

ウマツラハギの個体と尾鰭細胞における温度耐性の関連性

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者名	阪本, 憲司 五十嵐, 真由
発行元	水産増殖談話会
巻/号	62巻1号
掲載ページ	p. 31-35
発行年月	2014年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ウマヅラハギの個体と尾鰭細胞における温度耐性の関連性

阪本憲司*・五十嵐真由

Correlation between the Temperature Tolerance of Live Fish and Caudal Fin Cells in Black Scrapper *Thamnaconus modestus*

Kenji SAKAMOTO* and Mayu IGARASHI

Abstract: We evaluated the correlation between the temperature tolerance of live fish *in vivo* and caudal fin cells *in vitro* in black scrapper *Thamnaconus modestus*. Fish were reared at 17°C then exposed to high temperature (30°C) and the time to death was measured. In addition, we incubated black scrapper caudal fin cells at 43°C for 2 h and measured cell viability using the trypan blue assay. There was a significant correlation between the *in vivo* and the *in vitro* tolerance to high temperature in this species ($P<0.05$). Our results suggest that the caudal fin cells from live fish may be used to evaluate high temperature tolerance traits in selective fish breeding programs.

Key words: Black scrapper; Temperature tolerance; Caudal fin cell

ウマヅラハギ *Thamnaconus modestus* は、フグ目カワハギ科ウマヅラハギ属に分類され、フグ毒のテトロドトキシンを蓄積しないため肝臓も食用として利用されている。また、本種やカワハギ *Stephanolepis cirrhifer* の養殖魚では天然魚よりも比肝重が高くなることが知られている。このことから、ハギ類は魚価の低迷、餌料価格の高騰などによる養殖業の厳しい経営状況に置かれた昨今において、新たな養殖対象種として注目されている (水野 2009)。しかし、本種における増養殖技術の基礎的知見は少なく、今後の種苗生産技術の開発が望まれている (Mizuno et al. 2012)。

魚類にとって水温は生息域を決める制限要因の一つであるとともに、増養殖を行う上でも成長や生残、生殖などの飼育成績に関わる重要な環境要因の一つである。よって、ウマヅラハギの高温耐性育種を行うに当たり、的確な高温耐性評価法の開発が望まれる。そのためには、魚を殺すことなく、迅速且つ簡易的に高温耐性を評価する必要がある。

Sakamoto et al. (2002, 2004) は、クローンギンブナ

Carassius langsdorfii を実験魚とし、魚体を殺すことなく個体の高温耐性を評価することができる尾鰭細胞を用いた高温耐性評価法を開発した。本評価法は、アユ *Plecoglossus altivelis* やヒラメ *Paralichthys olivaceus* といった有用種にも応用可能であり (Sakamoto et al. 2005)、高温耐性が高い品種や系統の作出における選択育種の効率を高めることができるものと期待されている。

本研究では、Sakamoto et al. (2002, 2004, 2005) によって開発された尾鰭細胞による高温耐性評価法を応用し、ウマヅラハギにおける個体と尾鰭細胞の高温耐性の関連性を調べた。

材料および方法

供試魚

広島県尾道市因島で採集した天然魚51尾 (平均全長 ± 標準偏差: 125.7 ± 10.8 cm, 平均体重 ± 標準偏差: 22.4 ± 5.8 g) を供試魚とした。採集した個体は、屋外

2013年8月27日受付; 2013年11月26日受理。

福山大学生命工学部海洋生物科学科 内海生物資源研究所 (Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, 452-10 Ohama, Innoshima, Onomichi, Hiroshima 722-2101, Japan).

*連絡先 (Corresponding author): Tel, (+81) 845-24-2933; Fax, (+81) 845-24-3449; E-mail, sakamoto@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp (K. Sakamoto).

