

# 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生産・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類 2 種の産卵生態と初期生活史に関する基礎研究

(パナマ)

平成 23 年度実施報告書

代表者：澤田 好史

近畿大学水産研究所・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。

平成 22 年度 (R/D 署名以前と以降 2011 年 3 月)。

来年度からの本格的な飼育実験のための準備期間として、研究・分析設備・機器の準備、試料の分析方法開発、予備的試験等を研究目標とした。また、人的要素の整備として、3 つの研究チーム、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の編成と、カウンターパート技術水準等の情報収集、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について協議を行った。

平成 23 年度 (2012 年 4 月から 2013 年 3 月)

相手国における主な研究実施場所である IATTC アチョチネス研究所、ARAP アグアドルセ研究所において、キハダ・クロマグロ親魚産卵データ収集、キハダ卵・仔魚飼育実験、分析用野生個体の採取、各種分析技術開発とカウンターパートの技術取得、キハダ飼育技術開発とカウンターパートの技術取得、飼育・分析用機器配備を実施した。また、各研究項目の近畿大学、ARAP、IATTC の担当者決定とその実施スケジュール協議を実施するとともに、近畿大学大学院での修士号・博士号取得を目標とした大学院レベルのカウンターパートの教育について協議を行った。さらに、試薬、その他消耗品等のパナマ共和国での調達体制の確立に向けた努力を行った。

## 2. 研究グループ別の実施内容

平成 22 年度

### 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整備を目指している。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鱭を採取、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巢から 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 穴マイクロタイタープレート 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。

## 平成23年度

### 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整備を目指している。平成 23 年度はこれらの本格的研究を開始した。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(PO 1-1.~1-4.)、2. キハダと太平洋クロマグロの母系解析(PO 2-1.~2-2.)、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(PO 4.1)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・栄養条件との関係解明(PO 1-1.~1-4.)

キハダについてはパナマ共和国 IATTC アチョチヌス研究所の飼育親魚の産卵状況(孵化率等)と飼育環境の記録採取。受精卵の化学成分分析用材料の採取。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を記録する(PO 1-1, 1-2)。キハダについて異なる餌料を与えた親魚群から得られた受精卵、仔魚を比較する。

クロマグロとキハダについて、飼育および野生個体の内臓の cDNA ライブラリー作成のための試料を収集して cDNA ライブラリー作成に供する。(PO 1-4.;小林・澤田・柳下担当)。

##### 2. キハダと太平洋クロマグロのミトコンドリア DNA の D-loop 領域における多型による母系解析(PO 2-1.~2-2.)

太平洋クロマグロについては、日本市場の漁獲物から、あるいは自らの採取により、個体ごとに鱭を採取、試料を収集し、解析する。キハダでは、日本でこのような方法および自らの採取で資料収集を行うと同時に、パナマ共和国その他の漁獲物調査を実施する。

##### 3. キハダの遺伝的解析と遺伝管理のためのツール作成(PO 4-1.)

キハダDNAのBACライブラリー作成(4-1-1)、キハダとクロマグロのSTRプライマー開発(4-1-3)、キハダおよびクロマグロのGH、IGF、Myo-D 遺伝子クローニング(4-1-5)を実施する。

#### 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・栄養条件との関係解明(PO 1-1.~1-4.)

キハダについてはパナマ共和国 IATTC アチョチヌス研究所の飼育親魚の産卵状況(孵化率等)と飼育環境の記録採取が順調になされた。受精卵の化学成分分析用材料の採取は予定したよりも得られている試料が少ない。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を記録することがなされた(PO 1-1, 1-2)。キハダについて異なる餌料の栄養成分分析を実施したが、餌料の投与試験と親魚から得られた卵・仔魚の分析は未実施である。

cDNA ライブラリー作成のための試料収集として、沖縄県南城市沖でキハダ釣獲を行い、肝臓を凍結保存して標本とした。また精巢についても標本を得て cDNA ライブラリー作成を試みた。また、キハダの各発生段階および 40 日齢までの初期発育段階における cDNA ライブラリーの作製を行った。

