

博士論文

魚類の通し回遊現象の起源と進化に関する研究

2016

東京大学 大学院農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻

中村 政裕

指導教員 東京大学 教授

大竹 二雄

Doctor Dissertation 2016

Origin and evolutionary process of diadromous migration

Masahiro NAKAMURA

Department of Aquatic Bioscience  
Graduate School of Agricultural and Life Sciences  
The University of Tokyo

Supervisor: Professor Tsuguo OTAKE  
The University of Tokyo

## 第2章 通し回遊の行動的起源についての検討

### 第1節 トラフグ属魚類における低張環境進入行動の解発メカニズム

#### 第1項 材料と方法

供試魚

運送及び馴致

選択実験

#### 第2項 結果

試験水温と終了時の塩分

給餌条件と低張環境進入率

給餌条件と新規海水環境進入率

給餌条件と活動度

給餌条件と低張環境先行指数

活動度と低張環境進入率の相関関係

個体別の低張環境進入率と活動度

### 第2節 考察

#### 第1項 実験装置の有効性

#### 第2項 通し回遊の行動的起源

#### 第3項 餌料条件の影響

#### 第4項 今後の課題

## 第3章 通し回遊種の生理特性の獲得過程についての検討

### 第1節 非出生浸透圧環境における広範な水温帯での浸透圧調節能力の獲得過程

#### 第1項 水温を急変させた場合の生残率に基づく検討

##### 1. 材料と方法

##### 2. 結果

##### 3. 考察

#### 第2項 水温を段階変化させた場合の血漿浸透圧と遺伝子発現に基づく検討

##### 1. 材料と方法

##### 2. 結果

##### 3. 考察

### 第2節 予備適応の獲得過程

#### 第1項 低張環境を選好したスズキの淡水適応能

##### 1. 材料と方法

##### 2. 結果

##### 3. 考察

#### 第2項 汽水域まで遡上したスズキの淡水適応能

1. 材料と方法
  2. 結果
  3. 考察
- 第3項 スズキ・ウグイ・クロダイにおける淡水・海水順応マーカーの検討
1. 材料と方法
  2. 結果
  3. 考察
- 第4項 淡水域まで遡上したスズキの淡水適応程度
1. 材料と方法
  2. 結果
  3. 考察
- 第5項 非出生浸透圧環境先行指数とマーカー遺伝子発現
1. 材料と方法
  2. 結果
  3. 考察

## 第4章

### 第1節 低張環境順応能の比較

#### 第1項 材料と方法

#### 第2項 結果 5種の低張環境適応能

### 第2節 トランスクリプトームの比較

#### 第1項 材料と方法

#### 第2項 結果

#### クラスター分析

### 第3節 考察

#### 第1項 5魚種の低張環境順応能

#### 第2項 単一ハロハビタット種の適応機構

#### 第3項 河口偶来種の適応機構

#### 第4項 通し回遊種の適応機構

## 第2章 通し回遊の行動的起源及び進化過程

動物は移動することができる。それ故、順応不能環境での滞在時間を調節することで、ホメオスタシスの攪乱程度を制御し、そこにある資源を利用することが可能である。こうした例は自然界に数え切れない程ある。例えば、海に潜って海中の餌資源を利用するウミイグアナは、水中で血中酸素濃度や体温が取り返しの付かないほど低くなる前に摂餌を終え、順応可能環境である陸上に戻って攪乱を取り戻す。これは狭塩性の単一ハロハビタット種であっても同様であろう。すなわち、非出生浸透圧環境中で体液浸透圧が致命的な攪乱を受ける前に出生浸透圧環境に引き返すことで、非出生浸透圧環境における資源を利用可能であるということである。Tsukamoto et al. (2009)は、単一ハロハビタット種から通し回遊種が進化する際、どこかの時点で単一ハロハビタット種に属する個体の一部(pioneers)が非出生浸透圧環境に進入し、それにより出生浸透圧環境に留まった個体の適応度を上回る事態が発生する必要があるだろうと考察している。このように、単一ハロハビタット種の非出生浸透圧環境進入行動は通し回遊の進化を駆動する要因として重要なものであると考えられている。しかしながら、未だその存在すら実証されておらず、その解発・進化メカニズムも全く明らかになっていない。これらが検証されれば、通し回遊の起源と進化過程における行動学的側面の理解に大いに貢献できるものと期待される。

複数ハロハビタット種の Partial Migration (以下, PM) の解発機構に関するこれまでの生態・実験的研究から餌料環境が非出生浸透圧環境進入行動に重要な影響を与えることが示唆されている。河口偶来種のスズキ, white perch, そして通し回遊種のタイセイヨウサケでは、生活史初期の成長率 (growth rate) が高かった個体が出生浸透圧環境に留まる残留型となり、成長率が低かった個体が非出生浸透圧環境に侵入する回遊型となることが報告されている(Fuji et al. 2014; Kraus & Secor 2004; Bujold et al. 2004)。河口偶来性のサケであるホッキョクイワナでは、肥満度が低い個体の方が(Näslund et al. 1993), また餌の供給量を減らされた個体の方が(Nordeng 1983, Näslund et al. 1991), それぞれ回遊型になりやすいことが確認されている。同じく河口偶来性のサケ類である ブラウントラウトでも餌が少ない環境で育てられた個体がより回遊型になりやすいことが確認されている(Olsson et al. 2006)。さらにブラウントラウトとホッキョクイワナでは大規模な移植実験が行われており、両種とも個体密度が高く比成長速度が低い環境に移植した集団で回遊型が出現する割合が増加することが確認されている(Olsson et al. 2006; Nordeng 1983)。これに加え、日本に生息するイトヨでも、小型個体が降海型の生活史を選択することが示唆されており(Kitamura et al. 2006), 種内の競争的相互作用によって生じた体サイズの差を生が回遊するか否かの意思決定に重要な影響を及ぼすことが示唆されている(Secor 2015)。出生浸透圧環境から出生浸透圧環境への移動を扱った例になるが、通し回遊種のアユでは飢餓が河川への遡上行動を促進することが報告されている(Tsukamoto et al. 2009)。さらに、マッドスキッパー (*Monopterus, Anabas spp.*) の陸上への進出行動も飢餓により促進されることが

報告されていることから(Liem 1987), 餌料条件は非出生浸透圧環境に限らず, 様々な新規ハビタットへの進入行動に影響を及ぼす普遍的な要因である可能性がある。

以上の背景から, 本章では餌料条件に着目し, これが通し回遊の様々な進化段階に属する種を含むトラフグ属魚類の単一ハロハビタット種と河口偶来種の非出生浸透圧環境進入行動に与える影響を検証することで, 非出生浸透圧環境進入行動が単一ハビタット種に備わるか否か, そしてその解発メカニズムの進化過程を検討した。

## 第1節 トラフグ属魚類における低張環境進入行動の解発メカニズム

### 第1項 材料と方法

#### 供試魚

3種全て, 本学附属水産実験所(34° 42' N; 137° 36' E)において孵化し, 一貫して飼育された人工種苗を用いた。トラフグとショウサイフグが当歳魚, クサフグが1才魚であり, 実験終了時の体サイズはトラフグが60–83 mm, クサフグが70–79 mm, ショウサイフグが34–46 mmであった (Table 4-1-1)。

#### 輸送及び馴致

トラフグとクサフグは2015年7月17日に, ショウサイフグは2015年8月12日に酸素封入して本学附属水産実験所から京都大学の舞鶴水産実験所(35° 29' N; 135° 22' E)まで輸送した。その後, 実験に使用されるまで種ごとに約15個体ずつ, 200-lのポリカーボネートタンク中で海水を掛け流し, 十分にエアレーションされた条件で飼育した。水槽は屋根付きの野外飼育施設に設置し, 自然日長・水温条件で1日1回飽食給餌した (ショウサイフグ: トラフグ EP@, トラフグ, クサフグ: トラフグ EP@)。

#### 選択実験

トラフグのTR1–TR3, クサフグのTN1, TN2では2015年7月28日から8月10日にかけて(Exp.1), ショウサイフグのTS1–TS3とトラフグのTR4–TR6については8月15日から8月28日にかけて(Exp.2), ショウサイフグのTS4–TS6とクサフグのTN3–TN5については9月2日から9月29日にかけて(Exp.3)それぞれ, 給餌および非給餌条件でFig. 4-1-1を用いた行動実験をこの順番で行った。Exp.1とExp.2においては給餌条件と非給餌条件をそれぞれ7日間ずつ設け, それぞれの1日目, 3日目, 7日目に行動観察を行った。Exp.3ではより長期の絶食条件における結果を検討する目的で給餌条件と非給餌条件をそれぞれ14日ずつに延長し, それぞれの1日目, 3日目, 7日目, 14日目に行動観察を行った。

実験は, 室温を25°Cに設定した空調設備付きの屋内実験室において12L/12Dの明暗条件で行った。2つの実験水槽がそれぞれ同一の淡水貯水槽と海水貯水槽と接続され, 正面にビデオカメラを設置し, 水槽とビデオカメラを暗幕で覆った。これを実験室内に3セット設

置したため、6つの水槽を使用した実験が平行して進められた。ただし、Exp.については実験水槽が1つ破損するトラブルが発生したため、5つの水槽を用いて実験を行った。以下に実験の工程を詳述する。

### (1) 供試魚の導入と実験水槽での馴致期間

各実験水槽の中央の仕切りの高さまで両区画を海水で満たし、仕切りの上に馴致期間における供試魚の移動を予防するためのプラスチック製の柵を設置した。供試魚は1個体ずつ左側の区画に導入し、導入された翌日から給餌条件での試験が開始されるまで1日1回、10分間で食べきる量の餌料を与えた。トラフグとショウサイフグについては馴致時に与えていた配合飼料を与えたが、クサフグは行動実験水槽で配合飼料を食べなかったため、オキアミを与えた。左右の部屋は十分にエアレーションされた状態に保たれ、供試魚を導入した右側の区画には投げ込み式フィルターを設置した(Fig. 4-1-1 c)。導入された5-6個体全ての供試魚が摂餌を開始した当日から摂餌条件での実験を開始した。馴致期間は3-4日間であった。実験期間中は2日に1回の頻度で水槽の水を1/3程度入れ替えた。

### (2) 行動観察

すべての実験操作は8:00 - 16:00の間に行った。給餌条件の場合、行動観察を行う2時間前に給餌が行った。撮影開始の1時間前に全ての実験水槽から投げ込み式フィルター、エアストーン、中央の仕切り上の柵を取り出した。このとき、全ての貯水槽の水温を測定し、記録した(Table 4-1-2, 3, 4)。なお、貯水槽には行動観察が行われる12時間前までには淡水と海水を注水し、行動観察時の両貯水槽の水温が等しくなるよう、また貯水槽に通気することで溶存酸素が飽和状態となるよう配慮した。1時間経過後、すべての実験水槽に海水を注水し、中央の仕切りの6cm上の高さまで水位を上昇させた(Fig. 4-1-1 a)。注水完了後、直ちに1時間のビデオ撮影を行い、水槽全体が海水で満たされているときの供試魚の行動を記録した。撮影終了後、供試魚が左側の区画に移動したタイミングで中央に移動防止の柵を再び設置し、右側の区画の海水を全て排水した。その後、右側の部屋の1/3程度の高さまで淡水を注水し、これを再び排水することで供洗いを行った後、仕切りの高さまで淡水を注水した。淡水が仕切りの高さに達した時点で中央の柵を取り除き、水位が仕切りの6cm上に達するまで淡水を注水し続けた。水位が目標の高さに達し次第、注水を中止し、ふたたび1時間のビデオ撮影を行い、水槽内に異なる浸透圧環境が存在する場合の供試魚の行動を観察した。1時間経過後、各水槽の左右の区画の底層塩分を測定したのち、再び供試魚を左側の区画に誘導し、中央の仕切り上に柵を設置した後、右側の区画のみから排水することで低張水のみを排水し、海水で共洗い後再び右側の区画に水位が仕切りの高さに達するまで海水を注水した。なお、Exp. 3の無給時条件の7日目と14日には、I, II, III, IVすべての区画の塩分を測定し、区画ごとの塩分のばらつきを調べた(Table 4-2-@)。

### (3) 解析

得られた各 1 時間の画像データから供試魚の位置を 10 秒毎に記録し、新規海水環境進入率、活動度、低張環境進入率、低張環境選好性指数の 4 つの指標を導出した。新規海水環境進入率は、水槽全体が海水で満たされているとき、供試魚にとっての新規に進入可能になった海水環境 (Fig. 4-2-1(a)の赤枠部分)に供試魚が位置したコマ数の合計値を解析した総コマ数である 360 で割った値である。活動度は、水槽全体が海水で満たされているとき、供試魚が Fig. 4-2-1(a)の I, II, III, IV の境界を跨いだ回数合計値である。低張環境進入率は水槽内に低張・高張環境が共存するときに、供試魚が低張環境 (Fig. 4-2-1(b)の青い部分)に進入したコマ数の合計値を解析した総コマ数である 360 で割った値である。低張環境選好指数は低張環境進入コマ数から新規海水環境に進入したコマ数を引いた値を解析した層コマ数である 360 で除することで算出した。全ての解析に際して、供試魚の位置は目を基準に定めた。これら 4 つの指標を給餌条件と無給餌条件の同一のタイムポイントにおいて同一種内 (トラフグ・ショウサイフグ: 6 個体, クサフグ: 5 個体) でプールし、比較した。3 つの指標は全て Welch's t-test によりエクセル統計 2013 を用いて比較した。有意水準は 5%とした。

## 第 2 項 結果

### 試験水温と終了時の塩分

トラフグの試験水温は 23.0–25.7°Cの間であり、淡水槽と海水槽の温度差は 0–0.3 であった。試験終了時の低張区画の底層塩分は 0.4–3.0 であり、高張区画の底層塩分は 32.1–34.4 であった (Table 4-1-2)。クサフグでは、試験水温が 22.1–25.7°Cの間であり、淡水層と海水槽の温度差は 0–0.3°Cの間であった。また、試験終了時の低張区画の塩分は 0.4–3.9 であり、高張区画の底層塩分は 31.7–34.2 の間であった (Table 4-1-3)。ショウサイフグの試験水温は 22.1–25.4°Cの間であり、淡水槽と海水槽の温度差は 0–0.3°Cであった。試験終了時の低張区画の塩分は 0.2–0.8 であり、高張区画では 32.2–34.7 であった (Table 4-1-4)。試験終了後に I, II, III, IV 各区画の塩分を測定した結果、II, III, IV の塩分はほとんど変わらないことが確認されたため、この区画をまとめて低張環境として扱うことには問題がないものと考えられた。

### 給餌条件と低張環境進入率

3 種とも全てのタイムポイントにおいて給餌の有無による低張環境進入率の差は認められなかった (Fig. 4-1-@)。低張環境進入率の平均値は、トラフグで 0.97–0.99, クサフグで 0.67–0.99, ショウサイフグで 0.82–1.0 であり、クサフグは他の 2 種と比べて低い値を示す場合があった。

### 給餌条件と新規海水環境進入率

3種とも全てのタイムポイントにおいて、水槽内をランダムに移動した場合に示すと考えられる 0.58 よりも高い進入率を示した (Fig. 4-1-@). また、全種全てのタイムポイントにおいて給餌の有無による新規海水環境進入率における差は認められなかった。新規海水環境進入率の平均値はトラフグで 0.70 – 0.94, クサフグで 0.78 – 0.99, ショウサイフグで 0.73 – 0.93 であった。

#### 給餌条件と活動度

トラフグでは給餌を中止して 1 日目に給餌時よりも高い活動度が認められ ( $p < 0.05$ , welch's t-test), 他のタイムポイントにおいても同様の傾向がみられた (Fig. 4-1-@). クサフグでは給餌を中止すると一貫して低い活動度を示し、給餌時活動度に大きなばらつきがみられた。給餌条件の 3 日目には無給時よりも有意に高い活動度が認められ ( $p < 0.05$ , welch's t-test), 14 日目にも同様の傾向がみられた (Fig. 4-1-@). ショウサイフグでは全てのタイムポイントにおいて給餌時と無給時で活動度に有意差は認められなかったが、給仕を中止して 3 日目以降は一貫して無給時条件で給餌条件よりも活動度が高い傾向にあった。

#### 給餌条件と低張環境選好指数

3種とも全てのタイムポイントにおいて給餌の有無による低張環境選好指数の差は認められなかった (Fig. 4-1-@). 低張環境選好指数の平均値は、トラフグで 0.05 – 0.29, クサフグで -0.32 – 0.19, ショウサイフグで 0.04 – 0.24 であり、クサフグが他の 2 種と比べて低い値を示す傾向にあり、唯一負の値を示す場合があった。

#### 活動度と低張環境進入率の相関関係

決定係数  $R^2$  値はトラフグで 0.0854, クサフグで 0.0178, ショウサイフグで 0.0008 と極めて低い値を示し、全種について活動度と低張環境進入率の間に相関関係は認められなかった。

#### 個体別の低張環境進入率と活動度

トラフグでは給餌の有無に関わらず全個体が高い低張環境進入率を示した。TR3 と TR4 は無給餌時に活動度を大幅に上昇させた。TR1, TR2, TR5 では給餌時と無給餌時で同程度の活動度が観察された。TR6 については給餌条件の 1 日目と 3 日目に給仕しても摂餌を行わず、そのデータを除外したため、給餌時と無給餌時の活動度の比較ができなかった。クサフグにおいては生殖腺が十分に発達していたため、雌雄を判別することができた (Table 4-1-1). TN1, TN3, TN5 が雄, TN2 と TN4 が雌であったが、活動度および低張環境進入率に性による明瞭な違いは認められなかった。TN1, TN2, TN4, TN5 は給餌条件に寄らず一貫して高い低張環境進入率を示した。一方, TN3 は給餌時の 1, 3 日目に低張環境にほとんど

ど進入せず、他の個体と明らかに異なる行動を示した。活動度については、給餌時に無給餌時と比べて同一個体のタイムポイント間で大きく変動する傾向が認められた。ショウサイフグの TS3, TS4, TS5, TS6 においては給餌条件に関わらず一貫して高い低張環境進入率が見られた。TS1 は給餌時と無給餌時それぞれの 1 日目に、低い進入率を示し、TS2 は無給餌時の 7 日目にやや低い 0.8 程度の進入率を示した。TS1, TS5, TS6 では無給餌時の活動度がやや高くなる傾向がみられ、他の個体では給餌条件によってほとんど変化しなかった。

## 第 2 節 考察

### 第 1 項 実験装置の有効性

試験終了時の底層塩分は低張区画においてショウサイフグでは 1.0 を上回ることがなく、またトラフグとクサフグでも 4.0 を超えることがなく、低張条件が維持されていた。また、高張区画の底層塩分は全種を通して 31.0 を下回ることがなく、明らかな高張条件であった。このことから、今回使用した実験装置はトラフグ属における浸透圧環境の選択性を調べるに当たって有効に機能していたといえるだろう。なお、ショウサイフグと他の 2 種における攪拌程度の違いは主にサイズ差によるものと考えられる。

### 第 2 項 通し回遊の行動的起源

唯一非出生浸透圧環境への進入行動を検討した狭塩性の単一ハロハビタット種のショウサイフグに強い非出生浸透圧環境選好性が備わったことから、少なくとも一部の単一ハロハビタット種は非出生浸透圧環境に進入する行動特性を備えるものと推測される。こうした単一ハロハビタット種では実現ハビタットが順応可能環境外まで達しており、野生環境においても一部の個体が非出生浸透圧環境に進入している可能性がある。多くの種で単一のハロハビタットを利用する生活史が進化的に安定な状態(Evolutionary stable state)になっているのは、非出生浸透圧環境に進入した個体の適応度が出生浸透圧環境に残留した個体の適応度を上回る状況にないからであろう。順応不能環境進入個体の適応度の上昇を阻む要因としては、例えば進入先の環境における競合種や捕食者の存在が考えられる(Fig. 4-1-10a)。

進化的時間スケールの中では、例えば氷河の拡大・縮小、新たな火山島の出現などの地質学的イベントにより、こうした適応度の上昇を阻む要因が取り除かれることがあるだろう。このとき、付近に非出生浸透圧環境進入行動を示す単一ハロハビタット種が分布すれば、一部の個体は直ちに非出生浸透圧環境における空白ニッチを利用し始めるであろう(Fig. 4-1-10b)。そして、非出生浸透圧環境における条件が整っていれば、進入個体は残留個体の適応度を上回るだろう。一度こうした状況になれば、より非出生浸透圧環境耐性が高い個体、より非出生浸透圧環境に進入しやすい行動特性を示す個体が選択されていき、種の順応可能環境が非出生浸透圧環境方向に拡大するとともに、実現ハビタットも同一の方向に移行していくだろう(Fig. 4-1-10c)。こうした移行は順応不能環境進入個体の適応度が残留個体を

上回る限り続き、順応不能環境進入個体の適応度が残留個体のそれと等しくなったときに止まると予想される(Fig. 4-1-10d).

本実験により、順応不能な非出生浸透圧環境に進入するパイオニアは常時存在し、その適応度が残留した個体を上回る状況が発生すると、順応不能環境の拡大と実現ハビタットの移行という通し回遊の起源的段階が生ずるのという進化シナリオの一例を提示することができた。

(行動の機能的意義：2章の結果と絡めた考察になるので総合考察に譲る?)

2章より、ショウサイフグの血漿浸透圧は等張条件で海水中に比べて30mOsm程度の大幅な低下を示した。また、海水中での10日間の絶食期間の後、血漿浸透圧が絶食前に比べて高くなる傾向を示した。これらの事実はショウサイフグが海水中での浸透圧調節に無視できないコストを払っていることを示唆する。したがって、短期間の低張環境での滞在は浸透圧調節の節約の機能を持つ可能性が考えられる。

### 第3項 餌料条件の影響

3種の非出生浸透圧環境進入率・選好性ともに、全てのタイムポイントにおいて有意差は認められなかった。このことから、トラフグ属魚類に関しては、これまで研究が行われてきた分類群と異なり餌料条件が **migratory status** に影響を与えない可能性が考えられる。ただし、今回の実験では実験開始前に個体の **migratory status** が形作られていた可能性を否定できない。White perch では生活史初期の環境条件が個体の **migratory status** を形作り (Kerr & Secor 2010)、それが個体の一生を通じて維持されることが知られる (Kerr et al. 2009)。今回の実験に用いた3種は全て高密度条件で飼育されており、密度依存的な種内競争が回遊型の割合を増加させることが示唆されていることから (Olsson et al. 2006, Fuji et al. 2014)、今回の供試魚は実験開始前に **migratory status** が回遊型に決定されてしまっていた可能性がある。今後、低密度条件で発生した個体を使用してもう一度同様の実験を行うことで、この可能性を検討する必要があるだろう。今回実験に供した個体は実験水槽内で摂餌することが確認されていたので、極度にストレスがかかった状態ではなかったと考えられる。ただし、この水槽の大きさや、単独飼育されていたことがストレスになっており、回遊の動因が高まっていた可能性も否定できない。今後、より大きな実験水槽を作成し、群れでの行動を観察することも試みてみるべきであろう。

### 第4項 今後の展開

今回発見された、狭塩性の単一ハロハビタット種における非出生浸透圧環境進入行動は通し回遊種の進化的起源になりうる重要な行動である。しかし、今回検証に用いたトラフグ属魚類はさまざまな形質において特殊な性質をもつ分類群である。したがって、これはトラフグ属にだけ固有の例外的な事象である可能性は否定できない。今後は、淡水産卵生の単一

ハロハビタット種も含めたより広範な分類群で本行動特性を示すか否かを検証していきたい。また、本行動が実際に通し回遊行動の進化につながるか否か、世代時間の短い単一ハロハビタート種のモデル生物であるゼブラフィッシュを用いて進化実験による検証を行うことも非常に有意義であろう。

### 第3章 通し回遊種の生理特性の獲得過程についての検討

通し回遊種は2つの特徴的な生理学的性質を備える。一つは、季節変化のある緯度帯で一年を通じて経験する広範な水温帯において非出生浸透圧環境での浸透圧調節が可能な浸透圧調節能力である。もう一つは非出生浸透圧環境への進入に先立ち浸透圧以外の環境因子の変化により非出生浸透圧環境における浸透圧調節能が発達する、予備適応の機構である。これらは通し回遊種に普遍的な性質であるが、その獲得過程についてはほとんど明らかになっていない。そこで本章では、通し回遊種の回遊機構の原型を保持すると考えられる河口偶来種に着目し、多様な分類群に属する種についてこれらの性質が備わるか否かを調べることで生理特性の獲得過程を推定することを目的とした。

#### 第1節 非出生浸透圧環境における広範な水温帯での浸透圧調節能力の獲得過程

一般に複数年の寿命をもつ遡河回遊種や降河回遊種は、一旦成長のために非出生浸透圧環境に進入すると、成熟するまでの数年間一貫してそこに留まり産卵まで出生浸透圧環境に戻ることはない。こうした回遊生態は季節変化のある緯度帯に生息する多くの通し回遊種にみられる（サケ科魚類，ウナギ属魚類，アロサ属魚類，チョウザメ類）。この事実は、これらの通し回遊種が季節変化を通じて経験する広範な水温帯において非出生浸透圧環境で体液浸透圧を調節する能力を持つことを示唆する。一方、河口偶来種では多くの種が非出生浸透圧環境への季節的な出入りを繰り返すことが知られる。温帯の河口域に生息する魚類の豊富さや多様性は冬季になると大きく減少し、魚類の群集構成が夏季と冬季で大きく変化する（Day et al. 1989; Able & Fahay 1998; Ishitobi et al. 2000）。例えば、北アメリカのハドソン川及び中部太平洋湾の河口域に進入する海水産卵性の white hake (*Urophycis tenuis*) や northern kingfish (*Menticirrhus saxatilis*) などの河口偶来種は、越冬のため沖合や南方海域へ回遊することが知られている（Able & Fahay 1998; Able & Fahay 2010）。また、日本に生息する海水産卵性の河口偶来種であるタイ科のクロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*) は、島根県中海の汽水域に夏季にのみ出現することが知られており、他の季節には海洋に留まることが示唆されている（Yokoo et al. 2010）。一方、ニシン科の gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) やコイ科のウグイ (*Tribolodon hakonensis*) などの淡水産卵性の河口偶来種は夏季に河口域や沿岸域に進入し冬になると越冬のため淡水環境に移動することが報告されている（Hildbrand & Schroeder 1928; Sakai 1995; Murdy et al. 1997; Able & Fahay 2010; Katano et al. 2010）。これらの知見は温帯域に生息する河口偶来種が冬季に出生浸透圧環境に戻る傾向をもつことを示唆する。

こうした魚類の行動には、被食圧や餌料環境の変動など様々な要因が影響すると考えられるが、その中でも水温が重要な要因の一つであることが、これまでの生態・生理学的研究の結果から示唆される。北アメリカのチェサピーク湾の固有種である bay anchovy (*Anchoa mitchilli*) では、冬季の水温低下がより遅い時期におこる南方の河口域に生息する個体群が、

より遅い時期に河口域を去ったり河口域に周年留まったりすることが知られる (Vouglitois et al. 1987). これを根拠に、河口偶来種の河口域からの退出は水温に影響されるのではないかと Able & Fahay (2010) は主張している.

