

安武 由矢

1. はじめに

本研究を実施した愛知県師崎沖は伊勢・三河湾に面しており、国内でも有数の漁場である。伊勢・三河湾内ではイワシ類の仔魚であるシラスの漁場が形成されていることから、多くの魚類が再生産の場として利用していると考えられる。資源管理のためには産卵の時期や量、産卵海域を詳細に把握する必要があり、特に水産有用種では種を同定した上で解析が重要である。魚卵の同定においては一般的には浮遊性卵が対象とされ、日本近海に出現する魚卵のうち、外部形態が明らかにされている種は300種類程度であり、さらにホルマリン固定後では61種類しか識別ができず(沖山, 2014)、魚卵の卵期については形態から種を識別できない場合が多いという現状がある。

形態から同定が難しい魚卵には分子生物学的手法の一つであるDNAバーコーディング法が非常に有用である。しかし、各魚卵を1つずつDNAバーコーディングすることは費用的にも時間的にも現実的ではない。近年、メタバーコーディングの手法が開発され、魚卵を対象とした事例ではミトコンドリアDNAのCO1領域の710 bpおよび16S rRNA領域の570 bpを対象にしたプライマーを用い、多くの魚卵をまとめて識別することが可能であるとされた(Duke & Burton, 2020)。その際、試料の固定にホルマリンを用いると、ホルマリンおよびその変性物質によりDNAの断片化やPCRの阻害が引き起こされることが知られており(Pääbo *et al.*, 1989)、この手法のPCR対象領域の長さはホルマリンの影響を受けると考えられる。そのため、試料の固定にはDNAの断片化やPCRの阻害が起きにくいエタノールが用いられるが、メタバーコーディングでは種ごとの魚卵数を推算することが難しく、外部形態による種同定またはタイプ分けで得られた魚卵数から推算する必要がある。しかし、試料をエタノールで固定する場合、魚卵はエタノールの脱水作用により外形が保持されない、あるいは卵膜が濁り内部構造が確認できなくなり外部形態情報を得ることが難しくなるという問題が生じる。

近年、架橋を解く処理を行うことや断片化していても増幅が可能な短い領域を対象としたプライマーを用いることで、ホルマリン固定試料から配列情報を得られる可能性が示されている(Shinozaki *et al.*, 2021)。そこで本研究ではミトコンドリアDNAの12S rRNA領域の163 - 185 bpという短い領域を対象として設計されたMiFish(Miya *et al.*, 2015)を用いて、ホルマリン固定試料からメタバーコーディングを行うことを試みた。また、得られた結果から師崎沖の卵からみた魚類相を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 魚卵の採集

2022年4月20日に愛知県知多郡南知多町師崎沖の3地点(図1)で丸稚ネットを表層において船速2ノットで5分間曳網し、試料を採集した。採集した試料を2 Lポリエチレン製容器に収容し、最終濃度が1%となるように中性ホルマリンを添加し、冷蔵保存した。冷蔵した各試料について、①DNA検出における保存期間の影響と②メタバーコーディングにおいて検出されるための最低魚卵数を推定するため、

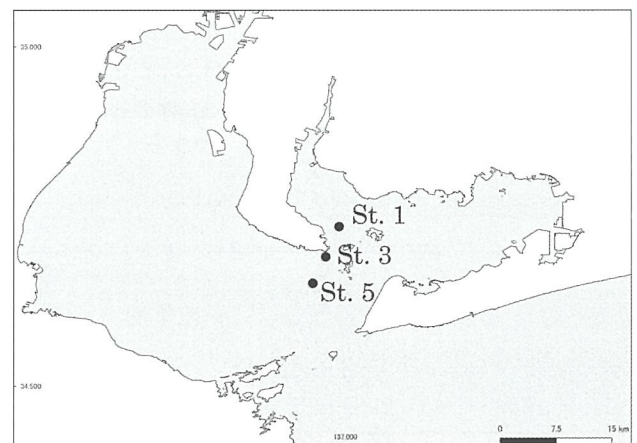


図1 調査地点(師崎沖)

