

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20580198

研究課題名（和文） ヤシガニ牧場の構築に向けた基礎的研究

研究課題名（英文） Studies on seed production and genetic population structure in the coconut crab

研究代表者

濱崎 活幸（HAMASAKI KATSUYUKI）

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号：90377078

研究成果の概要（和文）：ヤシガニの遺伝的多様性の保全に配慮した増養殖技術の確立に向けた種苗生産技術の開発と遺伝的集団構造の解明に取り組んだ。ゾエアとメガロパの飼育に適した環境（水温、光、湿度、宿貝、基盤（隠れ家）、上陸時期）を解明し、大量種苗生産技術の足がかりを得た。北太平洋から得たサンプルの mtDNA の塩基配列を解析した結果、採集場所独自のハプロタイプがグループを形成しないことから、遺伝的分化の程度は小さいことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study developed the seed production technology and examined the genetic population structure for supportive breeding of the coconut crab *Birgus latro*. We revealed the optimal rearing condition of zoeae and megalopae such as water temperature, light intensity, photoperiod, humidity, and shell and shelter availability for mass seed production. The sequence analysis based on mtDNA COI region showed small genetic differentiations among crab samples collected from the North Pacific Islands.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：希少種、ヤシガニ、増養殖、種苗生産、集団遺伝、初期生活史、オカヤドカリ類

1. 研究開始当初の背景

ヤシガニは体重 2 kg 以上に成長する陸生の大型ヤドカリ類で、琉球列島以南の島嶼域に分布している。開発による生息域の縮小によって個体数が減少し、環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧Ⅱ類（絶滅の危機が増大している種）として掲載されるに至っている。しかし、最近、沖縄ではヤシガニ料理を売りにする飲食店等も目だって増えており、商業

利用による乱獲・絶滅が強く懸念されている。

このような絶滅の危機に瀕したヤシガニ資源を持続的に利用するには、天然個体の捕獲を制限・禁止しながら、人間が利用するものについては養殖によってまかなうことが必要である。養殖技術の確立には、第一にふ化から稚ガニまでヤシガニを育てる種苗生産技術の確立が必須であり、この人工的に育てた稚ガニを、逃亡を防ぐように区画した陸

上で放牧するのである。

ヤシガニの卵は雌の腹部に抱かれて発生する。ふ化が近付くと雌は海岸に移動し、幼生を海に放つ。ふ化後の幼生は海水中で発育し、4期のゾエアと1期のメガロパを経て稚ガニへ脱皮する。メガロパになると普通のヤドカリと同じように貝殻に入り、上陸すると言われているが、いつ上陸するのか詳細は不明で、稚ガニの脱皮・成長に成功した事例はない。

2. 研究の目的

本研究は、絶滅危惧種でありながら食用として利用されているヤシガニの増養殖技術（ヤシガニ牧場）を確立する基礎として、第一に種苗生産技術を開発することを目的としている。また、種苗生産技術が開発されれば、稚ガニを自然界へ放ち、天然個体群の復活を目指した保全増殖活動も可能になる。そうした場合、保全の対象を明確にしておくことが重要である。近年では、例え同種であっても、進化的背景の異なる進化保全単位（ESU: Evolutionarily Significant Unit）ごとに管理・保全すべきとされ、異なるESUの島から他の島へ稚ガニを放つことは避けなければならない。また、ESUごとにヤシガニ牧場を管理する必要がある。そこで、本研究では遺伝的多様性の保全に配慮した増養殖技術を確立する基礎として、琉球列島を中心とした北太平洋におけるヤシガニの遺伝的集団構造の解明にも取り組む。

本研究の目的を達成するための主要な研究課題は以下の通りである。

(1) 卵発生を定量化し、ふ化日の予測を可能にする。また、卵の人工培養方法を開発し、卵発生に適した温度を明らかにする。

(2) 甲殻類の種苗生産では幼生が水槽底に沈降し、大量に死亡する現象が知られており、その原因として、幼生の発育にともなう行動特性の変化、すなわち走光性や走地性の変化が指摘されている。そこで、ヤシガニ幼生の走光性、走地性および浮遊性に関わる体密度の変化を明らかにする。

