

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な利用に資する研究」領域)

資源の持続的利用に向けたマグロ2種の産卵生態と

初期生活史に関する基礎研究

(パナマ共和国)

平成 22 年度実施報告書

代表者： 澤田 好史

近畿大学水産研究所大島実験場・教授

<平成 22 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

パナマ共和国を含む中米諸国ではキハダと太平洋クロマグロの漁業、養殖業は重要産業であるが、その資源量の大きな変動に加え、漁獲過剰と地球規模の気候変動による減少が危惧され、産業基盤が揺らいでいる。本課題では両種の将来に亘る持続的な漁業に必要な資源管理技術向上と、キハダの天然資源に頼らない養殖技術確立を、パナマ共和国水産資源庁 (ARAP)、日本およびパナマ共和国を含む 16 カ国が加盟する全米熱帯マグロ類委員会 (IATTC) との共同研究で目指す。また将来これらの研究を担うパナマの若い専門家の育成も行う。

本年度は本格的な研究・技術開発の準備期間とし、来年度からの本格的な飼育実験予備試験、野生キハダの試料採取、研究・分析設備・機器の準備、来年度から得られる試料の分析方法開発等を研究目標とした。主な研究内容は以下 1、2、3 である。

1. 予備試験および実験・分析体制の協議と準備

- ・研究情報収集・予備試験 (R/D 署名以前と以降 2011 年 3 月末まで)

当課題の研究体制は 3 つのチーム、産卵生態解明、栄養要求解明・飼料開発、初期発育解明と飼育技術開発チームで編成されている。これらのチームで、来年度以降の本格的な共同研究実施内容について、情報収集と予備的な試験を行った。

- ・実験・分析体制の協議と準備

近畿大学専門家の ARAP および IATTC 実験場訪問 (R/D 署名以降 2011 年 3 月末まで)

近畿大学専門家が上記を訪問し、飼育実験の設備と技術、試料分析の設備と技術水準等の情報を収集し、来年度からの実験に備えて協議を行った。また、来年度からの実験に備え、上記の 3 つの研究チームでそれぞれの成果目標と研究・技術開発スケジュールの確認と各研究者の役割分担の協議を行っている。これらは平成 23 年 4 月末までに終了する予定。

2. 野外調査 (R/D 署名以降 2011 年 3 月末まで)

日本で野生キハダ幼魚の試料を得た。この試料から野生・飼育個体群の遺伝情報解析技術開発、視覚の発育過程解析準備、健康状態の指標作りを開始している。

3. IATTC および ARAP 研究員の近畿大学での博士号取得を到達点とする教育 (大学院レベルの教育) の対象者の人選と研究テーマの選定 (R/D 署名以前と以降 2011 年 3 月末まで)

ARAP および IATTC で特に若手研究者について、近畿大学での博士号取得を目標とした大学院レベルの教育を 2・3 名程度について実施することを目標とし、そのための人選と研究テーマの選定、スケジュールの立案を行っている。これについては平成 23 年 4 月末までに概要を決定する。

2. 研究グループ別の実施内容

産卵生態解明チーム

① 研究のねらい

産卵生態解明チームでは、キハダと太平洋クロマグロの資源予測技術向上を目指した天然海域での年毎の産卵状況の把握法開発と、キハダの人工孵化・養殖技術の基礎となるキハダ親魚の飼育下での産卵生態解明、系統判別と育種のための基盤西部を目指している。平成 22 年度はこれらの本格的な研究の準備を実施した。内容としては、1. キハダおよび太平洋クロマグロの飼育下での産卵状況、産卵と環境との関係に関する情報の収集、2. キハダと太平洋クロマグロの母系解析、3. 両種の産卵親魚の生理状態把握のための遺伝子発現解析と系統判別・育種のための基盤整備である。

②研究実施方法

1. キハダおよび太平洋クロマグロの飼育下での産卵状況、産卵と環境との関係に関する情報の収集

キハダについてはパナマ共和国 IATTC アチョチヌス実験場で飼育されている産卵親魚の産卵状況（孵化率・卵の化学成分等）と飼育環境の毎日記録する。太平洋クロマグロについては、近畿大学水産研究所大島実験場で飼育されている産卵親魚の産卵状況と飼育環境の毎日記録する。

