

DNA を分類形質とした浮遊性魚卵の種査定と初期発生に関する研究

2012

東京大学 大学院 農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻
川上 達也

指導教員 東京大学 教授
塚本 勝巳

Doctoral dissertation 2012

**DNA species identification and early development of
pelagic fish eggs**

**Tatsuya Kawakami
Department of Aquatic Bioscience
Graduate school of Agricultural and Life Sciences
The University of Tokyo**

**Supervisor: Professor Katsumi Tsukamoto
The University of Tokyo**

目次

第1章 緒言	1
第1節 魚類卵期の研究	1
第2節 魚卵の種査定法	2
第3節 DNAによる種査定法	3
第4節 研究の目的	5
第2章 形態形質の有効性の検討	6
第1節 対象魚種と方法	6
第1項 対象魚種	6
第2項 受精卵の採卵および飼育方法	7
第3項 発生段階の定義	13
第4項 測定方法	13
第2節 卵の形態と初期発生の記載	13
第1項 ニホンウナギ	13
第2項 ハモ	16
第3項 ニシン	20
第4項 オニオコゼ	23
第5項 クエ	26
第6項 アカアマダイ	28
第7項 ヒラメ	28
第8項 ババガレイ	31
第9項 ヌマガレイ	34
第10項 マツカワ	37
第11項 ホシガレイ	39
第3節 孵化後のPAL/TLと筋節数の変化	39
第4節 考察	42
第1項 形態形質の安定性	42
第2項 形態形質の可塑性	43
第3項 高次分類群における形態形質の共通性	45

第 4 項	新しい分類形質の探索	46
第 5 項	形態に基づく魚卵の分類	46
第 6 項	形態形質による分類の限界	52
第 3 章	DNA 種査定法の検討	53
第 1 節	シーケンスデータの取得・解析方法	54
第 1 項	DNA データベースの探索	54
第 2 項	魚類の採集と形態による同定	54
第 3 項	DNA の抽出と増幅および塩基配列の決定	54
第 4 項	シーケンスデータの解析	60
第 2 節	既存データを用いた 16S rRNA と COI の比較	60
第 1 項	GenBank における 16S rRNA 領域と COI 領域の登録状況	60
第 2 項	アラインメントと遺伝距離	61
第 3 節	成魚 DNA ライブラリの作成	64
第 4 節	種内・種間の相同性	64
第 5 節	考察	69
第 1 項	対象領域の検討	69
第 2 項	配列比較法の検討	70
第 3 項	種を識別する適切な基準	70
第 4 項	DNA に基づいた種査定法の提示	71
第 4 章	浜名湖に出現する魚卵の種組成と分布	72
第 1 節	材料と方法	72
第 1 項	浜名湖	72
第 2 項	魚卵の採集	73
第 3 項	形態によるタイプ分け	73
第 4 項	PCR とシーケンス	75
第 5 項	DNA に基づいた種査定	76
第 6 項	分布の解析	76
第 2 節	各採集点の環境	77
第 3 節	採集個数と形態によるタイプ分け	80
第 4 節	DNA による種査定の結果	80
第 1 項	DNA によるクラスタリング	80
第 2 項	出現種	80

第5節 魚卵の分布	82
第1項 採集密度	82
第2項 種が判明した卵の分布	85
第3項 不明卵の分布	85
第6節 アンカーネットで採集された魚卵	97
第7節 出現環境	97
第8節 考察	103
第1項 浜名湖における DNA 種査定の有効性と問題点	103
第2項 浜名湖産魚類の産卵生態	104
第3項 浜名湖での卵の流出入	105
第4項 環境と産卵の関わり	106
第5章 マリアナ海域に出現する魚卵の種組成と分布	108
第1節 材料と方法	108
第1項 魚卵の採集	108
第2項 形態によるタイプ分け	110
第3項 PCR とシーケンス	110
第4項 DNA に基づいた種査定	110
第5項 分布の解析	111
第2節 形態によるタイプ分け	111
第3節 DNA による種査定の結果	111
第1項 DNA によるクラスタリング	111
第2項 出現種	113
第4節 魚卵の分布	113
第1項 採集密度	113
第2項 分類群が判明した卵の分布	116
第3項 種不明卵の分布	123
第5節 考察	123
第1項 マリアナ海域における DNA 種査定の有効性と問題点	123
第2項 外洋性魚類の産卵生態	125
第3項 外洋性魚類の産卵と海山との関わり	126
第6章 DNA 種査定に基づく卵の形態記載	127
第1節 材料と方法	127