に設置した2kl円形水槽に収容し、14日間飼育した。その間の飼育水温(平均±標準偏差)は、 $17 \pm 0.8^\circ\text{C}$ であった。なお、餌は冷凍オキアミとし、毎朝定時に飽食量を与えた。

個体差が得られる温度条件の検討

本実験では、個体と尾鰭細胞における高温耐性の関連性を調べることを目的とした。そのためには、個体の生存時間の幅をより広く得ることができる温度条件が重要となる。そこで、まず始めに高温耐性の個体差を得るための高温曝露条件を検討した。本実験に供した個体16尾を、恒温室に設けた100l水槽に収容した。飼育水を循環ろ過し、水槽内にエアストーンを入れて通気をした。飼育水温は 17°C とし、高温耐性実験を行うまでの20日間飼育した。なお、餌は冷凍オキアミとし、毎朝定時に飽食量を与えた。

高温耐性実験には、25l容量のプラスチック製保温容器2つを使用した。これらの容器に海水20lを入れ、3個のエアストーンで十分な通気をし、サーモスタットで温度調節をするヒーターで水温を調節した(設定温度 $\pm 0.5^\circ\text{C}$)。高温耐性実験は、30あるいは 31°C 設定で行った。本実験においてこの2つの温度条件を設定した理由は、事前調査により、 29°C 設定では高温曝露をしてから6時間後においても供試した全ての個体(8尾)で死亡が確認されなかったからである。一方、 32°C 設定では、設定温度に到達してから5分以内に供試した全ての個体(8尾)が死亡し、明確な個体差が得られなかったからである。

実験条件を同じくするために、前日から餌止めしていた全ての供試魚を8尾ずつ各水槽に収容し、水温

を 17°C から10分間に 1°C ずつ上昇させた。30あるいは 31°C に達した時点で実験開始とし、以後この温度を維持して供試魚が死亡するまでの生存時間を測定した。実験中は常時個体の様子を窺い、平衡喪失が観察された際に個体を掬い取り、鰓蓋の動きが無く、突付くなどの刺激に対する反応が認められない場合に死亡と判定し、生存時間を記録した。なお、実験は最長生存個体が死亡した547分間行った。

個体と尾鰭細胞における高温耐性の関連性

尾鰭細胞を用いた高温耐性の評価実験を行うために、恒温室に設けた500l水槽に供試魚19尾を収容した。飼育水を循環ろ過し、水槽内に3個のエアストーンを入れて十分に通気をした。飼育水温は 17°C とし、高温耐性実験を行うまでの20日間飼育した。なお、餌は冷凍オキアミとし、毎朝定時に飽食量を与えた。

高温耐性実験には、上述と同様の容器を用いた。尾鰭細胞の高温耐性との関連性を見るために、個体を分けて実験を行う必要があるため、この容器内に15cm角のプラスチック製の籠を8個セットし、各籠に供試魚を1尾ずつ収容した。高温耐性実験は、水温を 17°C から10分間に 1°C ずつ上昇させ、 30°C に達した時点で実験開始とし、以後この温度($30 \pm 0.5^\circ\text{C}$)を維持して供試魚が死亡するまでの生存時間を測定した。死亡の判定は、上述と同様とした。

