

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 16 年度博士課程 進学
氏 名 川上 達也
指導教員名 塚本 勝巳

論文題目 DNA を分類形質とした浮遊性魚卵の種査定と初期発生に関する研究

魚卵の分布、出現時期や量に関する知見は、魚類の産卵生態の解明と資源変動機構の研究において重要な基礎情報となる。しかし、魚卵は特徴的な分類形質に乏しく、発生に伴い著しく形態が変化するため、形態形質に基づく種査定は極めて困難で、これが研究上の大きな障害となっている。一方、近年では、DNA 情報に基づく新たな種査定法が様々な生物群で提唱されるようになった。しかし、DNA による種査定法を実際のフィールド研究へ大規模に適用した例はまだない。そこで本研究では、まず、半閉鎖水域である浜名湖と開放的外洋域であるマリアナ海域で得られた成魚のミトコンドリア DNA (mtDNA) の配列を解析し、魚卵の DNA 種査定法を開発することを目的とした。次にこれを浜名湖とマリアナ海域で得られた魚卵に適用し、魚類の産卵生態に関する新知見を集積した。さらに、本研究で初めて種が明らかになった魚卵の形態を詳しく記載することもねらいとした。

1. 形態形質の有効性の検討

魚卵のもつ形態情報の分類形質としての有効性を検討するため、種が既知の5目11種の魚類(ニホンウナギ、ハモ、ニシン、オニオコゼ、クエ、アカアマダイ、ヒラメ、ババガレイ、ヌマガレイ、マツカワ、ホシガレイ)の受精卵を人工受精、または養成下の自発産卵によって得、卵の形態と胚発生過程を記載した。その結果、種間で卵径、油球の有無とその数、卵腔の広さ、胚の色素出現パターンに違いがあることがわかった。さらに、孵化仔魚では胸鰭、口、筋節の形成と眼の黒化の程度に差が認められ、孵化時の発生段階が大きく異なることもわかった。得られた形態に基づき上記11種の卵を分類したところ、ニシンは付着性の卵膜をもつことで、またニホンウナギ、ハモ、ヌマガレイ、オニオコゼは油球の有無と卵径で、他種と明確に識別できた。しかし、ヒラメ、アカアマダイ、クエから成るグループと、ホシガレイ、マツカワ、ババガレイから成るグループでは、胚の色素、または孵化仔魚の筋節数とサイズを比較しなければ種を識別できなかった。以上の結果から、発生が進めば識別できる可能性は高まるものの、形態のみによる魚卵の種査定は困難であると考えられた。

2. DNA 種査定法の検討

種査定に用いる遺伝子領域を決定するため、まず、多くの魚類が含まれる条鰭類で、mtDNAの16S rRNA 遺伝子(16S)と、cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子(COI)の既存の情報量を調べた。その結果、2011年6月22日時点で、16Sは42目383科2065属5469種の計13221件、COIは43目360科1794属4412種の計23126件の配列がGenBankに登録されていた。登録件数はCOIの方が多いが、分類学的・生態学的研究の基礎となる科、属、種の数に着目すれば、16Sの方で多くの分類群が揃っている。さらに、16SはCOIよりも条鰭類の分類群を識別する能力が高いことが報告されており、種査定に用いるには16Sが適切と考えられた。

次に、2004年4月～2005年9月に浜名湖で、2010年8～9月にマリアナ海域で採集した成魚計181個体を形態に基づき正確に分類し、16Sの部分配列を決定した。浜名湖で得た15目55科85種142個体(778～1226 bp)とマリアナ海域で得た7目20科32種類39個体(916～1181 bp)の配列をBLASTにより総当たりで比較したところ、種内相同性は浜名湖で98.35～100% (n=97)、マリアナ海域で99.81～100% (n=3)だった。一方、種間相同性は、浜名湖で77.13～99.89% (n=2819)、マリアナ海域で77.87～98.35% (n=188)だった。しかし、浜名湖では、1個体のボラと、種間相同性が高かったトラフグ属4種を除くと、種内相同性の最小値は99.05%、種間相同性の最大値は97.27%となり、種内と種間の相同性の範囲を明瞭に分けることができた。以上の結果

から、浜名湖とマリアナ海域のいずれでも、16S の配列間で 99% 以上の相同性を示す場合には、同種と判断できると考えられた。以降の種査定では、上記で得た 16S 配列と GenBank をデータベースとして、魚卵の配列を BLAST 検索した。