非出生浸透圧環境の水温に生息域間の移動が駆動されることは、わが国におけるウグイの回遊パターンの地理的な差異からも示唆される. 日本列島の北方に位置する北海道の武川, そして新潟県に生息する個体群は, 冬季に沿岸もしくは河口域から淡水域に遡上する越冬回遊を行うことが知られている (Sakai 1995; Katano et al. 2010). 一方, 日本の中央部に位置する三重県の鴨川に生息する個体群は春の産卵期にのみ淡水域に遡上し, 越冬遡上を行わないことが確認されている (Ishizaki et al. 2009). こうした違いは冬季の海面の月間平均水温が 3 地点で大きく異なることに起因する可能性がある (海面水温データは気象庁のウェブサイトを参照: [http://www.data.jma.go.jp/kaiyou/data/db/kaikyo/monthly/sst\\_HQ.html](http://www.data.jma.go.jp/kaiyou/data/db/kaikyo/monthly/sst_HQ.html) 2015 年 5 月 6 日にアクセス). 北海道では冬季の沿岸域の海面水温が 1-2 °C まで, 新潟県でも 10 °C 程度まで低下する. 一方, 暖流の黒潮の影響を強く受ける三重県では 15-16 °C を下回ることがない. 以上のことから, 北方の 2 個体群と南方の個体群の間にみられる回遊パターンの差異は冬季の海面水温の降下に関連することが示唆される. すなわち, ウグイは低温条件下では非出生浸透圧環境である海水に順応できず, それ故北方の個体群は冬季に出生浸透圧環境である淡水への越冬回遊を行う可能性が考えられる. 以上の生態学的な証拠に加え, 実験的研究によりニベ科に属する河口偶来種である Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) の低温耐性が出生浸透圧環境に比べて非出生浸透圧環境で低下することが確認されている (Lankford & Targett 2001). 以上の事実は, 河口偶来種の非出生浸透圧環境における好適な水温帯が出生浸透圧環境に比べて狭いことを示唆する. もしこれが河口偶来種に普遍的な性質であれば, 河口偶来種から通し回遊種への進化過程で, 非出生浸透圧環境における好適な水温帯の拡大があったという進化プロセスが導出される. これまでのところ, これを考察できるような実験的研究は 1 種類の河口偶来種を用いて行われたのみであり, さらに低温条件についてしか検証されていない (Lankford & Targett 2001). したがって, この性質が河口偶来種の中でどれほど一般的なものなのか, そしてこれは高温条件下でも当てはまるのかということは依然として不明である.

本章の第一の目的は, 生態学的な知見が比較的充実しており, 上記の性質が未だ検証されていない分類群に属する河口偶来種であるウグイとクロダイを用いて, 両種の非出生浸透圧環境における好適な水温帯が出生浸透圧環境で狭まるか否かを検証することで, 通し回遊の生理学的進化プロセスの一端を明らかにすることとした. 両種について, 出生浸透圧環境と非出生浸透圧環境に馴致された 2 つの実験群で, それぞれが順応した浸透圧条件で水温を急変させる実験と水温を段階的に変化させる 2 つの実験を行い, 両種の非出生浸透圧環境順応能の水温依存性を総合的に検証した.

#### 第1項 水温を急変させた場合の生残率に基づく検討

## 1. 材料と方法

### 供試魚

ウグイは2013年10月に舞鶴湾に流入する榎川の下流淡水域(35° 29 N; 135°22 E)において投網を用いて採捕した。採捕した個体は、速やかに京都大学舞鶴水産実験所(35° 29 N; 135°22 E)まで輸送した。実験に用いたウグイの標準体長は64.6–146.5 mmであった。クロダイは2013年5月に舞鶴水産実験所で孵化し、一貫して自然日長・温度条件下のろ過海中で飼育された個体を用いた。本実験に用いたクロダイの標準体長は47.9–57.5 mmであった。

出生・非出生浸透圧環境への馴致を開始する前のおよそ10日間、200個体のウグイと80個体のクロダイはそれぞれ淡水とろ過海水で満たされた500-lの透明なポリカーボネートタンク中で飼育した。このときウグイは2つのタンクを用い約100個体ずつ飼育し、クロダイは全個体を1つのタンクで飼育した。クロダイはろ過海水を4 l/minでかけ流し、ウグイは水道水をチオ硫酸ナトリウムで脱塩素した止水条件で、ともに十分に通気された条件(600 ml/min)で飼育した。これら3つのタンクは屋根付の野外環境に設置し、自然日長に晒した。この間、供試魚は1日1回飽食給餌した(ウグイ：川魚のえさ ジェックス株式会社。日本；クロダイ：おとひめ S2,日清丸紅飼料株式会社。日本)。

### 出生・非出生浸透圧環境への馴致

両種はそれぞれ実験前に2週間以上、出生浸透圧環境(ウグイにとっての淡水とクロダイにとっての海水)と非出生浸透圧環境(ウグイにとっての海水とクロダイにとっての淡水)に馴致された(ウグイ：各80個体程度ずつ、クロダイ：各30個体ずつ)。馴致に用いた淡水と海水の塩分はそれぞれ0.1–0.2 pptと32–34 pptであり、両種につき、それぞれの浸透圧環境で満たされた500-lの透明のポリカーボネートタンクを用意した。馴致期間中の水温はサーモスタット(日東機材株式会社, 日本)付のヒーター(東立電機株式会社, 日本)により20°C前後に保った。非出生浸透圧環境への移行は、供試魚の斃死を避けるため以下の手順で段階的に行った。ウグイは、まず淡水から15 pptの希釈海水に移行し、3日後に完全な海水にもう一度移行した(32–34 ppt)。予備実験の結果からクロダイの非出生浸透圧環境に対する耐性はウグイよりも低いと考えられたため、クロダイはより多くの段階を設けて非出生浸透圧環境に移行した。クロダイは、まず完全な海水から10 pptの体液とほとんど等張の希釈海水に移行し、ここに1日馴致したのち、タンク内の水の塩分を5 pptに低下させ、さらに1日馴致した。その後、塩分濃度が1 pptに達するまで毎日2 pptずつ馴致水槽の塩分を低下させ、1 pptで72時間馴致した後、最終的に淡水(0.1–0.2 ppt)に移行した。2つの海水タンクはろ過海水を4 l/minでかけ流し、2つの淡水タンクは上記の手順で脱塩素された水道水で満たした。すべてのタンクは十分に通気し(600 ml/min)、淡水タンクには投げ込み式フィルターを設置し、4日おきにおよそ1/3の水を交換した。大半のタンクで死亡個体はほとんど観察されなかった。しかしながら、海水に馴致されているウグイのタンクでは、浸透圧ストレスに弱いと考えられる小型個体を中心に、比較的多くの死亡個体がみられた。

## チャレンジ試験

2013年の11月7日から12月3日にかけて以下の手順に則り実験室内で行った。まず、実験室内に試験水槽の水温を調節するための4つのチラー（レイシー株式会社）と2つのヒーター（メーカー）が設置されたウォーターバス(幅: 1800 mm, 奥行き: 900 mm, 深さ: 400 mm)を設置した。ウォーターバス内には6つのアクリル水槽(幅: 450 mm, 奥行き: 300 mm, 深さ: 300 mm)を設置し、このうち3つは淡水で、残りの3つは完全な海水で満たした。こうすることで、各水温について出生・非出生浸透圧環境についてそれぞれトリプリケートが設けられたことになる。また、ウォーターバス内の水は2つのポンプを用いて循環させ、バス内の水温が均一になるようにした。各試験水温での試験は、ウグイとクロダイの出生・非出生浸透圧環境それぞれに順応した実験群について、単一のウォーターバス内で同時に行った。このとき、不自然な振る舞いをしておらず外傷がない個体のみを用いた。供試魚を移行した試験水温は、ウグイが6・10・15・20(馴致水温)・30℃で、クロダイが10・20(馴致水温)・33℃である。したがって、それぞれトリプリケートの形式で調べられた2つの浸透圧環境における比較試験はウグイで5回、クロダイで3回、それぞれ行われたことになる。ウグイに比べてクロダイで検証した水温が少ないのは、クロダイはウグイに比べて少ない個体数しか用意できなかったためである。各試験水槽は十分に通気し、12L-12Dの明暗周期条件下に置いた。実験室内には2つのウォーターバスを設置し、2つの実験を同時に行った。実験水槽は遅くとも実験開始24時間前にはウォーターバス内に設置し、実験開始時には水槽内の水温が試験水温に到達するよう調節した。

実験時には、まず馴致水槽内の水で満たされたアクリル製の容器(幅: 280 mm, 奥行き: 170 mm, 深さ: 160 mm)中に馴致水槽中の3-5個体の試験魚を移行した。続いて、馴致水槽内の水とともに供試魚を容器ごと実験水槽中に入れた。こうすることで、供試魚の周囲の水温が瞬時に大きく変化しないようにし、瞬間的な水温変化により供試魚がショック死することを防いだ。試験水槽中のバイオマスを種ごとに凡そ統一するために、各水槽中の供試魚の個体数は3-5の間で調節した。各水温処理で用いた合計個体数はウグイで13-15個体、クロダイで11-12個体であった。移行に用いた容器内の水温が試験水温に達するまでの時間は20℃の処理区で0分、他の実験区では1-3時間であった。容器内の水温は定期的に温度計を用いて測定し、容器内の水温が試験水温に達するとともに供試魚を水槽内に放ち、ただちに移行に用いた容器を試験水槽から取り出した。すべての移行は午前中7時ごろに行い、水槽には魚の飛び出しと水の蒸発を防ぐための蓋が取り付けられた。48時間にわたって観察を継続し、供試魚の生残状況を12時間ごとに確認した。魚体のいかなる部分にも動きが見られなかったとき、これを死亡個体とみなした。死亡個体を発見し次第、試験水槽から取り出し標準体長・体重を測定した。供試魚が試験水温に晒されてから24時間後と48時間後に各試験水槽の生残率を計算した。非出生浸透圧環境での試験に用いたウグイは出

生浸透圧環境で試験した個体よりも有意に大きかった(Welch's *t*-test,  $p < 0.01$ )が、これは海水馴致期間中に多くの小型個体が死亡したことによるものと考えられた。クロダイについてはすべての試験水槽間で標準体長に差異は見られなかった(Welch's *t*-test,  $p > 0.05$ )。

## 解析

出生・非出生浸透圧環境馴致群間での生残率の比較を行うのに先立ち、トリPLICATE間の生残率の差異の有無を検証した。その結果、すべてのトリPLICATE間で生残率に有意差がみられなかったため (Fisher's exact test,  $p > 0.05$ )、トリPLICATEデータをまとめて解析した。非出生浸透圧環境での生残に対する SL・BW の影響は、非出生浸透圧環境で生残した個体と死亡した個体の SL・BW を比べることで検証した。この解析には生残個体と死亡個体がそれぞれ 3 個体以上ずつ必要であったため、この条件を満たす以下のタイムポイントについて解析を行った。ウグイでは、6°C と 30°C (3 個体が生存し 9 個体が死亡) については 24 時間後のデータを用いたが(6°C : 5 個体が生存し 10 個体が死亡 ; 30°C : 3 個体が生存し 9 個体が死亡)、10°C では 24 時間の時点で十分な数の死亡個体がいなかったため、48 時間後のデータ (11 個体が生存し 3 個体が死亡) を用いた。クロダイでは、10°C (6 個体が生残し、6 個体が死亡)、33°C (4 個体が生残し 8 個体が死亡) とともに 24 時間後の結果を解析に用いた。出生・非出生浸透圧環境馴致群間の同一試験水温における生残率の差異は Fisher's exact test により検定した。非出生浸透圧環境における生残率と SL・BW の関係性の検定には Welch's *t*-test を用いた。すべての検定の危険率は  $\alpha = 0.01$  に設定した。Welch's *t*-test はエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd.)を用いて行い、Fisher's exact test には統計解析ソフト R(R Development Core Team, 2014; www.R-project.org)を用いた。

## 2. 結果

### 出生・非出生浸透圧環境における生残率

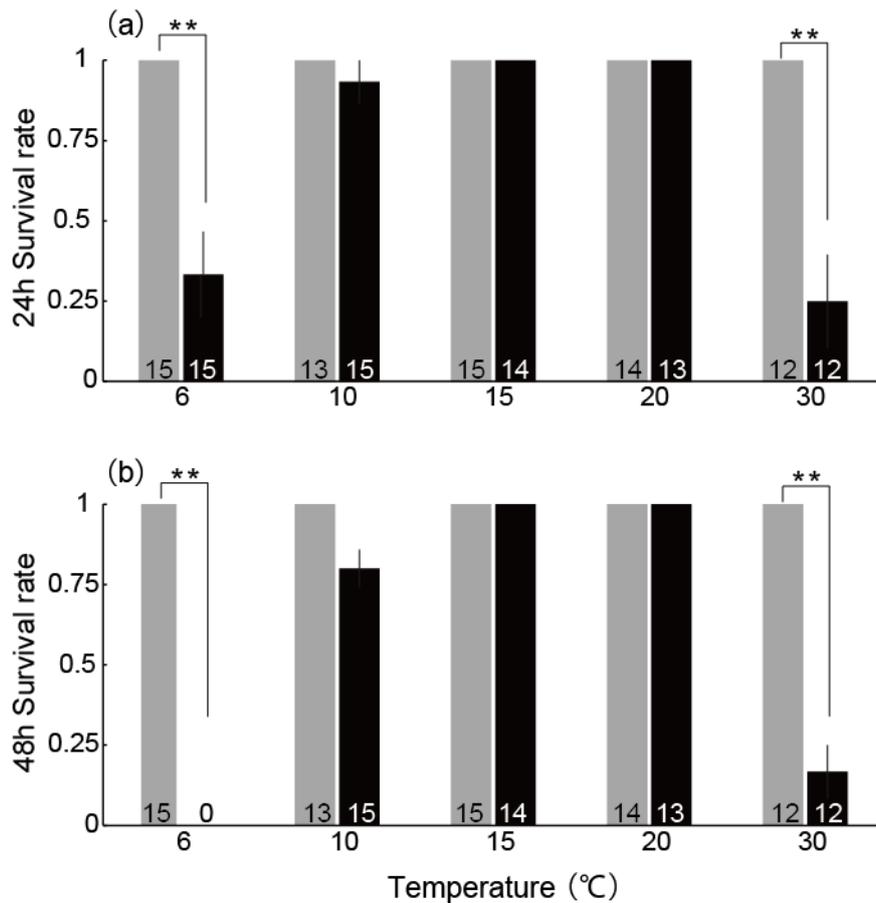
ウグイでは 6°C の水温処理区を除く全ての水温処理区で出生・非出生浸透圧環境馴致群間で SL・BW について有意差が検出された(Table 3-1-1, Welch's *t*-test,  $p < 0.01$ )。これはチャレンジ試験に先立って、完全な海水中に馴致した 14 日間のうちに体サイズの小さい個体が多く死亡したことに起因すると考えられる。一方、クロダイでは出生・非出生浸透圧環境馴致群の間で SL・BW の差異は検出されなかった(Table 3-1-1, Welch's *t*-test,  $p > 0.05$ )。

ウグイの淡水馴致群は、全ての水温処理区において全個体が 48 時間生存し、海水馴致群においても、20°C と 15°C の水温処理区では全個体が 48 時間生存した(Fig. 3-1-1 b)。しかしながら海水の水温が 10°C まで低下すると、淡水馴致群との間に生残個体数の有意差はなかったものの、48 時間のうちに約 20% の個体が死亡した(Fisher's exact test,  $p > 0.05$ )。海水馴致群の 6°C と 30°C の水温処理区では 24 時間後に多くの個体が死亡し、同じ水温の淡水馴致群に比べて有意に低い生残率を示した (Fisher's exact test,  $p < 0.01$ )。30°C での生残率は

**Table 3-1-1** Standard length (SL), body weight (BW) and the total number of individual fish used in each experimental temperature treatment for Japanese dace *Tribolodon hakonensis* and Japanese black porgy *Acanthopagrus schlegelli*.

Species	Temp.	SW			FW		
		SL	BW	n	SL	BW	n
<i>Tribolodon hakonensis</i>	6° C	116.3±12.4	18.9±6.0	15	104.4±19.5	16.8±8.3	14
	10° C	119.1±8.4*	20.5±4.4*	15	101.6±15.2	14.8±5.4	13
	15° C	123.3±9.2*	23.1±4.7*	14	100.1±19.3	15.2±9.5	15
	20° C	119.9±9.0*	20.4±6.2*	14	88.32±26.1	12.23±7.3	15
	30° C	102.0±17.2*	17.2±6.5*	14	80.3±30.5	11.2±7.4	14
<i>Acanthopagrus schlegelli</i>	10° C	65.1±13.9	7.2±4.4	12	65.7±10.2	10.1±4.2	12
	20° C	66.5±15.0	8.6±5.6	12	67.2±13.4	9.6±5.8	11
	33° C	68.0±16.1	9.3±5.8	11	63.2±8.0	8.4±2.7	12

\*SW acclimated individuals were significantly larger (Welch's t-test,  $p < 0.01$ ). SL and BW is expressed with mean ± standard deviation.



**Fig. 3-1-1** Survival rate of Japanese dace, *Tribolodon hakonensis* acclimated to natal and non-natal osmotic environments. Black and grey bars indicate seawater adapted and freshwater adapted groups, respectively. The upper panels show results after 24 hours and lower panels show the results after 48 hours. Lines above the bars show SE, and numbers in each bar indicate the total number of individuals used in each experiment. Asterisks indicate  $p < 0.01$  level of significant differences between the freshwater and seawater adapted treatments for each temperature.

48 時間後にはさらに低下し(Fisher's exact test,  $p < 0.01$ ), 6 °C では全個体が死亡した(Fig. 3-1-1 a, b).

クロダイの海水馴致群は, 全個体が全実験区で生残した. 一方, 淡水馴致群では 10 °C と 33 °C で 24 時間後には半数以上が死亡し, 同水温の海水馴致群に比べて有意に低い生残率を示した (Fisher's exact test,  $p < 0.01$ ). 48 時間後にはこの傾向がより顕著になった (Fisher's exact test,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3-1-2 a, b).

#### 標準体長・体重と生存の関係

ウグイでは非出生浸透圧環境の全ての水温処理区において生残個体と死亡個体の間に SL・BW における差異が認められなかった (Fig. 3-1-3 a, b).

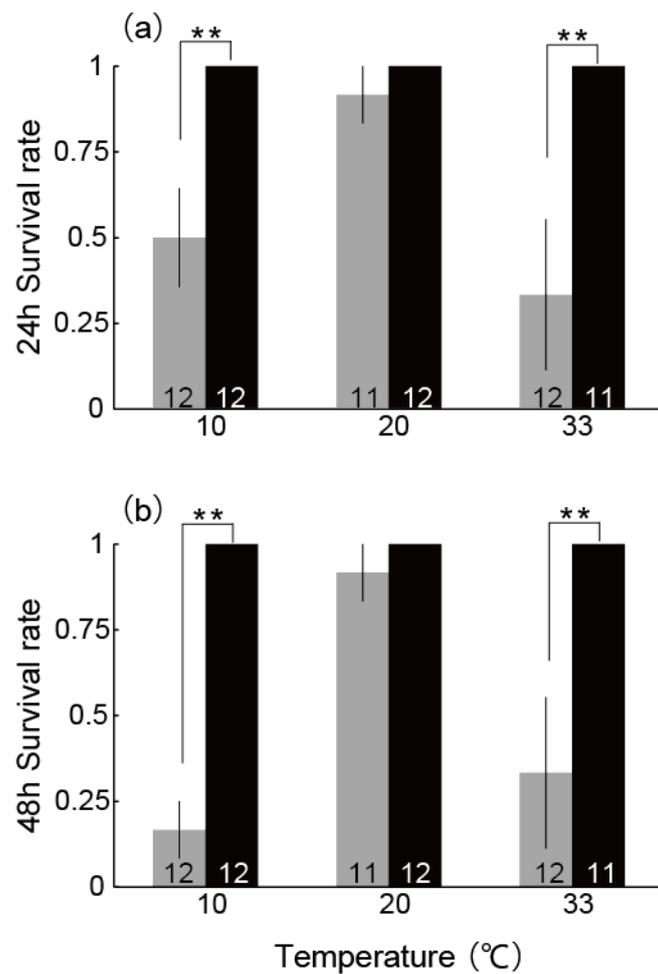
クロダイでは, 10 °C の処理区において生残個体の SL・BW が死亡個体に比べて有意に大きかった (Welch's *t*-test,  $p < 0.01$ ). 有意差は見られなかったが 33 °C の処理区でも同様の傾向が観察された (Welch's *t*-test,  $p > 0.05$ ) (Fig3-1-4 a, b).

### 3. 考察

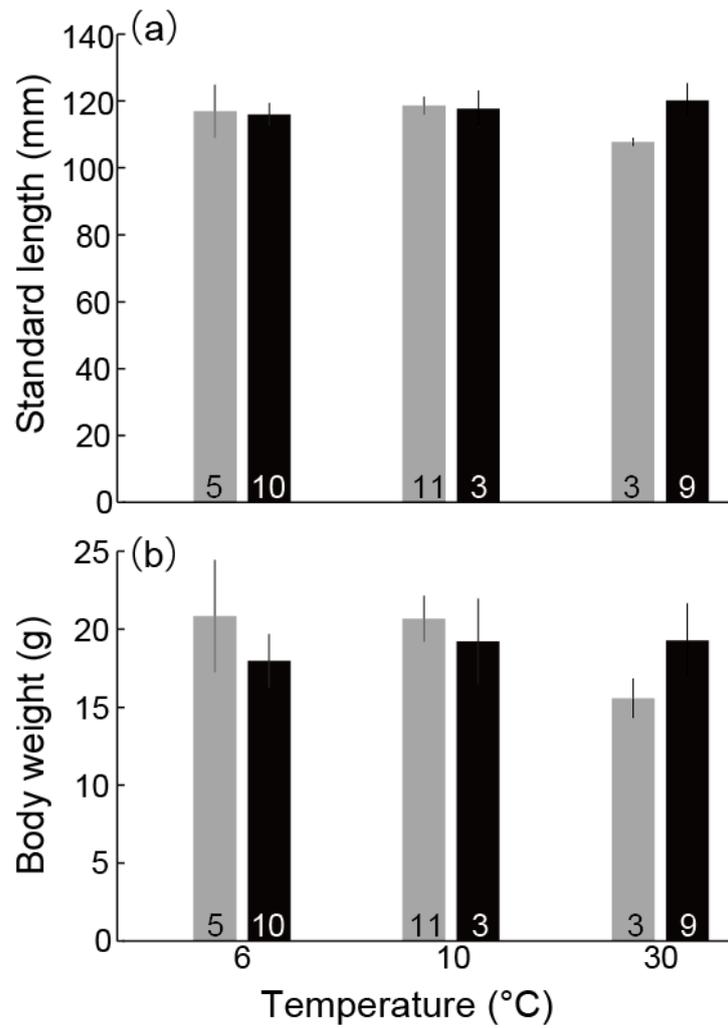
本実験の結果, ウグイやクロダイが急激な水温変化に晒された際, 非出生浸透圧環境に馴致された実験群の生残率が出生浸透圧環境に馴致された実験群のそれよりもいくつかの水温条件で低くなることが明らかになった. ウグイでは, 6 °C と 30 °C の水温処理区で海水馴致群の生残率が淡水馴致群に比べて有意に低く, クロダイでは, 10 °C と 33 °C の水温処理区において淡水馴致群の生残率が海水馴致群の生残率に比べて有意に低かった. これらの結果は, 両種の非出生浸透圧環境における水温急変時の低・高温耐性が出生浸透圧環境に比べて低下することを示唆する.

ウグイでは, 出生・非出生浸透圧環境馴致群の間でサイズ差が検出された. ただし, 海水中の低・高温条件下でみられた高い死亡率は, 非出生浸透圧環境における低・高温耐性の低下に起因するものと以下の理由から考えられる. ウグイのチャレンジ試験に用いた非出生浸透圧環境馴致群は出生浸透圧環境馴致群に比べて標準体長が 20-30 mm ほど大きく, また体重も重かった. このサイズ差は 2 週間の海水馴致期間中に小さい個体が多く死亡したことに起因する. このことから, ウグイでは小型個体が大型個体に比べて低い海水適応能をもつことが示唆された. この期間を生存して実験に用いた比較的大型の個体では, 非出生浸透圧環境における水温耐性に体サイズによる違いがみられなかった. また, 淡水馴致群では全個体が全ての水温処理に耐え生残した. これらの結果は, ウグイの体サイズと水温耐性の間に明確な関係がないことを示唆する. したがって, ウグイの出生・非出生浸透圧環境馴致群の間には有意なサイズ差があったものの, 海水馴致群で観察された高い死亡率は非出生浸透圧環境において低・高温耐性が低下したことによるものと考えられる.

