

親子鑑別によって確かめられたブリ親魚の総参加型の誘発産卵

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-04-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長倉, 義智, 大原, 恵理子, 中野, 昌次, 高橋, 誠, 石橋, 矩久, 坂本, 崇, 岡本信明 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014540

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



親子鑑別によって確かめられたブリ親魚の 総参加型の誘発産卵^{*1}

長 倉 義 智^{*2}・大原恵理子^{*3}・中 野 昌 次^{*2}・高 橋 誠^{*2}
石 橋 矩 久^{*2, *4}・坂 本 崇^{*3}・岡 本 信 明^{*3}

A Parentage Test Confirmed that Almost All Yellowtail Parents Mated Randomly in Induced Spawning

Yoshitomo NAGAKURA, Eriko OHARA, Shouji NAKANO, Makoto TAKAHASHI,
Norihisa ISHIBASHI, Takashi SAKAMOTO, and Nobuaki OKAMOTO

Two groups (A and B) of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) broodstock were used for induced spawning experiments. Brooders were reared under controlled conditions of both photoperiod and water temperature, were carefully selected by monitoring the degree of ovarian maturation, and were injected with human chorionic gonadotropin in order to induce spawning. A parentage test using three microsatellite DNA markers confirmed the relationship between the broodstock and their offspring and showed that 88% and 83% of brooders actually reproduced on the same day in groups A and B, respectively. These results suggest that the spawning method described above is effective in controlling the reduction of genetic variability of hatchery-reared stock.

2002 年 12 月 17 日受理

ブリ (*Seriola quinqueradiata*) は日本・朝鮮半島および沿海州南部を主な生息域とし、カムチャツカ半島南部から台湾沿岸海域にかけて移動する大型の回遊魚であり、我が国の水産資源の中でも最も重要な種類の一つである。その種苗生産に関しては、道津¹⁾、原田²⁾、藤田ら^{*5}、煤田・落合³⁾、広沢⁴⁾、日本栽培漁業協会⁵⁾、有元ら⁶⁾、虫明⁷⁾および日本栽培漁業協会⁸⁾など多くの報告がある。日本栽培漁業協会では、五島事業場および屋島事業場における種苗生産で、2000 年には 22.9 万尾の人工種苗を生産している。また、全国では放流用として 6.7 万尾、養殖用として 33.4 万尾の人工種苗が 2000 年に生産されている⁹⁾。

ブリの産卵期は、主要な産卵海域である東シナ海では 2~3 月である。一方、日本栽培漁業協会の五島、古満目

事業場における養成親魚の産卵期は、4 月下旬~5 月上旬であるが、この時期に得られたふ化仔魚より生産した放流種苗の大きさは天然当歳魚に比べると小さいため、放流効果が懸念されている¹⁰⁾。そのため、人工種苗のサイズを同時期の天然当歳魚のサイズと同じか、あるいはより大型化するという目的で、通常の採卵時期よりも早い種苗生産が行われることが要望されるようになった。この要望に対し、産卵期前のブリ親魚を、光および水温の環境条件制御下で養成することにより成熟を促進させ、最後にヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin, HCG) 注射を行うことで、通常の産卵期より約 3 ヶ月早い 2 月に採卵させる手法が開発された^{11, 12)}。

一方、生物多様性条約が 1992 年に採択されたのを受

^{*1} 本論文の概要は、平成 14 年度日本水産学会春季大会において口頭発表した。

^{*2} 日本栽培漁業協会五島事業場 〒853-0501 長崎県南松浦郡玉之浦町荒川郷 122-7 (Japan Sea-Farming Association Goto Station, 122-7, Arakawa, Tamanoura, Minamimatsuura, Nagasaki, 853-0501 Japan).

^{*3} 東京水産大学資源育成学科 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7.

^{*4} 現所属：日本栽培漁業協会南伊豆事業場 〒415-0156 静岡県賀茂郡南伊豆町石廊崎 183-2.

^{*5} 藤田矢郎・道津喜衛・原田輝雄 (1965) ホルモン刺激によるブリの人工採卵. 昭和 40 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 15.