これらの個体を実験水槽に収容する間に、尾鰭先端部の約5mm角を解剖バサミで採取し、これを尾鰭細胞の高温耐性実験に用いた。

鱗片をダルベッコ処方リン酸緩衝液で洗浄後、1.5ml容遠心チューブに入れ、0.25%トリプシン-

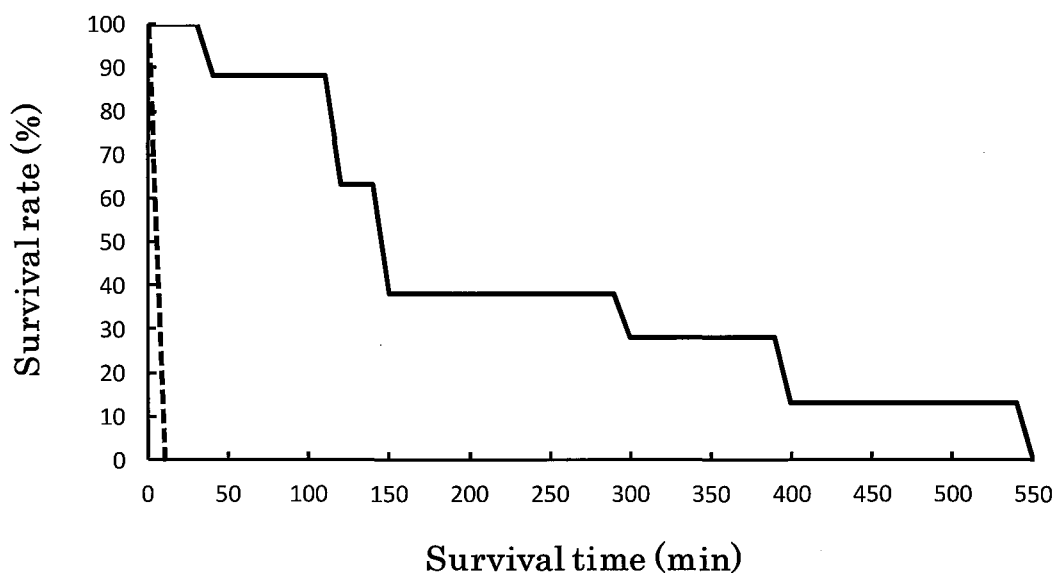


Fig. 1. Cumulative survival of black scraper following exposure to high temperature at 30 or 31°C . The solid line and dotted line represent the 30 and 31°C treatments, respectively.

PBSを加えて37℃で10分間インキュベートした後、ピペティングにより細胞を遊離させた。その後、酵素反応を止めるために牛胎児血清を添加した Leibovit's L15 培地を等量加えて、これを実験に用いた。この尾鰭遊離細胞を Sakamoto et al. (2002, 2004, 2005) の方法に従って43℃で2時間処理し、その後、等量の0.3%トリパンブルー-PBSで染色し、全細胞あたりの生細胞率を算出した。なお、高温処理前の細胞に、染色された細胞(死細胞)はみられなかった。また、1個体から得た1試料当たりの全細胞測定数は、およそ200~300細胞の範囲であった。

さらに、本実験で供試した全ての個体において、それらの体サイズ(全長あるいは体重)と高温耐性との関連性についても調べた。

なお、相関係数の有意性は r 表により判断した。

結 果

個体差が得られる温度条件の検討

17℃で馴致飼育していた供試魚を30あるいは31℃に高温曝露したときの生存率の推移を Fig. 1 に示す。31℃処理区においては、設定温度に到達してから6分後に1個体が死亡した。続いて7分後に3個体が、9分後に4個体が死亡し、全ての供試魚が実験開始から短時間で全滅した。一方、30℃処理区においては、設定温度に到達してから39分後に最初の1個体が死亡し、その後の時間経過に伴って生存率は低下し、最も

生存時間が長かった個体は実験開始から547分後に死亡した。

個体と尾鰭細胞における高温耐性の関連性

17℃で馴致飼育していた供試魚を30℃に曝露したときの個体の生存時間と、各個体から得られた尾鰭細胞の高温処理後の生細胞率との関係を Fig. 2 に示す。その結果、両者の間に有意な正の相関($r=0.686, P<0.05$)が認められた。

本実験に供試した個体の体サイズ(全長あるいは体重)と、各個体における高温耐性の関係を調べた。その結果、全長と各個体の高温曝露後の生存時間に有意な相関($r=0.078, P>0.05$)は認められなかった(Fig. 3)。また、体重と各個体の高温曝露後の生存時間においても有意な相関($r=0.052, P>0.05$)は認められなかった(Fig. 4)。

考 察

高温耐性形質は、養殖においては対象魚の成長や生残などに直接的に関係し飼育成績を大きく左右する形質であるため、形質発現に関わる生理学的・遺伝学的評価法を確立することは重要な研究課題となる。また、増養殖機関においては夏季の水温上昇に伴う大量斃死が懸念されることから、高温耐性の高い品種や系統の作出が被害の緩和に繋がるものと期待される。しかし、魚類の育種はその成果をみるまでに多くの時間と労力