第 1 項 魚卵のグルーピング	127
第 2 項 飼育方法	128
第 2 節 形態の記載	128
第 3 節 形態学的多様性	128
第 4 節 考察	131
第 1 項 形態学的記載における DNA 種査定法の有効性	131
第 2 項 浮遊性魚卵の形態学的多様性	132
第 7 章 総合考察	158
第 1 節 DNA 種査定法を取り入れた生態学的研究	158
第 2 節 DNA による魚卵の種査定の有用性と問題点	160
第 1 項 DNA 種査定法の有効性	160
第 2 項 問題点	163
第 3 節 沿岸域と外洋域における魚卵形質の適応	164
第 4 節 水産学への貢献	169
第 5 節 今後の展望	169
謝辞	171
引用文献	173
要旨	183
付属資料	187

第1章 緒言

第1節 魚類卵期の研究

魚類の繁殖様式は一般的に卵生であり、多くの魚種が、分類群やその生態、分布域によらず浮遊性の卵を産む (Kendall et al., 1984). これまでに、魚類の卵期を対象として幅広い分野で様々な目的の研究がおこなわれてきた。例えば、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* は脊椎動物の発生生物学、遺伝学的研究において有用なモデル生物であり、その卵は、成魚の飼育によって得ることが容易であることに加え、卵膜が透明で、胚の観察が容易である、発生速度が速いという理由で、生物学的な基礎的研究において頻繁に用いられている (Gilbert, 2003). 魚類学においては、様々な魚種で、形態的な多様性を明らかにするための分類学的な研究 (例えば、水戸, 1961a), また、初期生活史を明らかにするための数多くの生態学的研究が魚類の卵期を対象におこなわれてきた (Kendall and Matarese, 1994). また、数は少ないながらも、魚卵・胚の形態と初期発生過程の比較から、魚類の系統を考察した例もある (Collazo et al., 1994; Virta and Cooper, 2009). さらに、水産資源学や水産増養殖学など、人間生活と深く関わる応用的研究の土台としても魚卵および魚類卵期の情報は有用である。

魚卵の分布、出現時期やその量に関する知見は、魚類の産卵生態の解明と資源変動機構の研究において重要な情報となる。魚類の浮遊性魚卵は、多くの魚種において卵期が数日以内であり (水戸, 1961a, b, 1962a, b, c, d, 1963a, c, b, d), その出現は産卵イベントと時間的に近接している。そのため、天然海域で魚卵を採集し、その出現時期、時刻、分布を解析することで、産卵の時期、時刻、場所といった魚類の繁殖・産卵という生活史上の極めて重要なイベントの実態を明らかにすることができる。近年では、長年の疑問であったニホンウナギ *Anguilla japonica* の産卵場が、成熟親魚の採集とともに産卵後の受精卵が採集されることで、マリアナ諸島南方の海域であると特定された (Tsukamoto et al., 2011). これは、魚卵の分布から魚類の産卵生態を明らかにした研究の大きな成果である。また、魚卵の出現量からは、産卵期と産卵海域がわかるだけでなく、産卵個体群の生物量、さらに初期生残率が推定でき、これは資源変動を正確に予測する上で極めて重要な変数である (Stratoudakis et al., 2006). しかしながら、魚卵の分布調査のほとんどは、水産上重要なマイワシ属 *Sardinops* やカタクチイワシ属 *Engraulis* などのニシン科魚類 (Van der Lingen et al., 1998; Curtis, 2004; Zwolinski et al., 2006), あるいは異体類 (Baldo et al., 2006) といったごく一部の魚種を対象としている。多くの魚種について天然海域での卵の出現に関する情報

は極めて限られており、その原因のひとつとして、魚卵の種査定の難しさがある。

第2節 魚卵の種査定法

従来、魚卵の種査定は形態形質に基づいておこなわれてきた。魚卵の種査定には、卵の外形、卵径、卵膜表面の構造、内卵膜の有無、卵黄上の亀裂の有無、囲卵腔の広狭、油球の数、油球径、胚体の特徴などの形質が用いられている（水戸, 1960; Ahlstrom and Moser, 1980; 池田・水戸, 1988）。しかし、これらの形質は形態的な変異が乏しいため、まったく異なった分類群の卵であっても酷似した形態を示す場合が多く、明瞭に識別できる形態的特徴を示す種は限られる。例えば、大部分の魚種の卵は球形で、卵径は0.6–1.6 mmの範囲にある（Ahlstrom and Moser, 1980）。胚体には体のプロポーシオンや色素、筋節数といった比較的变化に富む形質が観察できる。しかし、これら胚体の形態的特徴は発生に伴って著しく変化するため、発生の一時期にしか使えない。また、発生過程の形態変化を理解しなければ、同一種の卵であっても別種と判断してしまうこともある。また技術的な問題として、ホルマリン固定やアルコール保存により魚卵の外形および胚が収縮、変形し、さらに色素が消失するなど、形態が生時から大きく変化する（池田・水戸, 1988）。以上の理由から、形態形質に基づく魚卵の種査定は困難であり、野外における魚卵を対象とした研究の障壁となっている。