## 2. キハダと太平洋クロマグロのミトコンドリア DNA の D-loop 領域における多型による母系解析(PO 2-1. ~2-2.)

クロマグロ、キハダ共に試料採取・収集計画の立案を行ったのみであるが、この立案と実施準備には当初より時間がかかることを予想していたので、特に遅れは無い。

### 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)

キハダ飼育親魚について、IATTC アチョチヌス研究所・ARAP より、飼育法について基礎的・設備的情報を近畿大学が得た。

ミトコンドリア DNA 多型解析について、DNA 抽出法、PCR 用プライマー作成法、PCR 法、多型分析法について近畿大学専門家が、ARAP および IATTC 研究員に教えた。

### 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

キハダについて、親魚の栄養条件が産卵に与える影響を解明する(PO 1-3)。

クロマグロとキハダ仔魚を飼育し、体化学成分を分析し(PO 3-3-2)、またキハダ仔稚魚の餌料となるプランクトンを天然海域で採取し、栄養分析を実施して(PO 3-3-3)、キハダ仔稚魚の栄養要求を解明する。

クロマグロとキハダの人工飼料、その他入手可能な生餌の栄養分析を実施し(PO 3-4-1)、異なる餌料での飼育による生育の比較を行って(PO 3-4-2)、仔稚魚の栄養要求の情報とする。

### ②研究実施方法

#### 1. 親魚餌料がキハダの産卵に及ぼす影響(PO 1-3)

キハダ親魚に与えたイワシ類、イカ類および配合飼料(他魚種用)の粗タンパク質、粗脂質、粗灰分および脂肪酸組成を、AOAC 法およびガスクロマトグラフィーを用いて分析し、餌料の違いによる産卵数やふ化率の変化に及ぼす栄養成分の影響を調べる。

#### 2. クロマグロおよびキハダ仔稚魚の栄養要求(PO 3-3-2・3-3-2)および異なる餌料での飼育試験 (3-4-1・3-4-2)

キハダ卵、ふ化仔魚およびふ化 40 日後までの仔稚魚、そして、これら初期発育における餌料生物のワムシ、アルテミア、天然プランクトンなどと、クロマグロ配合飼料の粗タンパク質、粗脂質、粗灰分、脂肪酸組成などを先の方法で分析した。キハダの初期発育期間における体成分変化から、発育に伴う栄養要求の変化について貴重な基礎資料を得る。

### ③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

## 1. 親魚餌料がキハダの産卵に及ぼす影響(PO 1-3)

親魚餌料と産卵成績については、特定の餌料を多く給与することで産卵成績が向上することが示唆され、当初の計画を概ね達成できた。

## 2. クロマグロおよびキハダ仔稚魚の栄養要求(PO 3-3-2・3-3-2)

キハダ卵、仔稚魚、天然プランクトンを含む餌料生物、人工飼料、生餌の分析は完了した。クロマグロ初期発育期間における体成分の変化は、平成24年度に実施する。

## 3. 異なる餌料での飼育試験 (PO 3-4-1・3-4-2)

アチョチヌス実験場の施設規模・稚魚生残数の問題から、異なる餌料での稚魚の飼育試験は実施できなかった。平成24年度に実施したい。

### 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)

平成24年2月に Carlos Tejada 氏(IATTC;パナマ人)を研修のため近畿大学水産研究所に招き、数種の栄養強化剤がワムシの体栄養成分に及ぼす効果について指導した。この間に、ワムシの培養方法、栄養強化法、タンパク質、脂質、灰分、脂肪酸組成などの技術・分析手法の移転を行った。

### 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)

パナマ共和国での栄養学的分析について、ARAP、IATTC 以外の外部研究所での分析を計画していたが、基本的な分析については IATTC アチョチヌス研究所に配備することに変更し、その配備を進めた。また、より高度な分析についてはパナマ共和国 INDICASAT で実施することを決め、MOU 締結の準備を進めている。