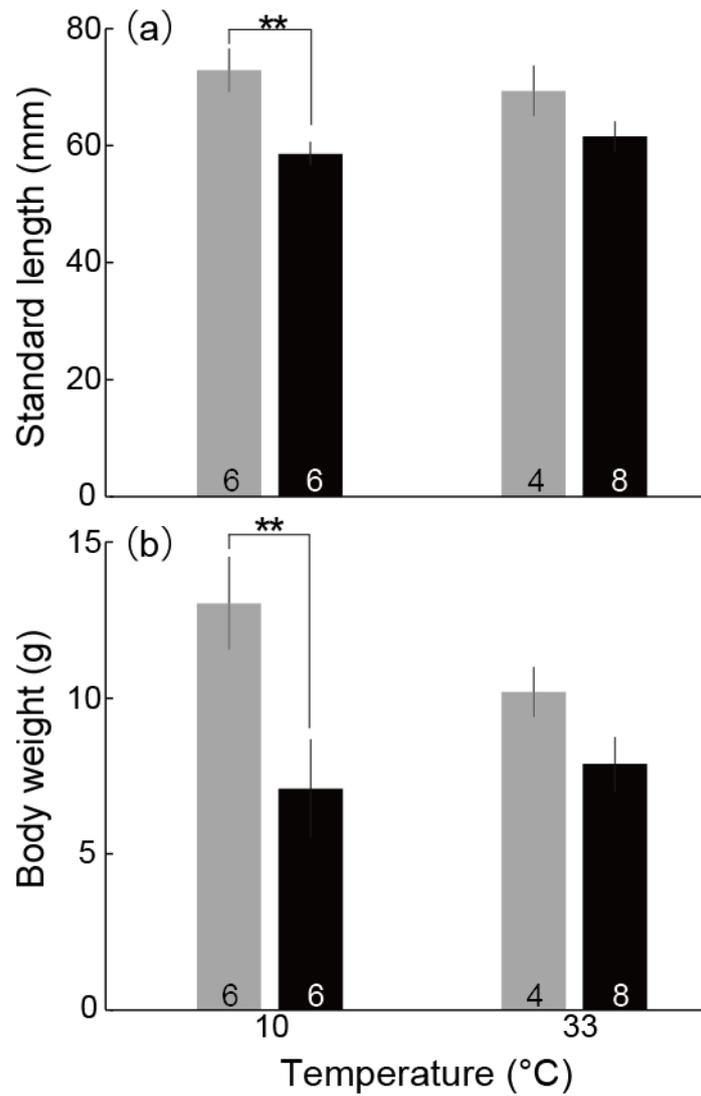
浸透圧変化に際しての魚類の低温耐性は, 一般に細胞・組織レベルにおけるイオンバランスの維持能力に支配される(Maetz & Evans 1972; Toney & Coble 1980; Hochachka 1988).



**Fig. 3-1-2** Survival rate of Japanese black pogy *Acanthopagrus schlegelii* adapted to natal and non-natal osmotic environments. Black and grey bars indicate seawater adapted and freshwater adapted groups, respectively. The upper panels show results after 24 hours and lower panels show the results after 48 hours. Lines above the bars show SE, and numbers in each bar indicate the total number of individuals used in each experiment. Asterisks indicate  $p < 0.01$  level of significant differences between the freshwater and seawater adapted treatments for each temperature.



**Fig. 3-1-3** Standard length (SL) and body weight (BW) of survived (grey) and dead (black) individuals in non-natal osmotic environments of Japanese dace *Tribolodon hakonensis*. Lines on the bars show SE and numbers in columns indicate the total number of individuals used for analysis.



**Fig. 3-1-4** Standard length (SL) and body weight (BW) of survived (grey) and dead (black) individuals in non-natal osmotic environments of Japanese black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. Lines on the bars show SE and numbers in columns indicate the total number of individuals used for analysis. Asterisks indicate  $p < 0.01$  level of significant differences between dead and survived individuals at the same temperature.

このことから、低温の非出生浸透圧環境で死亡した個体は浸透圧調節に失敗した可能性が考えられる。また、ウミメダカ *Fundulus heteroclitus* のイオン輸送効率は低温条件で急激に低下することが知られる(Buhariwalla et al. 2012)。ウグイとクロダイの非出生浸透圧環境への適応に重要な働きをするイオン輸送タンパクの好適水温範囲が本実験の結果に影響した可能性は十分に考えられる。

クロダイでは非出生浸透圧環境において小型個体の死亡率が高いという結果が得られた。これも浸透圧調節に直接関係する理由で引き起こされた可能性がある。Allanson et al. (1971) と Martin (1988) は、それぞれモザンビークティラピア *Tilapia mossambica* とタカサゴイシモチ科魚類 (*Ambassidae*) で小さい個体のほうが大きい個体よりも水温による浸透圧ストレスに弱いという傾向を報告している。これは小型個体の体質量に対する鰓の表面積の比が大型個体に比べて大きくなるというアロメトリー則によるものと考えられている (Hurst & Conover 2002)。

本実験の結果、ウグイとクロダイの水温の急変に対する耐性は非出生浸透圧環境では出生浸透圧環境に比べて狭くなることが明らかになった。しかし、本実験だけでは明確な死亡理由が不明である。また、より段階的な水温変化を与えた場合、浸透圧調節機構を変化させることで、より広い水温帯で非出生浸透圧環境に順応可能になる可能性も考えられる。これらの点を検討するため、より段階的な水温変化を与え、血漿浸透圧から各水温・浸透圧条件における浸透圧調節能を見積もり、さらに浸透圧調節機構の動態を推測するために鰓の塩類細胞における主要なイオン輸送体の発現量を測定する実験を行った。

## 第2項 水温を段階変化させた場合の血漿浸透圧と遺伝子発現に基づく検討

### 1. 材料と方法

#### 供試魚

ウグイは天然個体を、クロダイは卵から海水飼育された飼育個体を用い、両種とも京都大学舞鶴水産実験所で一定期間飼育したのち、東京都文京区に位置する東京大学弥生キャンパス(35° 42 N; 139° 45 E)に輸送して実験を行った。ウグイは2014年1月に投網を用いて舞鶴湾に注ぐ寺川中流の淡水域で際捕した。採捕した個体は採捕場所の河川水で満たした75-1のふた付きプラスチックバケツに入れ、十分に通気した状態で京都大学舞鶴水産実験所まで輸送した。輸送時間はおおよそ20分程度であり、実験に用いた個体の標準体長は80–162 mmであった。クロダイは前項の水温急変実験に用いたものと同じの集団を用いた。実験に使用した個体の標準体長は59–104 mmであった。実験に必要な数のウグイが集まって東京大学弥生キャンパスに輸送するまでの6日間、おおよそ250個体のウグイと150個体のクロダイは500-lの透明なポリカーボネートタンクに入れ、それぞれ淡水・海水中で馴致した(ウグイ2タンク、クロダイ1タンク)。クロダイが入った海水タンクは4l/minで濾過海水をかけ流して十分に通気した状態で保った(600 ml/min)。ウグイの飼育にはチオ硫酸ナトリウム

(0.6 mg/l)で脱塩素された水道水を用いた。排泄物による輸送時の水の汚れを避けるために両種とも輸送前の6日間は絶食条件で飼育した。舞鶴水産実験所からの発送は1月20日に行った。翌日に東京大学弥生キャンパスで受け取り次第、屋根付の野外環境に設置された700-lの濾過槽付きFRPタンクに移行した。ウグイとクロダイは20°Cの循環淡水・海水中でそれぞれ飼育した。水温変化実験に供されるまでの間両種は1日1度配合飼料を飽食給餌した(ウグイ：川魚のえさ ジェックス株式会社、日本；クロダイ：おとひめ S2,日清丸紅飼料株式会社、日本)。

#### 出生・非出生浸透圧環境への馴致

輸送されたウグイとクロダイの半数(ウグイ：約120個体、クロダイ：約70個体)を、淡水と海水で満たした水槽に1月21日にそれぞれ移行した。これらを実験までの2-3ヶ月間一貫してその浸透圧環境で飼育し、それぞれウグイの淡水馴致群とクロダイの海水馴致群とした。残りの半数のウグイとクロダイを以下の手順でそれぞれの非出生浸透圧環境に段階的に移行し、そこに10日以上馴致することで、それぞれの非出生浸透圧環境馴致群を得た。ウグイの海水馴致群は、まず700-lタンク中で淡水から15pptの半海水に移行した。その5日後に32pptの完全海水で満たされた300-lの濾過・水温調節装置付きの亚克力実験水槽に35個体ずつ移行し、実験開始までここで飼育した。先の水温急変実験で、小型個体を中心に比較的高い死亡率が観察されたため、今回は15pptにおける馴致期間を3日から5日間に延長した。低張環境に順応したクロダイについては当初、先に行った水温急変実験と条件を合わせるために、淡水に順応した実験群を得る予定であった。そのため、まず水温急変試験の際と同じ方法で飼育水の塩分を段階的に淡水にまで低下させた。しかしながら、淡水に移行して8日の間に合計10個体が死亡した。このことから、2週間の絶食条件での実験を行うほどにはクロダイの淡水適応能力は高くないと考えられた。そこで、淡水移行後8日目に塩分を再び1pptに上昇させ、実験までの期間この環境に馴致することで1pptの低張環境に順応した実験群を得た。その後、実験水槽に移行するまでの間に追加で数個体が死亡した。後述するように、クロダイではまず海水馴致群での実験を行ってから低張環境馴致群の実験を行った。海水馴致群では各水温処理区(低下・上昇・20°C一定)あたり20個体を用い、合計60個体で実験を行った。しかしながら低張環境馴致群については供試魚の一連の死亡により、供試魚の個体数が60個体に満たなくなった。そのため、低張環境馴致群については各水温処理区あたりの個体数を18個体として実験を行った。

#### 水温変化試験

実験は300-lの濾過・水温調節装置付きの亚克力水槽を3つ使用して2014年2月14日から5月13日にかけて行った(ウグイ海水馴致群：2/14-3/1, ウグイ淡水馴致群：4/3-4/18, クロダイ海水馴致群：3/10-3/25, クロダイ低張環境馴致群：4/28-5/13)。3つの実験水槽をそれぞれ水温が1日1°C上昇する上昇区・1日1°C低下する低下区・20°C一定に保たれる

対照区とし、合計 15 日間の実験を行った。そのため、実験デザイン上は 15 日後の水温は上昇区で 35°C、低下区で 5°C となる。しかしながら、上昇区では 35°C 未満の水温で全個体が死亡する試験区があったため、また低下区では装置の性能上水温を 5°C まで下げることができなかった実験区があったため、最終的な試験水温は実験区によってばらついた。ウグイの海水・淡水馴致群の上限水温はそれぞれ 31°C・32°C であった。一方、クロダイは海水・低張環境馴致群の両方で水温を 35°C まで上昇させることができた。低下区の最低水温は、外気温が上昇した 4 月から 5 月に試験を行った両種の淡水区については装置の性能上 6–7°C までしか水温を低下させることができなかった。一方、気温が低い時期に行った両種の海水馴致群については水温を 5°C まで低下させることができた。

ウグイの淡水馴致群・クロダイの海水・低張環境馴致群については、700-1 タンクで馴致している個体の中から最初の標本採取を行ったのち、3 つの試験水槽に同数ずつ導入した。ウグイの海水馴致群については、3 つの試験水槽から 2 個体ずつ、合計 6 個体を採取し、これを最初の標本とした。ウグイでは試験水槽での海水馴致期間中に死亡個体が全く認められなかったため、最初の標本採取後の各水槽中の個体数は 33 ずつになった。しかし、淡水馴致群は実験水槽中に 30 個体ずつ導入された状態で実験を開始した。そのため海水馴致群の個体数をこれと合わせるため、各水槽から 3 個体ずつ取り除いた。最初の標本採取後に各実験水槽に導入した個体数は、ウグイ淡水・海水馴致群で：30 個体ずつ、クロダイ海水馴致群で：20 個体ずつ、クロダイ淡水馴致群で：18 個体ずつ(理由は上述)となった。採取した個体数は、ウグイの海水区の最初の標本採取時のみ 6 個体、海水馴致ウグイの最初の標本採取時以外の時点と、それ以外の実験では原則として各時点で 5 個体とした。ただし、試験期間中に比較的多くの個体が死亡したクロダイの低張環境馴致群の対照区と上昇区の t3、そしてウグイの海水馴致群の上昇区の t4 は、それぞれ 4 個体の標本しか得られなかった。

#### 標本処理

標本として採取した個体は、直ちに 0.1%フェノキシエタノールで麻酔し、SL と BW を測定した。その後、ヘパリン処理したシリンジと注射針を用いて尾動脈から血液を採取し、さらに最前列の鰓弁を摘出した。摘出した鰓弁は Isogen (株式会社ニッポンジーン, 日本)中でその後の RNA 抽出まで -80°C 条件で保存した。一連の実験は東京大学の実験動物委員会によって定められた原理と手続きに則って行った。

#### 血漿浸透圧の測定

採取した血液を 5,000g で 5 分間遠心分離して血漿を分離し、蒸気圧浸透圧計(VAPRO 5520; Wescor, Logan, UT)を用いて血漿浸透圧を測定した。

#### mRNA 発現量の測定

本節では鰓におけるイオン輸送体の mRNA 発現量を real-time PCR 法により測定した。測

定したイオン輸送体は、ウグイで cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), sodium-potassium-chloride cotransporter-1a, 1b (NKCC1a, 1b), sodium-hydrogen exchanger-3 (NHE3), クロダイで CFTR, sodium-potassium-chloride cotransporter-1 (NKCC1), NHE3 である。測定方法を以下に詳述する。

#### (1) Total RNA の抽出および DNase 処理

Total RNA の抽出試薬には Isogen を用いた。抽出後、DNase I (株式会社ロシュ・ダイアグノティクス, 日本)を用いてゲノム DNA を分解した。得られた RNA は直ちに cDNA の合成に供した後、残りは $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (2) cDNA の合成

cDNA の合成は Total RNA 2000ng から High Capacity RNA to cDNA kit (株式会社ライフテクノロジーズジャパン, 日本)を用い、製品付属マニュアルに従って 20 $\mu\text{l}$  の反応系を調製して行った。得られた cDNA は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (3) Primer の作成

ウグイの NHE3 は既知の塩基配列をもとに Primer 3 plus を用いて Primer を設計した。ウグイにおける他の輸送体遺伝子とクロダイの全ての輸送体遺伝子、そして内部標準遺伝子である 18S rRNA については、データベースに登録されている他魚種の配列情報を参照し、保存性の高い領域にプライマーを設計した。

#### (4) 分子クローニング及びスタンダード DNA の作成

ウグイについては CFTR, と NKCC, クロダイについては CFTR, NKCC, NHE3, の cDNA 断片がディジェネレート PCR により、両種の鰓弁から得られた cDNA テンプレートより増幅された。PCR 反応は鰓弁から得た 50 倍希釈 cDNA 溶液 1 $\mu\text{l}$  を鋳型として行った。得られた PCR 産物は pGEM-T Easy Vector System I (Promega) のプラスミドベクターにライゲーションした。得られたプラスミドは大腸菌 XLI-Blue 株の形質転換を行いクローン化した。大腸菌からのプラスミド抽出には Fast Gene<sup>TM</sup> Plasmid mini kit (Nippon Genetics)を用いた。クローニングされた PCR 産物についてシーケンス反応を行い、Genetyx Ver. 11 (株式会社ゼネテックス) を用いて塩基配列を決定した。次に、プラスミド DNA 溶液の濃度を求め、コピー数を算出し、 $10^{10}$  copies/ml の濃度のプラスミド DNA 溶液を作成した。これをもとに  $10^2\sim 10^8$  copies/ $\mu\text{l}$  の濃度の希釈系列を作りスタンダードとした。

#### (5) Real-time PCR

(2) で合成した cDNA を用いて、ウグイ、クロダイにおけるイオン輸送体遺伝子の mRNA 発現量を測定した。Real-time PCR 用のプライマーは(4)で検討した配列情報を基に Primer 3

を用いて設計し、それぞれ Table 3-1-2 に示したものをを用いた。装置および試薬は LightCycler 480 および LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社, 日本)を用いた。PCR 反応は 0.2μM のプライマーセットおよび製品付属マニュアルに従って 20μl の反応系を調製して行った。データは 18S rRNA の発現量を用いて標準化した。データの解析は Light Cycler® 480 Software release 1.5.4 SP4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社, 日本)を使用して行った。

## 解析

ウグイとクロダイそれぞれについて、全ての標本採取時点間で標本の標準体長と体重の差異の有無を検証した。血漿浸透圧については、同一時点で標本採取した上昇区・低下区・対照区の値を比較した。ただし、ウグイ海水区の上昇区では水温が 31° C に達すると多くの個体が死亡し解析に必要な個体数が確保できなくなる恐れがあった。そのため標本の採取を 1 日早め、翌日採取した対照区・低下区の標本と合わせて解析を行った。また、ウグイの海水区・淡水区の t5 については、t4 の時点で高温区の魚を全て採取してしまったため、対照区と低温区についてのみ比較を行った。遺伝子発現量については、各種同一遺伝子の発現量を同一試験区の時点間で比較した。すべての検定は tukey-kramer 法により行ない、解析ソフトには Excel 統計 2013 を使用した。血漿浸透圧の検定の有意水準は  $p < 0.05$  に、遺伝子発現量の差異と標本採取時点間の SL・BW の差異の検定の有意水準は  $p < 0.01$  にそれぞれ設定した。

## 2. 結果

### 実験区間のサイズ差

ウグイ、クロダイともに全ての実験区間で SL と BW について有意差は検出されなかった (tukey-kramer test  $p > 0.05$ ) (Table 3-1-3, 3-1-4).

### 血漿浸透圧と死亡個体数

#### ウグイ海水馴致群

上昇区は、26°C 以上の水温で対照区・低下区に比べて有意に高い血漿浸透圧を一貫して示した (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ) (Fig. 3-1-5)。低下区は、対照区に比べて低い値をとる一貫した傾向を示し、8°C の t4 では 20°C の対照区に比べて有意に低い血漿浸透圧を示した (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ) (Fig. 3-1-5)。t3 の時点まではすべての水温区で死亡数に大きな差はなかったものの、水温が 30°C を超えると高温区での死亡個体数が大きく増加し、最終的には合計で 12 個体が死亡した。低下区と対照区では最終的な死亡個体数は同じ 6 個体であった (Fig. 3-1-5)。

**Table 3-1-2** Primers used for quantitative PCR (qPCR) for CFTR, NKCCa, NKCCb, NHE3 of dace and CFTR, NKCC, NHE3 for porgy.

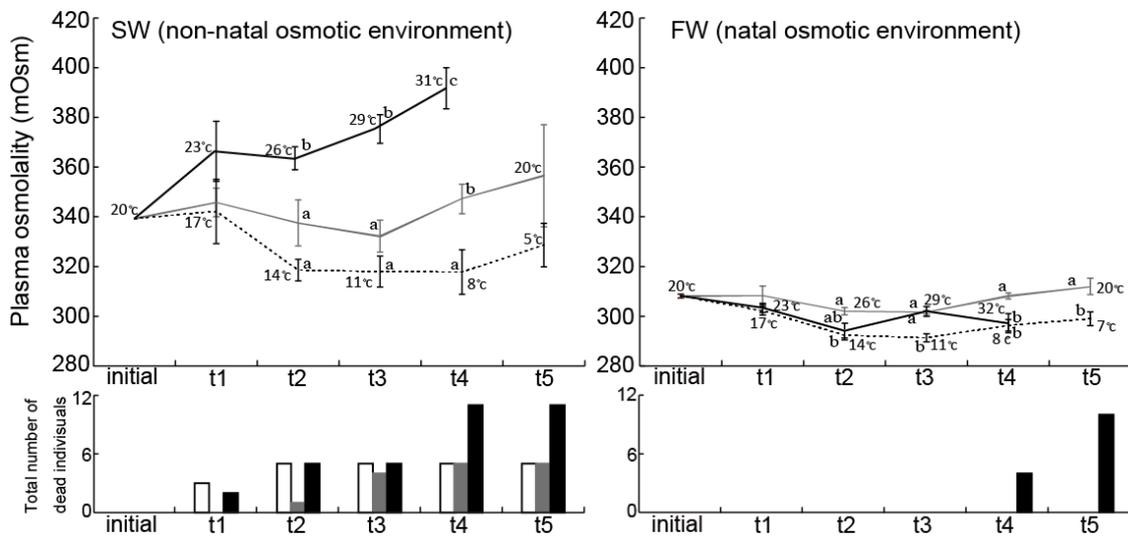
Primers	Sequence (5'-3')
porgy_cftr_F	CGAGGAAGATCGGTTCTCTG
porgy_cftr_R	CTCAGCACCATGCAGTAGGA
porgy_nhe3_F	ATCAATGCAAACATGGACGA
porgy_nhe3_R	GAGGAACGAGCCTGAACTTG
porgy_nkcc_F	GAAGCAGCTGAGTCCAAAGG
porgy_nkcc_R	AGCCATTCCAACGATCAAAC
dace_nkcc_a_F	CACGATGAACTCGACAAGGA
dace_nkcc_a_R	GCCGAACTTCACTGTTCCCTC
dace_nkcc_b_F	GGGGTGTGATGCTCTTCATT
dace_nkcc_b_R	CCTCGTACAAAGCCATTGGT
dace_nhe3_F	CACCGCTGAGAAGAAGTCC
dace_nhe3_R	TGGCAGGTTAATGTTGGTGA

**Table 3-1-3** Temperature at each time point, Standard length (SL), Body weight (BW), total number of individuals sampled at each time point and Plasma osmolality of dace.

			t0	t1	t2	t3	t4	t5
FW	Down	temp(° C)	20	17	14	11	8	7
		n	5	5	5	5	5	5
		SL (mm)	124.4±8.8	119.2±7.5	118.0±6.9	130.6±8.0	124.8±8.8	135.0±7.5
		BW (g)	23.9±8.6	21.3±3.3	20.2±2.7	26.0±5.2	25.0±5.3	29.7±5.0
		OP (mOsm)	308.2±0.8	302.2±1.8	292.4±2.0	291.4±1.6	296.4±2.3	299±2.8
	Control	temp(° C)	20	20	20	20	20	20
		n	5	5	5	5	5	5
		SL (mm)	124.4±8.8	119.4±10.3	121.4±3.1	120.6±5.2	117.2±9.2	126.2±8.0
		BW (g)	23.9±8.6	22.0±4.7	18.1±1.4	21.0±3.0	19.8±4.4	24.0±3.8
		OP (mOsm)	308.2±0.8	308.4±3.8	337.6±9.3	302±0.8	308.2±1.2	312±3.3
	Up	temp(° C)	20	23	26	29	32	
		n	5	5	5	5	5	
		SL (mm)	124.4±8.8	115.6±10.7	121.6±9.0	124.0±8.7	128.8±10.0	
		BW (g)	23.9±8.6	20.1±5.1	19.7±3.5	23.4±4.9	25.9±5.2	
		OP (mOsm)	308.2±0.8	303.4±1.8	363.4±4.6	302.0±2.0	297.8±4.9	
SW	Down	temp(° C)	20	17	14	11	8	5
		n	6	5	5	5	5	5
		SL (mm)	114±9.5	123.8±7.8	126.6±7.8	129.8±5.9	125.6±3.0	134.2±8.6
		BW (g)	18.7±3.7	20.1±3.9	23.3±4.0	24.9±3.6	20.4±2.2	26.8±5.1
		OP (mOsm)	339.3±5.5	342.2±12.9	318.6±4.3	318.0±6.2	317.8±8.3	328.6±7.9
	Control	temp(° C)	20	20	20	20	20	20
		n	6	5	5	5	5	5
		SL (mm)	114±9.5	118±6.9	121.4±3.1	116.4±3.6	119.8±3.9	123.8±7.7
		BW (g)	18.7±3.7	18.4±3.1	18.1±1.4	16.4±1.9	18.4±1.1	19.9±4.1
		OP (mOsm)	339.3±5.5	345.8±5.7	337.6±9.3	332.2±6.5	347.2±5.9	356.6±18.4
	Up	temp(° C)	20	23	26	29	31	
		n	6	5	5	5	4	
		SL (mm)	114±9.5	122±7.7	121.6±9.0	124.0±5.7	132.3±9.9	
		BW (g)	18.7±3.7	20.3±3.9	19.7±3.5	19.4±2.9	20.4±4.2	
		OP (mOsm)	339.3±5.5	366.4±12.0	363.4±4.6	375.4±5.8	391.8±8.9	

**Table 3-1-4** Temperature at each time point, Standard length (SL), Body weight (BW), total number of individuals sampled at each time point and Plasma osmolality of porgy.

			t0	t1	t2	t3
SW	down	temp(° C)	20	15	10	5
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	78.8±5.7	72.4±4.8	80.1±4.8	77.0±5.6
		BW (g)	11.4±2.7	7.0±1.6	12.1±1.9	9.9±2.1
		OP (mOsm)	344.4±5.1	344.0±5.6	338.8±4.1	314.1±3.1
	Control	temp(° C)	20	20	20	20
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	78.8±5.7	76.0±7.4	78.4±4.7	83.0±5.7
		BW (g)	11.4±2.7	11.2±4.1	11.0±1.9	13.0±2.6
		OP (mOsm)	344.4±5.1	356.6±2.3	352.2±4.9	353.4±3.8
	Up	temp(° C)	20	25	30	35
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	78.8±5.7	74.6±3.7	79±6.2	83.4±5.6
		BW (g)	11.4±2.7	8.3±1.3	11.7±2.9	12.5±2.6
		OP (mOsm)	344.4±5.1	352.4±3.3	356.4±6.4	356.6±4.1
FW	Down	temp(° C)	20	15	10	5
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	86.4±3.5	83.8±4.6	73.6±4.7	74.6±4.9
		BW (g)	15.4±1.8	14.1±2.5	9.6±2.2	10.8±2.4
		OP (mOsm)	354.2±5.1	342±1.8	337.2±3.4	320.2±2.3
	Control	temp(° C)	20	20	20	20
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	86.4±3.5	81.8±6.4	79.2±3.7	82.5±5.3
		BW (g)	15.4±1.8	14.1±3.8	12.6±3.1	14.1±3.0
		OP (mOsm)	354.2±5.1	348.6±2.9	348.2±1.6	355.8±5.2
	Up	temp(° C)	20	25	30	35
		n	5	5	5	5
		SL (mm)	86.4±3.5	84.2±5.7	83.4±4.5	76±6.2
		BW (g)	15.4±1.8	14.2±2.7	12.8±2.0	11.0±3.1
		OP (mOsm)	354.2±5.1	342.0±2.1	349.0±1.1	298±13.6



**Fig. 3-1-5** Changes in plasma osmolality in dace and the total number of dead individuals during long time exposure to changing temperatures. Data of plasma osmolality are expressed as means  $\pm$  SE (n = 4-5 ). Significance of differences was tested by tukey-Kramer test. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , compared to plasma osmolality of different temperature acclimated fishes at the same time point. Solid and broken black lines indicate temperature increased and decreased section respectively. Grey line indicate the plasma osmolality of control section. White, black and grey bars indicate the total number of dead individuals of temperature increased, decreased section and control section respectively.