けて、FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) は水生動物遺伝資源の保全の必要性を確認し、放流される人工種苗集団の野生集団に及ぼす遺伝的影響を考慮する必要があることを指摘している^{13, 14)}。人工種苗における遺伝的多様性を低下させないためには、天然親魚あるいは天然魚を養成した親魚を用い、さらに“集団の有効な大きさ”(Effective size of population; 以下 N_e と記す) を高く維持することが推奨されており、雌雄とも十分な親魚尾数を確保するとともに、種苗生産には異なった採卵日に得られた卵を供することが重要であるとされている^{15, 16)}。しかし、これらは種苗生産現場におけるコストの上昇を招くことや、大規模な施設を必要とすることなどが懸念されるため、コストの低減および省力化を図っていきながら N_e を高く維持する手法の開発が強く望まれている。

著者らは、ブリ親魚群を光および水温の環境条件制御下で飼育し成熟を促進させ、成熟度調査により成熟の進んだ個体を選別して、HCG 注射による誘発産卵の同調化を図り、多くの親魚が産卵に関与する手法を検討した。そして、採卵に供した親魚と、生産した種苗との間で親子鑑定を行って産卵に関与した親魚を特定することで、ブリの産卵誘発において効率的に N_e を高く維持する手法を検討した。

材料と方法

供試親魚と成熟度選別 試験には以下の2親魚群(A群およびB群とする)を供した(表1)。

A群: 1997年5月に長崎県福江島三井楽地先の定置網で漁獲され、日本栽培漁業協会五島事業場(以下、五島事業場と記す)で2年7ヵ月養成した天然魚養成親魚44尾(雌22尾、雄22尾)を、1999年12月14日に海上生簀から陸上水槽(90 kL)2面に分けて収容した。雌雄の判別は、カニューレを用いて採取した生殖腺内容物により行った。陸上水槽に収容後、2000年1月20日と同年2月4日にカニューレを用いて卵巣卵の一部を採取し、その中で最も成熟の進んでいると思われる最大卵径を有する群の卵径を万能投影機を用いて測定し、その平均値(以下、卵巣卵径と記す)に基づいて2回の親魚選別を行った。すなわち、1月20日に卵巣卵径が330 μm 以下

で成熟が進んでいない個体を選別し(卵巣卵径が330 μm を超えていた個体は本試験とは別の試験に使用)、陸上水槽(90 kL)1面に収容し(雌13尾、雄10尾)、次いで、2月4日に卵巣卵径が660 μm 以上の成熟が進んでいる雌親魚8尾と、腹部を押圧し放精が確認できたものの、あるいは放精の確認ができないものの体色等から健康状態が良いと判断された(体色が黒ずんでいないもの、やせていないものあるいは遊泳が異常でないもの)雄親魚8尾を選別し、陸上水槽(90 kL)1面に収容しA群(雌8尾、雄8尾)とした(表1)。

B群: 1996年5月に長崎県五島灘周辺海域において採捕された天然モジャコを五島事業場で3年7ヵ月養成した天然魚養成親魚40尾(雌21尾、雄19尾)について、1999年12月13日および2000年2月8日に卵巣卵径に基づいた選別を行った。すなわち、12月13日に、卵巣卵径が170 μm 以上の成熟が進んでいる個体を選別し、海上生簀から陸上水槽(90 kL)1面に収容し(雌11尾、雄10尾)、次いで、2月8日に卵巣卵径が700 μm 以上の成熟が進んでいる雌親魚9尾と、腹部を押圧し放精が確認できた雄親魚9尾を選別し、陸上水槽(90 kL)1面に収容しB群(雌9尾、雄9尾)とした(表1)。

これらの親魚群の海上生簀での養成期間中は主に配合飼料を給餌し、その他に生餌(マアジ・マサバ)、モイストペレットを給餌した。陸上水槽に収容後は配合飼料のみを給餌した。両群とも陸上水槽に収容後、長日処理(16L8D)を行い、飼育水温は陸上水槽に収容2日後までに19℃まで加温し、その後は19℃を維持した。