表1の条件でホルマリン保存後に、総魚卵数に対するカタクチイワシ卵の割合が5%、2%および1%となるように卵を抽出し、エタノールで保存した。

表1 各地点のDNA試料の条件

地点	ホルマリン保存期間	カタクチイワシ	球形卵	総魚卵数
St.1	2日以内	25個(5%)	475個	500個
St.3	20 - 23日	10個(2%)	490個	500個
St.5	30 - 40日	5個(1%)	495個	500個

2.2 魚卵形態分析

魚卵は日本産稚魚図鑑(沖山, 2014)に基づき種同定し、種ごとに魚卵数を計数した。未同定の魚卵については計測した卵径および油球径からタイプ分けを行い、タイプごとに計数した。

2.3 メタバーコーディング

各地点の試料から表1に示すように魚卵を500個ずつ選別し、それらを纏めてDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen社)を用いDNAを抽出した。メタバーコーディングにはMiFish-U-F, MiFish-U-Rプライマー (Miya *et al.*, 2015)を用いた。得られた配列情報についてはBlast検索を行い、配列の相同性や対象生物の分布域に基づき整理した。

3. 結果

3.1 魚卵形態分析結果

形態による魚卵の同定結果を表2に示す。採取された試

料には全地点合計で7タイプが含まれ、カタクチイワシ、コノシロおよびネズッポ科が種または種群まで同定が可能であったが、残りの4タイプについては同定が困難であった。St.1では6タイプ12,012個、St.3では7タイプ7,610個、St.5では7タイプ10,006個の魚卵が確認された。全地点でカタクチイワシが最も優占した。

3.2 メタバーコーディング

各試料の抽出時のDNA濃度とメタバーコーディングの結果を表3に示す。抽出時のDNA濃度はSt.1で9.20 ng/ μ l、St.3で3.01 ng/ μ l、St.5で2.42 ng/ μ lであった。メタバーコーディングでは全地点で3目8科10種(タイプ)が確認され、いずれの地点においても8種(タイプ)が確認された。

4. 考察

4.1 プライマーとメタバーコーディングの有用性

本研究で行ったメタバーコーディングではトビヌメリとセトヌメリについてMiFishプライマーで増幅される領域では識別ができなかったためネズッポ科までの同定に止めた。ネズッポ科の1種の1タイプを含め3地点ともに8種類ずつ、全地点合計で10種類が検出された。3地点に共通して5種類、2地点に共通して4種類、1地点のみの検出は1種であった。

ホルマリン保存期間により抽出DNA濃度は異なった(表3)が、最もホルマリン保存期間が長く、試料中のカタクチイワシ魚卵の割合が最も小さいSt.5の試料からカタクチイワシが検出された。また、形態分析の結果、3地点で確

表2 魚卵の計数計測結果

和名	卵径 (mm)	油球径 (mm)	油球数	St.1	St.3	St.5
コノシロ	1.24 - 1.39	0.09 - 0.16	1	215 (51)	405 (85)	235 (67)
カタクチイワシ	0.51 - 0.68×1.03 - 1.36	-	0	9536 (25)	4458 (10)	7093 (5)
ネズッポ科	0.63 - 0.68	-	0	1341 (226)	836 (30)	667 (43)
単脂球形卵-1	0.79 - 0.85	0.19 - 0.27	1	530 (140)	248 (200)	1156 (244)
単脂球形卵-2	0.89 - 0.99	0.13 - 0.25	1	382 (52)	1564 (164)	795 (123)
単脂球形卵-3	1.01 - 1.02	0.21	1	8 (6)	96 (8)	17 (17)
単脂球形卵-4	1.39 - 1.58	0.40 - 0.47	1	0 (0)	3 (3)	43 (1)
合計				12012(500)	7610(500)	10006(500)
種類数				6	7	7