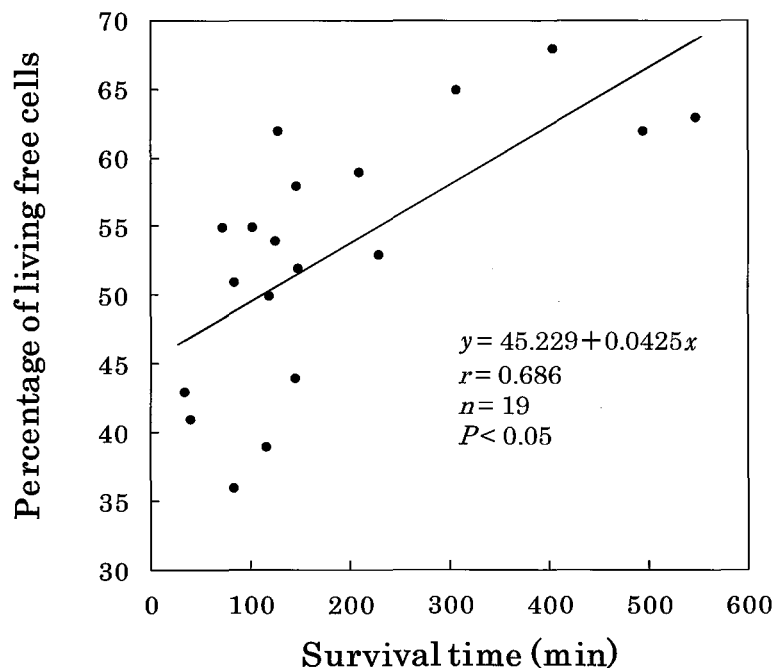


Fig. 2. Correlation between the percent of live cells from caudal fin clips incubated at 43℃ for 2 h and the time to death of black scraper individuals exposed to high temperature (30℃).

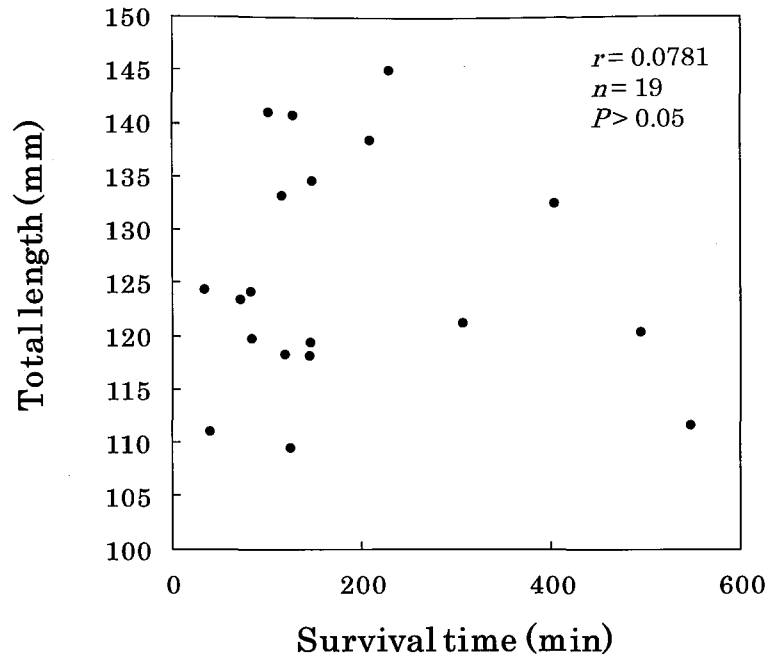


Fig. 3. Relationship between individual fish size (Total length: mm) and the times to death of black scraper individuals exposed to high temperature (30°C).