産卵誘発と採卵 A群およびB群とも、2回目の成熟度調査時(A群は2月4日、B群では2月8日)に産卵誘発のため、背部筋肉内にHCG注射(600 IU/kg)を行い、その後、水温をさらに上げ、産卵時の水温は19.5℃とした。HCG注射2日後に水槽内に産卵された卵は、水面下10~20 cmに設置したフレキシブルホース($\phi 50$ mm)2本をサイホンとして用い、水槽横に設置した採卵水槽内の採卵ネット($\phi 70$ cm×深さ70 cm、実容量0.23 kL、黒色ゴース地テトロン、東レ社製)で過収集して回収した。そして、メスシリンダー(容量2 L)内で分離させた浮上卵を、アルテミアふ化器(実容量1 kL)へ収容し、既報⁸⁾に基づき、注水と通気を施しながらふ化まで管理した。

表1. 実験に供試した親魚の由来およびサイズ

	A 群		B 群	
	雌	雄	雌	雄
由来	天然		天然	
養成期間 ^{*1}	2年7ヵ月		3年7ヵ月	
尾数(尾)	8	8	9	9
尾叉長(cm) ^{*2}	78.6±2.4	78.2±2.6	74.0±2.4	72.8±2.9
体重(kg) ^{*2}	9.4±1.0	9.2±1.0	8.0±0.9	7.6±0.9

*1 漁獲後、日本栽培漁業協会五島事業場での養成期間。

*2 平均値±標準偏差。

種苗生産 A 群より 2 月 6 日に採卵して得られたふ化仔魚 37 万尾を 2 月 9 日に、また、B 群より 2 月 10 日に採卵して得られたふ化仔魚 55 万尾を 2 月 13 日にそれぞれ別の四角形コンクリート水槽（実水量 50 kL）に収容して、飼育を開始した。各飼育水槽の中央部にはエアーストン 1 個を、水槽底面の壁側には塩ビパイプ（φ13 mm）で作製したエアブロックをそれぞれ設置し、初期の生存率を向上させるために飼育水の攪拌を行った。餌料には、飼育仔稚魚のサイズにあわせてシオミズツボムシ（L 型）、アルテミアノープリウスおよび配合飼料を使用した。両水槽とも、種苗が全長 100 mm 前後に達した時点で陸上水槽から取り揚げて、その後は海上生簀で継続して飼育した。

鰭の採取と親子鑑定 試験に供した両群親魚および生産された稚魚あるいは幼魚（F₁）の尾鰭の一部（約 1 cm×1 cm）を採取し、親子鑑定に供した。なお、親魚からの鰭の採取は本試験に先立ち行った。A 群の F₁ では 2000 年 4 月 17 日～9 月 26 日（ふ化後 69～231 日）に採集された 126 尾から、B 群の F₁ では 2000 年 6 月 21 日～9 月 26 日（ふ化後 130～227 日）に採集された 159 尾から鰭を採取した。供試した鰭からの DNA 抽出は常法¹⁷⁾ により行った。得られた DNA を鋳型 DNA とし、ブリの DNA 多型を検出するために設計されたプライマー 3 組（Sequ56, Sequ57 および Sequ58）を用いて、PCR (polymerase chain reaction) 法により標的領域を増幅した。PCR の温度条件は 94℃で 1 分、各プライマーに最適なアニーリン

表 2. 親魚および F₁ の 3 つのマーカー座におけるマーカー型 (A 群)

		Sequ56	Sequ57	Sequ58			Sequ56	Sequ57	Sequ58
雌親魚の 個体番号	AF1	102/115	127/149	156/197	雄親魚の 個体番号	AM1	107/109	118/140	152/160
	AF2	123/153	137/151	148/170		AM2	107/139	116/134	162/162
	AF3	102/107	112/139	156/162		AM3	107/123	149/155	148/162
	AF4	96/117	122/143	150/160		AM4	123/129	122/134	160/160
	AF5	105/131	130/145	160/160		AM5	129/139	124/138	154/166
	AF6	113/117	120/132	152/169		AM6	123/149	124/126	154/146
	AF7	117/119	118/140	148/150		AM7	129/139	145/147	152/152
	AF8	121/133	130/149	144/167		AM8	119/123	140/142	154/154