#### ウグイ淡水馴致群

上昇区は、29°Cまで対照区と変わらない値をとり続けたが、32°Cになると対照区に比べて有意に低い血漿浸透圧を示した (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ). 低下区では、14°C以下で対照区よりも有意に低い値を一貫して示し続けた (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ). 上昇区でのみ30°C以上で死亡個体が認められ、水温が33°Cに達すると全ての個体が死亡した (Fig. 3-1-5).

#### クロダイ海水馴致群

上昇区は、水温が35°Cまで上昇しても20°Cの対照区と変わらない値を一貫して示し続けた。低下区は、水温が低下するにしたがって対照区・上昇区に比べて低い値を示す傾向が認められ、5°Cのt3では低下区の値が対照区・上昇区に比べて有意差に低くなった (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ). 死亡個体は対照区で1個体見られたのみであった (Fig. 3-1-6).

#### クロダイ低張環境馴致群

上昇区は、30°Cまで対照区と変わらない血漿浸透圧を維持していたものの、35°Cに達すると対照区と比べて大幅に低い値を示した (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ). 低下区では、10°Cと6°Cで対照区よりも有意に低い値を示した (tukey-kramer test  $p < 0.05$ ). 対照区では実験期間を通して死亡個体が認められ、上昇区では水温が30°Cを超えると多くの個体が死亡した。t3の時点では上昇区・対照区で6個体ずつ死亡したが、低下区では死亡個体が全く認められなかった (Fig. 3-1-6).

#### 輸送体遺伝子の発現変動

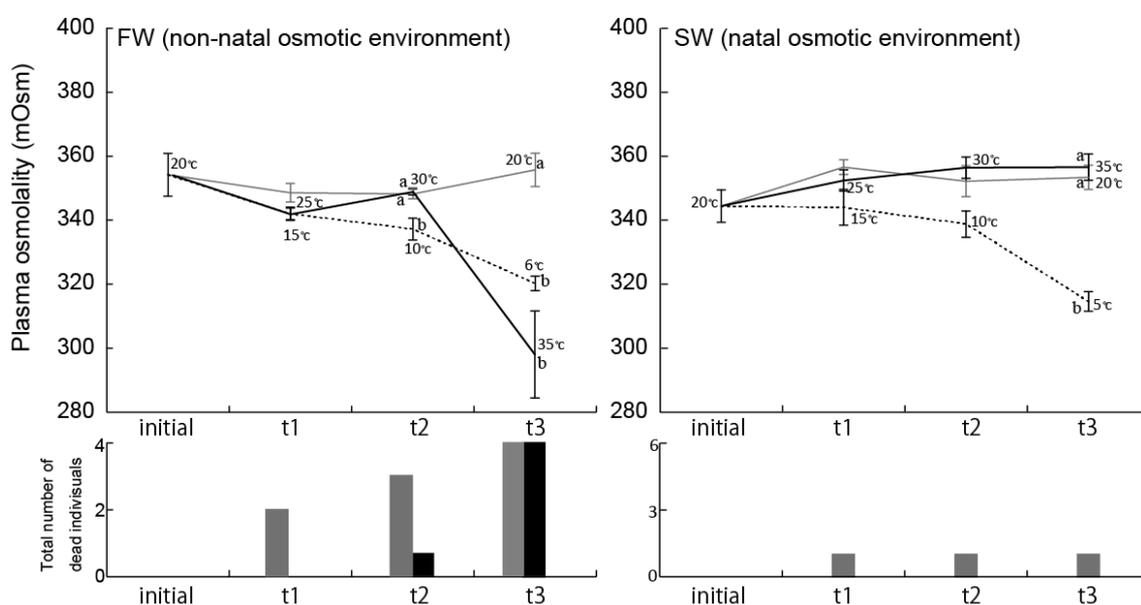
ウグイの淡水馴致群では上昇区のt4 (32°C)でt0 - t3に比べてNKCC1aの発現量が有意に増加した (tukey-kramer test  $p < 0.01$ ). また、海水馴致群においては低下区のt4 (8°C)でt0 - t4とt5に比べてNHE3の発現量が有意に増加し (tukey-kramer test  $p < 0.01$ ), t5でも有意差は認められないものの依然増加傾向にあった (tukey-kramer test  $p > 0.05$ ) (Fig. 3-1-7). クロダイでは、低張・海水馴致群のいずれの水温条件でもCFTR・NKCC・NHE3の発現量は変化しなかった (tukey-kramer test  $p > 0.05$ ) (Fig. 3-1-8).

### 3. 考察

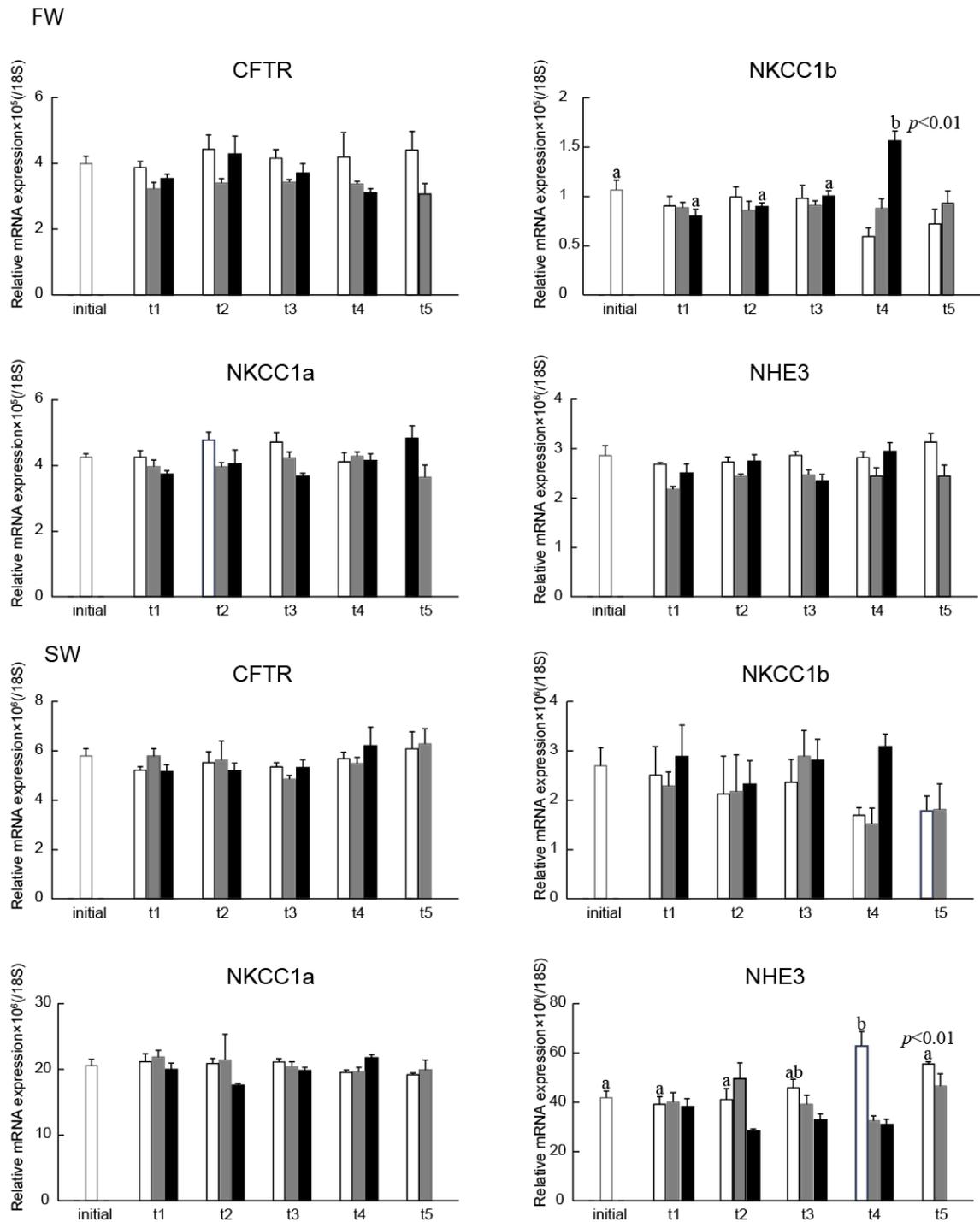
#### 高温条件での血漿浸透圧

高温条件においては、ウグイはいずれの浸透圧条件でも、クロダイは非出生浸透圧環境においてのみ、血漿浸透圧が環境水の浸透圧に近づいた。この結果は両種の浸透圧調節能力が高温条件で低下したことを示唆する。ウグイは非出生浸透圧環境の海水中では26°C以上で浸透圧調節能力を低下させた。これは出生浸透圧環境である淡水中で浸透圧調節能力の低下が確認された32°Cよりも6°C低い値であり、ウグイの浸透圧調節能が維持される温度帯

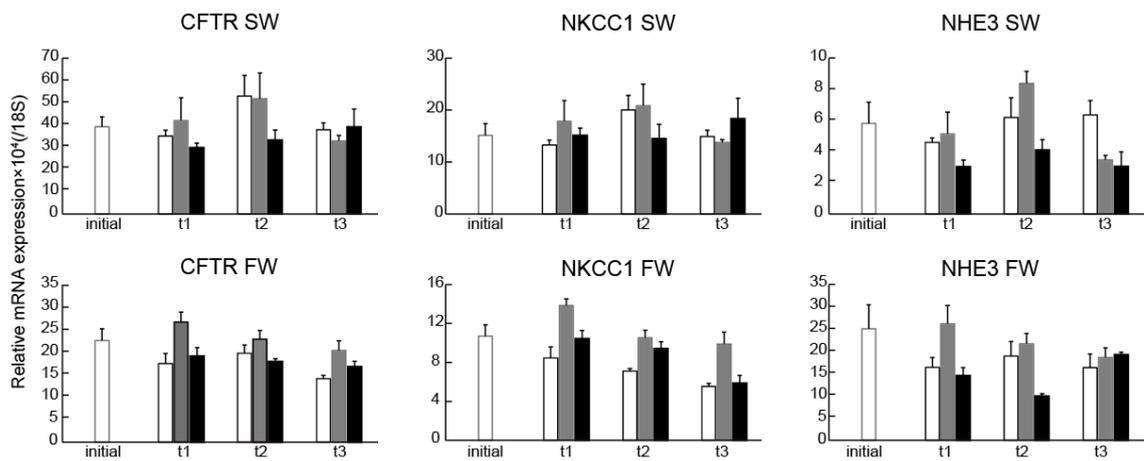
が非出生浸透圧環境では出生浸透圧環境より最低でも 6°C 高温方向に狭いことを意味



**Fig. 3-1-6** Changes in plasma osmolality in porgy and the total number of dead individuals during long time exposure to changing temperatures. Data are expressed as means  $\pm$  SE (n = 4-5). Significance of differences was tested by tukey-Kramer test. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , compared to plasma osmolality of different temperature acclimated fishes at the same time point. Solid and broken black lines indicate temperature increased and decreased section respectively. Grey line indicates the plasma osmolality of control section. Black and grey bars indicate the total number of dead individuals of temperature increase section and control section, respectively.



**Fig. 3-1-7** Expression levels of CFTR, NKCCa, NKCCb, and NHE3 mRNAs in the gills of dace acclimated to FW, SW under various temperatures. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=5 or 4). Different letters indicate significance of difference at  $P < 0.01$ .



**Fig. 3-1-8** Expression levels of CFTR, NKCC and NHE3 mRNAs in the gills of porgy acclimated to FW, SW under various temperatures. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=5 - 3). Different letters indicate significance of difference at  $P < 0.01$ .

する。クロダイは、非出生浸透圧環境である低張環境では 30°C の時点で 20°C の対照区と変わらない血漿浸透圧を示したが、35°C では血漿浸透圧が劇的に低下した。この結果は、クロダイの非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力が 30°C から 35°C の間のいずれかの水温で低下することを示唆する。一方、出生浸透圧環境である海水中では 35°C でも血漿浸透圧は 20°C の対照区と変わらなかった。以上より、両種が非出生浸透圧環境で浸透圧調節能力を低下させない上限水温は出生浸透圧環境に比べて低いと考えられた。淡水産卵生の広塩性種であるモザンビークティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の血漿浸透圧は、非出生浸透圧環境である海水中や 200%海水中では水温上昇に伴い上昇し環境水の浸透圧に近く一方で、淡水中では水温が上昇しても血漿浸透圧が変化しないことが報告されている (Fiess et al. 2007)。この結果はモザンビークティラピアが非出生浸透圧環境で浸透圧調節能力を低下させない水温の上限が出生浸透圧環境に比べて低いことを示唆するものであると言えるだろう。系統的に離れた 3 種の河口偶来種で同様の傾向が確認されたことから、非出生浸透圧環境で浸透圧調節能力を低下させない上限水温は出生浸透圧環境よりも低いという性質は河口偶来種の中に広く存在する可能性がある。

#### 低温条件での血漿浸透圧

ウグイは、低温の海水中で対照区と変わらないか、対照区よりも低い血漿浸透圧を示した。このことは、ウグイが低温の海水中で浸透圧調節能力を低下させなかったことを意味する。クロダイは、低張環境でも高張の海水中でも低温条件において血漿浸透圧を低下させた。低張条件での血漿浸透圧の低下は、浸透圧調節能力の低下によるものであると考えることもできるだろう。しかし、今回の場合は低張環境における血漿浸透圧の動態が海水中における動態と酷似していること、さらに最も水温の低い 6°C でも個体間のばらつきが極めて小さかったことなどから、その可能性よりも低温条件に対する何らかの適応機構が作用したと考えるのが妥当であろう。以上より、両種とも段階的に水温を変化させた場合、7-5°C 程度の低温条件では非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力を低下させないことが示唆された。両種とも、先に行った水温急変実験では、これらの水温でほとんどの個体が死亡したことから、時間的猶予が与えられた今回の実験では 20°C の条件とは異なる浸透圧調節機構を働かせることで低温の非出生浸透圧環境に順応したものと考えられる。

淡水中のウグイもクロダイと同様に低温条件で対照区に比べて有意に低い血漿浸透圧を示した。ウグイとクロダイで観察された低温条件における血漿浸透圧の低下は、浸透圧調節とは異なる低温適応機構が関与した可能性が考えられる。同様の知見は数多く報告されている。ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を淡水中で 8°C から 1°C に移行すると、血漿浸透圧が低下する傾向がある (Finstad et al. 1988)。また、Umminger (1971) は 0.5°C の淡水中に 18 日以上馴致された淡水種の brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) は 20°C に順応した実験群に比べて血清浸透圧を有意に低下させること、そして淡水に順応した mummichog (*Fundulus heteroclitus*) は 1°C に比べて 0.1°C の低温で血清浸透圧が低下することを報告している。こ

うした淡水環境における血漿浸透圧の低下が生ずる理由として、浸透圧調節能力の低下によるとする説 (Umminger 1969) や、浸透圧調節コスト節約のための適応的な応答であるという説 (Prosser et al. 1970) が唱えられてきた。しかしながら、本研究の結果、ウグイもクロダイも低張環境だけでなく高張環境である海水中でも低温条件で血漿浸透圧を低下させることが明らかになったため、本研究で観察された血漿浸透圧の低下の理由は、上記の2つの仮説では説明がつかない。(浸透圧調節能力が低下するのなら、海水中では血漿浸透圧が上昇するはずであるし、海水中で血漿浸透圧を下げるには余計にコストがかかる。) 今回確認された低温条件における血漿浸透圧の低下という現象は、真骨魚類がもつ未知の低温適応メカニズムの一端である可能性がある。

ただし、低温で血漿浸透圧を低下させるという応答は真骨魚類に普遍的な現象とはいえないことには留意する必要があるだろう。逆に低温で血漿浸透圧が上昇する場合も数多く知られている。Banded killifish は  $0.5^{\circ}\text{C}$  の低温条件の淡水中で  $15^{\circ}\text{C}$  に馴致されている実験群よりも高い血漿浸透圧を示す (Ahokas & Sorg 1976)。また、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*) のプレスモルトは  $1.5^{\circ}\text{C}$  の低温条件で、淡水中でも海水中でも血漿浸透圧が  $10^{\circ}\text{C}$  に馴致されている実験群よりも有意に高くなる (Virtanen & Oikari 1984)。低温の淡水中で血清浸透圧を低下させた mummichog は  $20^{\circ}\text{C}$  から水温が  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $4-2^{\circ}\text{C}$ , 氷点下と低下するにつれて血漿浸透圧が上昇する (Umminger 1969)。コイ (*Cyprinus carpio*) は水温が低下しても血清浸透圧が変化しない (Houston & Madden 1968), もしくは上昇傾向を示す (Metz et al. 2003)。海水中のイシビルアメ (*Scophthalmus maximus*) も水温低下に伴って血漿浸透圧が上昇する傾向をもつことが報告されている (Imsland et al. 2003)。真骨魚類が低温条件に晒された場合の血漿浸透圧の応答は変化に富んでおり、それぞれの応答の機能的意義にも満足のいく説明がなされていないというのが現状である。

#### 水温変化に伴う輸送体遺伝子の発現変動

ウグイでは高温の淡水で NKCC1a が、低温の海水中で NHE3 がそれぞれ高発現を示した。NKCC は  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  の共輸送体であり、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  により維持されている  $\text{Na}^+$  の細胞内外の濃度勾配に駆動されて  $\text{Na}^+\cdot\text{K}^+\cdot\text{Cl}^-$  を細胞内に取り込む働きをしている (McCormick 2013)。本遺伝子は海水中の鰓の塩類細胞において重要な役割を持つことが知られているが、淡水中での役割は知られていないため、淡水中における発現上昇の理由を推定することは現状困難である。NHE3 は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger の一種で、 $\text{H}^+$  を細胞外に排出し細胞内に  $\text{Na}^+$  を取り込む働きを持つことが示唆されており (Watanabe et al. 2008)、淡水順応時のモザンビークティラピア (Watanabe et al. 2008) や Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) (Choe et al. 2005) で海水順応時の約 2 倍の発現量を示すことから淡水適応に重要な遺伝子であると考えられている。また、ウグイでは酸性の軟水に順応する際にイオンバランスの調節に関与することも示唆されている (Hirata et al. 2003)。ただし、これらの知見から今回観察された低温の海水中での発現上昇に合理的な説明を与えることは困難である。これらのイオン輸送体が温度変

化に際して発現変動した以上、それぞれの条件で何らかの役割を担っているものと推察される。しかしその具体的な理由を理解するには、これらの輸送体の機能に関する基礎的知見のさらなる集積を待つ必要があるだろう。

#### 高温の非出生浸透圧環境における能力低下

本実験で得られた結果は、ウグイとクロダイが水温の高い夏季に河口域を利用し、水温が低下する冬季にはそれぞれの出生浸透圧環境へと戻るといった生態学的知見 (Sakai 1995; Katano et al. 2010; Yokoo et al. 2010) から予想されるものとは逆であった。すなわち両種の生態からは、非出生浸透圧環境において浸透圧調節能を低温で低下させ、高温では低下させない生理的性質を持つことが予想されたが、実際にはその逆の結果が得られた。まず、高温の非出生浸透圧環境における浸透圧調節能の低下が両種の生態に与える影響について考察する。以下では、浸透圧調節能を低下させるニッチを「順応不能ニッチ」と定義し議論を進める。

海水に順応したウグイの浸透圧調節能力は 26°C 以上で低下したが、本実験で使用した個体を採捕した寺川が注ぐ舞鶴湾の真夏の水温はこれを大幅に上回る。例えば 2014 年 7 月 31 日には、水深 1m の表層水温が午後には 30°C に達し、水深 10m でも 26.5°C 程度の水温が昼夜問わず維持されており 26°C を下回ることがなかった (水産総合研究センターリアルタイム海洋情報収集解析システム : [http://buoy.nrifs.affrc.go.jp/buoy/buoy\\_total.php](http://buoy.nrifs.affrc.go.jp/buoy/buoy_total.php); accessed; 4 Jun 2015)。このように、真夏の舞鶴湾はウグイの順応不能ニッチとなる場合がある。

クロダイが、非出生浸透圧環境で浸透圧調節能力を低下させる水温は 30°C から 34°C の間にあった。もしこれが 30°C 付近であった場合、舞鶴の真夏の河口域が全体的に本種にとっての順応不能ニッチとなる可能性が高い。なぜなら、舞鶴湾に流入する河川の下流域では 8 月には最も流れの強い流芯部ですら水温が 30°C を超えるためである (Yatsuya et al. 2012)。もしこれが 34°C 付近であった場合、流芯部が本種の浸透圧調節能力を低下させる水温にまで上昇することはほとんどないと考えられる。しかし、遊泳能力の乏しい稚魚は、流れの強い流芯部を避け、流れのゆるやかな淵や浅瀬に生息する傾向をもつ (Day 1951, Blaber 1974; Blaber & Blaber 1980)。例えば舞鶴湾に注ぐ伊佐津川には河口から約 1km 上流に様々な魚種の稚魚が生息するワンドがあるが、この水温はしばしば外気温と同程度まで上昇する。2012 年の 8 月の舞鶴は、日最高気温の平均が 34.4°C あった (Japan Meteorological Agency [http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly\\_s1.php?prec\\_no=61&block\\_no=47750&year=2012&month=&day=&view=](http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=61&block_no=47750&year=2012&month=&day=&view=); 2015 年 5 月 22 日にアクセス)。このように、クロダイの分布域において 34°C を超える低張環境、すなわち本種にとっての順応不能ニッチが河口域に出現することは決して例外的な事象ではない。以上より、高温条件における非出生浸透圧環境順応能の低下は両種の活用ニッチを制限する要因の 1 つになっているものと考えられ、両種が 1 年を通じて非出生浸透圧環境に留まるには非出生浸透圧環境に順応可能な水温帯を高温方向に拡大する—すなわち順応不能ニッチを拡大する—必要があるものと推測される。

ウグイとクロダイが、高温の非出生浸透圧環境を避けるように天然環境で振舞うという報告は私の知る限り存在しない。しかし、両種の浸透圧調節能力が高温の非出生浸透圧環境で低下する以上、両種が夏季の河口域において順応不能ニッチである高温の非出生浸透圧環境を避けるように行動している可能性がある。例えば、クロダイは非出生浸透圧環境において水温の高まりを感知すると、遊泳水深を深くし塩水くさびに入るなどして低張の非出生浸透圧環境を脱出することができるだろう。ウグイも沿岸域の水温が 26°C を超えるような時期には、比較的水温が低い低層を遊泳したり定期的に河川の低張環境に戻ってくるなどするのもかもしれない。実際、河口偶来種の生態研究が進んでいる北アメリカのチェサピーク湾では高温の非出生浸透圧環境を避ける河口偶来種が知られる。チェサピーク湾を中心に生息する海産の河口偶来種である Spotted hake (*Urophycis regia*) は、比較的水温が低い秋から春にかけて非出生浸透圧環境を含む河口域に進入し、水温が上昇する 6 月になると降海する (Bigelow & Schroeder 1953, Barans 1972)。また、4-7 月にかけて京都府の由良川を遡上するスズキ (*Lateorabrax japonicus*) の当才魚は 7 月に水温が 30°C 近くなると淡水域ではほとんど採捕されなくなり (Fuji et al. 2010, 2011)、高水温時に河口域から退出することが示唆される。今後、バイオロギングの手法を用いた河口偶来種の詳細な移動生態に関する知見が集積されれば「ウグイやクロダイが河口域で高温の非出生浸透圧環境を避けるように振舞う」という仮説を指示する証拠が得られる可能性があるだろう。

河口偶来種が冬季に河口域を利用しない理由について

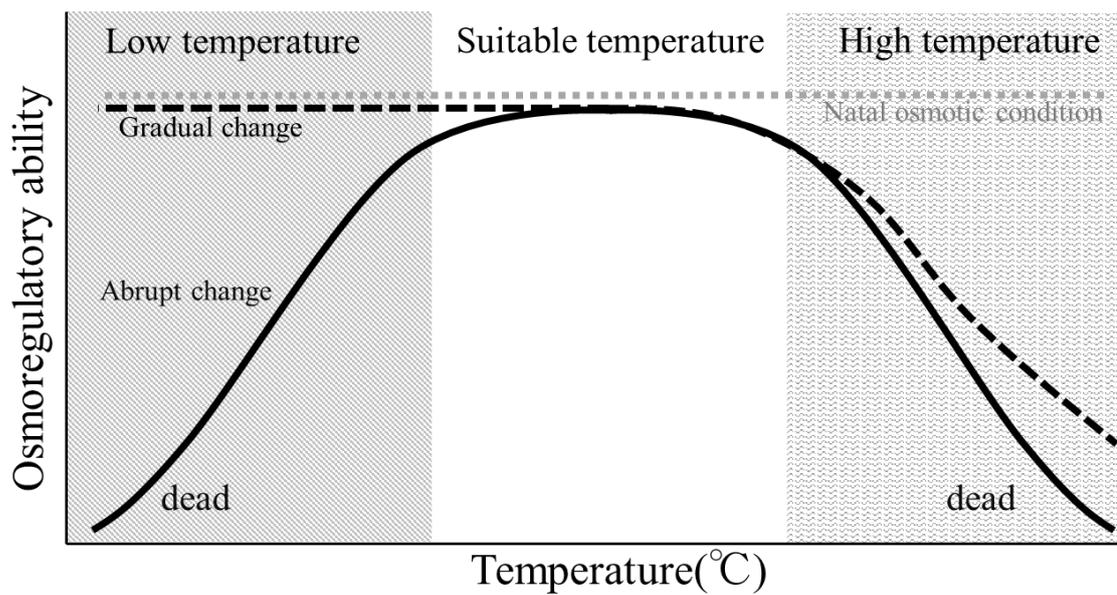
ウグイとクロダイは冬季にそれぞれの出生浸透圧環境に戻るということが示唆されているが、本実験の最低試験水温である 5—7°C では、両種の非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力の低下は確認されず、両種が冬季に河口域を利用しない理由を水温依存的な浸透圧調節能力の低下に求めることができなかった。しかしながら、本実験の結果のみからこの可能性を否定することはできない。これは両種の分布域で冬季に経験しうる 5°C 未満の水温では非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力が低下する可能性が考えられるためである。例えば、2014 年の舞鶴湾では 2 月の水温が表層から水深 10m にかけて氷点下まで低下している (水産総合研究センターリアルタイム海洋情報収集解析システム; [http://buoy.nrifs.affrc.go.jp/buoy/buoy\\_graph.php](http://buoy.nrifs.affrc.go.jp/buoy/buoy_graph.php); accessed 5 Jun 2015)。河川内の水温も稚魚や若魚が分布する流れのゆるやかなワンドでは、気温と同程度の 0°C 付近まで低下しうる。たとえば、サケ科の河口偶来種であるカワマス (*Salvelinus fontinalis*) は海水中で水温が 2°C を切ると血漿浸透圧が致命的レベルまで上昇することが知られる (Saunders et al. 1975)。こうした、氷点に近い水温で実験すれば非出生浸透圧環境での浸透圧調節能力の低下が確認できたかもしれない。また、本研究と同程度、もしくはより低い水温で河口偶来種について実験を行い、浸透圧調節能力を低下させない水温の下限が、出生浸透圧環境よりも非出生浸透圧環境で高いことを示した研究がいくつか存在する。淡水産卵性のカダヤシ類である Banded killifish (*Fundulus diaphanus*) は 0.5°C の海水中で 2 週間飼育すると血漿浸透圧が上昇