もうひとつの魚卵の種査定における大きな問題点は、魚卵の形態に関する知見の不足である。形態に基づく魚卵の種査定では、種不明卵の形態を種が既知の卵の記載された形態と比較し、同定する。しかしながら、魚卵は成魚と大きく形態が異なるため、たとえ形態的にあるグループとして識別できたとしても、特定の種に対応させることは非常に困難である。ここで卵と成魚との対応関係を明らかにするためには、飼育環境下で種が既知の成魚から受精卵を得る、もしくは天然から様々な発達段階の卵・仔稚魚を得てシリーズを作成しなければならず、多くの調査、実験と体系的な比較研究が必要になる。そのため、魚卵の形態記載はいまだごく一部の種でしかおこなわれておらず、世界的にみてもそれを体系的にまとめた研究は池田・水戸(1988)、Moser et al. (1984) などがあるのみである。また、卵黄の形態（Virta and Cooper, 2009）と原腸形成の様式（Collazo et al., 1994）に系統的なまとまりがあることが示唆されているものの、卵および胚の形態と高次分類群とは強い対応を示さない（水戸, 1979）。そのため、種不明卵を高次分類群に帰属させることもまた難しい。

こうした魚卵の種査定に関する問題点を解決するために、これまでに形態学的種査定法の応用としていくつかの方法が試みられてきた。まず、孵化実験の併用（池田ほか, 1991）や卵膜微細構造の観察（Boehlert, 1984; Hirai, 1988; 平井, 1991; Hirai, 1993; Shao et al., 2002）による種査定が試みられている。しかし、孵化実験では多数の卵を長時間観察する必要があるため、また、出現

種類が多様であれば同定ができないといった限界がすでに認められている（池田ほか, 1991）。卵膜の微細構造は発生期間を通じて安定した形質で、魚種によって多様な形態を示すことが報告されており、分類形質としての有効性も示唆されている（Boehlert, 1984; Hirai, 1988; 平井, 1991; Hirai, 1993; Shao et al., 2002）。しかし、この方法には電子顕微鏡による観察が必要であり、多数の卵を処理できない。さらに、卵膜微細構造に関する現在の限られた知見では、観察された構造が種特異的であるか判断できず、分類形質としての実用性は低いと考えられる。

このように、魚卵の形態学的な種査定には明らかに限界があり、不特定多数の魚卵を種レベルで厳密に種査定するためには、新たな分類形質を導入した魚卵種査定法を確立する必要がある。

第3節 DNAによる種査定法

生物の分類は伝統的に形態形質に基づいておこなわれてきた。しかしながら、その限界として、表現型の可塑性や個体変異、発生段階による形態の違いや性的二型、隠蔽種の存在、専門知識の必要性が指摘されている（Hebert et al., 2003）。そのため、形態によらない方法として、DNAをはじめとした分子生物学的手法が取り入れられてきた。DNAは形態形質とは異なり、発達、成長を通じて変化することがなく、さらに数値化、定量化が容易で客観的な分類ができる。そのため、近年では様々な生物群においてDNAを用いた分類が試みられており、これらのアプローチによって、これまでまったくうかがい知ることのできなかつた微生物や線虫類などの多様性が明らかになってきた（例えば Pace, 1997; Moon-van der Staay et al., 2001; Floyd et al., 2002; Moreira and Lopez-Garcia, 2002）。また、地球上にはおよそ870万種の生物が存在すると推定されているものの（Mora et al., 2006）、現在はそのわずか一部しか記載されていない。現在では生物多様性を大規模に把握するプロジェクトが世界的に進行しており（例えば 藤倉ほか, 2009; 白山・藤倉, 2009; Fujikura et al., 2010）、DNAに基づく分類は、生物多様性を明らかにするために非常に有効な手法だと考えられている（Blaxter and Floyd, 2003）。

DNAバーコーディングとは、標準化された単一のDNA断片の配列を指標として生物種を識別する方法である（Valentini et al., 2009）。このコンセプト自体は古くからあったものの、2003年にHebert et al. (2003)が線虫類の分類にミトコンドリアDNA (mtDNA) の cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子 (COI) を用いてその実用性を報告してから、DNAの解析技術の発展と相まって急速に普及した。DNAバーコーディングでは、種が既知の配列と検索配列とを比較してその一致の程度で種査定をおこなうために、種を識別する基準が明らかでない、また、種はDNAの配列によって定義されないことから、結果の解釈が難しいという問題点が指摘されている（Will and Rubinoff, 2004）。そのため2000年代前半には批判も多く、数多くの議論があった

(例えば Moritz and Cicero, 2004; Will and Rubinoff, 2004; Ebach and Holdrege, 2005; Gregory, 2005; Hebert and Gregory, 2005). しかしその後、様々な生物群で数多くの研究例を蓄積し、DNA データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) の充実にも伴い、その有効性を増している。