(3) 幼生の飼育に適した水温と光周期を把握する。

(4) メガロパに変態すると、貝殻に入り上陸するが、完全に陸上生活へ移行する時期は明らかではない。そこで、メガロパの行動の変化を詳細に捉える。また、湿度、宿貝と基盤（隠れ家）の有無および上陸時期が上陸行動や上陸後の成長と生残に及ぼす影響を実験的に明らかにする。

以上の取り組みによってメガロパ・初期稚ガニまでの大量種苗生産技術の確立に向けた足がかりを得る。

(5) 琉球列島を含む北太平洋の島嶼域からヤシガニを入手し、ミトコンドリア DNA

(mtDNA) の塩基配列に基づき、集団遺伝学的解析を行い、遺伝的変異性と集団構造を推定する。さらには、将来的なヤシガニ稚ガニ放牧後の野外調査における採集個体の種判別を確実にを行うために、ヤシガニを含むオカヤドカリ科7種の遺伝的種判別手法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 先島諸島で捕獲した抱卵雌を陸（プラスチック製のプレート）と海（人工海水）を備えた容器に収容した（図1）。ふ化までの期間中に適宜卵を採集して側面から写真撮影し、卵の側面積に対する胚体の面積比を算出してふ化までの積算温度の関連を調べた。

卵の人工培養は、淡水と異なる塩分の人工海水（10、20、30、40、50%）10 mLを入れた20 mLのスクリー菅瓶（各区3本）を用いる方法と湿らせた脱脂綿を入れたシャーレ（各区3枚）を用いる方法について検討した。未発眼卵と発眼卵を各10個、それぞれの容器とシャーレに入れ、28℃に空調した室内で培養し、発生状況を調べた。観察は抱卵雌にふ化が起こるまで行った。卵の温度別培養実験は21、24、27、29、32℃に調節した温度勾配インキュベータを用いて実施し、未発眼の卵を供した。卵の培養は9 mLの25%と30%の人工海水を入れた10 mLのスクリー菅瓶に卵を1個ずつ収容して行い、両塩分とも各温度区で15本の瓶を用いて発眼までの日数を調べた。

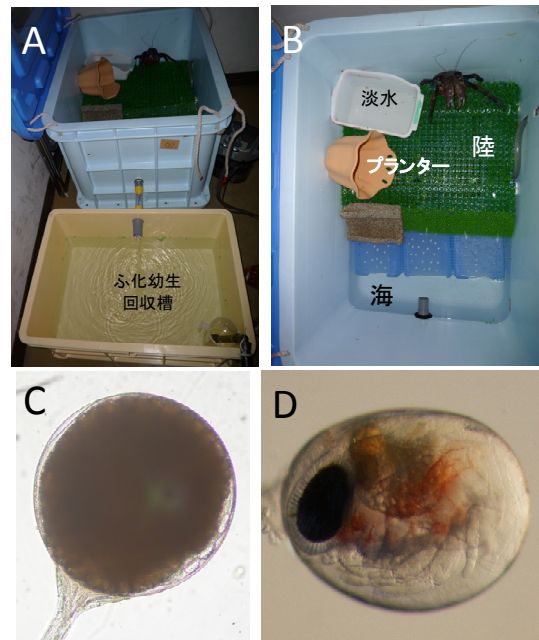


図1 ヤシガニ抱卵雌の飼育容器 (A, B), 胚体形成卵 (C, 長径 0.75mm) およびふ化直前卵 (D, 長径 0.95mm). (浜崎 2011)