F₁

	Sequ56	Sequ57	Sequ58	特定された親魚の個体番号	
1	113/123	132/142	152/154	♀: AF6	♂: AM8
2	102/139	138/149	154/156	♀: AF1	♂: AM5
3	107/121	118/130	144/160	♀: AF8	♂: AM1
4	117/129	120/124	152/166	♀: AF6	♂: AM5
		・			
		・			
		・			

表 3. 親魚および F₁ の 3 つのマーカー座におけるマーカー型 (B 群)

		Sequ56	Sequ57	Sequ58			Sequ56	Sequ57	Sequ58
雌親魚の 個体番号	BF1	102/116	119/125	156/156	雄親魚の 個体番号	BM1	108/133	123/155	152/166
	BF2	100/121	141/147	156/158		BM2	111/143	137/169	156/162
	BF3	102/102	123/127	146/160		BM3	100/131	119/129	152/168
	BF4	114/139	119/143	156/162		BM4	110/137	119/127	156/166
	BF5	116/127	121/137	148/156		BM5	113/115	147/147	152/158
	BF6	106/125	127/151	156/170		BM6	139/141	127/135	152/156
	BF7	102/106	123/133	162/170		BM7	123/135	129/131	146/160
	BF8	106/131	131/133	156/164		BM8	108/127	109/129	148/156
	BF9	114/137	135/147	152/156		BM9	121/133	127/143	156/174

F₁

	Sequ56	Sequ57	Sequ58	特定された親魚の個体番号	
1	102/133	119/123	152/156	♀: BF1	♂: BM1
2	121/137	127/135	156/156	♀: BF9	♂: BM9
3	100/127	109/141	148/156	♀: BF2	♂: BM8
4	125/133	127/127	170/174	♀: BF6	♂: BM9
		・			
		・			
		・			

グ温度で 30 秒, 72℃で 30 秒のサイクルを 35 回行った。なお, 使用したプライマーは DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されており, その配列はいずれ開示されることになっている。各プライマーのアニーリング温度とアクセッションナンバーは, Sequ56 が 55℃, AB096040, Sequ57 が 52℃, AB096041, Sequ58 が 52℃, AB096042 である。DNA 多型の検出は, ³³P アイソトープでエンドラベルした PCR 増幅断片を 6% アクリルアミドゲルで分離し, イメージングプレートに感光させて行った。また, アリルの判読は M13 フェージ DNA シークエンシングラダーを分子量マーカーとして実施し, 3つのマーカー座における個体ごとのマーカー型を決定した。親魚と F₁ のマーカー型を照合することにより, 各 F₁ 個体の親魚を特定した。

結 果

A 群および B 群において, マーカー座別, 個体別に判読決定したマーカー型をそれぞれ表 2 および表 3 に示す。供試したすべてのサンプルで 3 座におけるマーカー型が決定し, それらを親魚と F₁ で照らし合わせ, すべての F₁ でその雌雄の親魚がそれぞれ特定できた。A 群および B 群の親魚と, 両群 F₁ における親子鑑定結果をそ

れぞれ表 4 および表 5 に示す。その結果, サンプルングした F₁ の親魚として, A 群の雌親魚では供試した 8 尾中個体番号 AF7 を除く 7 尾 (87.5%) が, 雄親魚でも 8 尾中 AM7 を除く 7 尾 (87.5%) が確認され, 少なくとも 2 月 6 日の産卵に雌親魚 7 尾, 雄親魚 7 尾が関与していたことが確認された (表 4)。また, B 群の雌親魚では 9 尾中個体番号 BF4 と BF8 を除く 7 尾 (77.8%) が, 雄親魚でも 9 尾中 BM1 を除く 8 尾 (88.9%) の関与が確認され, 少なくとも 2 月 10 日の産卵に雌親魚 7 尾, 雄親魚 8 尾が関与していたことが確認された (表 5)。