し、半数が死亡する。しかし、同水温の淡水中ではこうした大量死は起こらない(Ahokas & Sorg 1977)。また、汽水産卵性の striped bass は 0ppt の淡水中では 7°C 以下で全海水中や汽水中に比べて生残率が低下し、1°C を切ると 35ppt の全海水中でも 5—25ppt の汽水中よりも生残率が低下することが知られる(Hurst and Conover 2002)。さらに、海水産卵性の河口偶来種である Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*)は水温 3°C の条件では塩分が低下するほど生残期間が短くなる(Lankford and Targett 2001)。このように、系統的に遠い複数の河口偶来種で同様の傾向が観察されているため、非出生浸透圧環境で浸透圧調節が可能な水温帯が、高温方向だけでなく低温方向にも狭いという傾向は河口偶来種に普遍的なものである可能性がある。より低温で実験を行うことで、ウグイとクロダイにおいても低温の非出生浸透圧環境における血漿浸透圧調節能力の低下が観察される可能性があるだろう。また、低温条件では血漿浸透圧を維持することができても、調節コストが増加する可能性も考えられる。本研究でも低温の非出生浸透圧環境でウグイの NHE3 の発現量が増加することが確認された。具体的な機能は不明だが、これは調節コスト増大の一面を捉えた結果かもしれない。様々な水温の出生浸透圧環境と非出生浸透圧環境における酸素消費量を測定することで、この可能性を検証することができるだろう。

ここまで、今回の実験では低温の非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力の低下が検出できなかった可能性を考えてきた。しかし、両種の浸透圧調節能力が低温条件では実際に低下せず、これらの種の冬季の河口域からの退出が浸透圧調節能力とは直接関係しない原因により引き起こされる可能性も当然考えられる。今回の実験では、非出生浸透圧環境においては水温を 20°C 一定に保つ対照区でもある程度の死亡個体がみられた。出生浸透圧環境においてはこうした死亡がほとんど観察されなかったことから、非出生浸透圧環境に滞在すること自体が河口偶来種に負担を強いているものと考えられる。それでも河口偶来種が河口域に進入するのは、適応度の向上に寄与する何らかの対価が得られるからであろう(例えば豊富な餌や、捕食者の目を欺く濁った水など)。冬季にはそうした見返りが十分でなくなるため、河口域を離れるのかもしれない。この可能性を検証するためには、両種の河口域への進入動態と河口域の多様な環境条件を照合できるような大規模な生態調査が必要であろう。

#### 水温急変時および段階変化時の非出生浸透圧環境適応能

Fig. 3-1-9 は、水温急変実験と段階変化実験の結果から考えられた、ウグイとクロダイにおける水温と浸透圧調節能力の関係を示した概念図である。出生浸透圧環境中ではいかなる水温でも浸透圧調節能力を低下させた証拠は得られなかった。一方、非出生浸透圧環境では水温によって浸透圧調節能力が大きく異なった。両種共に、水温を急上昇させると大半の個体が死亡した。また、段階的に上昇させると死亡個体は減少したものの、血漿浸透圧が環境水の浸透圧に近づくことが確認された。このことから、両種は非出生浸透圧環境



**Fig. 3-1-9** Inferred osmoregulatory ability of dace and black porgy in natal (Grey line) and non-natal (Black lines) osmotic condition. Solid and broken black line indicate the osmoregulatory ability during abrupt and gradual temperature changes respectively.

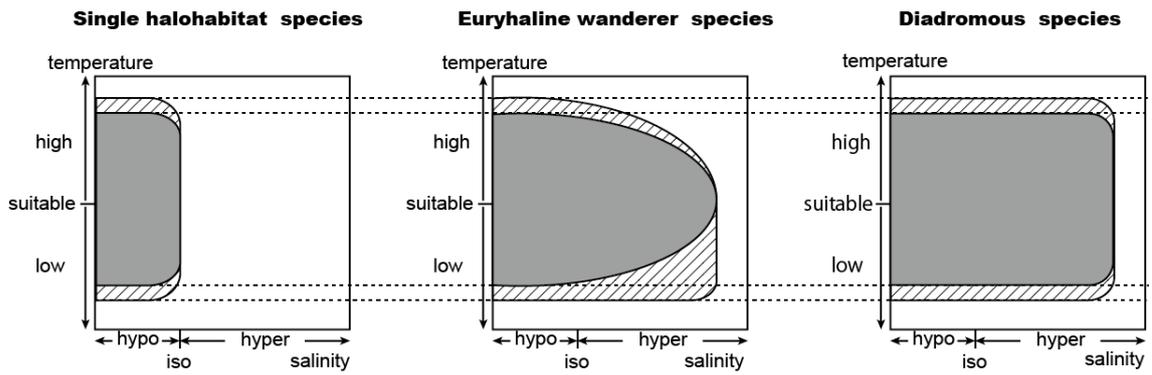
における浸透圧調節能力を高温条件で低下させると言える。水温を急激に低下させると両種とも多くの個体が死亡したが、段階的に低下させると死亡個体が減少した。また血漿浸透圧の変化から浸透圧調節能力を低下させた証拠も得られなかった。このように、時間的猶予が与えられた場合のみ低温に順応できたことから、両種は 20°C 程度の好適水温条件順応時とは異なる機構で低温の非出生浸透圧環境に順応したことが示唆された。ウグイとクロダイという系統的に離れており、産卵場の浸透圧環境も対照的な 2 種で同様の性質がみられたことから、これらは河口偶来種に普遍的な性質である可能性が考えられる。以上より、河口偶来種が非出生浸透圧環境において浸透圧調節が可能な水温帯は少なくとも高温方向に狭まることが明らかとなった。この生理的性質は河口偶来種が 1 年を通じて非出生浸透圧環境に留まることの制約になっている可能性が高いものと考えられる。

#### 非出生浸透圧環境における順応可能ニッチの拡大過程

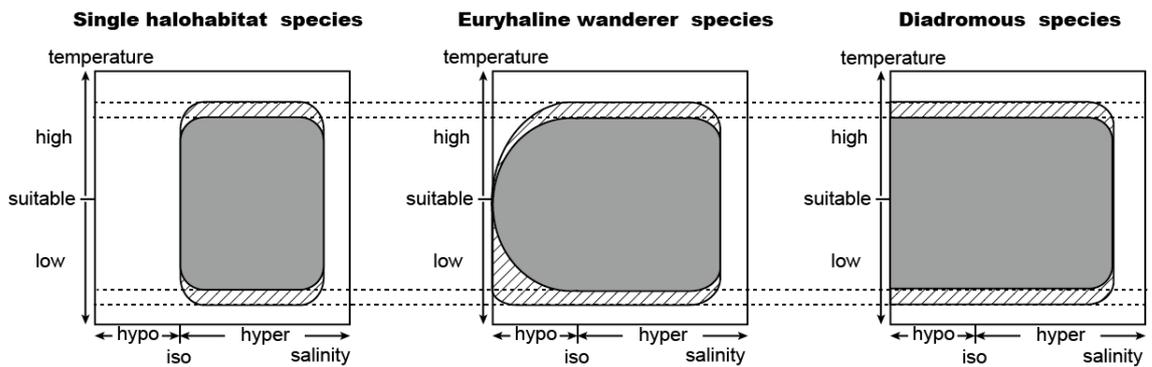
本実験の結果と既存の知見から推定される通し回遊の進化過程における順応不能ニッチの拡大過程を示す (Fig 3-1-10)。非出生浸透圧環境を利用しない単一ハロハビタット種にとって、非出生浸透圧環境は基本的に順応不能ニッチであると考えられる。この仮定はまず、琵琶湖に生息する湖産アユ・ビワマスなど、陸封された淡水産卵生の通し回遊種では塩分耐性が低下しているという事実から支持されよう (Tabata and Azuma 1986; 藤岡 1991)。理論の上でも、不要な調節機構の保持には余分なコストが掛かる可能性があり、もしそうであればこの調節機構を持たない個体が選択されることが予想される。さらに、仮に個体の適応度に影響するほど機構の保持にコストが掛からなかったとしても、その機構が使用されなければ機構の維持に有害な遺伝的変異を浄化するシステムが働かなくなることから、多くの遺伝子に関わる複雑な機構を維持することはできないだろう。ある浸透圧調節機構が、進化的な時間スケールで使用されなければ、その調節機構が退化するのは当然のことであると考えられる。ただし、出生浸透圧環境の範囲内であれば、活用ニッチ外の塩分条件も順応可能ニッチに含まれるだろう。これは新たな浸透圧調節機構が必要ないためである。実際、淡水産の単一ハロハビタット種であるゼブラフィッシュは、直接移行実験においても塩分 12ppt までは順応可能であることが知られる (Dou et al. 2006) (Fig 3-1-10)。

河口偶来種では順応可能ニッチが拡大し、好適な水温条件においては、海産種と淡水種にとって天然環境における各々の極限的な非出生浸透圧環境である淡水と海水もが順応可能ニッチとなる場合がある。こうした極限的な浸透圧条件は水温が急激に変化する場合には順応不能ニッチとなるが、段階的に低下する場合には順応可能ニッチとなる。一方、水温が上昇する場合にはその速度に依らず順応不能ニッチとなる。以上より、非出生浸透圧環境における順応可能ニッチは低温方向から拡大することが示唆される。これには単位時間当たりには鰓を通過する環境水の質量が関係する可能性が考えられる。高温条件では環境水中の溶存酸素量が少なく代謝も活発になるため、より多くの環境水を鰓に通す必要が生じ、その結果として環境水と体液のイオン交換が盛んになることが予想される。低温条件

**Freshwater species**



**Marine species**



**Fig. 3-1-10** Conceptual diagram of expansion process of un-acclimatable niche during the evolutionary process of diadromous species from single habitat species via euryhaline wanderer species. Upper and lower rows show evolutionary processes from freshwater and marine species to diadromous species, respectively. White area indicates the acclimatable niche under rubrapt temperature change and grey area indicates the acclimatable zone under gradual change.

では呼吸量が抑えられ、イオンの交換速度がより緩やかになるため、順応が比較的容易なのかもしれない。

季節変化を伴う緯度体に生息する通し回遊種では、非出生浸透圧環境における順応可能ニッチは低温・高温の両方向に少なくとも出生浸透圧環境と同程度まで拡大しているだろう。一連の結果から、以上の順応可能ニッチの拡大過程が推定された。

## 第2節 予備適応の獲得過程

McCormick (1994)は、サケ科魚類の高張環境における浸透圧調節機構の発達には3つの主要な様式があることを指摘した。すなわち、(1)生活史初期の個体発生に伴う外的環境要因とほぼ独立した発達様式、(2)より後の生活史ステージにおける日長に制御された発達様式、(3)塩分との直接の接触による発達様式である。(1)の発達様式はカラフトマス・マスノスケなど孵化後間もなく降海する種でみられる(McCormick 1994; Gallagher et al. 2013)。(2)はタイセイヨウサケ・ニジマス・ギンザケなど、1年以上の河川生活期を経て降海する種でみられ(McCormick 1994; McCormick 2013)。(3)はブラウントラウト・レイクトラウトなどの河口遇来種で報告されている(McCormick & Naiman 1984a; McCormick 1994; McCormick 2013)。(1)や(2)のように直接の塩分変化刺激なしに回遊開始に先立って非出生浸透圧環境に対する生理学的適応を開始する機構を予備適応<sup>1</sup>と呼ぶ。

予備適応は海洋への生態学的依存度が高いサケ類には普遍的に観られるが、その適応的意義の1つとして海洋環境移行時の生残率を向上させることが考えられる。淡水環境から海洋環境への移行は、サケ類の血漿中のイオン攪乱を引き起こすことが知られており(McCormick 2013)、その結果として海洋環境での被食リスク (Diepermk et al. 2002; Javi 1990; Handeland et al. 1996) や罹病リスク (Loge et al. 2005) を上昇させることが示唆されている。予備適応はサケ類が河口域を通過する際の浸透圧攪乱 (osmotic perturbation) を最小化するため (McCormick & Saunders 1987; Hoar 1988; McCormick 2013)、上記の死亡リスクを低下させ、適応度の向上に寄与していると推定される。

通し回遊種の予備適応に関する研究は50年ほど前からサケ科魚類を対象に精力的に行われてきた。McInerney (1963)は *Oncorhynchus* 属のカラフトマス・サケ・マスノスケ・ベニザケ・ギンザケの5種について、高張環境への選好性が発現する発生段階と、高張環境への耐性が高まる発生段階を比較し5

種全てで高張環境選好性の発現に先立って高張環境耐性が高まることを明らかにした。続いて *Oncorhynchus* 属のニジマスでも塩分耐性が降海時期の数ヶ月前に銀化変態に先立って同様に高まることが確認され (Conte & Wagner 1965)、降海回遊に先立つ塩分耐性の向上が本属にとって普遍的な性質であることが強く示唆された。さらに、ニジマス・ベニザケ・

---

<sup>1</sup> (2)のみを特に予備適応と呼ぶこともある(例えば McCormick 2013 Chap. 6)。しかし、本論分では塩分刺激なしに高張環境における浸透圧調節機構が発達する点を重視し (1)の場合も含めることとした。

ギンザケにおけるこの塩分耐性の向上が高張環境における浸透圧調節能の向上によることが明らかになり (Conte & Wagner 1965; Clake et al. 1978), この能力の上昇には鰓の NKA 活性の上昇が寄与することを示す実験結果がギンザケ・ニジマス・マスノスケ・タイセイヨウサケで得られた (Zaugg & McLain 1970; Zaugg & Wagner 1973; Saunders & Hendersoon 1978; Ewing et al. 1979). タイセイヨウサケを用いて最近行われた一連の研究から, 海水適応に重要なイオン輸送体である NKCC や CFTR の鰓における mRNA とタンパク質の発現がスモルト化に伴って淡水中で上昇することが報告されており (Pelis et al. 2001; Nilsen et al. 2007; McCormick 2013), サケ科魚類における予備適応の至近的メカニズムはかなり詳細に明らかになってきたと言えるだろう.

サケ科以外の分類群に属する通し回遊種の予備適応に関する研究も過去 30 年ほどで大いに発展し, ヤツメウナギ (Richards & Beamish 1981; Reis-Santos et al. 2008)・チョウザメ (Allen et al. 2011)・シャッド (Zydlowski & McCormick 1997; Leguen et al. 2007; Bardonnnet & Jatteau 2008)・ウナギ属魚類 (Wilson et al. 2004; Wilson et al. 2007) などの通し回遊種にも予備適応の機構が備わること示唆する研究結果が次々と報告され, この生理特性が通し回遊種に普遍的なものであることが明らかになってきた.

予備適応の通し回遊種における普遍性や生理学的メカニズムに関する理解が大いに進展した一方, その進化過程の解明に取り組んだ研究は僅かである. 原始的はサケ類であり, 河口偶来種であるブルックトラウトでは, 日長の変化により NKA 活性が高まることが確認されなかった (McCormick & Naiman 1984). また, ブルックトラウト, そして同様の回遊生態を示すレイクトラウトの耐塩性メカニズムを誘導する最も重要な環境因子は塩分刺激そのものであると考えられており (McCormick 2013), これらサケ類の河口偶来種には予備適応の機構が備わらない可能性が考えられる. このことから, 上述の 2 種と同様の移動生態を持つ河口偶来種には予備適応の仕組みが備わらないことが示唆され, もしこれが正しいならば予備適応の仕組みが河口偶来種から通し回遊種への進化過程で獲得されたものであることを示すことができると期待される.

そこで本節では, 通し回遊種の回遊機構の原型を保持すると考えられる河口偶来種における予備適応の有無を検証することで, 最終的に, 通し回遊種における予備適応の機構の獲得過程を推定することを目的とした. 本節では以下に示す 2 つのアプローチを用いてこの課題に取り組んだ.

1 つ目のアプローチでは, 河口域の利用生態に関する知見が充実している海産河口偶来種であるスズキの野生稚魚に着目した. 本種は冬に産卵し, 稚魚の一部は春先から夏にかけて河川を淡水域にまで遡上することが知られる (Fuji et al. 2010, 2011). そこで, まず河川遡上を開始していない海域に分布する集団のうち淡水に選好性を示した個体 (遡上予備群) と河川遡上途中の河川汽水域まで遡上した個体 (遡上開始群) で淡水に直接移行した際の生残能を調べることで, 予備適応の有無を検討した. これらの実験の結果, スズキ稚魚には予備適応の仕組みが備わらないことが示唆された. そこで, 河川遡上を完了させた淡水に分布す

る個体における、浸透圧調節に重要な輸送体遺伝子の発現量を測定することで、淡水適応を完了させずに淡水に存在する個体の有無を調べた。

2 つ目のアプローチでは、スズキ稚魚に加え、海産河口偶来種であるクロダイの稚魚と、淡水産卵性の河口偶来種であるウグイの稚魚を用いた。これら 3 種について、鰓における輸送体遺伝子の発現量と非出生浸透圧環境に対する選好性の関係性に着目して予備適応の有無を検討した。具体的には、まず 3 種における淡水・海水適応機構の発達指標を特定するために各種イオン輸送体遺伝子の発現変動を調べ、3 種における淡水・海水適応マーカー遺伝子を特定した。次に、行動実験により非出生浸透圧環境選好指数を算出した各個体の鰓における環境適応マーカー遺伝子の発現量を測定し、両者の関係を調べたことで、非出生浸透圧環境への選好性に浸透圧適応機構の発達が関係するか否かを検討した。

## 第1項 低張環境を選好したスズキ稚魚の淡水適応能

### 1. 材料と方法

#### 供試魚

本実験に用いたスズキは 2013 年 5 月 21 日に付近に大きな流れ込みがない舞鶴湾和田の碎波帯において、サーフゾーンネットを用いて採捕した。採捕した個体は、現場海水で満たした 20-1 のふた付プラスチックバケツに入れ、十分に通気した状態でおよそ 15 分かけて京都大学舞鶴水産実験所まで輸送した。実験に用いた個体の標準体長は 22.2–37.9 mm であった。続く低張環境選好性検証実験までの 2-5 日間、ろ過海水を掛け流した 200-1 の透明なポリカーボネートタンク中で十分に通気した条件で(600 ml/min)給餌せずに飼育した。

#### 試験水

淡水には舞鶴湾に注ぐ伊佐津川の下流淡水域の河川水 (Sal. 0.1)を、海水にはろ過海水を用いた。選択実験を開始する 24 時間前までに、室温を 25°C に設定した実験室に設置した 500-1 のポリカーボネートタンク中に試験水を入れ、実験時には両試験水の水温が等しくなるようにした。浸透圧環境選択試験時に通気すると水槽内の浸透圧構造を攪拌してしまうため、試験に用いた海水と淡水は試験水槽に注水する前に強通気して酸素を飽和させておいた。

#### 浸透圧環境選択試験

低張環境選好個体の抽出実験は 2013 年 5 月 23 日から 5 月 27 日にかけて、アクリル実験水槽 (幅: 280 mm, 奥行き: 170 mm, 高さ: 160 mm) (Fig. 3-2-1) を用いて、室温を 25°C に設定した室内環境で行った。まず、この選択水槽に高さ 63 mm まで海水を注水 (3-1)し、供試魚を 1 個体入れた後、10 分間馴致した。その後、水位が 126 mm に達するまで海水を注水し、水位が目標の高さに達し次第 5 分間のビデオ撮影を行った。撮影終了後、水槽の上部

半分 (3-1) を淡水の河川水で置換した。このとき試験水槽の浸透圧構造は、海水の上に低張の河川水が乗った状態となる (Fig. 3-2-1)。決められた高さまで水位が達し次第、再び 5 分間のビデオ撮影を行った。行動観察が完了した個体は海水 (対照区) もしくは淡水河川水 (実験区) で満たされたアクリル水槽 (幅: 280 mm, 奥行き: 170 mm, 高さ: 160 mm) に 1 個体ずつ移行し、24 時間の間十分に通気された状態で単独飼育した。最終的に合計 13 個体を海水環境, 11 個体を淡水環境にそれぞれ移行し、これらについて 24 時間後の生残率をそれぞれ求めた。魚体のいかなる部分にも動きが見られなかった個体を死亡個体とした。

### 解析

提要環境選好個体の選抜に際して、得られたビデオ映像を 1 秒おきに観察し、水槽が海水で満たされた状態と、上部半分が淡水河川水で置換された両方の状態において、試験魚が水槽の上部 1/3 に滞在したコマ数を計測した (Fig. 3-2-1; 赤枠で囲われた領域)。なお、試験魚の位置は目を基準に定めた。上部が淡水で置換されている場合に上部 1/3 に滞在したコマ数 (Fig. 3-2-1; f2) が、水槽が海水で満たされている場合に上部 1/3 に滞在したコマ数 (Fig. 3-2-1; f1) よりも多かった個体を低張環境選好個体とした。海水環境移行群と淡水環境移行群の生残率の比較は Fisher's exact により統計解析ソフト R (R Development Core Team, 2014; [www.R-project.org](http://www.R-project.org)) を用いて行った。有意水準は 5% とした。

## 2. 結果

低張環境を選好したスズキのうち、海水に移行した 13 個体は 24 時間経過後も全個体が生残した。一方、淡水に移行した 11 個体のうち 4 個体は 24 時間以内に死亡し (Table 3-2-1), 海水に移行された集団に比べて有意に低い生残率を示した (Fig. 3-2-2) (Fisher's exact test  $p < 0.05$ )。

## 3. 考察

淡水に移行した個体のうち 3 割強が 24 時間後に死亡した。海水に移行した個体はその全てが 24 時間生残したことから、淡水で死亡した個体は行動実験や移行のストレスではなく、淡水へ順応できずに死亡したものと考えられる。通し回遊種における予備適応の有無を、非出生浸透圧環境に直接移行した際の生残率により検討した先行研究では、回遊時期になると少なくとも 9 割程度が移行後も生残することが確認されている (Zydlowski & McCormick, Allen et al. 2011)。スズキではこれよりも高い割合で死亡個体が認められた。

淡水で死亡した個体が存在した一方で、淡水移行後も 7 割弱の個体が生残した。この理由としては、(1) 河川内の低張環境から高張の海洋環境に進入してすぐに採捕されたため、低張環境順応能を保持していた; (2) 予備適応をしていたため、低張環境順応能を有していた; (3) 予備適応をしていなかったが、24 時間のうちに一定の低張環境順応能を獲得した; (4) 実験終了時まで低張環境で積極的に浸透圧調節を行う能力を持たず、淡水環境で 24 時間耐

えた、という4つの可能性が考えられる。この中で、まず(1)の可能性について、近隣の最大河川である由良川では、4-6月にかけてスズキ稚魚が河川を遡上し、ほとんどの個体は少なくとも7月まで河川淡水域に留まることが知られる(Fuji et al. 2011)。本実験の供試魚を採捕したのはスズキの河川遡上時期である5月であったため、河川から海に降るスズキはほとんど存在しないものと考えられる。加えて、サンプリング定点の付近には大きな流れ込みが存在しないため、低張環境を出たばかりのスズキが採捕される可能性も低い。以上の理由から(1)の可能性は考えにくいと言える。また、スズキは淡水順応能を有することは既に確認されており、淡水順応程度の指標の1つである、塩類細胞の二次鰓弁上での発現は淡水移行後1日後には既に開始されていることが知られる(Hirai et al. 1999)。このことから(4)の可能性も排除してよいだろう。可能性としては(2)と(3)が残るが、本実験の結果からこれ以上のことはわからない。本実験では海洋に生息しながら低張環境への選好性を示す、いわば河川遡上予備群の低張環境順応能を検討した。つづいて、河川遡上開始群ともいえる、河川汽水域に分布する個体の低張環境順応能を調べた。

## 第2項 汽水域まで遡上したスズキの淡水適応能

### 1. 材料と方法

#### 供試魚

本実験に用いたスズキは2013年6月10日に、伊佐津川の河口から1km上流の汽水域(塩分19.2)において、サーフゾーンネットを用いて採捕した。採捕した個体は、現場の河川水で満たした20-1のふた付プラスチックバケツに入れ、十分に通気した状態でおよそ15分かけて京都大学舞鶴水産実験所まで輸送した。実験に用いた個体の標準体長は32.4-53.2mmであった。