(2) 《走光性》横長のアクリル水槽 (13×150×10 cm) の中心に幼生を10尾投入し、片側

から以下の光量別・波長別条件で光を照射し、5分後の幼生の位置を記録した。いずれの試験も光源として太陽光の波長に近いメタルハライドランプを用いた。光量別試験では、0.0031、0.031、0.31、3.1、31 および 310 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ の照射区と暗黒区、計7区を設け、波長別試験では、400~660 nm の範囲で20 nmごとに14区を設けた。各波長はバンドパスフィルターで調整し、光量は1.3 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ とした。《走地性》円筒形アクリル容器（直径10 cm、高さ40 cm）上部より光を照射する区（3.1 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ）と暗黒区を設け、幼生を水面から1尾ずつ投入し、5分後の位置を記録した（ $n = 10$ ）。《体密度》比重1.063~1.093 g/cm^3 （0.002 間隔）のショ糖溶液に幼生を1尾ずつ收容し、中性浮力を示したショ糖の比重を幼生の体密度として記録した（ $n = 20$ ）。さらに、海水を入れた100 mLメスシリンダーの上部より麻酔処理をした幼生を投入し、20 mLずつメモリを通過したラップタイムを計測し、沈降速度を算出した（ $n = 20$ ）。

(3) 6段階の異なる水温区（平均18.9, 21.3, 24.6, 27.0, 29.8, 32.4°C）と5段階の異なる光周期区（24L:0D（以下、24L区）、18L区、12L区、6L区、0L区）を設けた。飼育には1Lビーカーを用い、ふ化幼生を30尾ずつビーカーあるいは組織培養6穴プレートに收容し、餌としてワムシやアルテミアを与えてメガロパまで飼育した。

(4) メガロパが貝殻に入り歩行するまでの行動変化を調べるために、メガロパをアクリル製の小型容器に個別に收容して CCD カメラで連続撮影した。観察は12L:12D条件で行い、暗期には赤外線を照射して画像を記録した。

メガロパの上陸行動と成長・生残は、陸（砂）と海（人工海水）を備えた小型の実験容器（図2）を用いて調べた。環境条件として湿度の高低および宿貝と基盤の有無を設定し、また上陸時期が異なる区を（メガロパ変態当日、5日目、10日目、貝殻に入って歩行可能後）を設定した。

以上の飼育実験で用いたヤシガニ成体は実験終了後に採集地に放した。

(5) 与論島（15尾）、沖縄本島（5尾）、北大東島（9尾）、宮古島（12尾）、石垣島（32尾）、鳩間島（41尾）、与那国島（24尾）、グアム島（7尾）、パラオ・ペリリュー島（4尾）、インドネシア・マナド（5尾）において、自切させて得たヤシガニ第4脚の筋肉サンプルを用い、mtDNAのCOI領域をFolmerのユニバーサルプライマーでPCR法により増幅し、オートシーケンサーで塩基配列を決定した。また、文化庁の許可を得て入手した国内産オカヤドカリ類5種（オカヤドカリ、コムラサキオカヤドカリ、ムラサキオカヤドカリ、ナキオカヤドカリ、オオナキオカヤドカリ）お

よびパラオ産サキシマオカヤドカリの筋肉サンプルを用い、PCR法により核DNAのITS-1領域を増幅し、各種の制限酵素（Alu I・Hae III・Taq I・Msp I・Xsp I・Afa I）で処理後に切断片長を比較した。