考 察

ブリの種苗生産現場では, 種苗生産の効率をあげるため, 同じ日にまとまった量の受精卵を得る技術開発がこれまで進められ, 日長処理および水温制御によって成熟を促してからホルモンにより産卵誘発し, 同じ日に大量の卵を確保できるようになった^{7, 8, 11, 12)}。しかし, このような処理だけでは, 供試したすべての雌親魚の成熟を完全に同調させることは経験的に困難であった。そこで今回, 産卵直前に成熟の状態がそろった雌親魚を供試することで, 特定の期日の産卵に多くの親魚を関与させ, 大量の卵を確保するとともに, 得られる卵の遺伝的多様性

表 4. 各雌雄の組み合わせに由来すると判定された F₁ の尾数*¹ (A 群)

		雌親魚の個体番号								計
		AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	
雄親魚の 個体番号	AM1				4		1		10	15
	AM2				1					1
	AM3		4			2				6
	AM4				1		1		6	8
	AM5	11	1	1	3		13		14	43
	AM6			3			6		1	10
	AM7									
	AM8			1			42			43
計		11	5	5	9	2	63		31	126

*¹ 親子鑑別はブリのマイクロサテライトマーカー (Sequ56, Sequ57 および Sequ58) を用いて行った。

表 5. 各雌雄の組み合わせに由来すると判定された F₁ の尾数*¹ (B 群)

		雌親魚の個体番号									計
		BF1	BF2	BF3	BF4	BF5	BF6	BF7	BF8	BF9	
雄親魚の 個体番号	BM1										
	BM2	5	1	10		2	1	1			20
	BM3	4	1							1	6
	BM4	5		3		3		2		3	16
	BM5	7	4	3			1	2		7	24
	BM6	3	1	12		2		6		4	28
	BM7			1		1		2			4
	BM8	1	1			9		5		3	19
	BM9	9	1	17		4		1		10	42
計		34	9	46		21	2	19		28	159

*¹ 親子鑑別はブリのマイクロサテライトマーカー (Sequ56, Sequ57 および Sequ58) を用いて行った。

を保持することをねらいとして、卵巣卵径による雌親魚の選別を2回行った。雄親魚についても、体色等から判断して健康状態の良いと思われる個体あるいは放精の確認された個体をできるだけ選別し使用した。その結果、産卵に関与した親魚の割合は、雌雄合計でA群で87.5%、B群では83.3%であった。

一方、マダイでは雌雄比1:1で親魚を収容した水槽において、数日間にわたって自然産卵された卵を用いて生産した種苗と親魚の親子鑑定を行ったところ、数日間の産卵に関与したことが確認された親魚は全親魚の35%であること¹⁸⁾、ヒラメでも自然産卵された卵を用いて生産した種苗と親魚の親子鑑定を行ったところ、産卵に関与したことが確認された親魚は、ひとつの種苗生産群当たり全親魚の8~23%であり、採卵期間を通して雄で70%であったのに対し、雌では26%にすぎないこと¹⁹⁾が報告されている。また、産卵に参加した親魚の雌雄の組み合わせをみると、マダイでは、1尾の雌に多くの雄が交配するという構図が親子鑑別で判明している¹⁸⁾。このように、産卵させる条件(マダイ・ヒラメではホルモン注射あるいは成熟度による選別を行っていない)および産卵様式の違いはあるものの、本試験においては、供試親魚のうち多くの親魚を産卵に関与させることができた。これは、前述のように、親魚の2回選別により成熟度を同調させ、多くの個体が産卵に関与できるようにした結果と考えられる。これまで雌親魚については、産卵直前に卵巣卵径を調査することにより、産卵に関与する可能性がありそうな個体はおおよそ推定できたものの、雄親魚については、産卵への関わりを特定する方法がなかった。本試験で示されたように、親子鑑定の技術を使用することで、実際の産卵に多くの親魚が関与していたことが確認できた。