#### 移行試験

舞鶴水産実験所までスズキを輸送後、採捕した現場の汽水(塩分19.2)、もしくは伊佐津川下流の淡水で満たされた200-1のポリカーボネートタンク中に14-18個体ずつ速やかに移行した。各浸透圧条件の水槽をそれぞれ3つずつ用意し、トリプリケートで実験を行った。十分に通気された条件下で24時間にわたって供試魚を無給餌飼育し、24時間後の生残率を調べた。なお、実験は屋根つきの野外飼育施設にて自然日長・温度条件で行った。

#### 解析

両浸透圧環境移行群の生残率の比較に先立って、トリプリケート間の生残率の比較を行った。その結果、トリプリケート間で生残率に差が検出されなかったため(Fisher's exact test,  $p > 0.05$ ) (Table 3-2-2), 各トリプリケートデータをまとめて解析に用いた。汽水移行群と淡水移行群の生残率の比較はFisher's exact testにより、統計解析ソフトR(R Development Core Team, 2014; www.R-project.org)を使用して行った。有意水準は5%とした。

## 2. 結果

汽水域まで遡上したスズキのうち、汽水で飼育した 49 個体は 24 時間経過後も全個体が生残した。一方、淡水に移行した 47 個体のうち 16 個体が 24 時間以内に死亡し、汽水で飼育した集団に比べて有意に低い生残率を示した(Fig. 3-2-3) (Fisher's exact test  $p < 0.01$ )。

## 3. 考察

本実験の供試魚を採捕した現場の塩分は 19.2 であり、高張環境ではあるものの海水よりも塩分が 15 程度低い環境であった。そのため、ここに生息する個体は環境水の塩分低下を経験しているはずである。それにも関わらず、淡水に移行した個体のうち 34%は移行後 24 時間以内に死亡し、先項で検討した遡上予備群と同程度の死亡率を示した。本実験の供試魚の採捕現場は河川淡水域から 100m 程度下流の汽水域であった。そのため、本実験の生残個体の生残理由としては先の実験で可能性から除外した(1)が考えられる。したがって、本実験で生残した個体の生残理由としては、(1)・(2)・(3)の 3 つの可能性が考えられるが、このいずれの理由が当てはまるかは本実験の結果からだけではわからない。

### 第3項 スズキ・ウグイ・クロダイにおける環境適応マーカー遺伝子の検討

#### 1. 材料と方法

本節の以降の実験では、河口由来種であるスズキ・ウグイ・クロダイの鰓におけるイオン輸送体遺伝子の発現量から非出生浸透圧環境への順応程度を推定した。そこでまず、3 種の淡水・海水順応時に鰓での発現量が異なる輸送体遺伝子を検討し、これらを各種の鰓における環境適応マーカー遺伝子と定義して後の実験を行った。

#### 供試魚 / 馴致期間

スズキは舞鶴市東神埼の砕波帯で際捕した 65 – 88 mm の天然個体を、ウグイは舞鶴湾に注ぐ寺川中流の淡水域で採捕した 93 – 136mm の天然個体を、クロダイは舞鶴水産実験所で一貫して海水飼育した 31 – 38 mm の人口種苗をそれぞれ用いた。これらを淡水・海水中にそれぞれ 14 日以上馴致し、淡水・海水順応個体とした。

#### 標本処理

馴致期間終了後、水槽から標本を採取し 0.08% フェノキシエタノールで麻酔した後、全個体の SL を測定した。続いて全標本の最前列の鰓弁を摘出し、RNA 抽出まで Isogen (株式会社ニッポンジーン, 日本)中で  $-30^{\circ}\text{C}$  において保存した。

#### mRNA 発現量の測定

鰓におけるイオン輸送体の mRNA 発現量を real-time PCR 法により測定した。測定したイ

オン輸送体は、スズキで CFTR・NKCC・NHE3・NCC, ウグイで CFTR・NKCCa・NKCCb・NHE3, クロダイで CFTR・NKCC・NHE3 である。ウグイとクロダイの各遺伝子については本章の第 1 節と同一の方法で行ったのでそちらを参照されたい。以下にスズキの輸送体遺伝子の測定方法についてのみ、追加で必要な情報を記す。

スズキの輸送体遺伝子については、第 1 節と同一の方法で Total RNA を抽出した後、DNase 処理を行ない、cDNA を合成した。続く Primer の作成について、スズキの NCC に関しては既知の塩基配列（井ノ口, 未発表データ）をもとに Primer 3 plus を用いて以下のプライマーを設計した (Forward: 5'-GGGCGTATTTTCATGATCTCC-3' Reverse: 5'-AATCCCGCATCATGTCAACG-3')。他の輸送体遺伝子については、クロダイと同じ Primer を用いた。スズキの CFTR・NKCC・NHE3 については、本章の第 1 節と同様の方法で分子クローニングを行ない、塩基配列を決定した。また、NCC を含めた 4 つ全ての輸送体遺伝子について  $10^{10}$  copies/ml の濃度のプラスミド DNA 溶液を作成し、これをもとに、 $10^2\sim 10^8$  copies/ $\mu$ l の濃度の希釈系列を作りスタンダードとした。

## 解析

測定した mRNA 発現量を各種の淡水・海水順応群間で比較した。比較には Welch's t-test を用い、発現量に差が認められた遺伝子をマーカー遺伝子とした。統計解析には、Excel stat 2008 を用い、全ての解析の有意水準を 5% とした。

## 2. 結果

スズキでは海水馴致群の CFTR・NKCC1 の発現量が淡水馴致群に比べて有意に高い値を示し、NCC・NHE3 の発現量が淡水馴致群で海水馴致群に比べて有意に高い発現量を示した (Table 3-2-4) (Welch's t-test  $p < 0.05$ )。ウグイでは海水馴致群で CFTR・NKCC1a の発現量が淡水馴致群に比べて有意に高い発現量を示した (Table 3-2-3) (Welch's t-test  $p < 0.05$ )。淡水で発現量が有意に上昇する遺伝子はウグイについて調べたものの中には確認されなかった。クロダイでは CFTR・NKCC1 の発現量が海水馴致群で淡水馴致群に比べて有意に高く、NHE3 の発現量が淡水馴致群で海水馴致群よりも有意に高かった (Table 3-2-3) (Welch's t-test  $p < 0.05$ )。以上の結果から、スズキとクロダイでは CFTR・NKCC1 が、ウグイでは CFTR・NKCC1a がそれぞれ海水適応マーカーとして使用可能であり、スズキでは NCC・NHE3 が、クロダイでは NHE3 がそれぞれ淡水適応マーカーとして使用可能であることが明らかになった。

## 3. 考察

NHE3 と NCC は淡水中におけるナトリウムイオンの取り込みに寄与し淡水中で重要な働きを持つと考えられている (Watanabe et al. 2008; Inokuchi et al. 2009; Hiroi et al. 1999; Kirschner 2004; Prest et al. 2004; Hiroi and McCormick 2012)。一方、海水中では CFTR が塩化物イオンの排出に関与し、NKCC1 は NKA の働きにより生じた電気化学的勾配にそって、陽イオン

を細胞外液から塩類細胞中に取り込む働きをしていると考えられている (Evans et al. 2005). NCC の発現量はスズキでのみ測定したため、ウグイとクロダイにおける発現動態については不明だが、スズキでは淡水順応時に鰹で増加するという、先行研究から予想される動態を示した。スズキとクロダイの両方で調べられた遺伝子については両種で同様の振る舞いが観察された。すなわち、海水順応時に CFTR・NKCC1 が増加し、淡水中で NHE3 が増加するという、よく知られる一般的な発現動態である。一方、ウグイでは NKCC1 について2つのサブタイプが確認され、その一方の NKCC1a のみが海水順応時に発現上昇した。CFTR は海水順応時に発現量が上昇し、一般によく知られる振る舞いを示した。また、一般に淡水適応時に重要な働きを持つと考えられている NHE3 の発現量が淡水・海水順応時で変化しないという、一般的な魚種とは異なる傾向を示し、一般的な浸透圧調節機構とはやや異なる仕組みで浸透圧調節を行うことが示唆された。これは、ウグイがコイ科という、これまでに淡水中や海水中におけるイオン輸送体の発現動態に関する研究がほとんど行われてこなかった分類群に属し、非出生浸透圧環境における独自の浸透圧調節を進化させたために観察されたものと考えられる。

#### 第4項 淡水域まで遡上したスズキの淡水適応程度

##### 1. 材料と方法

##### 供試魚・標本処理・解析

2013年7月19日に伊佐津川下流の淡水域(塩分0.1)において8個体を採捕した。これを現場河川水で満たした20ℓのふた付プラスチックバケツに入れ、十分に通気した状態でおよそ15分かけて京都大学水産実験所まで輸送したのち、直ちに0.08%フェノキシエタノールにより麻酔し、SL・BWを計測した(Table 3-2-4)。計測後、全ての標本から最前列の鰹弁を摘出し、RNA抽出まで Isogen (株式会社ニッポンジーン, 日本)中で-30°Cで保存した。その後、本章の1節1項と同様の方法で Total RNA を抽出した後、マーカー遺伝子として使用可能であることがわかった CFTR・NKCC1・NHE3・NCC の mRNA 発現量を測定し、それぞれの遺伝子の発現量が淡水順応時の値を示すか否かを個体ごとに検討した。

##### 2. 結果

個体2-4,そして個体6-8における全てのマーカー遺伝子の発現量は淡水順応時の発現量の範囲内に収まった。一方、個体1では NHE3 の発現量が、個体5では CFTR の発現量がそれぞれ海水順応時の発現量の範囲内の値を示した (Fig 3-2-4)。

##### 3. 考察

本実験の目的は、「河口遇来種が予備適応なしに非出生浸透圧環境に進入する」という仮説を支持する証拠を天然の遡上個体より得ることであった。すなわち、天然環境で淡水に分布するにもかかわらず、マーカー遺伝子の発現量が海水順応時の値を示す個体が存在すれ

ば、上記の仮説を支持する一つの証拠になると考えられた。発現量を調べた 8 個体のうち 6 個体では、すべてのマーカー遺伝子の発現量が淡水適応時の値を示した。しかしながら、個体 1 では NHE3、個体 5 では CFTR の発現量がそれぞれ海水順応時の値を示した。このことは、淡水順応を完了させずに淡水まで遡上する個体が存在することを意味する。これらの遺伝子発現量が淡水中で海水順応時の発現量を示すことは、淡水での浸透圧調節に支障をきたす可能性がある。この事実は、河口由来種が予備適応なしに非出生浸透圧環境に進入するという結論を支持する一つの生態学的証拠と言えよう。また、個体 1 と 5 でそれぞれ別の遺伝子が海水適応時の値を示したことから、スズキの淡水適応に関わる遺伝子の調節機構には、個体差があることが示唆される。

## 第5項 非出生浸透圧環境先行指数とマーカー遺伝子の発現量の関係

### 1. 材料と方法

#### 供試魚

本実験に用いたスズキは 2013 年 5 月 14 日に付近に大きな流れ込みのない、舞鶴湾和田の砕波帯において、サーフゾーンネットを用いて採捕した。採捕した個体は、現場海水で満たした 75-1 のふた付プラスチックバケツに入れ、十分に通気された状態で、およそ 10 分かけて京都大学舞鶴水産実験所まで輸送した。実験に用いた個体の標準体長は 22.7–37.9 mm である (Table 3-2-5)。続く浸透圧環境選択試験までの 1~3 日間、ろ過海水を掛け流した 500-1 の透明なポリカーボネートタンク中で十分に通気された条件で(600 ml/min)給餌せずに飼育した。

ウグイは 2014 年 8 月に若狭湾に注ぐ由良川の下流淡水域でサーフゾーンネットを用いて採捕した。これらを、現場河川水で満たした 75-1 のふた付プラスチックバケツに入れ、十分に通気した状態で、およそ 40 分かけて京都大学舞鶴水産実験所まで輸送した。実験に用いた個体の標準体長は 56.1 – 67.8 mm である (Table 3-2-5)。浸透圧環境選択試験までの間、現場河川水で満たされた 500-1 の透明なポリカーボネートタンク中で十分に通気された条件で(600 ml/min)1 日 1 回の飽食給餌条件 (川魚のえさ ジェックス株式会社。日本) で飼育した。

クロダイは京都大学舞鶴水産実験所における屋根付きの野外飼育施設において、自然日長・水温条件下で一貫して海水飼育した人口種苗を用いた。実験に用いた個体の標準体長は 37.7 – 47.6 mm である (Table 3-2-5)。浸透圧環境選択試験までの馴致期間中は、過海水を掛け流した 500-1 の透明なポリカーボネートタンク中で十分に通気した条件で(600 ml/min) 1 日 1 回の飽食給餌条件 (おとひめ S2,日清丸紅飼料株式会社。日本) で飼育した。

#### 浸透圧環境選択試験

全ての実験は室内実験室で、種ごとに異なる試験水槽を用いて 7:00 から 17:00 の間に行った。海水にはろ過海水を、淡水には伊佐津川淡水域下流の淡水を用いた。浸透圧環境選択

試験時に通気すると水槽内の浸透圧構造を攪拌してしまうため、試験に用いた海水と淡水は試験水槽に注水する前に強通気して酸素を飽和させておいた。この処理を試験開始の少なくとも 24 時間前までに行うことで、淡水と海水の温度を同様にしておいた。すべての魚種で試験は 1 個体ずつ行った。各種の具体的な試験方法は以下の通りである。

#### スズキ

スズキの浸透圧環境選択試験は生残実験と同じ実験水槽を用い (Fig. 3-2-1), 同様の方法で 2013 年 5 月 15 日から 17 日にかけて行った。選択試験に供した 12 個体中 3 個体について、選択試験終了時の表層塩分と底層塩分を屈折率測定方式の測定したところ、3 個体全てで、表層塩分 : 0・底層塩分 : 35 であった。本種に関しては浸透圧構造の攪乱がほとんど認められなかった。試験水温は 17.5–20.0°C であった。

#### ウグイ

ウグイの浸透圧環境選択試験は、Fig. 3-2-5 に示した実験水槽を用いて 2013 年 8 月 20 日から 8 月 30 日にかけて室内実験室で行った。垂直方向の移動で両浸透圧環境が選択できたスズキの試験水槽と異なり、この水槽では中央の亚克力板で仕切られた左右の区画に浸透圧の異なる試験水が注水してあり、仕切り上の領域を通じた水平方向の移動により、2 つの浸透圧環境が選択可能な構造になっている。

以下に選択試験の詳細を記す。まず、両区画に仕切りの高さまで淡水を注水した状態の試験水槽の左側の区画に試験魚を導入し 10 分間馴致した。その後、仕切りの上部 5cm まで淡水を注水し、これが完了し次第 30 分間のビデオ撮影を行った。撮影終了後、試験魚が左側の区画にいる状態で中央の仕切り上に試験魚の移動を防ぐプラスチック製のネットを設置し、右側の区画から排水を行うことで右側の区画を空にし、海水でこの区画を共洗いした。ついで、右側の区画を仕切りの高さまで海水で満たし、プラスチック製のネットを除去した後、供試魚が入っている左側の区画から淡水を注水し、中央の仕切りの上部 5cm まで水位を上昇させた。この状態で再び 30 分間のビデオ撮影を行い、これが終わった時点で選択試験を終了とした。なお、ウグイは水槽外の物の動きに敏感に反応したため、本試験水槽は上面と正面以外の面を外側から青色に塗装した。さらに、実験水槽と撮影用のビデオカメラの周りを青色のビニルシートで囲うことで試験魚から周囲の環境が出来る限り見えないよう配慮した (Fig. 3-2-5 では水槽の構造を明示するために透明にしてある)。また、中央の仕切りが透明であると試験魚が仕切りを障害物と認識できない可能性が考えられたため、仕切りには青いビニル製のシートを貼り付けた。試験に供した 14 個体中 6 個体について実験終了後の底層塩分を屈折式塩分計により測定したところ、低張区 : 0–5・高張区 : 31–32 であった。実験時の水温は 22–24°C であった。

#### クロダイ

クロダイの選択試験は 2013 年 9 月 20 日から 22 日にかけて Fig. 3-2-6 に示した実験水槽を用いて行った。これはウグイで用いた試験水槽を一回り小さくしたものであり、基本的な実験手順はウグイと同様である。クロダイの場合はまず、両区画に仕切りの高さまで海水を注水したのち、左側の区画に試験魚を導入し 5 分間馴致した。ついで仕切りの上部 5cm まで海水を注入し、注水が完了し次第 30 分間のビデオ撮影を行った。撮影終了後、試験魚が左側の区画に移ったタイミングで中央の仕切り上にウグイと同様のプラスチックネットを設置し、右側の区画から排水を行うことで、この区画を空にした。ついで、この区画の 1/4 程度まで淡水を注水し、これを再び排水することでこの区画の共洗いを行った。再び仕切りの高さまで淡水を注水し、プラスチックネットを除去したのち、水位が仕切りの上部 5cm に達するまで引き続き右の区画から淡水を注水した。注水が完了し次第、この状態で 30 分間のビデオ撮影を行った。クロダイもウグイと同様、水槽外の物の動きに敏感に反応したため、試験水槽は上面と正面を除き、外側から青色で塗装し、試験水槽とビデオカメラを青色のビニル製シートで囲って実験を行った。また、中央の仕切りはウグイと同様青いビニル製のシートを貼り付け、試験魚が障害物と認識しやすいよう配慮した。試験終了時の底層塩分を試験に供した 8 個体中 3 個体で屈折式塩分計により測定したところ、低張区：0-1・高張区：30 であった。試験水温は 22-24°C であった。

#### 標本処理と mRNA 発現量の測定

全ての試験魚は浸透圧環境選択試験終了後、直ちに 0.08% フェノキシエタノールにより麻酔し、SL・BW を計測した。その後、全ての標本から最前列の鰓弁を摘出し、RNA 抽出まで Isogen (株式会社ニッポンジーン, 日本) 中で -30°C にて保存した。その後の mRNA 発現量の測定と解析は本章第 1 節の第 2 項と同様の方法で行った。

#### 解析

スズキでは、得られたビデオ動画を 1 秒ごとに解析し、水槽が海水で満たされている状態で試験魚が水槽の上部 1/3 に滞在した合計コマ数 (f1) と上部 1/2 が低張の河川水で置換された状態で試験魚が水槽上部 1/3 に滞在した合計コマ数 (f2) を記録した。f2 から f1 を引いた数を解析した合計コマ数である 300 で除した値をスズキの各個体における非出生浸透圧環境選好指数とした。ウグイとクロダイでは、得られたビデオ画像を 5 秒ごとに解析し、水槽が出生浸透圧環境の水で満たされている状態で試験魚が右の区画に滞在した合計コマ数 (f1) と、右側の区画が非出生浸透圧環境の水で置換された状態で試験魚が右の区画に滞在した合計コマ数 (f2) を記録した。f2 から f1 を引いた値を解析した合計コマ数である 360 で除した値をウグイとクロダイの各個体における非出生浸透圧環境選好指数とした。3 種について、非出生浸透圧環境選好指数と各マーカー遺伝子の回帰分析を Microsoft Excel 2010 を用いて行い、決定係数  $r^2 = 0.2$  を基準に相関の有無を判断した。

## 2. 結果

非出生浸透圧環境選好性と上記マーカー遺伝子の発現量を検討するために用いた個体の非出生浸透圧環境選好指数はスズキで-0.2 から 0.38, ウグイで-0.56 から 0.32, クロダイで-0.37 から 0.59 であった (Table 3-2-5). スズキにおけるマーカー遺伝子の発現量と非出生浸透圧環境選好指数の間で回帰分析を行った際の決定係数 ( $R^2$  値)は NCC で 0.005, NHE3 で 0.076, NKCC で 0.0003, CFTR で 0.011 であり (Fig. 3-2-7), ウグイについては NKCCb で 0.031, CFTR で 0.089 (Fig. 3-2-8), クロダイでは NHE3 で 0.043, NKCC で 0.197, CFTR で 0.037 であり (Fig 3-2-9), 全て種の全マーカー遺伝子発現量と非出生浸透圧環境選好指数の間に相関関係は認められなかった.

## 3. 考察

3 種全てについて, 非出生浸透圧環境を忌避する個体から非出生浸透圧環境を選考する個体まで, この環境に対して多用な反応を示す個体のマーカー遺伝子発現量を測定することができた. 非出生浸透圧環境を選考した個体のマーカー遺伝子発現量が, そうでない個体に比べて, その種が非出生浸透圧環境順応時に示す値に近い値を示せば, その種に予備適応の機構が備わるものと考えられたが, 3 種全てのあらゆるマーカー遺伝子発現量について, そうした傾向は認められなかった. このことは, 今回取り上げた 3 種の河口遇来種では, 非出生浸透圧環境への順応能の発現に先立って, この環境への選好性が発現することを示しており, 予備適応の機構が備わらないことを示唆する.

本実験の一つの問題点として, これまでに予備適応の機構が備わることが確認されている通し回遊種とは異なる方法で河口遇来種における予備適応の有無が検討されたことが挙げられるだろう. たとえば, タイセイヨウサケでは銀化, アメリカンシャッドとヤツメウナギでは仔魚から稚魚への変体といった明瞭な形態変化が非出生浸透圧環境への進入に先立って生ずる. そのためこれらの種では変体の前後で非出生浸透圧環境への順応機構の発現状態を比較するといった研究がなされてきた (McCormick et al. 2013a; Zydlewski & McCormick 2001; Zydlewski et al. 2003; Reis-Santos et al. 2008). しかし, 本実験に用いた河口遇来種については非出生浸透圧環境への進入に先立つこうした形態変化は知られていない. そのため, 同様の手法で予備適応の有無を調べることが出来なかった. また, 回遊の前後でこうした変体を伴わない遡河回遊性の Green sturgeon では降河が起こる日齢の前後で同様の比較が行われている (Allen et al. 2009). しかし, 河口遇来種では非出生浸透圧環境に進入する日齢に大きなばらつきがあり (たとえば Dempson & Green 1985; Radtke et al. 1999; 石崎 2009 など), 残留個体も多く存在することから (Rounsefell 1958; Fuji et al. 2013), この方法を適用することも出来なかった. そのため, 同様の方法を既に呼び適応を行うことが確認されている通し回遊種に適用しても, 予備適応の機構が検出されるか否かは厳密には不明である. 今後, 本実験と同様の方法で上記の通し回遊種で予備適応の機構が検出されることを検証することが理想的ではあるだろう.

ただし、カラフトマス(*Oncorhynchus gorbusha*), サケ(*O. keta*), マスノスケ(*O. tshawytscha*), ベニザケ(*O. nerka*), ギンザケ(*O. kisutch*)という *Oncorhynchus* 属の 5 種のサケ類について、こられの種にとっての非出生浸透圧環境である高張環境への選好性の発現時期と、高張環境での生残能の関係が、本実験に用いたものと同様の行動実験水槽を用いて検証されており、この 5 種については非出生浸透圧環境への選好性の発現に先立って高張環境での生残能が高まることが確認されている(McInerney 1959). この結果は、*Oncorhynchus* 属で高張環境選好性を示した個体が高張環境適応に重要な輸送体遺伝子等の発現を進入に先立って増加させておくといった、予備適応をしていたことを示唆しており、少なくともこの 5 種では本実験と同様の方法で予備適応が検出されているとあって差し支えないだろう。したがって、本実験で用いた 3 種の河口遇来種に予備適応の仕組みが備わらないと結論することには一定の妥当性があるものと考えられる。多様な分類群に属し、産卵場の浸透圧環境も異なる種で同様の結果が得られたことから、予備適応のせずに非出生浸透圧環境に進入するという性質は河口遇来種にある程度普遍的なものであると考えられる。

予備適応とは、浸透圧そのものでなく、日長など、浸透圧以外の環境因子の変化により非出生浸透圧環境における浸透圧調節能が発現する現象であると言える。河口遇来種は非出生浸透圧環境における浸透圧調節能力は既に保持しているし、少なくとも今回検証した 3 種は季節変化と連動した生活史を持つことから、日長変化を感知する能力も持っていると考えて差し支えないだろう。したがって、河口遇来種が予備適応の機構を獲得するためには、この 2 つの能力を関連付ける機構が備わればよく、これは比較的容易に獲得されてもよさそうなものであるように思える。さらに、本章の緒言でも触れたように、予備適応の機能の一つである非出生浸透圧環境移行時における生残率の向上は河口遇来種にとっても間違いなく有益なものであるだろう。一体なぜ、河口遇来種には予備適応の機構が備わらないのだろうか。

ブルックトラウトに降河行動に先立つ NKA 活性の高まりという予備適応が備わらないことを突き止めた McCormick & Naiman (1984)は、多様で日和見的な本種の移動生態が、予備適応の獲得に必要な選択圧を十分に提供しないのではないかと考察している。未だ、通し回遊種における予備適応の獲得メカニズムすら全く明らかになっていないため、「なぜ河口遇来種に予備適応の仕組みが備わらないのか」という問題は、それから約 30 年経過した今となっても到底明確な答えを出すことが出来ない難問であると言えるだろう。

ここでは、2 つの対立遺伝子がそれぞれ「予備適応をする」、「予備適応をしない」という表現型効果をもつ単純な 1 遺伝子座モデルを考え、この問題に対する一つの推論を導いてみることにする。以下の推論は到底現実的でないものであり、これがそのまま理由の説明として用いることができるとは思えない。それでも、今後この問題に取り組む際のなんらかのヒントは提供しうるだろう。少しでも現実との乖離を少なくするために、ここでは、移動生態が最もよく研究されているある河口遇来性のサケ類を想定して論証することにする。

