水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

ミトコンドリアDNA分析から推定した養成クロマグロの産卵生態

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産総合研究センター 公開日: 2024-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): northern bluefin tuna; genotype of eggs; spawning ecology 作成者: 升間, 主計, 手塚, 信弘, 尾花, 博幸, 鈴木, 伸明, 野原, 健司, 張, 成年 メールアドレス: 所属: 日本栽培漁業協会奄美事業場, 日本栽培漁業協会奄美事業場, 日本栽培漁業協会奄美事業場, 遠洋水産研究所, 遠洋水産研究所, 遠洋水産研究所
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010788

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

水研センター研報，第６号，９－14，平成15年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 6, 9-14, 2003

ミトコンドリアDNA分析から推定した養成クロマグロの産卵生態

升間主計[*1]，手塚信弘[*1]，尾花博幸[*1]，鈴木伸明[*2]，野原健司[*2]，張　成年[*2]

Spawning ecology of captive bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) inferred by mitochondrial DNA analysis

Shukei MASUMA[*1], Nobuhiro TEZUKA[*1], Hiroyuki OBANA[*1], Nobuaki SUZUKI[*2], Kenji NOHARA[*2] and Seinen CHOW[*2]

Abstract Sixty-three individuals of mature bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) have been maintained in a 14-ha cove of Amami Island, Japan. Spawning activity was observed on 22 days during May 28 through November 10 in 2001. In order to investigate spawning frequency, period and number of spawning female per day, mtDNA genotypes of spawned eggs were analyzed. MtDNA Dloop region was amplified via PCR and the genotypes of 23 to 64 eggs collected per day were determined by RFLP analysis. Ten genotypes were detected among 691 eggs in total. Forty percent of the eggs belonged to genotype 3, which was observed on 20 out of 22 spawning days. Occurrence of genotypes 6, 7 and 10 were also frequent and observed on 9 to 11 days. Occurrence of the other genotypes was much less frequent. In June, eggs having genotype 3 were observed almost every day for a whole week. Occurrence of certain genotypes for 2 to 3 consecutive days was not unusual. Substantial spawning with such consecutive spawning was observed by mid November. These results differed from general presumption that individual female of natural population spawns intermittently for only a few times during April to August.

Key words: northern bluefin tuna, genotype of eggs, spawning ecology

太平洋クロマグロ（*Thunnus thynnus orientalis*）や大西洋クロマグロ（*Thunnus thynnus thynnus*）は水産物の中で重要な魚種の１つであり，特に，日本の市場では，まぐろ類の中で最も高値で取引されている。そのため，近年海外からの蓄養物の輸入が急増し，さらに乱獲による資源の減少が懸念されている。

近年では種苗生産を目的とした親魚養成が行われるようになり，近畿大学では1979年に世界で初めて生簀網内で養成されたクロマグロからの自然産卵に成功し，その後いくつかの日本国内の機関で同様な取り組みがなされるようになった（Kumai, 1997）。水産庁の委託を受け，日本栽培漁業協会奄美事業場でも1994年から親魚養成に取り組み1998年から採卵に成功して以来，種苗放流による資源の涵養を目的として種苗生産技術開発に取り組んでいる。

人工種苗の放流については野生集団への影響が懸念されており，種苗の遺伝的多様性に関する情報が必要となっている。そのような状況の中で高感度DNAマーカーを用いて，親魚，種苗の遺伝的多様性の調査が盛んに行われている（谷口，1997）。また，ほとんどの魚種で

2002年８月７日受理（Received on August 7, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第29号（Contribution No. A 29 from the Fisheries Research Agency）
*1 日本栽培漁業協会奄美事業場　〒894-2323　鹿児島県大島郡瀬戸内町俵崎山原955-5（Japan Sea Farming Association Amami Station, 955-5 Hyosakiyamahara, Setouchi, Ooshima, Kagoshima 894-2323, Japan）
*2 遠洋水産研究所　〒424-8633　静岡県清水市折戸5-7-1　（National Research Institute of Far Seas Fisheries, 5-7-1 Orido, Shimizu, Shizuoka 424-8633, Japan）