()内はDNA実験に用いた魚卵の個数 単位:卵数/曳網

表 3 魚卵の計数計測結果

和名	学名	St.1		St.3		St.5	
		抽出DNA濃度:9.20 ng/μl		抽出DNA濃度:3.01 ng/μl		抽出DNA濃度:2.42 ng/μl	
		総リード数:81150		総リード数:72662		総リード数:73626	
		リード数	%	リード数	%	リード数	%
コノシロ	<i>Konosirus punctatus</i>	14606	18.00	17115	23.55	12168	16.53
カタクチイワシ	<i>Engraulis japonica</i>	11250	13.86	7039	9.69	5012	6.81
ホウボウ	<i>Chelidonichthys spinosus</i>			381	0.52	20	0.03
マダイ	<i>Pagrus major</i>	9997	12.32	17561	24.17	15320	20.81
クロダイ	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	23611	29.10	22173	30.52	25628	34.81
コブダイ	<i>Semicossyphus reticulatus</i>	1820	2.24			728	0.99
ネズヅボ科の一種*1	<i>Callionymidae</i>	637	0.78				
ハタタテヌメリ	<i>Repomucenus valenciennei</i>	18760	23.12	4873	6.71	6140	8.34
サワラ	<i>Scomberomorus niphonius</i>			1472	2.03	8610	11.69
ヒラメ	<i>Paralichthys olivaceus</i>	469	0.58	2048	2.82		

科名、種名及び並び順は、「日本産魚類検索 全種の同定 第三版」に準拠した。

*1: eDNA解析ではトビヌメリとセトヌメリを判別できないため、ネズヅボ科の一種として扱った。

認められた不明卵のタイプが重複しており出現傾向に大きく差がなかったと推定され、メタバーコーディングの結果からも種類数に差がなかった。以上 2 点から、MiFish プライマーを用いたメタバーコーディングではホルマリン保存期間が 40 日以内では検出力が極端に落ちることはないと考えられた。

メタバーコーディングでは DNA 量の少ない種は PCR の原理上増幅されにくく検出されないことがある。そこで検出されるために必要な最低魚卵数の推定のため、カタクチイワシの卵を St.1 は 5% (25 個)、St.3 は 2% (10 個)、St.5 は 1% (5 個) となるように調整したが、メタバーコーディングにおいてはいずれの割合においてもカタクチイワシが検出されたことから、1% 以上であれば検出可能であることが分かった。また、カタクチイワシのリード数の割合 (DNA 配列の数) は個数の割合よりも高かった。メタバーコーディングにおけるリード数は DNA 量に、DNA 量は細胞数に比例するが、魚卵の細胞数は発生段階により異なるため、魚卵の個数とメタバーコーディングのリード数が対応しなかったと考えられた。

また、本研究では 500 個の魚卵を 1 試料としたが、魚卵を溶解する段階で溶け残りが一部生じた。最終保存液のエタノールの影響が考えられるが、DNA 抽出キットで想定する試料量よりも多くなったことも原因の 1 つと考えられた。

今後は固定剤であるホルマリンの濃度や期間を変え、MiFish プライマーを用いた分析の検出限界を明らかにする

こと、および魚卵のメタバーコーディングを行う際の方法確立のために最適な試料量 (魚卵数) を明らかにすること、この 2 点について研究を行っていきたい。

4.2 形態分析とメタバーコーディングの対応

メタバーコーディングで検出された種の卵径および油球径 (沖山, 2014) を表 4 に示す。

ネズヅボ科は卵径が小さく油球がなく卵膜の表面に亀甲模様があり、メタバーコーディングの結果からハタタテヌメリとトビヌメリもしくはセトヌメリの 2 種あるいは 3 種が該当すると考えられる。また、ネズヅボ科とした魚卵は発生段階に近い

表 4 日本産稚魚図鑑に記された魚卵のサイズ

和名	卵径 (mm)	油球径 (mm)	油球数
コノシロ	1.14 - 1.60	0.09 - 0.25	1
カタクチイワシ	0.6 - 0.8×1.2 - 1.5	-	0
ホウボウ	1.20 - 1.27	0.25 - 0.27	1
マダイ	0.91 - 1.03	0.19 - 0.23	1
クロダイ	0.83 - 0.91	0.20 - 0.22	1
コブダイ*1	0.45 - 1.08	0.07 - 0.17	1
ネズヅボ科の一種*2	0.57 - 0.78	-	0
ハタタテヌメリ	0.63 - 0.75	-	0
サワラ	1.60 - 1.86	0.48 - 0.59	1
ヒラメ	0.83 - 0.98	0.15 - 0.18	1