なお、平成23年度までPDを務めていた Biswajit K. Biswas 氏が退職し、代わりに田中照佳氏が着任された。田中氏は生理活性物質に関する専門家であることから、新たな観点からのアプローチが可能になり、本チームの発展につながるものと期待される。

## 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。本年度は、キハダと太平洋クロマグロの卵、仔魚期の飼育下での発生、成長、発育、生残の様相、特にこれらと環境要因の関係を両種で比較しつつ明らかにする資料を得る。また、キハダの人工孵化・養殖技術基盤整備のために様々な条件の飼育下での成長、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. 環境要因と卵発生(PO 3-1-2)、2. 形態発育(PO 3-1-3)、環境要因と仔魚の成長・生残・ストレス反応の関係解明(PO 3-1-7)、3. 視覚(PO 3-2-1、3-2-2、3-2-4)、3. 両種の仔稚魚の摂餌生態・行動・成長・生残の比較(PO 3-3-1~3-3-4)、4. キハダの健康管理情報の収集(4-2)、5. キハダの親魚候補の捕獲・運搬法改善(PO 4-3)、5. キハダ飼育における空気、飼育水等の供給あるいは微生物環境と成長・生残の関係解明(PO 4-4-1)、海面生簀におけるキハダ稚魚試験飼育(PO 4-4-3)予備的試験を目標とした。

### ② 研究実施方法

#### 1. 環境要因と卵発生(PO 3-1-2)

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。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。



## 2. 形態発育(PO 3-1-3)、環境要因と仔魚の成長・生残・ストレス反応の関係解明(PO 3-1-7)

キハダ仔稚魚の外部形態形成を飼育により試料を得て実施する。環境要因を変えて仔魚飼育を行い、結果を比較する。

## 3. 視覚(PO 3-2-1、3-2-2、3-2-4)

これまでに自然界で採取した成魚、パナマで飼育した稚魚を材料としてキハダ視物質オプシン遺伝子の検出と構造解析を実施し、太平洋クロマグロのそれと比較する。次に、キハダおよび太平洋クロマグロ仔稚魚の光環境の変化に対する遊泳行動の応答を視運動反応装置によって撮影し、解析する。また、光源波長の異なる環境下で仔魚を飼育し、摂餌率、成長等を比較する。さらに、飼育した各種発育段階のクロマグロ仔稚魚の視物質オプシン遺伝子の発現パターンを RT-PCR 法で測定し、発現様式を推定する。

## 4. 両種の仔稚魚の摂餌生態・行動・成長・生残の比較(PO 3-3-1~3-3-4)

両種の摂餌生態を調べるため、光周期および光源波長の異なる環境下でキハダおよび太平洋クロマグロの仔稚魚を飼育し、摂餌率、成長、生残率等を比較する。

その他に餌生物の密度や種類などを変えた場合の仔魚飼育実験を実施する。

## 5. キハダの健康管理情報の収集(PO 4-2)

キハダ野生個体について、健康管理の基礎となる情報、本年度は特に寄生虫について調査する。

## 6. キハダの親魚候補の捕獲・運搬法改善(PO 4-3)

キハダ野生個体を異なる方法で捕獲・運搬し、生残率や損傷率を比較し、改善を進めて新たな方法を開発する。

## 7. キハダ飼育における空気、飼育水供給等あるいは微生物環境と成長・生残の関係解明(PO 4-4-1)

キハダ卵を用いて、卵の発生段階ごとの密度変化を解析し、初期減耗低減に応用する基礎資料を得る。原理は、すでにクロマグロで開発したものをを用いる。

キハダまたはクロマグロの仔魚飼育を行い、通常の飼育法と微生物制御を行った飼育法の飼育水における細菌群集組成の安定度を比較する。また、飼育水の細菌群集組成が安定する飼育法で仔魚飼育を行い、通常の飼育法に比して、飼育初期の生残率がどの程度向上するのかを評価する。