そこで、魚卵においても分子形質を新たな分類形質として導入することで、種査定に関する問題が解決できると考えられる。魚卵を対象とした分子形質を種査定法は 1970 年代以降に報告があり、免疫反応 (Orlowski et al., 1971; 大西ほか, 2003)、アロザイム多型 (polymorphic allozymes: Mork et al., 1983; Graves et al., 1990; Manaresi et al., 2001)、制限断片長多型 (RFLP, Restriction fragment length Polymorphism Restriction analysis: Daniel and Graves, 1994)、種特異的なプライマーセットを用いた multiplex PCR (Hyde et al., 2005)、SSCP (single strand conformation polymorphism: Garcia-Vazquez et al., 2006)、リアルタイム PCR (Fox et al., 2005; Bayha et al., 2008; Minegishi et al., 2009) で種査定法が開発されてきた。しかし、これらの方法は、ある特定の種を対象とした、少数の種間での識別しかできない。また、あらかじめ免疫反応やアイソザイム、プライマーセットの種特異性を前提とするため、多種が混じるサンプルからの識別では、false-negative, または false-positive の危険性が避けられない。RFLP と SSCP では、バンドパターンが既知の種間でしか識別できず、野外で採集される不特定多数の魚卵の種査定という目的には利用できない。

従って、魚卵の種査定には、DNA の配列を比較する DNA バーコーディングの手法が最も実用的だと考えられる。DNA はこれまでに多くの魚種で系統学的、集団遺伝学的研究に広く使われてきた。従って DNA データベースに登録されている遺伝子の蓄積も多く、現在も登録数は急速に増加している。これらのデータを用いることで、魚卵から得られた配列を多様な魚種の配列と比較することができ、魚卵の種査定に強力なツールとなるだろう。実際に、この手法は成魚の種査定にも使われている (Karaiskou et al., 2003; Ward et al., 2005; Akimoto et al., 2006; Lakra et al., 2011)。この手法は、絶対的な組織量が少ない魚卵を対象としては実験的に成功率が低いことが考えられるものの、実際に魚卵を対象として、ウナギ目 *Anguilliformes* (Aoyama et al., 2001)、サバ属 *Scomber* spp. (Sezaki et al., 2001)、キンメダイ *Beryx* spp. (Akimoto et al., 2002)、エソ科 *Synodontidae* (Shao et al., 2002)、マアジ属 *Trachurus* spp. (Karaiskou et al., 2007) で使われ、十分適用可能であると考えられる。また、天然海域で採集された候補種が未知の魚卵に対しても適用され、いくつかの魚種を同定している (Saitoh et al., 2009; Valdez-Moreno et al., 2010)。しかしながら、DNA バーコーディングの手法を、野外で採集された卵を対象として適用し、大規模な生態学的調査をおこなった例はいまだにない。

第4節 研究の目的

本研究では、DNA を分類形質とした魚卵の種査定法を確立し、その手法の有用性を、魚類相が明らかであり沿岸海域である浜名湖と、出現する魚類に関する知見の少ない典型的な外洋域であるマリアナ海域という対照的な両海域を対象として実証することを目的とした。また、それぞれの海域に出現する卵の種組成と分布を明らかにし、生息する魚類の産卵生態の考察と、魚卵の形態の記載をおこなう。さらに、本研究で得られた知見を総合し、生態学的研究におけるDNA 種査定法の実用性を検討する。また、魚卵の形態の適応と進化についても論じる。

本章に続き第2章では、種苗生産の対象となっている11魚種の卵の形態と初期発生過程を詳細に記載した。第3章では、DNA データベースの探索と、浜名湖およびマリアナ海域に出現する成魚DNA ライブラリを作成・解析することで、mtDNA の16S リボソームRNA 遺伝子(16S rRNA)を用いたDNA 種査定法を提示した。第4章では、半閉鎖水域である浜名湖で周年の調査をおこない、採集された魚卵に先述のDNA 種査定法を適用し卵の出現種を明らかにし、出現魚種の産卵と環境との関わりを考察した。第5章では、開放的外洋域であるマリアナ海域の魚卵の出現種をDNA 種査定法により明らかにし、外洋性魚類の産卵場について考察した。第6章では、第4章と第5章で採集された卵の形態を記載し、DNA と形態によるグルーピングを可能にした。最後に第7章で、これら一連の研究結果をまとめ、DNA の分類形質としての実用性を検討した。さらに、魚卵の形態と魚類の繁殖戦略の適応との関係についても考察した。

第2章 形態形質の有効性の検討

魚卵の形態学的分類の有効性を評価するためには、様々な分類群を対象として卵の形態形質と胚発生過程に関する情報を蓄積し、体系的な比較研究をおこなう必要がある。しかしながら、魚卵の形態や卵内発生に関する知見は断片的であり、体系的に整理した研究は皆無である。