は外見からの雌雄判別は困難であり，まぐろ類も例外ではない。外見や標識等で区別できたとしても，実際に産卵している現場を確認することは難しい。そのため，養成下における雌親魚数や雌個体ごとの産卵頻度や期間はほとんど不明であることが現状である。脊椎動物のミトコンドリアDNA（mtDNA）は母系遺伝することが知られている。もし個体の識別が可能なレベルの遺伝的変異がmtDNAで検出できれば雌親の特定が可能となり，産卵が行われたと同時に卵の遺伝子型分析を行うことができれば，ほぼリアルタイムの産卵モニタリングも可能となる。mtDNAの非翻訳領域であるDループ領域は変異性が高いことが知られている。まぐろ類においても高度な多型性が報告されているとともに（Alvarado-Bremer *et al.*, 1998, 1999; Chow *et al.*, 2000），比較的簡便なPCR-RFLP解析によりまぐろ類，かじき類で比較的高いレベルの多型が検出できることが報告されている（Chow *et al.*, 1997, 2000; Chow and Takeyama, 2000）。

本研究において，我々は産卵期間中に産出されたクロマグロ卵のmtDNA遺伝子型を調べ，産卵雌を想定することによって，飼育下でのクロマグロ雌親魚の産卵生態に関する調査を行なったので報告する。

材料と方法

親　魚

1993年に高知県沖で8月に漁獲された当歳魚（ヨコワ）が約1年間沖縄県本部町の民間養殖業者によって育てられた。このうち189個体を1994年6月に日本栽培漁業協会奄美大島事業場地先の生簀（直径40m，深さ15m）に収容し親魚としての養成を開始した。1995年9月に95尾を湾の奥と沖側を網で仕切った飼育施設（以下，仕切り網群）へ移し，養成を継続した。本群は1998年（5歳）から産卵を開始した後，毎年産卵を続けている。2001年（8歳）に本研究を開始するまでに取揚げまたは死亡した個体は32個体で，そのうち性別が判明したのは29尾であった。また，2002年4月までにさらに9個体が死亡した。取揚げまたは死亡した個体のうち性別が判明した個体は38個体でそのうち16個体が雌であった。

採　卵

目視による産卵行動の確認あるいは小魚が卵を摂餌する音が聞こえた後に，採卵を開始した。採卵は曳き網（枠の大きさ: 130×70cm，網の長さ: 180cm）をボートの舷側に取り付け，微速で前進しながら約20～40分間，表層に浮いた卵を採集する方法で行った。

DNA解析

死亡した親魚の筋肉組織及び産出卵からのDNA抽出はSepaGene（三光純薬）を用いて行なった。抽出したDNAを20μLのTEbufferで溶解し，PCRを行うまで冷蔵保存した。卵から抽出したDNAからmtDNAのDループ領域を増幅するためにnested PCR法を用いた。PCR反応液組成はChow and Kishino（1995）に従った。1stPCRは反応液3μLに抽出DNAを0.5μL加えて行った。用いたプライマーの塩基配列は5'-TAGCACTATTCTCCCCTAAC-3'（CB3R-LL）と5'-TCTAGAACAGGCTCCTCTAG-3'（12SAR-HL）である。この反応液を95℃で3分間初期加熱変性し，その後30サイクルの増幅反応（50℃ 30秒，72℃ 1分，95℃ 1分）後，72℃ 5分で最後のDNA鎖の伸長反応を行った。1stPCRの反応液を蒸留水で20倍に希釈し，そのうち0.4μLを2ndPCR反応液（10μL）に加えた。2ndPCR反応で用いたプライマーはPalumbi *et al.*（1991）によるCB3R-Lと12SAR-Hである。最後の伸長反応時間を6分間として，それ以外の反応は1回目のPCRと同様に行った。PCRサンプルをアガロースゲル電気泳動しエチジウムブロマイド染色によってDNAの増幅を確かめ，増幅が確認されたサンプルについて制限酵素処理を行った。6種類の制限酵素（*Bsa* JI, *Dde* I, *Dpn* I, *Rsa* I, *Msp* I, *Tsp*509 I）を用いて処理したPCRサンプルを2.5%アガロースゲル（Biogel, BIO101 Inc.）で2時間半から4時間程度電気泳動した。泳動後，エチジウムブロマイドで染色し，泳動像を撮影し切断片長多型を調べた。