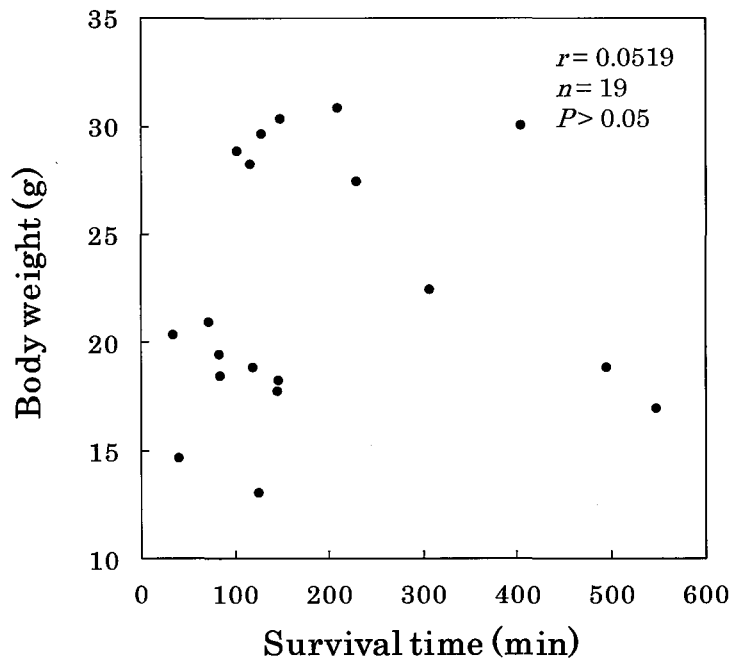


Fig. 4. Relationship between the individual fish size (Body weight: g) and the times to death of black scraper individuals exposed to high temperature at 30°C.

を要することから、高温耐性の高い魚類の育種をより効率的に行うためには、選択育種の指標となりうる耐性形質の適切且つ簡易的な評価法の開発が望まれる。

本実験では、新たな養殖対象種として注目されているウマヅラハギにおいて、Sakamoto et al. (2002, 2004, 2005) らが開発した尾鰭細胞による高温耐性評価法を

応用し、個体と尾鰭細胞における高温耐性の関連性を調べた。まず、高温耐性を評価する際に重要となる耐性の個体差が得られる温度条件を検討した。17°Cで馴致飼育していた供試魚を30あるいは31°Cに高温曝露したときの生存率の推移 (Fig. 1) をみると、31°C処理区においては実験開始から9分後に全ての供試魚が死

亡した。一方、30℃処理区においては、設定温度に到達してから39分後に最初の1個体が死亡し、その後の生存率は時間経過に伴って低下し、生存時間が最も長かった個体は実験開始から547分後に死亡した。これらの結果から、30℃で高温曝露することで高温耐性の個体差がみられることが明らかとなった。また、1℃の温度差であるにもかかわらず顕著な生存時間の差異がみられたことから、高温耐性を評価する際は温度制御に十分な配慮が必要であると考えられた。

ウマヅラハギの迅速且つ簡易的な高温耐性の評価を試みるため、尾鰭細胞による高温耐性評価法 (Sakamoto et al. 2002, 2004, 2005) を応用した。17℃で馴致飼育していた供試魚を30℃に曝露したときの個体の生存時間と、各個体から得られた尾鰭細胞の高温処理後の生細胞率との関係 (Fig. 2) を調べた結果、両者の間に有意な正の相関 ($r=0.686$, $P<0.05$) が認められた。クローンギンブナをモデル実験魚として開発され、アユやヒラメといった有用魚種にも応用可能であった尾鰭細胞による高温耐性評価法は、本種においても応用可能であった。また、尾鰭細胞を用いた高温耐性評価法は他の魚種において応用されており (Newton et al. 2010)、ウマヅラハギの選択育種においてもその効果が期待される。さらに、魚体から切り取られた尾鰭部分は、やがて短期間の内に再生し元に戻ることも本評価法の利点であるといえる。