日本近海に出現する浮遊性魚卵については、1910–20年代にかけておこなわれた神谷（1916, 1922a, b, 1924, 1925a, b）の研究があり、神谷（1924）には53種類の浮遊性魚卵についての検索が示されている。その後、1960年代におこなわれた水戸の一連の研究（水戸, 1961a, b, 1962a, b, c, d, 1963a, b, c, d）によって浮遊性魚卵の形態、分類に関する知見は大きく増加し、246種類の浮遊性魚卵について検索が作成された（水戸, 1966）。さらに池田・水戸（1988）は349種類の魚卵についての知見を整理し、299種類の検索を作成した。しかし、これらは日本近海に産する魚類3887種（中坊, 2000c）のごく一部であり、魚類全体の多様性からみれば、ほんのわずかしかなら明らかになっていない。世界的に見ても、魚卵の形態および分類に関する体系的な研究はほとんどおこなわれておらず、Moser et al.（1984）で分類群ごとに卵の形質が整理されている他は、Russell（1976）、Jones et al.（1978）、Hardy（1978a, b）、Johnson（1978）、Fritzsche（1978）、Martin and Drewry（1978）、Matarese et al.（1989）、Moser（1996）、Kendall（2011）などで断片的な記載があるにすぎない。近年でも、付着卵を産むネッタイイソイワシ *Atherinomorus duodecimalis*（Takemura et al., 2004）やニシン *Clupea pallasii*（Kawakami et al., 2011）で卵の形態、発生過程が報告されているものの、浮遊性魚卵に関する新しい知見の集積は進んでおらず、それらを総合して形態に基づいた分類に焦点を当てた比較研究は為されていない。

そこで本章では、広範な分類群に属する計11魚種について、卵の形態および胚発生過程と仔魚の形態を詳細に記録した。得られた形態形質の情報を分類群間で比較することにより、形態形質の共通性と分類における有効性を評価した。

第1節 対象魚種と方法

第1項 対象魚種

現在、日本では放流用もしくは養殖用として7目23科に属する計44種の海産魚類の種苗生産がおこなわれている（水産庁・独立行政法人水産総合研究センター・社団法人全国豊かな海づくり推進協会, 2011）。本研究では、魚類のなるべく広範な分類群を代表するように、種苗生

産対象種の中から以下の計5目8科11種を選び、その卵の形態、卵内発生および仔魚の形態を経時的に記録した (Table 2-1-1)。遠縁な分類群間だけでなく、近縁種間でも比較できるように、カレイ目は5種を含めた。本研究では浮遊性魚卵を対象としたが、粘着卵を産むニシンも比較のために含めた。すなわち、浮遊性魚卵を産む種としてニホンウナギ *Anguilla japonica* (ウナギ目 Anguilliformes, ウナギ科 Anguillidae), ハモ *Muraenesox cinereus* (ウナギ目, ハモ科 Muraesocidae), オニオコゼ *Inimicus japonicus* (カサゴ目 Scorpaeniformes, オニオコゼ科 Synancheiidae), クエ *Epinephelus bruneus* (スズキ目 Perciformes, ハタ科 Serranidae), アカアマダイ *Branchiostegus japonicus* (スズキ目, キツネアマダイ科 Malacanthidae), ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (カレイ目 Pleuronectiformes, ヒラメ科 Paralichthyidae), ババガレイ *Microstomus achne* (カレイ目, カレイ科), ヌマガレイ *Platichthys stellatus* (カレイ目, カレイ科 Pleuronectidae), マツカワ *Verasper moseri* (カレイ目, カレイ科), ホシガレイ *V. variegatus* (カレイ目, カレイ科), およびニシン *Clupea pallasii* (ニシン目 Clupeiformes, ニシン科 Clupeidae) である。

第2項 受精卵の採卵および飼育方法

1. ニホンウナギ

ニホンウナギの卵および仔魚を、2004年4月4日から4月9日に株式会社いらご研究所(以下、いらご研究所)において飼育した。

親魚には人工催熟した個体を用いた。雌では、淀川で採集された下りウナギの1個体(全長73.5cm, 体重492g)を海水中で養成し親魚として用いた。2004年2月9日からほぼ1週間に1回、サケ脳下垂体抽出物(Salmon Pituitary Extract; SPE)のアセトン乾燥粉末を生理食塩水に溶かし、40mg/kg body weight (BW)を筋肉注射した。初回の投与時から10%の体重増加がみられたSPE投与日(3月29日)の5日後(4月3日)に同様の方法でSPEを投与した。この個体のSPE投与回数は合計7回だった。最後のSPE投与の約24時間後に、エタノールに溶かし生理食塩水で希釈した $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)を腹腔内注射で2 mg/kg BW投与し、排卵を誘発した。雄は、養殖された個体を海水馴致して親魚として用いた。1週間に1回Human Chorionic Gonadotropin (HCG) (1000IU/kg)を筋肉内投与した。さらに産卵日の前日(約12時間前)には 17α -hydroxyprogesterone (2 mg/kg)とHCG (1000IU/kg)を筋肉内投与した。飼育水温は、雌では、養成期間は18°C, 最後のSPE投与後は20°C, DHPによる排卵誘発後は22°Cとした。雄では飼育期間を通じ20°Cとした。