## 8. キハダの海面生簀飼育の適地選定、許可取得、生簀設置(PO 4-4-2)

適地選定のための海況調査と許可取得に向けた法的条件の検討を実施する。

## 9. 海面生簀におけるキハダ稚魚試験飼育(PO 4-4-3) 予備的試験

キハダでの実施に向けた予備的試験として、クロマグロ稚魚の運動能力と摂取エネルギーを実施し参考資料とする。

### ③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

#### 1. 環境要因と卵発生(PO 3-1-2)

キハダ受精卵の胚発生段階の進行状況の決定、および異なる水温下での発生速度の差の調査は順調に経過した。

キハダの胚発生過程の解明における発生系列の組織標本の作製については、26.0℃の一定水温培養条件下で、2細胞期から30%エピボリー期(卵採取直後から6時間30分後まで)を5分ごと、その後から孵化まで30分ごとの、一連の発生系列組織解析用のサンプルを採取した。その間、胚発生期間における形態形成について外部形態変化を実体顕微鏡下における写真撮影記録を行い、キハダ胚発生における形態形成の各段階の決定を詳細に行った。このことにより、今後の本種の発生生物学的論議を他のモデルフィッシュとの比較のもとに詳細に行うことが可能になる。これらのサンプルについての組織学的検討については、発生項目について来

年度以降、順次検討を行ってゆく予定である。

## 2. 形態発育(PO 3-1-3)、環境要因と仔魚の成長・生残・ストレス反応の関係解明(PO 3-1-7)

キハダ仔稚魚の外部形態形成を検討する試料を飼育により得た。さらに試料を得る必要があるものの順調に経過している。環境要因を変えて仔魚飼育を行い、結果を比較するための研究計画の立案は実施したものの、まだ実際の飼育試験を実施できていない。

いくつかの発育段階でキハダおよび太平洋クロマグロ仔魚に水温、塩分、低酸素等の環境負荷を与えたところ、いずれも仔魚の発育に伴って環境ストレス耐性の低下する傾向が示された。しかし、対照区でも死亡率が非常に高くなり、実験方法の再検討と各発育段階での詳細な実施が必要であることが認識された。

## 3. 視覚(PO 3-2-1、3-2-2、3-2-4)

キハダが保有するオプシン遺伝子の種類がこれまでにわかっているクロマグロのそれよりも多いことが示唆された。しかし、オプシン遺伝子の完全長の同定には至っておらず、さらなる解析が必要である。次に、キハダおよびクロマグロの飼育実験、視運動反応実験から視覚特性を調べた結果、両者で多少異なることが示唆された。しかし、データのバラツキが大きく、実施技術を高めて再検討する必要があることが示唆された。さらに、クロマグロ仔稚魚の視物質オプシン遺伝子の発現パターンを調べた結果、これまでに見つけていなかったオプシン遺伝子が特定の時期に発現している可能性がでてきた。今後はその遺伝子の構造解析を行い、同定する必要がある。

## 4. 両種の仔稚魚の摂餌生態・行動・成長・生残の比較(PO 3-3-1~3-3-4)

摂餌生態を調べるため、異なる光周期および光波長で太平洋クロマグロの稚魚を飼育した結果、摂餌量と成長に明確な差異のあることが示唆された。キハダの稚魚については次年度以降に実施予定である。一方、キハダおよびクロマグロの仔魚を光波長の異なる環境下で飼育したところ、両種の摂餌率、生残率等に異なる傾向がみられた。しかし、データのバラツキが多く、仔魚期の摂餌生態については次年度の再検討が必要と考えられた。