結　　果

産卵状況

産卵は2001年5月28日から始まり，11月10日まで続いた。この間に22日で産卵が確認された（Fig. 1）。総採卵数は1,246万粒であった。正常ふ化率は平均75.3%（20.8～95.2%）であった。産卵期間中の水温は24.3～29.9℃で，開始時が24.4℃，終了時が24.5℃であった。2001年の産卵開始時での親魚数は63尾で，産卵期間中に8尾が死亡し，内2尾は雌であった。死亡魚のサイズは尾叉長で平均241cm（218～250cm），体重で平均298kg（181～367kg）であった。産卵期間後2002年4月までに雌1個体が死亡した。

卵の遺伝子型（タイプ）と出現頻度及び期間

採卵した日毎に23～64個の卵について遺伝子型分析を行ったところ，総数691個で10種類のタイプが検出された（Table 1）。

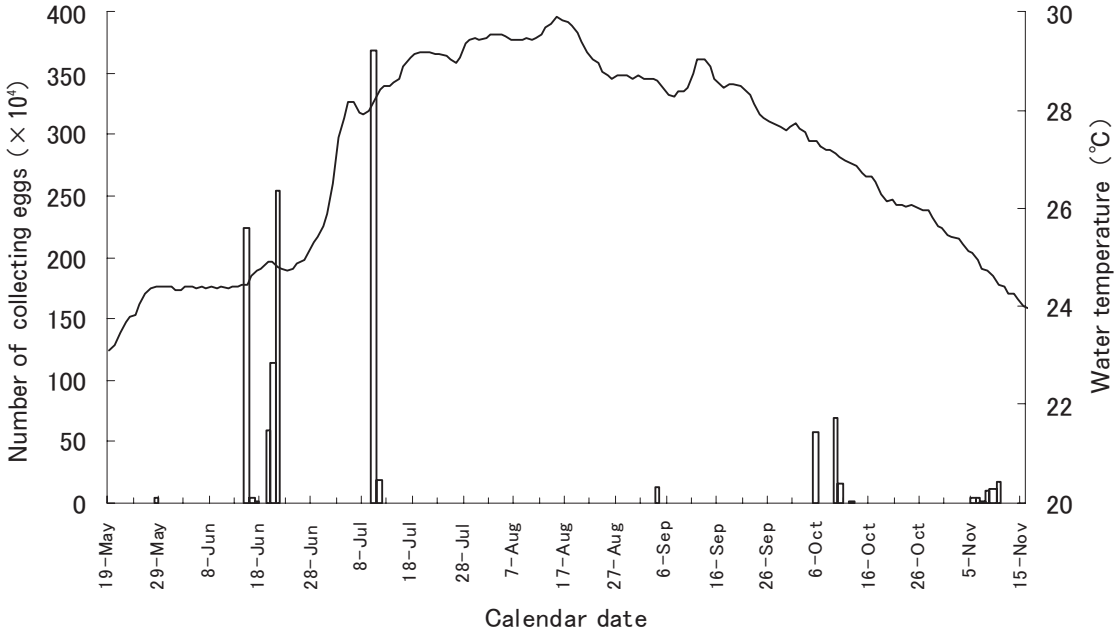

Fig. 1. Water temperature at 10 m depth and total number of eggs collected during the spawning season in 2001

Table 1. Composite genotypes of eggs spawned by bluefin tuna broodstock

Composite genotype	Genotypes					
	Bsa JI	*Dde* I	*Dpn* II	*Msp* I	*Rsa* I	*Tsp* 5091
1	*A*	*E*	*A*	*A*	*B*	*B*
2	*A*	*E*	*A*	*A*	*C*	*A*
3	*A*	*E*	*A*	*A*	*C*	*B*
4	*B*	*A*	*A*	*A*	*B*	*B*
5	*B*	*D*	*A*	*C*	*C*	*B*
6	*B*	*E*	*A*	*A*	*B*	*A*
7	*B*	*E*	*A*	*A*	*B*	*B*
8	*B*	*E*	*A*	*A*	*C*	*A*
9	*B*	*E*	*A*	*A*	*C*	*B*
10	*B*	*E*	*A*	*C*	*C*	*B*