*1 既知のベラ科の全サイズ

*2 トビヌメリとセトヌメリのサイズ

ものが多かったことから、リード数の比が魚卵数の比であると仮定するとハタタテヌメリがほとんどで、トビヌメリまたはセトヌメリは少数であると推察された。

単脂球形卵-1および2はメタバーコーディングの結果からマダイ、クロダイ、コブダイ、ヒラメのいずれかであると考えられる。コブダイについては卵径の報告がないが、報告のあるベラ科の卵径から判断すると1 mmより小さい卵もしくは1 mmをわずかに超える程度であると推定される。単脂球形卵-1は2と比べやや小さいが、上記4種の卵径範囲に収まることから、この2タイプの魚卵を形態により種の識別をすることは困難である。

単脂球形卵-3は1 mmをわずかに超える大きさであり、ホウボウ、マダイ、コブダイの可能性はある。St.1ではメタバーコーディングでホウボウが検出されていないことからSt.1ではホウボウ以外の2種のいずれかである可能性が高いと考えられ、St.3およびSt.5ではホウボウも含めた3種のいずれかであると考えられた。

単脂球形卵-4は本研究の中で得られた魚卵の中で最大のタイプである。該当する卵はSt.3およびSt.5では採集されたが、St.1では採集されておらず、メタバーコーディングで同様の出現傾向を示したのはホウボウとサワラであるが、卵径および油球径からサワラであると考えられた。

4.3 師崎沖の魚卵相

本研究では師崎地先海域のうち、St.1は三河湾、St.5は伊勢湾、St.3は両海域の組成を持つと想定した。しかし、各地点8種のうち3地点に共通して出現した種が5種で、3地点ともカタクチイワシが最も多いなど、魚卵の組成はよく似ていた。また、本研究で確認されたすべての魚種が水産資源として利用されている種であった。特にカタクチイワシ、サワラ、マダイおよびヒラメは資源評価対象種の拡大に伴い資源管理の検討が優先されている種である（水産庁，2021）。このように師崎海域では水産有用種を含む多くの魚類が再生産の場として利用していることが推察された。一方で、伊勢・三河湾周辺で4月も産卵期とされるマアジ（阪地・藤田，2007）、マサバ（船越，1993）および愛知県近海に生息しているネズミゴチ（中島，2003）など確認されなかった種もあり、成魚は生息していても産卵場の違いや産卵時期の少しのずれなどの要因が考えられた。

5. まとめ

魚卵の分析においてMiFishプライマーを用いたDNA分析を行う場合、約1か月以内の保存であれば1%ホルマリン固定であってもDNA分析が可能である。魚卵のメタバーコーディングを行う場合、1%以上の個数の魚卵があれば検出される。しかし、メタバーコーディングのリード数と魚卵数は対応しないという問題点もある。また、多くの水産有用種が師崎地先海域を再生産の場として利用していることが推察された。

参考文献

- Duke, E. M. and Burton, R. S. 2020. Efficacy of metabarcoding for identification of fish eggs evaluated with mock communities. *Ecol. Evol.* 10(7): 3463–3476.
- 船越茂雄. 1993. 三河湾および渥美外海に出現する魚卵稚仔. 愛知県水産試験場研究報告. 1 : 19-39.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. and Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. open sci.* 2: 150088.
- 中島徳男, 2003. 愛知県近海の魚類. 自費出版, 198p., 79pls.
- 沖山宗雄 (編). 2014. 日本産稚魚図鑑 第二版. 東海大学出版会. i-ii+1-976, i-xiv+977-1639+(i) pp.
- Pääbo, S., Russell, G. H. and Allan, C. W. 1989. Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *J. Biol. Chem.* 264(17): 9709–9712.
- 阪地英男, 藤田弘一. 2007. 志摩半島で漁獲されるマアジの産卵期. 黒潮の資源海洋研究. 8 : 79–83.
- Shiozaki, T., Itoh, F., Hirose, Y., Onodera, J., Kuwata, A. and Harada, N. 2021. A DNA metabarcoding approach for recovering plankton communities from archived samples fixed in formalin. *PLoS ONE.* 16(2): e0245936.
- 水産庁. 2021. 資源評価スケジュールについて. 水産政策審議会 第108回 資源管理分科会 配付資料. <https://www.jfa.maff.go.jp/j/council/seisaku/kanri/attach/pdf/210323-5.pdf> (14 Oct. 2022)