しかし、一方で、特定の親魚でF₁の割合が多かったり(表4のAF6、表5のBF3など)、反対にF₁の割合が極端に少なかったり(表4のAF5、表5のBF6など)ということがみられた。このようなF₁の割合における親魚間の偏りは、F₁における遺伝子の組成に偏りを生ずることから、人工種苗の遺伝子の多様性を図る上で、今後改善すべき課題である。

種苗生産現場で、これまで産卵に関与している親魚が非常に少ない魚種では、可能であれば産卵直前の成熟度による選別を行い、多くの親魚を産卵に関与させることで、効率よく人工種苗における遺伝子の多様性が図れる可能性もある。

謝 辞

稿を終わるに当たり、本研究を取りまとめる契機を与えられ、また、本論文の御校閲をいただいた日本栽培漁

業協会五島事業場の虫明敬一場長に深謝します。また、有益な御助言、御協力を頂いた東京水産大学および日本栽培漁業協会の関係各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 道津喜衛 (1962) 採卵用親魚の育成. 日水誌, **28**, 549-551.
- 2) 原田輝雄 (1966) 人工ふ化、ブリの増殖に関する研究. 近畿大学水産研究報告, **1**, 24-38.
- 3) 榎田 晋・落合 明 (1971) 産卵期前後における養成ブリの成熟について. 魚雑, **18**, 175-181.
- 4) 広沢国昭 (1972) ブリの採卵について. 栽培技研, **1**, 17-24.
- 5) 日本栽培漁業協会 (1983) III-1 種苗生産技術開発, ブリ. 栽培漁業技術開発の歩み, pp. 47-60.
- 6) 有元 操・津崎龍雄・宿輪 仁 (1987) ブリの親魚養成と自然産卵. 栽培技研, **16**, 63-79.
- 7) 虫明敬一 (1996) シマアジおよびブリの親魚養成技術の開発に関する研究. 特別研究報告, **9**, 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 34-51.
- 8) 日本栽培漁業協会 (1999) ブリの親魚養成技術開発. 栽培漁業技術シリーズ, **5**, 日本栽培漁業協会, 東京, 72 pp.
- 9) 水産庁・日本栽培漁業協会 (2002) 平成12年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国)資料編. 422 pp.
- 10) 藤本 宏 (1997) IV 資源添加技術開発の概要, ブリ. 日本栽培漁業協会事業年報(平成7年度), pp. 252-257.
- 11) MUSHIAKE, K., K. KAWANO, T. KOBAYASHI, and T. YAMASAKI (1998) Advanced spawning in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by manipulations of the photoperiod and water temperature. *Fish. Sci.*, **64**, 727-731.
- 12) MUSHIAKE, K. (2000) Achieving advanced maturation and spawning in yellowtail *Seriola quinqueradiata* by the manipulation of photoperiod and water temperature. *UJNR Technical Report*, **28**, 61-67.
- 13) 中前 明 (1996) 生物の多様性に関する条約. 水産振興, **30** (10), 46 pp.
- 14) 谷口順彦 (1995) 水生遺伝資源の利用と保全について, FAO 専門家会議の報告書 (1993) より. 水産育種, **22**, 83-102.
- 15) 谷口順彦・R. PEREZ-ENRIQUEZ・松浦秀俊・山口光明 (1998) マイクロサテライト DNA マーカーによるマダイ放流用種苗における集団の有効な大きさ(N_e)と近交係数(F)の推定. 水産育種, **26**, 63-72.
- 16) 谷口順彦 (1999) 魚介類の遺伝的多様性とその評価法. 海洋と生物, **21**, 280-289.
- 17) 中山広樹・西方敬人 (1995) DNA の抽出(バイオ実験イラストレイテッド, ②遺伝子解析の基礎), 秀潤社, 東京, pp. 117-128.
- 18) PEREZ-ENRIQUEZ, R., M. TAKAGI, and N. TANIGUCHI (1999) Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, **173**, 413-423.
- 19) 藤井徹生 (2001) ヒラメ人工種苗の遺伝的変異性. 水産育種, **30**, 23-26.