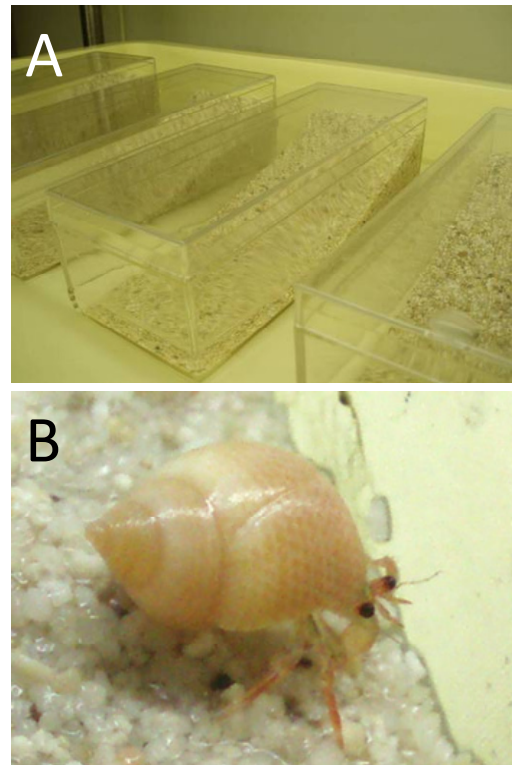


図2 メガロパの上陸実験に用いた飼育容器 (A) (8 cm 幅, 20 cm 長, 6.5 cm 高) と貝殻 (殻高は4 mm 程度) に入って上陸したメガロパ (B). 容器は人工海水を入れたバットに置き、多数の小さな穴を通して海水が入ってくるが、容器の奥半分側には砂を高く盛り、陸地となっている。(浜崎 2011)

4. 研究成果

(1) ふ化までの積算温度は胚体の側面積比が増大するにともない直線的に減少し、産卵からふ化までの積算温度は1000 日・°C程度と推定された。

ヤシガニ卵は淡水中では発生しなかった。塩分を含む人工海水中では発生が進行したが、10%と50%では発生が遅れ、ふ化現象はみられなかった。培養液のないシャーレ中では、発生が進んだものの、発眼・ふ化までに至らなかった。このように、ヤシガニ卵は20~40%の人工海水中で培養可能であり、培養には卵の浸透圧に近い25~30%の塩分が適しているものと考えられた。卵の温度別培養実験では、この塩分で培養した結果、いずれの温度でも発眼まで発生が進行し、「内的な発育最適温度」は24.5°C前後と推定された。

(2) 《走光性》ヤシガニ幼生は光に対して強い正の走性を示したが、齢期が進むほど弱い

光量 ($0.031\sim 0.0031\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) に対する正の走性は弱くなる傾向を示した。光量別試験では、ゾエア幼生はどの波長においても正の走性を示したが、 $620\ \text{nm}$ 以上の波長ではやや弱い正の走性を示す傾向がみられた。メガロパ幼生の波長に対する反応はゾエアと同様であったが、正の走性は弱くなる傾向がみられた。《走地性》第1齢と第2齢ゾエアは光照射・暗黒に関わらず容器内で分散し、第3齢と第4齢ゾエアは光照射によって容器上層に分布した。一方、メガロパはいずれもの条件でも容器底に沈降する傾向が強かった。《体密度》幼生の体密度は $1.089\ \text{g}/\text{cm}^3$ から $1.072\ \text{g}/\text{cm}^3$ へ成長とともに減少する傾向がみられた。一方、沈降速度は、第1齢から第3齢にかけて $7.4\ \text{mm}/\text{sec}$ から $10\ \text{mm}/\text{sec}$ へ増加し、以降一定となった。以上の結果より、ヤシガニ幼生の体密度は海水比重よりも大きいことから、海水中で浮遊するには正の走性による自発的な遊泳や水流による浮力の補助が必要であることが分かった。

(3) 第1齢ゾエアは 18.9°C では1度も脱皮せず全滅した。生残率と発育・成長は 27.0°C と 29.8°C で良好であり、ゾエアは4回脱皮してメガロパに変態した。ふ化からメガロパまでの期間は、高水温で短縮され、 21.3°C で54日、 32.4°C で15日であり、生残と発育に適していた $27.0\sim 29.8^\circ\text{C}$ では19~23日であった。また、水温とメガロパまでの期間の関係に積算温度則を適用して求めた発育臨界温度は 18°C 程度であり、実際の飼育実験の結果に一致した。

光周期実験では、0L区の生残率が他区に比較して低かった。日長時間と生残率の関係は上に凸の二次曲線で表され、12L~18Lで高い傾向を示した。メガロパまでの所要日数は0~18L区では16日前後であったが、24L区では延長され、平均19~20日を要した。頭胸甲長は24L区で、乾燥重量は0L区と24L区で大きい傾向がみられた。生残率と乾燥重量の間には有意な負の相関関係が認められたことから、成長の良い個体が生き残っている可能性が示唆された。