排卵誘発の約12時間30分後(4月4日)に雌の腹部を圧迫して卵を搾出した。雄では注射器で精子を採集した。人工授精には3個体(全長52.8–54.8 cm, 体重226–247 g)の精子を混合して使用し、海水で溶いてから使用した。これら卵と精子を用いて乾導法による人工授精をお

Table 2-1-1 List of species used in the present study for observation of embryonic development

Order ^a	Family ^a	Species	Location ^b
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	Irago Institute
	Muraenesocidae	<i>Muraenesox cinereus</i>	Irago Institute
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Clupea pallasii</i>	Miyako station, NCSE
Scorpaeniformes	Synancheiidae	<i>Inimicus japonicus</i>	Hakatajima station, NCSE
Perciformes	Serranidae	<i>Epinephelus bruneus</i>	Gotou station, NCSE
	Malacanthidae	<i>Branchiostegus japonicus</i>	Miyazu station, NCSE
Pleuronectiformes	Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Miyako station, NCSE
	Pleuronectidae	<i>Platichthys stellatus</i>	Miyako station, NCSE
		<i>Microstomus achne</i>	Miyako station, NCSE
		<i>Verasper moseri</i>	Akkeshi station, NCSE
		<i>Verasper variegatus</i>	Miyako station, NCSE

^a Classifications followed Nakabo (2000).

^b NCSE: National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, Japan.

こない、受精卵を得た。得られた受精卵からキングヨ網で浮上卵のみを採集し、海水で洗卵した後、飼育を開始した。飼育には塩分を 34 psu に調整した加塩海水を用いた。

2つの水温区を作り、20°C区では8lの円形プラスチック水槽に、22°C区では1lビーカーにそれぞれ150個/lの密度で受精卵を収容し、止水でゆるやかなエアレーションをかけた。20°C区では、調温海水を入れたコンクリート水槽にガラス水槽を浮かべて管理した。水温は管理期間を通じて20.0°Cだった。22°C区では、22°Cに設定したインキュベーター内で卵管理をおこなった。胚期以降は22°Cに設定したウォーターバスにビーカーごと収容し、管理した。飼育期間中の水温は22.0–24.0°C（平均：22.5°C）だった。底掃除と換水は適宜おこなった。孵化後の仔魚は同様の条件で飼育を継続した。孵化仔魚は無給餌で飼育した。

受精後約1時間経過した卵を20°Cで管理した卵で、受精後12時間以降の卵は22°Cで管理した卵で10分–6時間ごとに実体顕微鏡下（Nikon SMZ800, Nikon）で観察し、写真およびスケッチにより卵内発生を記録した。写真は実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ（DS-5M, Nikon）によって撮影し、スケッチは実体顕微鏡に取り付けた描画装置、または写真に基づいておこなった。仔魚は孵化直後とその後1日ごとに採集し、5%海水ホルマリンで固定した。仔魚の外部形態の観察、測定およびスケッチは、これらホルマリン固定標本を用いておこなった。

2. ハモ

ハモの卵および仔魚を2003年7月27日から8月9日にいらご研究所において飼育した。2003年7月27日に底曳き網漁で漁獲され伊良湖港（渥美魚市場）に水揚げされたハモ14個体（雄6個体、雌8個体）を購入し、親魚とした。これらは全長と体重を測定し、個体識別のためにPITタグ（Biomark, Inc.）を装着した後、コンクリート水槽に収容して、水温約25°Cで飼育した。これらの飼育開始時の体長と体重は、雄で48.9–73.2 cm, 125–542 g, 雌で64.0–121.5 cm, 345–3,958 gだった。受精卵は2003年7月27日に自然産卵によって得られた。産卵した雌親魚は全長97.0 cm, 体重2,108 gの個体だった。産卵に参加した雄親魚は特定できなかった。受精卵を産卵当日の23:00–24:00に採集し、5l容量の円形プラスチック水槽に収容して飼育を開始した。この円形プラスチック水槽を、24.2°Cに調温した200lパンライト水槽に浮かべ、温度管理をおこなった。これらの受精卵は、飼育開始から2日後に、水槽から24.2°Cに調温した30lパンライト水槽に移し、飼育を継続した。通気は飼育開始時からおこない、孵化直前には卵に物理的ストレスを与えないよう、極微量とした。飼育期間中の水温は24.1–25.5°C（平均24.4°C）だった。孵化後の仔魚は同様の条件で、無給餌で飼育を継続した。