餌密度、餌生物の種類などの条件を変えた飼育実験により観察、分析とその結果の2種での比較を行うための実験については計画の立案に留まっている。

## 5. キハダの健康管理情報の収集(PO 4-2)

キハダ野生個体の寄生虫について調査を実施し、順調に経過している。

## 6. キハダの親魚候補の捕獲・運搬法改善(PO 4-3)

キハダ野生個体を異なる方法で捕獲・運搬し、生残率や損傷率を比較し、改善を進める実験計画の検討の段階である。

## 7. キハダ飼育における空気、飼育水供給等または微生物環境と成長・生残の関係解明(PO 4-4-1)

キハダの卵発生に伴う密度変化解析について試験を終了した。

試験条件の設定に必要な情報を得るための飼育実験(予備試験)をパナマで実施した。現地で飼育実験を実施し、仔魚飼育環境の把握と、注水および飼育水の総細菌数と細菌群集組成の概要を把握するとともに、現地の不安定な電力事情等来年度の実験に向けた問題点の対応策を準備した。

## 8. キハダの海面生簀飼育の適地選定、許可取得、生簀設置(PO 4-4-2)

適地選定のための海況調査と許可取得に向けた法的条件の検討を計画より前倒して始めた。

## 9. 海面生簀におけるキハダ稚魚試験飼育(PO 4-4-3) 予備的試験

キハダでの試験飼育は後年度からの予定であるので、計画に先行してクロマグロで予備試験を行っている。

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)

#### 1. 環境要因と卵発生(PO 3-1-2)

キハダ受精卵の異なる水温下での発生速度の解析方法について技術移転した。また、水温および塩分変化に対する 24 時間半数致死レベルの測定方法を技術移転した。

#### 2. 視覚(PO 3-2-1、3-2-2、3-2-4)

視運動反応装置を用い、仔稚魚の光環境変化に対する可視閾値の測定方法を技術移転した。また、光源波長の異なる環境下での仔魚の飼育方法を技術移転した。

#### 3. 両種の仔稚魚の摂餌生態・行動・成長・生残の比較(PO 3-3-1~3-3-4)

光波長の異なる環境下でキハダ仔魚を飼育実験する方法を技術移転した。

#### 4. キハダの健康管理情報の収集(PO 4-2)

キハダ野生個体の寄生虫の検査法、種査定について技術移転した。

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)

両種の飼育比較を行うための飼育施設の整備に時間がかかっている。継続して進めている。

### 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、海外 0件)

③ 論文詳細情報

1. Takii K., Biswas B.K., Biswas A., Morales N., Tejada C.L.C., Scholey V. Effect of broodstock feed practice on spawning performance, and eggs and larval quality of yellowfin tuna, *Thunnus albacores*. (in preparation)
2. Biswas B.K., Takii K., Biswas A., Morales N., Tejada C.L.C., Scholey V. Artificial feed development for yellowfin tuna, *Thunnus albacores*—nutritional studies on early larval and juvenile stages. (in preparation)
3. Kim Y.S., Delgado D., Scholey V., Sawada Y. Suitable environmental condition for embryonic and larval development of yellowfin tuna. (in preparation)
4. Honryo T., Kaze N., Yamamoto H., Hirose H., Agawa Y., Sawada Y. Effect of different dietary fatty acids on survival, growth, handling stress resistance, and lipid-metabolic related gene expression of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. (in preparation)
5. Guillen A., Honryo T., Ibarra J., Margulies D., Scholey V., Kobayashi T., Sawada Y. Effect of water temperature on embryonic development of the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). (in preparation)
6. Kobayashi T., Adames K., Tapia I., Cusatti S., Saito Y., Yagishita N., Honryo T. Embryonic development and behavior of primordial germ cells of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. (in preparation)
7. Tsutsumi Y., Matsumoto T., Honryo T., Agawa Y., Sawada Y., Ishibashi Y. Effects of light wavelength on growth and survival rate in juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. (in preparation)
8. Agawa Y., Tamura K., Honryo T., Cusatti S., Adames K., Tapia I., Yagishita N., Kobayashi T., Scholey V., Margulies D., Sawada Y. Daily measurement of the frequency and quantity of yellowfin tuna females spawning under land cage rearing condition. (in preparation)

## (2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0件、海外 0件、特許出願した発明数 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 0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: 小林 徹 (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: 石橋 泰典 (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・発育に及ぼす生物・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