(4) メガロパは変態当日には活発に遊泳した(図3)。その後、遊泳頻度は次第に低下したが、潮位が高い時間帯に高くなる傾向がみられた。一方、貝殻に入る個体は2日目以降から増加し、4日目以降では貝殻を背負っている時間が背負っていない時間よりも長くなった。貝殻に対する興味行動は、3日目から5日目に多く確認された。また、貝殻に入って歩行する個体は潮位が低い時間帯に多く観察される傾向がみられた。以上のことから、メガロパ幼生は貝殻に入らない状態の浮遊生活、貝殻に入ったり脱いだりを繰り返しながら浮遊生活から底生生活へ移行する時期、貝殻を背負って海底上を歩く底生生活の

順で生活型を変化させているものと考えられた。また、遊泳および歩行のリズムから、接岸に選択的潮汐移動を利用している可能性が考えられた。

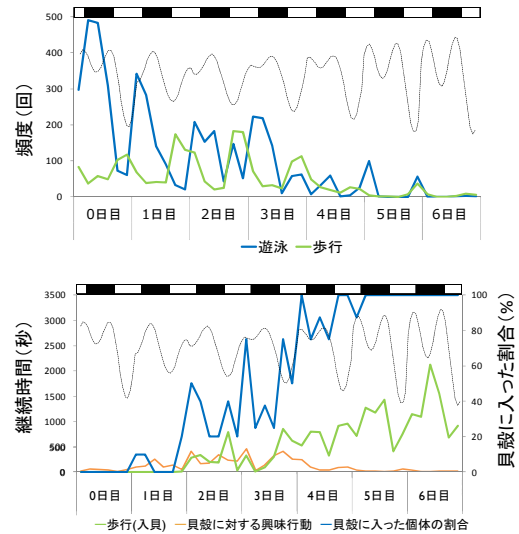


図3 ヤシガニメガロパの行動の変化。頻度は1日6回(各1時間)観察して求めた。上段のバーは昼(白)・夜(黒)を示す。また、破線は実験地近くの東京湾の潮位を模式的に示した。

メガロパは変態後1週間程度で上陸した(図2)。メガロパは宿貝を利用し、上陸率および生残率は高湿度で宿貝を与えた区で高い値を示した。また、基盤設置区では対照区より上陸個体の割合が高く、上陸個体は基盤下へ入る傾向が強かった。メガロパ変態当日に自主的に上陸可能とした場合、5日目、10日目に強制上陸させた場合、貝殻に入り歩行可能になった段階で上陸させた場合の生残と上陸状況を比較したところ、貝殻に入り歩行可能になった個体の生残率が安定する傾向があった。

以上のことから、メガロパを飼育するには高湿度環境下で適度な基盤が必要であるものと考えられた。そこで、適正な飼育条件下(高湿度、基盤有)で20~200尾のメガロパを大量飼育した。その結果、大量飼育した個体の半年後の生残率は20~40%程度に達し、ヤシガニ稚ガニの大量飼育技術の確立に向けた足がかりが得られた。

(5) mtDNAのCOI領域の塩基配列に基づく集団遺伝学的解析の結果、ヤシガニの遺伝的多様性は比較的高く、サンプル採集地独自のハプロタイプがグループを形成することはなかったことから、北太平洋のヤシガニ集団の遺伝的分化の程度は低いことが判明した。

オカヤドカリ科7種全てにおいて、ITS-1領域が増幅された。ITS-1領域はどの種でも

1,000 bp 前後であり、長さに大きな差はみられなかった。制限酵素による反応では、酵素 Msp I を用いた際に、すべての種で特異的なバンドパターンが確認され、種判別が可能であることが示された。

以上のことから、琉球列島産ヤシガニは同じ ESU とみなされ、本研究によって保全を目指した種苗生産が可能になった。

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 4 件)