各産卵日に検出された各タイプの卵数をTable 2に示した。各タイプの出現頻度については，タイプ3（*AEAACB*）が最も頻繁に出現し22日の産卵日数の内20日に見られた。また，タイプ10は11日，タイプ6は10日，タイプ7は9日に見られた。一方，タイプ8は4日，タイプ9は3日，タイプ5は2日，タイプ1，2及び4は1日と少なく，タイプによって出現頻度に大きな違いが見られた。出現頻度が高いタイプほど各採卵日での卵に占める割合が高い傾向が見られた。

数日間連続して検出されたタイプがあり，特にタイプ3は6月14日から21日の間，産卵行動と卵が確認できなかった1日の非採卵日以外毎日しかも高い割合で出現した。またその他の時期でも，出現頻度の高いタイプ 3，6，7及び10は2日から3日連続して出現した。

1日あたりの出現タイプ数は5，6種類がもっとも少なく1日のみで，1種類だけ見られた日が3日，4種類が見られた日が4日，そして2，3種類が最も多くそれぞれ7，6日であった。

親魚の遺伝子型

2001年の産卵開始から終了までの間に8個体が死亡した。いずれも生殖腺は十分に発達しており，雌と確認された2個体のうち7月29日に死亡が確認された1個体は腐敗が激しく廃棄されたため，遺伝子型分析は行わなかった。10月22日に死亡した別の1個体の遺伝子型はタイプ3であり，このタイプはそれ以降も産出卵中に出現した。

Table 2. Spawning profiles of bluefin tuna. Numbers of each cell indicate the number of eggs that had been identified genotypes by PCR-RFLP. See Table 1 for the composite genotypes.

	Composite genotypes										
Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
28 May			4							25	32
14 Jun.			4			23		2			29
15 Jun.			16							14	30
16 Jun.			22								22
17 Jun.		2	39								41
19 Jun.			15			5		4			24
20 Jun.			20						1	6	27
21 Jun.			28				5				33
10 Jul.			3	2				8		10	23
11 Jul.							32				32
3 Sept.			39			2					41
4 Sept.			2			7			1	20	30
5 Oct.			4			4				19	27
9 Oct.			9							23	32
10 Oct.			9			3	4		2	9	27
12 Oct.			4			22	3			2	31
5 Nov.			16			3	4				23
6 Nov.			5				24				29
7 Nov.			32			2					34
8 Nov.							32				32
9 Nov.	1		9		1	6	29			18	64
10 Nov.			1				23	2		2	28

考　　察

本研究は，養成下におけるクロマグロの産卵生態を知ることを目的として産出卵のmtDNA多型を用いた初めての分析である。しかし収容している親魚の遺伝子型が不明であり，産出卵で検出したタイプが実際に1尾の雌親由来かどうかについての確証はない。本研究と同じ手法を用いて解析した日本海と太平洋沿岸で漁獲されたクロマグロ幼魚標本計119個体のmtDNAハプロタイプ多様度は96.5%であった（張，未発表）。これは無作為に抽出した2個体が異なる遺伝子型である確率が96.5%であることを意味している。また，本研究で用いた制限酵素数は上記の分析よりも1種類多いことから，解析結果は個体識別に近いものと考えられる。しかしタイプ3であった雌が死亡後も同じ遺伝子型の卵が出現していることは，タイプ3の雌親が少なくとも2個体以上存在したことを示している。また，出現頻度が高いその他のタイプにおいても複数の雌親が存在する可能性を否定できない。しかしながら，本研究で出現頻度の高かったタイプが自然集団の標本中でも出現頻度が高いわけではなかった（張，未発表）。このことから，同じタイプを持つ雌個体が存在したとしてもかなり限られた個体数であるものと考えられる。

本種の産卵生態に関してはKishinoue（1923），中村（1938），Yamanaka（1963），矢部ら（1966），上柳（1967），沖山（1974），Okiyama（1979），依田（1976, 1981），西川（1986，1990），石原（1994）などによる漁獲物の成熟調査，仔稚魚の出現，分布調査に基づいた多くの報告がある。この中で，産卵多回性について中村（1938）は多回産卵の可能性は少ないとしたが，