今、ある河口遇来性のサケ類に、海水に順応可能な最低体サイズに達したら、長日刺激に

よって、淡水中で高張環境順応能を上昇させる、すなわち予備適応の機構を発現する表現型効果を持つ遺伝子が発現したとする。この個体が長日条件で降海した場合、本個体はこの予備適応によってもたらされる海洋環境移行時における生残能の向上という利益を享受することになるだろう。しかし、この個体はその年に降海しないかもしれない。なぜなら、河口遇来性のサケ類が降海を開始する年齢は個体によって大きくばらつく為 (Dempson & Green 1985; Radtke et al. 1999), 降海が可能な体サイズに達したからといって直ちに海に降るとは限らないからである。あるいは、そもそもこの個体はこうしたサケ類に多く見られる河川残留型かもしれないし (Rounsefell 1958), 長日ではなく、短日条件で降海する集団に属する個体群に属するかもしれない。実際、コッド岬に生息する河口遇来種のブルックトラウトは秋に降海するのだ (Bigelow & Schroeder 1953)。また、同様に河口遇来性のホッキョクイワナには年によって降海したりしなかったりする個体が存在することが知られる (Radtke et al. 1996)。そのため、本個体がもし今年降海して予備適応の利益を享受したとしても、来年もその恩恵に与ることができる保証はない。要するに、生活史の決まった段階に降海する通し回遊種に比べて、非出生浸透圧環境への日和見的な進入を行う河口遇来種では、非出生浸透圧環境に進入しない年の予備適応によるエネルギーの浪費や低張環境順応能力の低下といった不利益を被る可能性が遥かに高いように思われるのだ。このため、河口遇来種では予備適応する個体の適応度が、その個体が選択されるほど上昇しないのかもしれない。(自然選択は逆に予備適応をする個体を排除するように作用する可能性すらある)。非出生浸透圧環境に進入する年にだけ予備適応し、進入しない年には全く予備適応しないという能力をもつ個体が発現したとすれば、この変異は集団中に広まっても良さそうである。しかし、通し回遊種の残留型ですら、獲得していないそんな機構が都合よく備わるとは思えない。通し回遊性のサケ類の残留型でも、降海時期になると回遊型に比べれば僅かだが、NKA 活性の上昇が見られるのだ (Zaugg 1981; Ewing & Rodgers 1998; Nielsen et al. 2003)。予備適応の機構が進化するにはまず、種内で共通した生活史ステージに非出生浸透圧環境への進入行動が発現するという、移動生態の同期性が備わる必要あるのではないだろうか。つまり、予備適応の機構は通し回遊種になって初めて獲得可能なものであると考えられる。

#### 第4章 浸透圧調節能の獲得過程

通し回遊関連形質のエコゲノミクスはモデル生物のイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) で集中的に研究されており、画期的な成果を挙げてきた。例えば、鱗板形態を制御する *Ectodysplasin* (*Eda*) (Colosimo et al. 2005)、腹棘形態を制御する *paired-like homeodomain 1* (*Pitx1*) (Shapiro et al. 2004, Chan et al. 2010) など、本種の淡水環境への適応に重要な形態形質に影響する主要な遺伝子が特定されてきている。また、形態形質に留まらず、淡水への生理学的適応に重要である可能性のある複数の候補遺伝子も特定されている (Shimada et al. 2011)。DeFaveri et al. (2011) は北半球の 6 つの地域に近接して分布するイトヨの淡水個体群と海洋個体群を取り上げ、イトヨの淡水適応に重要な役割を果たしていると考えられている候補遺伝子の中から、淡水個体群で方向性選択に晒されている遺伝子を地域ごとに特定した。その結果、全ての地域を通じて選択のシグナルを示す遺伝子が存在しないことを突き止め、イトヨが淡水への生理学的適応を果たすには複数の異なる進化経路が存在する可能性を示した。通し回遊のゲノミクスはイトヨを対象とした研究により急速に発展していると言えるだろう。

しかしながら、イトヨだけを対象とすることには問題もある。第一に、通し回遊種は多系統的に出現する。したがって、その普遍的な進化メカニズムを理解するには多様な分類群について遺伝基盤を検討する必要があるだろう。第二に、イトヨでは淡水集団と海洋集団の間に低張環境における浸透圧調節能力に違いが認められない点が挙げられる (Grøtan et al. 2012)。Shimada et al. (2011) や DeFaveri et al. (2011) が方向性選択の検出に用いた手法は、集団におけるヘテロ接合度の期待値から導出される  $F_{st}$  値を基準にしたものであり、ヘテロ接合性が消失した遺伝子は原理的に検出できない。したがって、Shimada et al. (2011) が特定した、淡水個体群でより強い方向性選択が働いている浸透圧関連遺伝子は、必ずしも低張環境での浸透圧調節能力の能力差を生み出す遺伝子とは限らない。以上より、イトヨは、新規浸透圧調節能力の獲得に寄与した遺伝子を探索するには不向きな対象であると言えよう。より普遍的な進化メカニズムを理解するためにも、また新規浸透圧調節能力獲得の遺伝基盤を検討するためにも、浸透圧調節能力に明確な能力差をもつ種を含む、イトヨ属以外の分類群で同様の研究を行うことが望まれる。

適応放散過程にあるトラフグ属魚類には (Yamanoue et al. 2009)、遼河回遊種のメフグ (*Takifugu obscurus*) (Wu et al. 1978; Xu 1990; Yang & Chen 2004; Yan et al. 2004) とメガネフグ (*T. ocellatus*) (Wu et al. 1978)、河口偶来種のトラフグ (*T. rubripes*) (Fujita 1962) とクサフグ (*T. niphobles*) (Kato et al. 2010)、海産単一ハロハビタット種のショウサイフグ (*T. snyderi*) (松井ら, 1987) といった、遼河回遊のあらゆる進化段階に属する種が含まれる。また、トラフグ属魚類の低張環境適応能はそれぞれの低張環境への生態的な依存度に応じて異なることが示唆されている (Kato et al. 2005)。これに加えて、本分類群は分岐年代が 200–500 万年と浅く、遺伝的にごく近い関係にある (Yamanoue et al. 2009)。そのため、トラフグで解読された全ゲノム配列を他種で遺伝学的解析を行う際のリファレンスゲノムとして用いることが

でき、質の高いゲノムワイドな解析を行うことが可能である。したがって、トラフグ属魚類を使えば、通し回遊進化のゲノム科学的側面について、イトヨの研究からだけではわからなかった新たな知見が得られることが期待できる。

本章では、低張環境適応能が異なると予想されるメフグ・メガネフグ・トラフグ・クサフグ・ショウサイフグの 5 魚種について、まず低張環境への段階移行実験を行うことで低張環境適応能を評価した。次に各種の低張環境馴致時のトランスクリプトーム動態を調べることで、トラフグ属魚類の低張環境適応能獲得の遺伝基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

## 第 1 節 低張環境順応能の比較

### 第 1 項 材料と方法

#### 供試魚

メフグは中国の養殖場から提供された淡水飼育個体を、トラフグ、クサフグ、ショウサイフグは浜名湖水産実験所で卵から海水飼育された飼育個体を、メガネフグはフィリピンからの輸入個体をそれぞれ用いた。サンプリングされた個体の標準体長はメフグ 103 - 138 mm・メガネフグ 154 - 179 mm・トラフグ 121 - 157 mm・クサフグ 79 - 99 mm・ショウサイフグ 77 - 90 mm であった。

#### 低張環境への段階移行実験

##### メフグ

本種の移行実験は中国江蘇省に位置する Freshwater Fisheries Research Center (31° 31 N; 120°15 E)にて、2014 年 9 月に行った。本種は現地の養殖場で一貫して淡水飼育されていたため、移行実験開始前に 30ppt で 10 日間の馴致期間を設けた。馴致期間中は一日一回飽食給餌し(トラフグ EP4, 日清丸紅飼料株式会社, 日本), 続く試験期間中は給餌を行わなかった。移行実験は Fig. 2-1-1 に記した手順に則った。まず塩分 30 の高張条件 (対照区)・塩分 10 の等張条件 (試験区)・塩分 5 の低張条件の試験水で満たされた 500-l プラスチック製の円形水槽を 1 つずつ用意し、塩分 30 と 10 の水槽にのみ各々 40 個体ずつ供試魚を入れた。24 時間経過後、それぞれの水槽から 6 個体ずつサンプリングし、試験区の個体を予め用意しておいた 5ppt の水槽に手網を用いて移行した。このとき、対照区についても、全個体を手網で掬って実験水槽に戻す処理をすることで試験区の個体と同様の接触及び空気暴露ストレスを与え、実験区と同一の飼育密度を保つために 6 個体を間引いた。以降、実験区の個体を新しい水槽に移行する度ごとに対照区に同様の処理を施し、試験区と対照区の条件が浸透圧についてのみ異なるよう留意した。さらに 24 時間経過後、試験区の個体を 6 個体サンプリングし、残りの個体を予め用意しておいた塩分 3 の水槽に同様の手順で移行した。3 日間経過後に再び実験区からのみサンプリングし、残りの個体を 1ppt に移行、さらに 3 日後に再び実験区のみサンプリングし、残った個体を 0.2ppt(現地の水道水の塩分)に移行した。

そのさらに3日後、試験区と対照区からサンプリングし、移行実験を終了した。実験にはチオ硫酸ナトリウム(0.6 mg/l)を用いて脱塩素した水道水、及びそれに人工海水の素を溶かして塩分調整したものをを用いた。移行実験を行った施設に水温・明暗周期の調節設備が備わらなかったため、実験は水温ロガー(ティドビット V2, オンセト株式会社, 米国)で水温を記録しつつ室温(Fig. 1-1-2)・自然日長条件で行った。実験期間中の平均水温は実験区で 24.9°C, 対照区で 25.1°C であった。馴致及び実験期間中、飼育水は常に十分にエアレーションされた状態で(600 ml/min), 投げ込み式フィルターを用いて濾過した。また、蒸発による塩分変化を防ぐため、実験・馴致水槽にはビニル製の蓋を取り付けた。

#### クサフグ・トラフグ・メガネフグ・ショウサイフグ

上記4種の実験は本学附属の水産実験所に2014年10月から12月にかけて行った。クサフグ・トラフグ・ショウサイフグは孵化後一貫して、メフグも実験前に2年以上、それぞれ海水飼育されていたため4種についてはメフグで設けた高張条件での馴致期間を設けなかった。クサフグ・トラフグ・ショウサイフグの移行実験は1tのFRP水槽に500-lの試験水を入れてメフグと同じ手順で行った。ただし、メガネフグについては十分な個体数が得られなかったため、試験区2個体、対照区3個体で実験を行った。本種はFRP水槽中に設置した、縦40mm・横60mm・高さ30mmの容器中で飼育した。試験期間と低張環境への移行過程は他種と全く同じ手順で行ない、試験終了日に全個体をサンプリングした。ショウサイフグは他の4種に比べて低張環境順応性が低く、塩分でのサンプリングが終わった時点で実験を継続するのに十分な個体数が得られなくなったため、低張環境への以降は塩分1までとし、対照区も同じ時点でサンプリングした。また、本種は予備実験の際塩分3で大半の個体が死亡したため、本実験の際も塩分3に移行後12時間後にも一度サンプリングを行った。ただし、本実験の際は塩分3で他種と同様に72時間後に十分な個体数をサンプリング出来たため、12時間後に得たサンプルは後の解析には用いなかった。試験水温は、メフグの以降実験を行った水温と統一するため、水槽附属の水温調節システムにより水温を25°Cに保った。実験は止水条件で12L-12Dの明暗周期条件下にて濾過をせずに行った。実験には脱塩素された水道水及び、濾過海水を用いた。

#### 標本処理

実験水槽から取り出した個体は直ちに0.1%フェノキシエタノールで麻酔し、標準体長(SL)・体重(BW)を測定した後、ヘパリン処理したシリンジと注射針を用いて尾動脈から血液を採取し、さらに最前列の鰓弁及び腸(前腸・後腸・直腸)を摘出した。摘出した鰓弁と腸はその後RNA抽出までRNAlater(アンピオン株式会社, 米国)(メフグ)もしくはIsogen(株式会社ニッポンジーン, 日本)(メフグ以外)中で-80°Cにおいて保存した。一連の実験は東京大学の実験動物委員会によって定められた原理と手続きに則って行われた。

## 血漿浸透圧の測定

採取した血液を 5,000g で 5 分間遠心分離し、血漿を分離し、血漿浸透圧を測定するまで 30°C で保管した。血漿浸透圧は蒸気圧浸透圧計(VAPRO 5520; Wescor, Logan, UT)を用いて測定した。

## 第 2 項

### 結果

遡河回遊種のメフグは低張・高張条件下で一貫して低く安定した血漿浸透圧(273 – 296 mOsm)を示した (Table 2-1-2, Fig. 2-1-3)。本種では実験区で 4 個体、対照区で 1 個体が試験期間中に死亡した (Fig. 2-1-4)。同じく遡河回遊種のメガネフグは、低張条件では低い血漿浸透圧 (300mOsm)を示し、高張条件では高い血漿浸透圧 (341mOsm)を示した。対照区で 1 個体が死亡したが (Fig. 2-1-4)、死亡個体の尾部が欠損していたことから、これは本個体が他の個体から集中的に噛まれたことによるものと考えられる。河口偶来種のトラフグは、高張条件において 340mOsm 程度の血漿浸透圧を示した。低張条件では、塩分 1 まで血漿浸透圧を 320mOsm 程度に維持したが、塩分が 0.1 に低下すると血漿浸透圧を 300 mOsm 程度まで低下させた。本種は実験終了時まで全個体が生残した。同じく河口偶来性のクサフグは高張条件で 340 – 350 mOsm 程度の血漿浸透圧を示した。低張条件でも塩分 3 までは血漿浸透圧を 330 – 350 mOsm 程度に維持したものの、塩分が 1 になると 290 mOsm 程度まで低下し、塩分 0.1 では 240mOsm 程度まで低下した。また、本種は塩分 0.1 に移行した後にのみ、11 個体が死亡した。単一ハロハビタット種のショウサイフグは高張条件で 360 – 370mOsm と、5 魚種中最も高い血漿浸透圧を示した。塩分 10 の等張条件では 330 mOsm 程度と高張条件に比べて低い血漿浸透圧を示し、低張条件では一貫して血漿浸透圧が低下し続けた。塩分が 1 に達すると血漿浸透圧が劇的に低下し、全ての個体が死亡した。メガネフグ以外の 4 種で、高張条件の初日に比べて 11 日間後の最終日の血漿浸透圧が高くなる傾向が認められた。

本実験の結果から、RNA-seq 分析に供する個体を選抜する塩分を決定した。淡水適応能力を持つメフグとメガネフグは塩分 0.1 – 0.2 に馴致した個体から低張環境馴致サンプルを得た。淡水適応能を持たないトラフグ・クサフグ・ショウサイフグについては、概ね 300 mOsm の血漿浸透圧を示す最低塩分を、各種の低張環境適応能力を最大限発揮している条件と考え、この塩分でサンプリングした個体の中から低張環境馴致時のサンプルを得た。各種の低張環境馴致時のサンプルを得た具体的な塩分は、トラフグとクサフグが塩分 1、ショウサイフグが塩分 3.0 であった。高張環境馴致サンプルは全種、実験終了日まで塩分 30 に馴致した個体から選抜した。

## 第 2 節 トランスクリプトームの比較

### 第 1 項 材料と方法

## RNA 抽出

Total RNA の抽出試薬には Isogen を用いた。RNA-seq に供するサンプルは抽出後 RNase free water に溶かした状態で分析まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。その他のサンプルについては DNase I (株式会社ロシュ・ダイアグノティクス, 日本)を用いてゲノム DNA を分解し、直ちに cDNA の合成に供した後、残りは $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## cDNA の合成

cDNA の合成は Total RNA 2000ng から High Capacity RNA to cDNA kit (株式会社ライフテックノロジーズジャパン, 日本)を用い、製品付属マニュアルに従って 20 $\mu\text{l}$  の反応系を調製して行った。得られた cDNA は定量リアルタイム PCR 法に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## RNA-sequence 分析

### (1) サンプル調整

まず、全種について、高張条件で試験終了時まで飼育された個体(対照区)と血漿浸透圧 300mOsm 程度を維持できている最低塩分でサンプリングした個体(試験区)より得られた鰓と腸から抽出した Total RNA を 2-3 個体分ずつ用意した。鰓は 1 個体あたり、腸は前腸・後腸・直腸それぞれの部位あたり 10000ng ずつ 2-3 個体分の Total RNA をプールし RNase free water を加えて 100 $\mu\text{l}$  までメスアップしたものを RNA-seq 用のサンプルとした。血漿浸透圧が 300mOsm 程度を維持できていた最低塩分は、メフグが 0.2, メガネフグが 0.1, トラフグとクサフグが 1, ショウサイフグが 3 であった。

### (2) 分析

RNA-seq 法による分析は株式会社マクロジェン・ジャパンに委託し、HiSeq 2000 (イルミナ株式会社, 日本)にて行った。

## トランスクリプトームデータの解析

### (1) ペアエンド解析・RNA-seq 解析

まず、ペアエンド情報(pair end information)を 150-1000 にセットし、ペアエンド解析を行った。続いて、Takifugu rubripes v4.0 をリファレンスゲノムとして RNA-seq 解析を行った。このとき、遺伝子領域だけでなく、遺伝子間領域についてもマッピングを行った。これらの解析は CLC Genomics Workbench8.0 を用いて行った。本論文では、RPKM(Reads per kilobases per million)値 1.0 を閾値とし(Wang et al. 2012 Next generation microarray bioinformatics pp.270), これ以下の発現量は 0 として後の解析を行った。

*As RPKM roughly equals transcripts/cell for hepatocyte-sized cells, a threshold on the order of one RPKM is reasonable.*

## (2) 発現量比解析(Fold change analysis)

各種の鰓と腸について、高張環境馴致時に対する低張環境馴致時の発現量比を算出することで発現変動行列を得た。このうち、発現量が2倍以上低下、もしくは上昇した遺伝子を発現変動遺伝子(DEGs)と定義した。このとき、以下に示す2つの計算上の工夫をした。まず、低張環境における発現量が1以上で高張環境における発現量が0である場合、高張環境における発現量0を1として扱うことで低張環境における発現量の増加を検出できるようにした。この方法は発現量を過小評価する可能性があるが、大まかな傾向を捉える分には大きな問題はないと考えられる。次に、低張環境における発現量が0で、高張環境における発現量が1以上の場合、発現変動量が0になる。しかし、本論文では RPKM=1.0 を閾値とし、これ以下の発現量を0として扱っているため、もし1.0未満の発現量が一定の定量精度を持つ場合、発現量の減少を過大評価してしまう。この場合、低張環境における発現量0を1として扱うことで、高張環境での発現量が大きければ大きいほど発現変動量が小さくすることができる。こうすることで、低張環境における発現量の低下の傾向を捉えられるようにした。

## (3) クラスタ分析

各種・組織ごとの発現変動行列を群平均法による階層的クラスタリングにより分析した。本解析には統計解析ソフト R を用いた。

## (4) アノテーション

Blast2GO を用いて得られた配列情報のアノテーションを行った。データベースには **non-redundant protein sequences** を用い、E-value の閾値は  $1.0 \times 10^{-3}$  とした。

## (5) DGEs 数の比較

## (6) ベン図解析

## (7) GO 解析

### Real-time PCR による mRNA 発現量の測定

RNA-seq の定量精度を評価するために、鰓と腸における合計6つの遺伝子の mRNA 発現量を定量リアルタイム PCR 法により測定した。鰓については働きがよく知られたイオン輸送体である CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) と NHE3 (sodium-hydrogen exchanger 3)、メフグとメガネフグでのみ発現上昇遺伝子に分類された Pdlim2 (PDZ and LIM domain protein 2)、全種で発現上昇遺伝子に分類された cish (Cytokine-inducible SH2-containing protein) の4遺伝子を、腸では働きがよく知られたイオン輸送体である NKCC2

(sodium-potassium-chloride cotransporter 2), メフグとメガネフグでのみ発現上昇遺伝子に分類された NCC (sodium-chloride symporter), 鰻と同様, 腸においても全種で発現上昇遺伝子に分類された cish の 3 遺伝子についてそれぞれ分析した. 測定方法を以下に詳述する.

#### (1) Primer の作成

全ての遺伝子について, トラフグゲノム配列を参照し, Primer 3 plus を用いてプライマーを設計した. 内部標準遺伝子である 18S rRNA については, それぞれの遺伝子について, 過去に塩基配列が調べられた種の配列情報を参照し, 保存性の高い領域にプライマーを設計した.

#### (2) Real-time PCR

先に合成した cDNA を用いて, 上述した各遺伝子の mRNA 発現量を測定した. 装置および試薬は LightCycler 480 および LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics)を用いた. PCR 反応は 0.2 $\mu$ M のプライマーセットおよび製品付属マニュアルに従って 20 $\mu$ l の反応系を調製して行った. データは 18S rRNA の発現量を用いて標準化した, データの解析は Light Cycler® 480 Software release 1.5.4 SP4 (Roche Diagnostics)を使用して行った. なお, 内部標準として用いた 18S rRNA については 10<sup>10</sup> copies/ml の濃度のプラスミド DNA 溶液を基に 10<sup>2</sup> ~ 10<sup>8</sup> copies/ $\mu$ l の濃度の希釈系列を作り, これをスタンダードとした. RNA-seq 法による発現量の妥当性の検討のために測定した NCC 以外の遺伝子のスタンダードとしては, それぞれの遺伝子が多く発現しているサンプルの cDNA を 25 倍希釈したものを基に, 2<sup>0</sup> ~ 2<sup>4</sup> 倍の希釈系列をスタンダードとして用いた. NCC では種・腸内部位間で 1000 倍以上の大きな発現量差が認められたため, 発現量が高かったメフグの低張環境順応個体の直腸の cDNA を 20 倍希釈したものを基に, 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>6</sup> 倍の希釈系列を作成し, これをスタンダードとした. 高張・低張環境馴致時の発現量差の検定には Welch's *t*-test を用いた. すべての検定は危険率  $\alpha = 0.01$  と 0.05 の両方について検討した. Welch's *t*-test はエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd.)を用いて行わ

## 第 2 項 結果

### 階層的クラスタ分析

鰻でメフグとショウサイフグが, 腸でトラフグとクサフグがそれぞれ同一クラスターに分類された. いずれの組織でもクラスターは 1 つ以上形成されず, 低張環境順応能力と発現変動パターン間に明瞭な関係は認められなかった.

### DGEs 数の比較

鰻と腸で発現上昇した遺伝子と, 鰻で発現減少した遺伝子の数はショウサイフグで突出して多かった. 腸で発現減少した遺伝子の数については顕著な差異が認められなかった.

## ベン図解析

最も低い低張環境適応能をもつ単一ハロハビタット種のショウサイフグでのみ低張環境に応答して発現変動を示さない遺伝子が鰓で 4 個、腸で 3 個認められ、本種の鰓でのみ発現が低下しない遺伝子の中には海水適応に重要な *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) が含まれた。また、メフグとメガネフグでのみ発現上昇がみられた遺伝子が鰓と腸でそれぞれ 8 個ずつ、発現低下がみられた遺伝子が鰓で 14 個、腸で 7 個ずつあり、2 種の腸でのみ発現上昇した遺伝子の中には淡水適応に重要な *sodium-chloride cotransporter* (NCC) が含まれた。全種で協調して発現上昇・低下した遺伝子は鰓で 3 個、腸で 5 個認められた。中でも *cish* (Cytokine-inducible SH2-containing protein) は全種の鰓と腸で発現上昇した唯一の遺伝子であった。

## GO 解析

鰓で上方調節された遺伝子におけるエンリッチメント解析の結果、メガネフグで 70 個・クサフグで 76 個・ショウサイフグで 189 個の GO がそれぞれエンリッチされた。(Table 2-2-@-@+2) ショウサイフグとメガネフグで共通してエンリッチされた GO が 69 個、ショウサイフグとクサフグで共通してエンリッチされた GO が 46 個、3 種で協調してエンリッチされた GO が 26 個認められた (Fig. 2-2-@)。鰓で下方調節された遺伝子においてはメガネフグで 2 個、ショウサイフグで 51 個の GO がそれぞれエンリッチされ、両種で共通する GO は認められなかった (Fig. 2-2-@)。鰓で上方調節された遺伝子におけるエンリッチメント解析の結果、メフグで 14 個・メガネフグで 13 個・トラフグで 9 個・クサフグで 15 個・ショウサイフグで 163 個の GO がそれぞれエンリッチされた。各種でエンリッチされた GO の重なり方は Fig. 2-2@ に示したとおりである。腸で下方調節された遺伝子については、メガネフグで 51 個・トラフグで 8 個・クサフグで 24 個の GO がそれぞれエンリッチされた。メガネフグとクサフグでは 9 個の GO が協調してエンリッチされた。

## Real-time PCR

RPKM 値が 1.0 以上の全ての遺伝子について、RNA-seq 分析に用いたサンプルの Real-time PCR 法と RNA-seq 法の定量結果で同様の傾向が認められた。RPKM 値が 1.0 以上の遺伝子について、real-time PCR の測定結果では発現に有意差が認められなかったにも関わらず DEG に分類された、もしくは有意差があるにもかかわらず DEG に分類されなかった場合はメフグの *NHE3*・メフグの *Pdim2*・メガネフグの *Pdim2*・トラフグの *Pdim2*・メフグの *NKCC2* の 5 つであった。

### 第3節 考察

#### 第1項 5種の低張環境順応能

メフグ・トラフグ・クサフグ・ショウサイフグの4種は低張環境への移行に際して複数の時点でサンプリングを行った。この中で、等張の塩分10と各種の血漿浸透圧を測定した最低塩分における血漿浸透圧の変化はメフグが最小であった。メガネフグについては塩分0.1と30でサンプリングを行ったのみであったが、塩分0.1の条件でも300mOsmを超える血漿浸透圧を大きな個体差がみられない範囲で維持していた。メフグとメガネフグはいずれも淡水産卵種であり、淡水条件でも個体によって大きくばらつくことなく一定の血漿浸透圧を維持していた。このことから両種は高度な低張環境順応能を持つものと考えられる。メフグの血漿浸透圧が高張・低張両環境において290–270mOsm程度の低い値を維持したのに対し、メガネフグの血漿浸透圧は高張条件で340mOsm程度と高く、低張条件で300mOsm程度に低下した。このように、同じ淡水産卵種でも低張・高張環境に馴致された際の血漿浸透圧の動態は大きく異なり、両種の低張環境順応機構は異なることが示唆される。Kato et al. (2005)は、10–330gのメフグを海水から淡水に直接移行して10日間が経過しても、死亡個体が全く認められないことを報告している。本実験では段階移行したにも関わらず、塩分1で3個体が死亡し、塩分0.2で追加でさらに1個体が死亡している。明確な理由は不明だが、対照区でも1個体が死亡していることから、本研究で使用した供試魚の状態がKato et al. (2005)が用いたものに比べて悪かった可能性が考えられる。本研究で使用した個体は60g前後であり、Kato et al. (2005)も同程度の大きさの個体を実験に用いていることからサイズによる理由は考えにくい。

