海域におけるスルメイカ幼生の食性を調べる際には、まず本当にスルメイカ幼生であるか、DNA 分析により確認する必要がある。ブロッキングプライマーと次世代シーケンサー (NGS) を用いて天然海域で採集したスルメイカ幼生について胃内容物分析を行ったところ、ホスト (スルメイカ) の DNA はブロックされ、その他の生物の DNA を検出することができた。検出された動物プランクトンはカイアシ類とクラゲ類で、これらのデトリタスが胃内容物の中から検出されたと考えられた。ただし、検出された量は少なく、サンプリング時による DNA の損傷などの原因が考えられた。そのため、サンプリング後の保存方法の改良などが必要と考えられた。

(6) 天然スルメイカの付着微生物の解析から、親魚に候補因子を分解するグラム陰性菌の初期餌料関連菌が入手された。また、同個体の組織片の培養からも同菌は入手可能であることが分かった。同関連菌はこれまで飼育水槽で得られたものと同属であり、報告者らが仮説を立ててきた母子伝播に関わる菌は実験飼育環境や、サンプリング時に付着したのではなく、天然のスルメイカ本来持っているものである可能性が示唆された。

(7) ”3. 研究の方法 (4)” により仮説に沿う有機懸濁物の候補因子とその生化学的な特性を考察した。結果、同因子は巨大分子であり、一定条件下で線維化することが示された。同候補と前述の (6) の候補菌を含む分解物を人工授精したスルメイカ幼生に投与し、その効果を検証したが、用いた実験条件では初期餌料として明瞭な結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五十嵐紗衣, 中屋光裕, 沖本恭平, 高津哲也, 山本 潤
2. 発表標題 スルメイカの卵発生に適した環境の把握
3. 学会等名 日本水産増殖学会第20回大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 亨介 (Kohsuke Adachi) (00399114)	高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授 (16401)	
研究分担者	柳本 卓 (Takashi Yanagimoto) (30443386)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	中屋 光裕 (Mitsuhiro Nakaya) (80604313)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------