依田（1981）は卵巣卵径組成から，石原（1994）は卵巣卵の組織学的観察から本種の産卵多回性を示唆している。本研究では5月から11月の間で産卵活動が確認された22日において採卵を行った。このうちの1日のみに出現したタイプは3種類だけであり，2日ないし4日に出現したタイプが3種類，他の4種類は9日以上の頻度で出現した。この結果は養成クロマグロが多回産卵することを示しており，組織学的調査による結果を支持するものである。

自然状態では産卵海域で産卵期に巻網によって漁獲された群れのほとんどの雌がほぼ産卵可能な状態の卵巣を持っていることから，同調して群れで一斉に産卵を行っているのではないかと推測されている（石原，1994）。今回用いた手法によって検出された遺伝子タイプは10種類であったが，検出に漏れた個体の卵や上述したように同じタイプを持つ複数個体の存在が考えられるため，実際に産卵に関与した個体は10数個体いるものと考えられる。すなわち，出現したタイプ数から推定する産卵雌親数は常に過少評価していることになる。産卵日あたりに出現するタイプ数は2～3種類の場合が多く，5，6種類のタイプが出現した日もわずかではあったが見られたため，養成下においても複数の雌が同調して産卵に関与するものと考えられる。

まぐろ類における産卵間隔についてはキハダ，メバチ，ミナミマグロにおいて卵巣の組織学的観察に基づいて，成熟雌の平均産卵間隔がそれぞれ1.52日，1.09日，1.62日と推定されている（Farley and Davis, 1998; Nikaido *et al.*, 1991; Schaefer, 1998）。一方，上柳（1994）は，クロマグロにおいてはキハダやメバチのような連日産卵の証拠は見られず，個体の産卵期間を1ヵ月と仮定して，平均産卵間隔を6日前後と推算している。しかしながら，本研究結果での遺伝学的解析が個体識別レベルにあると仮定できるならば，限られた期間ではあるものの養成クロマグロには数日間連続して産卵する個体がいる可能性がある。

太平洋クロマグロの産卵期間は4月から8月と考えられており，フィリピン北方から南西諸島周辺海域にかけての南方では4月から5月に始まり本州沿岸では7月頃そして日本海では8月にも産卵が見られる（Collette and Nauen, 1983; 沖山，1974; Okiyama, 1979）。養成クロマグロでは，6月から7月に見られた産卵盛期と比較して採卵数はかなり少ないものの，個体数では盛期に匹敵するぐらいのレベルで11月初旬にも産卵していることが観察された。また，日本沿岸では体長20～30cmの幼魚が7月から8月にかけて多く出現するが，量的に少ないながらも2月から3月に同サイズの幼魚が出現することが報告されており（Yamanaka, 1963），これらの幼魚が11月から暮れの初冬にかけて生まれた可能性は高い。生態的に似ているミナミマグロにおいても春と秋生まれと考えられる明らかに体長が異なる幼魚が同時期に出現することが知られている（Grewe *et al.*, 1997）。これらのことから，11月に見られた産卵が養成下での特異的現象ではなく，自然界では従来考えられてきたよりも産卵期間が長いかあるいは春から初夏の産卵盛期とは別の産卵期がある可能性が高い。本研究で示唆されたように，同一個体が11月まで産卵を継続できる能力を有しているならば，産卵場として知られ，産卵時期が順次遅れて始まっている南西諸島から中部太平洋，日本海で同一の個体（群）が北上しながら産卵している可能性がある。一方，後期（11月）のみに産卵した個体（タイプ1）も見られることから，南西諸島，中部太平洋，日本海で別の群が産卵している可能性も残されている。いずれにしろ，天然魚の調査からこれらの点に関して言及した報告はない。

以上のように，天然魚での観察結果を支持する結果とそうでない知見が得られたが，本研究では養成親魚の遺伝子型が把握されていないことがひとつの大きな問題である。今後同様の分析を行う場合には，活け込む際に個体ごとに識別用のICチップの埋め込み及び組織片を採取しておくこと，さらに多型検出感度の高い手法を応用することが必要である。

謝　辞

本研究は奄美事業場スタッフの協力なくしてはありえなかった。また，DNA抽出及びPCR-PFLPに関わる煩雑な作業には奄美事業場職員富岡江利氏に負うところが大きい。日本栽培漁業協会参与廣瀬慶二博士にはクロマグロの成熟，産卵に関する多くの議論を通して，重要なポイントを指摘して頂いた。遠洋水産研究所浮魚資源部長鈴木治郎博士からは本論文に対するコメントをいただくとともに重要な参考文献を紹介して頂いた。ここに記して深く感謝の意を表する。

文　献

Alvarado-Bremer J. R., Stequert B., Robertson N. W., and Ely B., 1998: Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna（*Thunnus obesus*）populations. *Mar. Biol.*, **132**, 547-557.