受精卵を採卵後1–4時間ごとに実体顕微鏡下（Nikon SMZ-U）で観察し、写真およびスケッチにより卵内発生を記録した。写真は実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ（HC300Z, Fuji film, 東京）によって撮影し、スケッチは実体顕微鏡に取り付けた描画装置、または写真に基づいておこなった。仔魚は孵化直後とその後1日ごとに採集し、5%海水ホルマリンで固定した。

仔魚の外部形態の観察、測定およびスケッチは、これらホルマリン固定標本を用いておこなった。

3. ニシン

ニシンの卵および仔魚は、2003年2月10–22日に独立行政法人水産総合研究センター宮古栽培漁業センター（以下、宮古栽培漁業センター）において飼育した。2003年2月10日に宮古湾奥部、津軽石川河口付近で定置網によって採集された雌雄2個体ずつのニシンを親魚として、乾導法による人工授精をおこない受精卵を得た。受精時刻は13時45分だった。受精直後の受精卵を木枠に張ったナイロン網に付着させ、10 m³のコンクリート水槽に収容し、飼育を開始した。飼育期間中、網は重しをつけて水槽の底に沈めておいた。飼育開始時から濾過海水の注水をおこない、水温は飼育開始時には8.0°C、2日目（11日の11:20）には9.0°C、3日目以降（12日の13:30）は10.0°Cに設定した。飼育開始から10日後に受精卵を500 lパンライト水槽に移し、10.0°Cに設定した濾過海水の注水と通気をおこなった。飼育期間中の水温は8.0–10.8°Cだった。

受精卵および仔魚の観察は、採卵から孵化までの間、約6–12時間ごとに実体顕微鏡下でおこなった。受精から約3時間後に、卵径を万能投影機上（Nikon Profile projector, 10–100倍）でデジタルノギス（Mitsutoyo社製、デジマチックキャリパ）を用いて測定した。観察した受精卵および仔魚は5%海水ホルマリンで固定した。卵と仔魚のスケッチおよび仔魚の測定はホルマリン固定標本を用いておこなった。

4. オニオコゼ

オニオコゼの卵および仔魚の観察には、独立行政法人水産総合研究センター伯方島栽培漁業センターから提供されたサンプルを使用した。2000年および2001年に兵庫県明石市明石浦漁協に水揚げされ、伯方島栽培漁業センターにおいて養成された個体を親魚として用いた。受精卵は、2002年6月25日の自然産卵によって得られた。産卵時の水温は20.9°Cだった。得られた受精卵は水温21.2°Cで孵化管理をおこない、6月26日に孵化した。給餌は4日齢（孵化日を0日齢とする）の開口直後より開始し、日齢4–13ではワムシを、日齢8–30ではアルテミアノープリウスを、また、日齢12–30では配合飼料を順次重複して与えた。受精卵を適宜採集し、5%ホルマリンで固定した。孵化以降は、孵化仔魚と、日齢2、5、10の仔魚を採集し、10%ホルマリンで固定した後、70%エタノールに保存した。

5. クエ

クエの卵および仔魚の観察には、独立行政法人水産総合研究センター五島栽培漁業センターから提供されたサンプルを用いた。1993年に天然で漁獲され、その後9年間、五島栽培漁業センターにおいて海上小割網で養成されていた個体を親魚として用いた。2002年6月3日に、雌個体から卵を搾出し、乾導法による人工授精をおこなって受精卵を得た。なお、ホルモン投与

による人工催熟はおこなわなかった。人工授精によって得た受精卵約57万粒を孵化水槽に收容し、卵管理を開始した。8–20時間ごとに受精卵を採集し、5%ホルマリンで固定した。

6. アカアマダイ

アカアマダイの卵および孵化仔魚を、2003年10月7–10日に独立行政法人水産総合研究センター宮津栽培漁業センターにおいて飼育した。延縄漁で漁獲され、伊根漁港および養老漁港に水揚げされたアカアマダイを購入し、親魚とした。雌個体は、購入直後にHCG 300 IU/kg BWを背筋内に注射した後、宮津栽培漁業センターにおいて養成した。また、雄個体から藤浪ほか(2003)の方法により冷蔵保存精子を作成した。

2003年10月7日に、全長308 mm、体長254 mm、体重344 gの雌個体から卵を搾出し、冷蔵保存精子を用いた乾導法による人工授精をおこない、約6,400粒の受精卵を得た。採卵した個体はHCG投与後56時間が経過しており、5回目の採卵だった(28時間後、44時間後、48時間後、52時間後に採卵)。人工授精には、計26個体の雄(全長375–435 mm、標準体長302–352 mm、体重590–1,060 g)の精子を混合して作成した冷蔵保存精子(3–4日間保存)を使用した。これらの人工授精の受精率は62.3–93.9%だった。アカアマダイは多回産卵をおこなうことが知られており(船田, 1963; Okumura et al., 1996)、このような採卵方法はすでに実用化されている(竹内, 2003)。さらに、本藤ほか(2001)は1–4日間冷蔵保存した精子を用いて67.8–93.0%の受精率を得ており、今回もほぼ同様の受精率だった。さらに、人工授精に凍結保存精子を用いてはいるものの、同様の採卵方法で得られた受精卵はほぼ正常に発達することが報告されている(奥村・今泉, 1996)。以上のことから、今回得られた受精卵の卵質には問題がないと考えられた。