2. キハダと太平洋クロマグロの母系解析

太平洋クロマグロについては、世界の総漁獲量の 70-80%が水揚げされる日本市場の漁獲物から個体ごとに鱗を採取、試料を収集し、解析する。キハダも同様の方法で資料収集すると同時に、パナマ共和国その他の漁獲物調査を実施する。

3. 両種の産卵親魚の生理状態把握のための遺伝子発現解析と系統判別・育種のための基盤整備

生殖腺を含む内臓の生理状態の把握方法として、内臓の生理状態の指標となる遺伝子群の発現状況を知ることが重要な手段となる。それにはそのような遺伝子群のライブラリーの作成とクローニングとが必要となり、まずは各臓器で発現している遺伝子の mRNA の採取とその cDNA の配列決定が必要な項目となる。本年度は両種（キハダは野生魚、クロマグロは飼育魚）の各臓器の組織を採取し、そこで発現している mRNA の採取を試み、ライブラリー作成をまず行う。

さらに、今後母系解析や生理状態把握、個体識別、育種等で必要となる様々な遺伝子のライブラリーとして、両種のゲノム DNA の 1 セットをライブラリー化した BAC クローンを作成する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

1. キハダおよび太平洋クロマグロの飼育下での産卵状況、産卵と環境との関係に関する情報の収集

まずアチョチヌス実験場では、キハダの飼育下での産卵状況（産卵数・産卵時刻・孵化率）を毎日記録することを始めている。同時に、産卵と環境の関係を解明すべく、天候、気温、飼育水温等も記録している。さらに太平洋クロマグロでも、近畿大学大島実験場（和歌山県東牟婁郡串本町）においても、産卵状況、天候、気温、水温等の記録を毎日行っている。これらのデータの解析については、さらにデータを収集しつつ行う予定。

2. キハダと太平洋クロマグロの母系解析

太平洋クロマグロについては、すでに日本市場での 500 個体の試料の収集を終えて、ミトコンドリア D-loop と DNA マイクロサテライトの解析を始めている。キハダについては、試料採取と解析計画を立案中である。

3. 両種の産卵親魚の生理状態把握のための遺伝子発現解析と系統判別・育種のための基盤整備

クロマグロについては、飼育個体で、生殖腺を含む内臓の生理状態把握に有効な生理状態関連遺伝子をクローニングすべく、各内臓の組織試料収集を開始した。キハダについては、沖縄で野生個体 20 個体からの試料採取を実施した。

太平洋クロマグロについては飼育個体の精巣から DNA の BAC クローン作成に着手した。キハダについては、沖縄でのサンプリングにより、20 個体の野生個体の肝臓を採取し、現在抽出した DNA を用いて 384 穴マイクロタイププレー72 枚分の BAC クローンの作成を進めているところである。

④カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

今年度技術移転はなかったが、当事業の計画立案を共同で行うことにより、当事業の内容の研究課題の重点の置き方、方向性、研究方法についての情報は伝達された。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況（あれば）

特になし。

栄養要求解明・飼料開発チーム

①研究のねらい

本事業における栄養要求解明・飼料開発チームでは、キハダと太平洋クロマグロの仔稚魚・幼魚期の天然海域での生残を理解し、毎年の資源加入量の予測に繋げるために、生残に大きく影響する天然海域での餌料の栄養価の解析、両種の仔稚魚・幼魚期の栄養要求の解明、摂餌生態・消化機能の発育過程解明を目指している。両種の初期生活史における餌料生物の栄養価についてはこれまでにほとんど知見がない。本事業においても太平洋クロマグロの天然海域での餌料の試料を得ることは、産卵場が沿岸域から遠く離れるために困難であるため、同種の初期生活史における栄養要求は飼育実験結果からの解明が中心となるが、キハダについては、パナマ共和国の研究拠点である IATTC アチョチヌス実験場沖合いに産卵場があり、餌料となる生物の採取も可能であることから、天然海域の仔稚魚・幼魚の餌料の栄養価分析と仔稚魚のそれらの利用状況解明が可能である。