Alvarado-Bremer J. R., Naseli, I., and Ely B., 1999: Heterogeneity of northern bluefin tuna populations. *ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap.*, **XLIX**,

127-129.

Chow S. and Kishino H., 1995: Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, **41**, 741-748.

Chow S., Okamoto H., Uozumi Y., Takeuchi Y., and Takeyama H., 1997: Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial control region. *Mar. Biol.*, **127**, 359-367.

Chow S., Okamoto H., Miyabe N., Hiramatsu K., and Barut N., 2000: Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Mol. Ecol.*, **9**, 221-227.

Chow S. and Takeyama H., 2000: Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish (*Xiphias gladius*). *J. Fish Biol.*, **56**, 1087-1098.

Collette B. B. and Nauen C. E., 1983: FAO species catalogue, Scombrid of the world, FAO, Rome.

Farley J. H. and Davis T. L. O., 1998: Reproductive dynamics of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. *Fish. Bull.*, **96**, 223-236.

Grewe P. M., Elliott N. G., Innes B. H., and Ward R. D., 1997: Genetic population structure of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Mar. Biol.*, **127**, 555-561.

石原幸雄，1994: 日本近海におけるクロマグロの産卵に関する研究．東海大修士学位論文，19pp.

Kishinoue K., 1923: Contributions to the comparative study of the so-called Scombroid fishes. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **8**, 293-475.

Kumai H., 1997: Present state of bluefin tuna aquaculture in Japan. *Suisanzoshoku*, **45**, 293-297.

中村廣司，1938: マグロ *Thunnus orientalis* (Schlegel) の習性について（予報）．動物学雑誌，**50**, 279-281.

Nikaido H., Miyabe N., and Ueyanagi, S., 1991: Spawning time and frequency of bigeye tuna. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.*, **28**, 47-73.

西川康夫，1986: 1984, 1985年８月，日本海におけるクロマグロ仔魚の出現について．水産海洋研究会報，**50**, 186-187.

西川康夫，1990: クロマグロの主要産卵場．水産技術と経営，**36**, 13-21.

沖山宗男，1974: 日本海におけるクロマグロの後期仔魚の出現．日水研報，**25**, 89-97.

Okiyama M., 1979: Successful spawning of some holoepipelagic fishes in the Sea of Japan and zoogeographical implications. Proc. 7th Japan-Soviet Joint Symp. Aquaculture, September 1978, pp.223-233.

Palumbi S., Martin A., Romano S., McMillan W. O., Stice L., and Grabowski G., 1991: The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, University of Hawaii, Honolulu.

Schaefer K. M., 1998: Reproductive biology of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the eastern Pacific Ocean. *Inter-Am. Trop. Tuna Comm. Bull.*, **21**, 201-272.

谷口順彦，高木基裕，1997: ＤＮＡ多型と魚類集団の多様性解析，「魚類のＤＮＡ－分子遺伝学的アプローチ」（青木　宙，隆島史夫，平野哲也編），恒星社厚生閣，東京，pp. 117-137.

上柳昭治，1967: マグロ類の産卵場について．鮪漁業，**60**, 15-20.

上柳昭治，1994: マグロ類の産卵，初期生態．海洋，**26**, 534-538.

矢部　博，上柳昭治，渡部久也，1966: クロマグロの初期生態及びミナミマグロの仔魚について．南水研報，**23**, 95-129.

Yamanaka H., 1963: Synopsis of biological data of Kuromaguro *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel), 1842 (Pacific Ocean). *FAO Fish. Rep.*, **6**, 180-217.

依田　孝，1976: 本道日本海のクロマグロについて．北水試月報，**33**, 2-11.

依田　孝，1981: 道西日本海のクロマグロ卵巣の成熟状態について．北水試月報，**38**, 211-221.