3. 浜名湖に出現する魚卵の種組成と分布

浜名湖に出現する魚卵に DNA 種査定法を適用して種組成と分布および季節性を明らかにするため、2004 年 8 月～2005 年 11 月に湖内 8 定点のプランクトンネット調査と潮汐を利用した湖口部のアンカーネット調査を実施し、浮遊性魚卵計 6425 個を採集した。これらの卵は形態で 46 タイプに分けられた。そのうち 35 タイプ 340 個の卵で 16S の部分配列 (840～1231 bp) が得られ、99% の相同性を基準として 45 クラスタに整理された。これらの配列を BLAST 検索した結果、26 クラスタ (58%) 299 個の卵 (88%) が種に同定された。形態タイプと DNA クラスタが一致した 12 種 (セスジボラ、カタクチイワシ、ムシガレイ、クロサギ、メジナ、ササウシノシタ、イシガレイ、スズキ、ダイナンウミヘビ、アラメガレイ、クロウシノシタ、ギマ) のうち、カタクチイワシとアラメガレイの卵はほぼ周年出現したのに対し、スズキ、クロサギ、イシガレイ、ギマ、ササウシノシタの卵はその出現に明瞭な季節性がみられた。その他 5 種の出現数は 1 年を通じて少なかった。カタクチイワシ、イシガレイ、ギマの卵は、湖口部と満潮前後のアンカーネットではわずかしか出現しなかったのに対し、湖央部から湖奥部では多数出現したため、主に湖内で産卵していると考えられた。一方、アラメガレイ、スズキ、ササウシノシタ、クロサギの卵は湖口部の定点とアンカーネットに出現が集中したことから、湖口部周辺で産卵していると考えられた。以上の結果から、DNA 種査定法は浜名湖に出現する魚卵に適用可能であり、魚類の産卵生態の解明に有効であることがわかった。

4. マリアナ海域に出現する魚卵の種組成と分布

西マリアナ海嶺の海山域を含む外洋域に出現する魚卵の研究における DNA 種査定法の有効性を検討するため、2002 年 7～8 月に西部北太平洋のマリアナ海域 (7°～18°N, 137°～144°E) で採集した浮遊性魚卵に本法を適用し、種組成と分布の解明を試みた。得られた計 5321 個の卵のうち、死卵を除く 2698 個の卵は形態で 108 タイプに分けられた。そのうち 88 タイプからそれぞれ 1 個ずつ卵を無作為に選び、16S の部分配列 (1037～1190 bp) を得た。これらの卵は、16S の 99% の相同性を基準として 71 クラスタに整理された。これらの卵の配列を BLAST 検索した結果、28 クラスタ (39%) 37 個の卵 (42%) が種に同定された。種が同定できなかった 43 クラスタ

(51 個)のうち、6 クラス (9 個) の卵は、それぞれトビウオ科、ミサキソコダラ属、ユカタハタ属、マグロ属、マカジキ科、マカジキ属の複数種と高い相同性を示した。このうちマグロ属は遺伝子移入が起きているため 99% の相同性基準では種レベルの識別ができなかったと考えられた。30 個以上の卵が得られた種で分布を比較したところ、カツオ (n=982)、ネズミフグ (n=50)、ヨロイギンメ (n=46) は 72~80% が海山域から採集されており、海山近傍で産卵していると考えられた。一方、マルバラシマガツオ (n=144)、ムカシクロタチ (n=95)、アカマンボウ (n=81)、サヨリトビウオ (n=70)、クサビフグ (n=54)、テンガンムネエソ (n=42)、スジコバン (n=30) は海山域で 23~45% が採集されたが、海山域に集中する傾向はみられず、外洋域の広範囲で産卵していると考えられた。以上の結果から、マリアナ海域においても DNA 魚卵種査定法は適用可能で、これまでほとんど知見がなかった外洋性魚類の産卵生態の解明に有効であることがわかった。

5. DNA 種査定法に基づく卵の形態記載

魚卵の形態と初期発生に関する知見を得るため、DNA を用いて同定できた浜名湖の 26 種とマリアナ海域の 28 種、計 54 種の卵の形態を記載した。これらのうち 21 種では、飼育実験をおこない孵化仔魚の形態も記載した。加えて、種まで判別できなかった卵についても 16S のクラスターで整理し、計 62 種類を記載した。さらに DNA 解析をおこなえなかった 31 タイプの卵も記載した。その結果、浜名湖で計 56 種類、マリアナ海域で計 91 種類の卵の形態を記載し、両海域に出現する浮遊性魚卵の形態によるグルーピングを可能にした。以上の結果、魚卵を新規に記載できた種は、浜名湖で 7 種 (アラメガレイ、アカササノハベラ、ホシササノハベラ、クロサギ、ワニエソ、ササウシノシタ、ダイナンウミヘビ)、マリアナ海域では 15 種 (テンガンムネエソ、マルバラシマガツオ、ネズミフグ、ネッタユメハダカ、フサカザリホシエソ、モヨウモンガラドオシ、ヘラアナゴ、スジコバン、スジハナビラウオ、ヒシコバン、ムカシクロタチ、ヨロイギンメ、モトノコバウナギ、スミクイウオ、ソコイワシ科の 1 種) の計 22 種となった。

本研究は魚卵の DNA 種査定法を確立し、それが半閉鎖水域と開放的外洋域のいずれでも魚類の産卵生態研究に有効であることを実証した。また計 22 種の新規記載を含む計 54 種の卵の形態を記載すると同時に、種不明卵を含む計 116 種類の卵で DNA による識別を可能にした。これらの結果は魚卵の分類学の基礎を充実させると同時に、魚類の産卵生態の解明と資源変動機構の研究において力を発揮するものと期待される。