また、本事業では、飼育実験を実施することにより、キハダ養殖における基盤技術として、人工配合飼料の開発を行うことも目的としている。これについては、本事業では対象としないが、国内での研究が先行している太平洋クロマグロ仔稚魚の人工配合飼料の情報も参考とする。

本年度は、キハダ用人工配合飼料開発を目的として、酵素処理魚粉を通常の魚粉に置き換えた場合の消化酵素活性を、予備的試験として、まずは太平洋クロマグロで調べた。太平洋クロマグロの養殖用人工配合飼料として酵素処理魚粉を使用したものが近畿大学で開発されているが、現在の価格はまだまだ高く、産業用としては廉価な魚粉を使用した飼料の開発が必要であり、キハダにおいても将来同様の問題が生じることが予想される。

②研究実施方法

本年度はキハダでの飼育実験ができなかったため、太平洋クロマグロ稚魚で酵素処理魚粉の配合割合を変えた飼料で飼育実験を実施し、その影響を飼育期間中の成長、消化酵素活性を検証することにより調べた。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

現在太平洋クロマグロの飼育実験によって得られた結果を解析中である。今後は同様の飼育試験をキハダ稚魚にも実施し、両種の比較を通して両種の初期生活史における栄養要求解明とキハダの人工配合飼料開発に資する予定である。また、両種初期生活史の摂餌生態、消化器系の発育については、今後飼育試験と天然海域で得られる試料から解析することを予定している。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

本年度はこの分野では技術移転はなされなかった。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

特になし。

初期発育解明と飼育技術開発チーム

①研究のねらい

魚類は仔稚魚期に大量に斃死する、いわゆる初期減耗のため資源変動が激しい。仔稚魚期の生残過程を明らかにすることは、魚類資源管理にとって最も重要な研究である。本研究では大規模回遊をするク

ロマグロとキハダマグロ仔稚魚の生態的特徴について、種間比較を行い初期減耗の原因を解明する。具体的にはキハダと太平洋クロマグロの卵、仔魚、稚魚、幼魚期までの天然海域での成長、発育、生残の様相、特にこれらと環境要因および餌料との関係を両種で比較しつつ明らかにすることを目的としている。また、キハダの人工孵化・養殖技術基盤整備のために飼育下での成長、発育、生残の様相とそれらの改善策を開発することも目的としている。本年度の研究では、1. 卵発生、2. 視覚の発育、3. 行動の発育、4. クロマグロ稚魚の運動能力と摂取エネルギー解明、5. 形態発育を内容とした。

②研究実施方法

1. 卵発生

キハダ親魚水槽で採卵し、受精後の胚発生段階の進行状況の決定、および採卵後を異なる水温下で培養し、発生速度の差を調べる。水温と発生速度の関係 形態形成の進行状況が水温の高低によってどのような影響を受けるかを調べ、クロマグロの知見と比較する。キハダの胚発生過程の解明では発生系列の組織標本を作製し、胚葉形成、器官形成等につき、クロマグロの発生進行と比較する。特に生殖巣の形成過程、性分化に焦点を当てる。

2. 視覚の発育

キハダとクロマグロ仔稚魚の自然環境下における適切な生息環境を明確にするには、それぞれの魚の視覚特性と光情報に対する行動を詳細に調べることが望ましい。また、仔稚魚の環境変化に伴う影響を推察するには、各種環境負荷に対するストレス耐性および応答を調べる必要がある。本研究では、まずキハダ視物質の検出と構造解析、クロマグロ視物質の発現解析について検討した。また、クロマグロ仔稚魚の発育に伴う光刺激応答の行動解析を行った。さらに、クロマグロ仔稚魚の環境負荷に対する耐性を調べ、それらの耐性の変化を推察した。

キハダ視物質の検出と構造解析を行うため、パナマ共和国および沖縄県に出向き、天然キハダ成魚を釣獲して網膜を採取・保存した。定法に従い、キハダの視物質 mRNA を抽出して逆転写後に cDNA を作成し、クローニングして構造解析を行う。クロマグロは、近畿大学水産研究所大島実験場で飼育されたものを用い、既に報告された構造解析データを基に、仔稚魚の発育に伴う視物質の発現解析を行う。