一方、魚体と尾鰭細胞の間に高温耐性に対する共通の機能が在るのかどうか、また、他の臓器や組織由来の細胞でも共通した高温耐性を有しているのかについては不明であり、尾鰭細胞が魚体の全体的な機能や反応をどの程度反映しているのかは明らかでない。そのため、高温耐性形質の発現におよぼす分子生物学的発現機構の解明は、今後の研究課題である。

本実験に供試したウマヅラハギの個体サイズ (全長と体重) と、各個体における高温耐性の関係を調べた結果、全長あるいは体重と各個体の高温曝露後の生存時間に有意な相関は認められなかった (Figs. 3, 4)。

工藤ら (2001) は、ヒメマスの高水温耐性と尾叉長や体重との関係を調べ、それぞれにおいて有意な相関関係はなかったと報告している。本実験においても、ウマヅラハギの高温耐性と全長や体重との相関はみられず、本種の高温耐性は全長や体重と独立した形質であり、体サイズからは高温耐性を評価できないことが考えられた。しかし、高温耐性は発育段階や日齢の違いなどによって変化することが知られているため (Kanda et al. 1992; 藤沢ら 1998; 阪本ら 2002)、高温耐性と体サイズとの関連性については今後の詳細な調査が必要である。

要 約

ウマヅラハギの尾鰭細胞による高温耐性の評価を試みた。17℃で馴致飼育していた供試魚を30℃に高温曝露したときの個体の生存時間と、各個体から得られた尾鰭細胞の高温処理後 (43℃, 2時間) の生細胞率との関係を調べた結果、両者の間に有意な正の相関 ($r=0.686$, $P<0.05$) が認められた。本実験結果から、尾鰭細胞を用いることにより、魚体を殺すことなく個体の高温耐性の評価が可能であり、選択育種への効果が期待される。

文 献

- 藤沢公忠・中嶋正道・藤尾芳久 (1998) グッピーにおける高温耐性の系統差について。水産育種, **26**, 9-15.
- Kanda, N., M. Nakajima and Y. Fujio (1992) Genetic variation for thermal resistance of the guppy *Poecilia reticulata*. *Tohoku J. Agr. Res.*, **42**, 67-72.
- 工藤飛雄馬・井ノ口伸幸・木島明博 (2001) 完全同胞によるヒメマスの海水耐性および高水温耐性形質における広義の遺伝率と変動指数の推定。水産育種, **31**, 25-31.
- 水野かおり (2009) 愛媛県におけるウマヅラハギ・カワハギの生産技術開発について (特集 新魚種開発の動きをチェック!). 養殖, **46**, 16-18.
- Mizuno, K., S. Shimizu-Yamaguchi, C. Miura and T. Miura (2012) Method for efficiently obtaining fertilized eggs from the black scraper *Thamnaconus modestus* by natural spawning in captivity. *Fish. Sci.*, **78**, 1059-1064.
- Newton, J. R., C. Smith-Keune and D. R. Jerry (2010) Thermal tolerance varies in tropical and sub-tropical populations of barramundi (*Lates calcarifer*) consistent with local adaptation. *Aquaculture*, **308**, 128-132.
- 阪本憲司・中嶋正道・谷口順彦 (2002) クローンギンブナの高水温耐性形質における日齢と飼育水温の影響および広義の遺伝率の推定。水産育種, **32**, 33-38.
- Sakamoto, K., W. Koedprang, M. Nakajima and N. Taniguchi (2002) Thermal resistance traits of the clonal silver crucian carp *Carassius langsdorffii* and evaluation of these traits using primary culture cells. *Fish. Sci.*, **68**, 1029-1033.
- Sakamoto, K., W. Koedprang, M. Nakajima and N. Taniguchi (2004) Thermal resistance traits in the clonal lines of silver crucian carp *Carassius langsdorffii* evaluated by caudal fin cells. *Fish Genet. Breed. Sci.*, **33**, 87-92.
- Sakamoto, K., M. Nakajima and N. Taniguchi (2005) Thermal tolerance traits of juveniles of the ayu *Plecoglossus altivelis* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* evaluated by their caudal fin cells. *Aquaculture*, **246**, 93-99.