- ① 浜崎活幸 (2011) ヤシガニの初期生活史研究—飼育によるアプローチ. *Cancer* 20, 73-77. 査読なし
http://rose.hucc.hokudai.ac.jp/~s16828/cr/j-site/j-Top_page.html
- ② Katsuyuki Hamasaki, Mio Sugizaki, Ayaka Sugimoto, Yu Murakami, Shuichi Kitada (2011) Emigration behaviour during sea-to-land transition of the coconut crab *Birgus latro*: effects of gastropod shells, substrata, shelters and humidity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 403, 81-89. 査読あり
doi: 10.1016/j.jembe.2011.04.007
- ③ Mio Sugizaki, Katsuyuki Hamasaki, Shigeki Dan, and Shuichi Kitada (2010) Growth and morphogenesis of larvae reared at different temperatures and mass culture of larvae in the coconut crab *Birgus latro*. *Aquaculture Science* 58(1), 135-142. 査読あり
<http://wwb.jp/zoushoku/>
- ④ Katsuyuki Hamasaki, Mio Sugizaki, Shigeki Dan, and Shuichi Kitada (2009) Effect of temperature on survival and developmental period of coconut crab (*Birgus latro*) larvae reared in the laboratory. *Aquaculture* 292, 259-263. 査読あり
doi:10.1016/j.aquaculture.2009.04.035

[学会発表] (計 10 件)

- ① 飯塚千香子・中島香織・尾島明日香・浜崎活幸・北田修一 (2011) ITS 領域の PCR-RFLP 分析によるオカヤドカリ科 7 種の種判別. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.
- ② 服田 宙・高野 謙・浜崎活幸・北田修一・池本孝哉 (2011) ヤシガニとオオナキオカヤドカリ卵の人工培養による「内的な発育最適温度」推定の試み. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.
- ③ 小木曾陽介・浜崎活幸・北田修一 (2011)

ヤシガニゾエア幼生の生残と発育に及ぼす光周期の影響. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.

- ④ 加藤沙織・村上友羽・扇 俊秀・浜崎活幸・北田修一 (2011) 個別飼育によるオカヤドカリ科 6 種のゾエア幼生の発育過程の検討. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.
- ⑤ 渡邊知博・浜崎活幸・北田修一 (2011) オカヤドカリ類のメガロバと初期稚ガニの巣穴形成行動の比較: ヤシガニ・オオナキオカヤドカリ・ムラサキオカヤドカリ. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.
- ⑥ 石山尚樹・浜崎活幸・北田修一 (2011) ヤシガニメガロバ幼生の着底行動. 日本甲殻類学会第 49 回大会、平成 23 年 10 月 22 日、東京海洋大学、東京.
- ⑦ 尾島明日香・杉崎みお・杉本斐香・村上友羽・浜崎活幸・北田修一. 琉球列島産ヤシガニのミトコンドリア DNA における遺伝的変異性と集団構造について. 日本甲殻類学会、平成 22 年 11 月 13 日、沖縄県西原町、琉球大学.
- ⑧ 浜崎活幸. ヤシガニの初期生活史研究—飼育によるアプローチ. 日本甲殻類学会、平成 22 年 11 月 12 日、沖縄県西原町、琉球大学.
- ⑨ 杉本斐香・杉崎みお・村上友羽・浜崎活幸・北田修一. ヤシガニの初期生活史に関する研究: 幼生の成長にともなう走光性、走地性および体密度の変化. 日本甲殻類学会、平成 20 年 11 月 16 日、鹿児島市、鹿児島大学.
- ⑩ 村上友羽・杉本斐香・杉崎みお・安藤友佑・浜崎活幸・北田修一. オカヤドカリ類の初期生活史に関する研究: 抱卵期間の推定. 日本甲殻類学会、平成 20 年 11 月 16 日、鹿児島市、鹿児島大学.

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱崎 活幸 (HAMASAKI KATSUYUKI)
東京海洋大学・海洋科学部・准教授
研究者番号: 90377078

(2)研究分担者

北田 修一 (KITADA SHUICHI)
東京海洋大学・海洋科学部・教授
研究者番号: 10262338