メフグ・メガネフグについて高い低張環境順応能を示した種はトラフグであった。本種は塩分3まで個体差を小さな範囲にとどめながら323–330 mOsm程度の血漿浸透圧を維持した。塩分1では値を316 mOsmまで低下させたものの、依然として大きな個体差は認められなかった。塩分が0.1にまで低下すると289 mOsmまで血漿浸透圧を低下させ、ばらつきが大きくなった。本種では対照区と試験区の両方で死亡個体が全く見られなかった。海水から淡水への直接移行実験を行ったKato et al. (2005)でも、本種を淡水へ移行して3日が経過しても90%以上の個体が生残するという、本実験と同様の結果が得られている。

クサフグはトラフグに比べてやや低い低張環境順応能を示した。本種も塩分3までは334–343mOsm程度の血漿浸透圧を小さな誤差範囲内で維持したが、塩分が1に低下すると値を293mOsm程度まで大幅に低下させ、さらに0.1pptまで低下すると245mOsm程度まで低下した。また、塩分0.1に馴致した3日間のうちに9個体が死亡した。これはKato et al. (2005)が得た結果と異なるものである。Kato et al. (2005)では海水から淡水への直接移行でも3日間にわたって全く死亡個体がみられない。この違いがみられた理由としてはまずサイズ差が考えられる。Kato et al. (2005)の直接移行実験では18–128gの個体が用いられたのに対し、本研究では直接移行実験に用いられた最低サイズである20g程度の個体のみを用いている。また、直接移行実験では低張環境への進入経験をもつ可能性のある天然個体が使

用されているが、本実験では一貫して海水飼育された人工種苗を用いた。移行試験に供されるまでの個体の経験が実験結果に影響した可能性も考えられる。

最も低い低張環境順応能を示した種はショウサイフグであった。本種は低張環境で一貫して血漿浸透圧を低下させ続け、塩分が 1.0 まで低下すると 3 日のうちに合計で 9 個体が死亡し、これ以上のサンプリングが不可能となった。ただし、本種も塩分 3 までは小さい誤差範囲内で 300mOsm 程度の血漿浸透圧を維持していたことから、一定の低張環境耐性を有することが示唆された。本種はまた、塩分 30 で 363-367mOsm と 5 種中最も高い血漿浸透圧を示した。これは本種が沖合性の生活史を進化させる過程で高い体液浸透圧に適応した結果とみなすこともできるかもしれない。しかし、本種はほぼ等張の塩分 10 では血漿浸透圧 333mOsm と値を 30mOsm 程度低下させた。このことから、本種は浸透圧調節コストを節約しているが故に高張条件で高い血漿浸透圧を示す可能性が考えられた。

本実験の結果、低張環境順応能はショウサイフグ<クサフグ<トラフグ<メフグ=メガネフグの関係にあることが明らかになった。これは低張環境に対する生態的依存度を反映したものと考えられる。

## 第 2 項 低張環境順応能と発現変動パターンとの関係

5 種の鰓と腸より得られた発現変動行列について、組織ごとに階層的クラスタ解析を行った。その結果、腸でトラフグとクサフグが同一クラスタに分類された点を除き、低張環境順応能力と発現変動パターンとの間に明瞭な関係は認められなかった。これは、トラフグ属魚類において同じ低張環境順応能力を発揮するための多様な機構が存在することを示唆する。ただし、発現変動パターンに大きな個体差がみられる遺伝子を除去する、あるいは浸透圧調節に重要な遺伝子とそうでない遺伝子に適切な重み付けをするという処理を、今回の解析では行っていない。こうした処理を行うことで今回とは異なる結果が得られる可能性は十分にある。解析個体を増やすことでばらつきの大きな遺伝子を除去し、遺伝子に適切な重み付けをした解析を行うことは今後の課題である。

## 第 3 項 DEGs の数

鰓と腸で発現上昇・鰓で発現低下した遺伝子遺伝子の数がショウサイフグで最も多かった。鰓で発現低下・腸で発現上昇した遺伝子の数は特に本種で突出して多かった。移行実験の結果から本種は不完全な浸透圧調節の状態にあると考えられ、これにより生命活動に広範な悪影響を被っているものと推測される。したがって浸透圧調節に直接関係のないストレス応答系などに関与する遺伝子の発現状態も変化させている可能性がある。遺伝子を発現変動させることにはコストがかかるため（引用）、発現変動遺伝子数が多くなればなるほどコストが増大するものと推測される。このことからショウサイフグは低張環境における非効率的な調節機構をもつ可能性が考えられた。また、より高い低張環境順応能をもつ 4 種では発現変動遺伝子数がショウサイフグに比べて少ないことから、調節機構がより効率化

していることが示唆された。

#### 第4項 ショウサイフグでのみ異なる変動パターンを示した遺伝子

鰓で4個、腸で3個の遺伝子がショウサイフグでのみ異なる発現変動パターンを示した。これらの遺伝子がショウサイフグの低い低張環境順応能を規定するものである可能性がある。本種の鰓でのみ発現低下しない遺伝子の中には、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) を受動的に透過させる ATP 感受性イオンチャネルである CFTR が含まれた。本タンパク質が低張環境においても細胞膜上に発現していると、細胞内から環境水中へと濃度勾配に沿って Cl<sup>-</sup> が流出してしまう可能性がある。より順応能が高い4種では本遺伝子の発現量は大きく減少した。また、3章で登場する河口偶来種のスズキ・クロダイ・ウグイでも淡水順応時に CFTR の発現が減少することを確認している。さらに、ティラピアやサケ類でも低張環境順応時にも本遺伝子の発現が減少することが報告されている(引用)。本遺伝子は低張環境への順応に際して発現低下すべきものであることが強く示唆される。以上より、ショウサイフグでは低張環境への順応に際して浸透圧調節関連遺伝子の発現が適切に調節されていないことが示唆される。

#### 第5項 遡河回遊種特異的な変動パターンを示した遺伝子

鰓で22個、腸で15個の遺伝子が遡河回遊種の2種でのみ相同な発現変動パターンを示した。これらの遺伝子はトラフグ属魚類の淡水適応能を定義するものである可能性がある。中でも2種の腸で発現上昇がみられた NCC は定量リアルタイム PCR においても、同様の結果が確認された。また、前腸・後腸・直腸の部位ごとに発現量を調べてみると主に直腸で発現していることがわかった。NCC は淡水に適応したニホンウナギの直腸でも高発現を示し、消化管内容物からのナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)と Cl<sup>-</sup> の取り込みを担う淡水適応に重要な遺伝子であることが強く示唆されている(Watanabe et al. 2008)。Kato et al. (2011) はメフグ・トラフグ・ヒガンフグ (*T. pardalis*)・コモンフグ (*T. poecilonotus*) の4魚について、鰓・腎臓・膀胱の NCC 発現量を測定した。ヒガンフグとコモンフグは海産単一ハロハビタット種である。その結果、本遺伝子がメフグの腎臓でのみ他の3種に比べて1000–5000倍高い発現量を示すことを確認した。本研究でメフグ・メガネフグとトラフグ・クサフグ・ショウサイフグの腸において定量 PCR 法により認められた差はこれよりさらに大きく、同じ低張環境馴致時と比較してもその差は7000–46万倍に及んだ。Katano et al. (2011) はまた、メフグの鰓においては淡水・海水いずれの環境においても NCC がほとんど発現しないことを報告している。本研究で得られたデータもこれを支持するものであり、5魚種すべての鰓で飼育された浸透圧条件に依らず NCC はほとんど発現しなかった。同様の結果はニホンウナギの鰓についても報告されている(Watanabe et al. 2008)。トラフグ属やウナギ属の種は鰓でのイオンの取り込みに NCC を用いない機構を進化させているものと推定される。また、トラフグ・ヒガンフグ・コモンフグの3種においても、膀胱ではメフグと同等の高い NCC 発現を

示すことが確認されているため(Kato et al. 2011), トラフグ属の河口偶来種や海産単一ハロハビタツ種も適切に機能する NCC 遺伝子そのものは保持していると考えられる。したがって、トラフグ属魚類の低張環境適応能の向上に重要なプロセスは、新規遺伝子の獲得ではなく、特定の器官における既存の遺伝子の発現調節システムであることが示唆される。

RNA-seq 法の結果からメフグとメガネフグの鰓でのみ発現上昇遺伝子に分類された *Pdlim2* は細胞移動に関わる遺伝子である。鰓における塩類細胞の分布変化が淡水適応に重要であることが多様な魚種で報告されていることから(例えば Hirai et al. 1998), 本遺伝子も 2 種の低張環境適応能を規定する重要な遺伝子である可能性が考えられた。ところが、定量 PCR で発現量を測定したところ、*Pdlim2* は低張環境馴致時に有意な発現上昇を示さないことがわかった。メフグでは RNA-seq 法に供した 3 個体では比較的明瞭な上昇傾向が認められたが、サンプリングした全 6 個体の平均値をみると緩やかな上昇傾向が確認される程度であった。メガネフグでも RNA-seq 法で検出されたほど顕著な発現上昇は見られず、本遺伝子は実際には低張条件で発現上昇していないことが示唆された。Table 2-2@に示した遺伝子の中には *Pdlim2* のように実際の発現変動パターンが検出されていないものが他にも含まれる可能性があり、この点は留意する必要がある。こうした誤差がどの程度存在するかを検討するために、鰓と腸においていくつかの遺伝子の発現量を定量 PCR 法により測定し、得られた発現動態を RNA-seq 法より得た結果と比較した。

## 第 6 項 定量精度

RNA-seq 法により得られたデータのうち、解析に用いた RPKM 値 1 以上の遺伝子については、発現量が上昇もしくは低下したという発現変動の方向性が、RNA-seq 法により得られた結果と定量 PCR 法により得られた結果でほぼ一致した。唯一の例外はショウサイフグの *Pdlim2* であった。本遺伝子は RNA-seq 法ではわずかな上昇を示した(RPKM4.1→4.3)のに対し、定量 PCR 法では同一サンプルについてわずかな減少を示した ( $18s \times 10^3$  0.98 → 0.95)。このように、両方法で結果が食い違う遺伝子が存在したが、大きな差異があったわけではなく、全体の傾向を議論するには大きな問題はないものと考えられる。

変化の方向は両手法で概ね一致したが、変化の幅に関しては一定の差異が認められた。そのため、RNA-seq 法では 2 倍以上の際が検出され DEGs と認められた遺伝子のうちの 2 つで、定量 PCR の結果有意さが検出されなかった。それはメフグとメガネフグの *Pdlim2* であった。これらの遺伝子は、RNA-seq の結果からは基準値である 2 の近傍値で DEG に分類された(メフグ: 2.04 メガネフグ: 2.00)。一方、定量 PCR では同じ傾向が認められるものの有意差が検出されなかった。メフグでは RNA-seq 用にプールしたサンプルのみを定量した結果からは同様の傾向が検出されるため、サンプリングした 6 個体中の個体差の偏りが、見かけ上の DGE を生み出したものと考えられる。メガネフグでは RNA-seq 用にプールしたサンプルと全く同じものを分析したにも関わらず、異なる動態が認められた。メガネフグの測定方法による結果の食い違いは、2 つの方法の定量精度の違いにその原因があるように

思われる。このように、今回の解析基準では、基準値の近傍で DEG に分類されたものの中には実際には発現変動しないものが含まれる場合がある。

また、今回の DEGs の判定基準では、実際に発現量に差が存在する場合でも、それが 2 倍未満であれば DEGs に分類されない。そうした遺伝子が 3 個確認された。メフグの NHE3、トラフグの Pdlim2、メフグの NKCC2 である。メフグの NHE3 については、RNA-seq の結果では低張環境で発現が減少する傾向が認められたが、高張環境順応時との差が 2 倍に達しないため、DEGs に分類されなかった。定量 PCR では差が 2 倍に達しないものの、1%水準で有意差が認められた。トラフグの Pdlim2 とメフグの NKCC2 については、基準値近傍の値で DEG に分類されなかった（トラフグ：1.77 メフグ：0.55）。トラフグの Pdlim2 についてはサンプリングされた全サンプルでのみ、5%水準で、メフグの NKCC2 については RNA-seq 用にプールした 3 個体と、サンプリングした全個体でそれぞれ 5%と 1%水準で有意差が検出された。

こうした DEGs の検出感度の制約は全体に均等に作用するため、全体の傾向を論ずるに際しては大きな問題はないと思われる。ただし、発現量差が 2 倍以内で、進化上重要な遺伝子があった場合、それは見過ごすことになる。DEGs に分類する閾値を小さくすればこうした遺伝子も抽出できるかもしれないが、その分ノイズ（実際には発現変動していない遺伝子を DEGs として拾うケース）が大きくなる。この点は各サンプリング定点で 1 サンプルのみを分析した今回の分析手法の限界と言えよう。閾値を下げる解析を行うためにはサンプル数を増やして個体差の少ない遺伝子のみを選別し、それについて DEGs の抽出を行うという作業工程が不可欠だろう。

#### 第 7 項 低張環境順応能獲得の遺伝基盤

トラフグ属魚類の単一ハロハビタット種であるショウサイフグにおいても一定程度の低張環境耐性を有するが、いくつかの重要な遺伝子を適切に発現調節できないため、低張環境に対する適応能が低いこと、低張環境における浸透圧調節機構がより発達した河口偶来種では、適切な発現調節が行われ、その機構が効率化していること、天然での極限的な低張環境である淡水にまで適応可能な通し回遊種は新たに NCC の様な輸送体遺伝子の発現調節システムを獲得していることが推定され、トラフグ属魚類の低張環境順応能獲得の遺伝基盤の一端が明らかとなった。

トラフグ属魚類の中で最初に分岐した種はタキフグ(*Takifugu oblongus*)である。本種はインド - 西太平洋の熱帯域に分布し、汽水域に進入する河口偶来種である (Talwar & Jhingran 1991)。分布が熱帯域であり、氷河の影響を受けにくいこと、他のトラフグ属魚類と分岐してから長くとも 470 万年(Yamanoue 2015)しか経過していないことから本種はトラフグ属の祖先種の生活史型を保持している可能性が高い。このことから、トラフグ属魚類の祖先種は河口偶来種だと考えるのが現状最も妥当な推定といえよう。単一ハロハビタット種のシ

ョウサイフグ、そして遡河回遊種のメフグとメガネフグはそれぞれ河口偶来性の祖先種から分岐したものと考えられる。

それでも、今回得られた結果は単一ハロハビタット種から河口偶来種を経由して通し回遊種が進化したと考えられている、サケ科やウナギ属の系統で推定されている進化過程を理解する助けになりうると思われる。これまでの魚類の進化過程でハロハビタットの移行は繰り返し起こってきたものと考えられる(McCormick 2013)。そのため、河口偶来性の生活史を営む祖先種をもつ単一ハロハビタット種から河口偶来種を経由して通し回遊種が進化する場合は、決して例外的なものではないと思われる。ショウサイフグほど分岐年代が浅くないにしろ、単一ハロハビタット種に起源したと考えられる通し回遊種の系統の中にも、河口偶来種から分岐した単一ハロハビタット種から進化したものが存在する可能性は十分にある。もちろん、本章で得られた知見はトラフグ属という制限の中で得られたものであり、通し回遊の普遍的な進化過程を理解する為にはより多くの系統について検討する必要があることは論を待たない。

## 謝辞

博士課程の 2 回生から私を研究室に受け入れて頂き、本研究を行う機会を与えていただくとともに、温かいご指導とご鞭撻を賜った東京大学農学生命科学研究科の大竹二雄教授に深く感謝する。日本大学生物資源科学部の塚本勝巳教授には、これ以上ない魅力的な研究テーマを与えていただくと共に、修士課程から一貫して研究のご指導とご鞭撻を賜った。心より御礼申し上げます。東京大学農学生命科学研究科の金子豊二教授には論文審査の際に留まらず、特に浸透圧調節に関わる実験に関して、多くの有益なご指摘とご指導を賜った。同所の山川卓准教授にはメタデータの解析に関して貴重なご指摘を賜った。京都大学フィールド科学教育研究センターの益田怜爾准教授には特に行動実験に関して多くの有益なご指摘を賜るとともに、投稿論文執筆に際しても大変親身にご指導いただいた。東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の菊池潔准教授にはトランスクリプトーム解析に際し多大なご助言とご助力を頂き、また研究計画や論文作成に際してご指導いただいた。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の渡邊壮一助教には、研究全体にわたり多大なご助言とご助力を頂き、特に生理学分野の実験に際しては大変丁寧にご指導いただいた。

## 引用文献

- Able KW, Fahay MP (1998) The first year in the life of estuarine fishes in the Middle Atlantic Bight. Rutgers University Press, New Brunswick NJ
- Able KW, Fahay MP. Ecology of estuarine fishes (2010) The Johns Hopkins university press, Maryland
- Ahokas, R. A., & Sorg, G. (1977). The effect of salinity and temperature on intracellular osmoregulation and muscle free amino acids in *Fundulus diaphanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 56(1), 101-105.
- Allanson BR, Bok A, van Wyk NI (1971) The influence of exposure to low temperature on *Tilapia mossambica* Peters (Cichlidae) II Changes in serum osmolarity, sodium and chloride ion concentrations. *J Fish Biol* 3:181–185
- Allen, P. J., McEnroe, M., Forostyan, T., Cole, S., Nicholl, M. M., Hodge, B., & Cech Jr, J. J. (2011). Ontogeny of salinity tolerance and evidence for seawater-entry preparation in juvenile green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Journal of Comparative Physiology B*, 181(8), 1045-1062.
- Barans, C. A. (1972). Spotted hake, *Urophycis regius*, of the York River and lower Chesapeake Bay. *Chesapeake Science*, 13(1), 59-62.
- Bigelow, H. B., & Schroeder, W. C. (1953). *Fishes of the Gulf of Maine* (Vol. 53). Washington: US Government Printing Office.
- Behnke, R. J. (2002). Comment: First documented case of anadromy in a population of introduced rainbow trout in Patagonia, Argentina. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131(3), 582-585:
- Blaber, S. J. M. (1973). Population size and mortality of juveniles of the marine teleost *Rhabdosargus holubi* (Pisces : Sparidae) in a closed estuary. *Mar. Biol.* 21, 2 19-225
- Blaber, S. J. M. (1974). Field studies of the diet of *Rhabdosargus holubi* (Steindachner) (Teleostei : Sparidae). *J. Zool.. Lond.* 173,407-4 17
- Blaber SJM AND Blaber TG (1980). Factors affecting the distribution of juvenile estuarine and inshore fish. *J. Fish Biol.* 17, 143-162
- Buhariwalla HEC, Osmond EM, Barnes KR, Cozzi RRF, Robertson GN, Marshall WS (2012) Control of ion transport by mitochondrion-rich chloride cells of eurythermic teleost fish: Cold shock vs. cold acclimation. *COMP BIOCHEM PHYS A* 162: 234–244
- Choe KP, Kato A, Hirose S, Plata C, Sindic A, Romero MF, Claiborne JB, Evans DH. NHE3 in an ancestral vertebrate: primary sequence, distribution, localization, and function in gills. *Am. J. Physiol.* 2005; 289: R1520–R1534.
- Day JH (1951). The ecology of South African estuaries. Part I: General considerations. *Trans. R. Soc. S. Afr.* 33, 53-9 1.

- Day JW, Hall CAS, Kemp WM, Yanez-Arancibia A (1989) Estuarine ecology. John Wiley & Sons, New York
- Dou, H., Huang, J., Wang, X., Fan, W., & Liu, L. (2005). Salinity tolerance and salt water acclimation of gourami *Trichogaster trichopterus*. *Journal of fishery sciences of China/Zhongguo shui chan ke xue yan jiu yuan bian ji chu ban*, 13(5), 775-780.
- Fiess, J. C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L. G., Yancey, P. H., Hirano, T., & Grau, E. G. (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(2), 252-264.
- Finstad, B., Staurnes, M., & Reite, O. B. (1988). Effect of low temperature on sea-water tolerance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 72(3), 319-328
- Foote, C. J., Mayer, I., Wood, C. C., Clarke, W. C., & Blackburn, J. (1994). On the developmental pathway to nonanadromy in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Canadian Journal of Zoology*, 72(3), 397-405.
- 藤岡康弘 (1991) ビワマス の形態ならびに生理・生態に関する研究. 醒井養鱒場研報 3: 1-112
- Hildebrand SF, Schroeder WC (1928) Fishes of Chesapeake Bay. *Bull US Bur Fish* 43:1-366
- Fuji, T., Kasai, A., Suzuki, K. W., Ueno, M., & Yamashita, Y. (2010). Freshwater migration and feeding habits of juvenile temperate seabass *Lateolabrax japonicus* in the stratified Yura River estuary, the Sea of Japan. *Fisheries Science*, 76(4), 643-652.
- Hirata T, Kaneko T, Ono T, Nakazato T, Furukawa N, Hasegawa S, Wakabayashi S, Shigekawa M, Chang MH, Romero MF, Hirose S. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am. J. Physiol.* 2003; 284: R1199- R1212.
- Hochachka PW (1988) Channels and pumps-determinants of metabolic cold adaptation. *Comp Biochem Physiol B* 90:515-519
- Houston, A. H., & Madden, J. A. (1968). Environmental temperature and plasma electrolyte regulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Nature*, 217, 969-970.
- Hurst TP, Conover DO (2002) Effects of temperature and salinity on survival of young-of-the-year Hudson River striped bass (*Morone saxatilis*): implications for optimal overwintering habitats. *Can J Fish Aquat Sci* 59:787-795
- Imsland, A. K., Gunnarsson, S., Foss, A., & Stefansson, S. O. (2003). Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 218(1), 671-683.
- Ishitobi Y, Hiratsuka J, Kuwabara H, Yamamuro M (2000) Comparison of fish fauna in three areas of adjacent eutrophic estuarine lagoons with different salinities. *J Mar Syst* 26:171-181

- Ishizaki D, Otake T, Sato T, Yodo T, Yoshioka M, Kashiwagi M (2009) Use of otolith microchemistry to estimate the migratory history of Japanese dace *Tribolodon hakonensis* in the Kamo River, Mie Prefecture. *B JPN Soc Sci Fish* 75:419–424
- Katano O, Nakamura T, Abe SI, Baba Y (2010) Population density, growth and migration via the sea to different streams of Japanese dace *Tribolodon hakonensis* in lower reaches of small streams. *Ichthyol Res* 57:1–9
- Lankford TE, Targett TE (2001) Low-temperature tolerance of age-0 Atlantic croakers: recruitment implications for US mid-Atlantic estuaries. *T Am Fish Soc* 130:236–249
- Maetz J, Evans DH (1972) Effects of temperature on branchial sodium exchange and extrusion mechanisms in the seawater-adapted flounder *Platichthys flesus*. *L J Exp Biol* 56:565–585
- Martin TJ (1988) Interaction of salinity and temperature as a mechanism for spatial separation of three co-existing species of Ambassidae (Cuvier) (Teleostei) in estuaries on the south-east coast of Africa. *J Fish Biol A* 33:9–15
- McCormick SD, Farrell AP, Brauner CJ (2013) *Euryhaline Fishes*. Elsevier, Oxford
- Metz, J. R., Van Den Burg, E. H., Bonga, S. E. W., & Flik, G. (2003). Regulation of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 206(13), 2273-2280.
- Murdy EO, RS Birdsong, JA Musick (1997) *Fishes of Chesapeake Bay*. Smithsonian Institution Press, Washington DC
- Prosser, C. L., Mackay, W., & Kato, K. (1970). Osmotic and ionic concentrations in some Alaskan fish and goldfish from different temperatures. *Physiological Zoology*, 81-89.
- Sakai H (1995) Life-histories and genetic divergence in three species of *Tribolodon* (Cyprinidae). *Mem Fac Fish Hokkaido Univ* 42:1–98
- Quinn, T. P., & Unwin, M. J. (1993). Variation in life history patterns among New Zealand chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(7), 1414-1421.
- Quinn, T. P., Kinnison, M. T., & Unwin, M. J. (2001). Evolution of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations in New Zealand: pattern, rate, and process. *Genetica*, 112(1), 493-513.
- Saunders, R. L., Muise, B. C., & Henderson, E. B. (1975). Mortality of salmonids cultured at low temperature in sea water. *Aquaculture*, 5(3), 243-252.
- Toneys ML, Coble DW (1980) Mortality, hematocrit, osmolality, electrolyte regulation, and fat depletion of young-of-the-year freshwater fishes under simulated winter conditions. *Can J Fish Aquat Sci* 37:225–232
- Umminger, B. L. (1969). Physiological studies on supercooled killifish (*Fundulus heteroclitus*) I. Serum inorganic constituents in relation to osmotic and ionic regulation at subzero temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 172(3), 283-302.

- Virtanen, E., & Oikari, A. (1984). Effects of low acclimation temperature on salinity adaptation in the presmolt salmon, *Salmo salar* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 78(2), 387-392.
- Vouglitois JJ, Able KW, Kurtz RJ, Tighe KA (1987) Life history and population dynamics of the bay anchovy in New Jersey. *T AM Fish Soc* 116: 141–153
- Watanabe, S., Niida, M., Maruyama, T., & Kaneko, T. (2008). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 expressed in apical membrane of gill mitochondrion - rich cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fisheries Science*, 74(4), 813-821.
- Whitfield, A. K. & Blaber, S. J. M. (1978b). Feeding ecology of piscivorous birds at Lake St Lucia, Part 1: Diving birds. *Ostrich* 49, 185-198.
- Whitfield, A. K. & Blaber, S. J. M. (1979). Feeding ecology of piscivorous birds at Lake St Lucia, Parts 2 & 3: Wading and swimming birds. *Ostrich* 50, 1-20.
- Yatsuya, M., Ueno, M., & Yamashita, Y. (2012). Occurrence and distribution of freshwater shrimp in the Isazu and Yura Rivers, Kyoto, western Japan. *Plankton and Benthos Research*, 7(4), 175-187.
- Yokoo T, Mito T, Iwasaki T, Sasaki T, Michine T, Aranishi F (2010) Spatial and temporal variation of fish assemblages surveyed by set-nets in Nakaumi Lagoon. *Jap J Limnol* 71:11–18 (in Japanese with English abstract)