3. 行動の発育

仔稚魚の発育に伴う光刺激応答をビデオ撮影し、遊泳速度等の行動を詳細に解析する。さらに、クロマグロ仔魚を採取し、各種の環境負荷を与えた時の致死濃度を断片的に求める。

4. クロマグロ稚魚の運動能力と摂取エネルギー解明

稚魚期のクロマグロを対象として、水温と餌がクロマグロの運動能力と摂取エネルギーに及ぼす影響の研究を実施した。海面に $12 \times 12 \times 5 \text{ m}^3$ (縦×横×深さ) の生簀を2面 A、B を設置し、A は配合飼料 B はイカナゴ(生餌)で飼育し、成長・生残率・生残率の相違について解析した。

5. 形態発育

キハダ形態形成、成長発育に関するクローニングとその解析を行い、筋肉(赤身筋、血合筋)の形成解析とその形質に関する育種につなげるためのマーカー遺伝子探索を進める。また、胚発生期から100日齢への高成長期における筋肉形成過程の解析を行う。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

1. 卵発生

キハダの採卵はパナマでないと行えない。現時点ではサンプリングのあと持ち帰って行う組織学的

解析準備、現地での解析用の資材投入準備等のみであり、マダイ、マサバ等で解析技術の予備実験を行っている。

2. 視覚の発育

パナマ共和国では、渡航中にキハダ成魚を釣獲できなかった。そこで、帰国後に沖縄県に出向き、天然キハダ成魚を釣獲して網膜を採取・保存した。現在、視物質の検出と構造解析を行うために分析中である。クロマグロについては、視物質の発現解析を行うための各種試料を採取し、分析中である。

3. 行動の発育

動画撮影した仔稚魚の行動は、解析ソフトを使って測定中である。クロマグロ仔稚魚の環境負荷に対する耐性は、特定の仔魚を使って断片的に検討した。次年度は、そのデータを基準に全ての発育段階で詳細なデータを採取する予定である。

4. クロマグロ稚魚の運動能力と摂取エネルギー解明

運動能力と水温の関係、水温が摂取エネルギーに及ぼす影響について解析している。マグロ類は水温より1～数℃体温が高く保たれるが、水温変動により摂取エネルギーが変化し、これが稚魚期の死亡原因と密接に関係していることが示唆された。今後はクロマグロより高水温域で棲息するキハダについて、同様の実験を行い比較する必要がある。

5. 形態発育

現在 IGF 遺伝子の cDNA の全長決定を行っているところであり、順次 Myo-D やその他筋肉形成に関わる遺伝子および受容体遺伝子のクローニングをすすめ、発現解析を実施する予定。

- ④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
本年度は研究計画の協議のみを実施したので、技術移転はなかった。
- ⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特になし。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、国際 0 件)

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 X 件、海外 XX件、特許出願した発明数 XXX件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 Y 件、海外 YY 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 産卵生態解明チーム

- ① 研究者グループリーダー名： 澤田 好史 (近畿大学・教授)
- ② 研究項目

キハダの飼育下での産卵生態(産卵シーズン、産卵時刻、産卵と環境要因との関係、産卵と栄養状態との関係)解明。

キハダの栄養状態と産卵成績との関係解明

キハダ産卵個体識別と野生群の母系解析

(2) 栄養要求解明・飼料開発チーム

- ① 研究者グループリーダー名： 滝井 健二 (近畿大学・教授)
- ② 研究項目

キハダおよび太平洋クロマグロ仔稚魚・幼魚の摂餌生態解明

キハダ仔稚魚・幼魚の天然海域での餌料の栄養価分析

キハダの消化器官の発育解明

キハダの人工配合飼料開発

(3) 初期発育解明と飼育技術開発チーム

- ① 研究者グループリーダー名： 澤田 好史 (近畿大学・教授)
- ② 研究項目

キハダおよび太平洋クロマグロの成長・発育に及ぼす環境要因の影響解明

キハダおよび太平洋クロマグロの視覚の発育および光刺激に対する反応解明

飼育キハダの遺伝解析・管理技術開発

キハダ健康状態情報収集

キハダ親魚候補魚の捕獲・輸送技術開発

キハダ初期飼育および養成技術開発

以上