得られた受精卵の一部を、濾過海水を満たした11のガラスビーカー2個に收容し、20.0°Cに設定したインキュベーター(Iuchi, Culture Cool Incubator CCI 600S)内で飼育した。飼育開始から終了まで、底掃除と換水を適宜おこなった。飼育期間中の水温は19.7–20.8°C(平均20.1°C)だった。

受精卵と孵化仔魚を、受精から4時間後までは15分ごと、4–9時間後までは30分ごと、それ以降は1–5時間ごとに、描画装置を取り付けた実体顕微鏡下(Nikon SMZ-U, 7.5–75倍)で観察し、スケッチによって記録した。受精卵の卵径および孵化仔魚の生時の体長を万能投影機上(Mitsutoyo社製, Profile projector PJ311, 10–100倍)でデジタルノギスを用いて測定した。孵化直前の卵および孵化仔魚は、ごく微量の2-フェノキシエタノールで麻酔してから観察、スケッチした。孵化仔魚は5%海水ホルマリンで固定した後、体各部を測定した。

7. ヒラメ

ヒラメの卵および仔魚を、宮古栽培漁業センターにおいて2002年6月3–7日にかけて飼育した。2000年度に宮古魚市場に水揚げされ、宮古栽培漁業センターにおいて養成されていた個

体を親魚として用いた。これらの養成親魚に15°Cの加温処理をおこなって産卵させ、2002年6月2日夜から3日朝にかけて産卵された受精卵を採集した。2002年6月3日の午後12時に、受精卵を500l容量のパンライト水槽に収容し、飼育を開始した。飼育開始直後から、水温を15.5°Cに設定した海水の注水と通気をおこなった。飼育中の水温は15.0–15.5°C(平均15.4°C)だった。これらの卵は6月6日に孵化し、飼育はその翌日まで継続した。

生時の受精卵および仔魚の観察を約2–15時間ごとに実体顕微鏡下でおこなった。観察した受精卵および仔魚は3%海水ホルマリンで固定した。卵と仔魚の測定およびスケッチはホルマリン固定標本を用いておこなった。

8. ババガレイ、ヌマガレイおよびホシガレイ

ババガレイ、ヌマガレイおよびホシガレイの卵・仔魚の観察には、宮古栽培漁業センターから提供されたサンプルを用いた。いずれの種も、天然で漁獲された個体を親魚として用い、受精卵および仔魚は宮古栽培漁業センターにおいて飼育された。

ババガレイの受精卵は2001年3月22日の自然産卵によって得られた。これを2001年3月22日から4月12日に水温10°Cで飼育した。受精当日の卵を5%海水ホルマリンで、孵化仔魚と2日齢、5日齢の仔魚を70%エタノールで固定した。

ヌマガレイの受精卵は、2002年5月18日に乾導法による人工授精をおこなって得た。得られた受精卵と仔魚は水温15°Cで飼育した。受精から孵化までの間、受精卵を24時間ごとに採集し、5%海水ホルマリンで固定した。孵化仔魚と10日齢の仔魚も同様に固定した。

ホシガレイの受精卵は、2003年1月3日に乾導法による人工授精をおこなって得た。受精卵は水温18°Cで飼育した。2003年1月3日の産卵によって得られた受精卵では、受精直後と受精から1日後、4日後、7日後に受精卵を採集して5%海水ホルマリンで固定した。

9. マツカワ

マツカワの卵・仔魚の観察には、独立行政法人水産総合研究センター厚岸栽培漁業センターから提供されたサンプルを用いた。天然で漁獲された個体を親魚として用い、受精卵および仔魚は厚岸栽培漁業センターにおいて飼育された。

マツカワの受精卵は、2003年3月25日に乾導法による人工授精をおこなって得た。得られた受精卵と仔魚は水温8–10°Cで飼育した。受精卵を受精直後、受精から7時間30分後、4日後、7日後でそれぞれ1回ずつ採集し、5%海水ホルマリンで固定した。孵化仔魚も同様に採集、固定した。

第3項 発生段階の定義

本研究では、卵内発生の過程を、Matarese and Sandknop (1984) および池田・水戸 (1988) を改変し、以下の3つに区分した。ここでエピボリーとは、魚類の発生において原腸陥入に伴って細胞が卵黄を包み込む覆い被せ運動のことであり、ゼブラフィッシュの発生段階はエピボリーの進行度によって表される (Slack, 2002)。

1. 初期：受精からあるいはエピボリー (epiboly) の完了までの期間
2. 中期：エピボリーの完了から尾端が卵黄から離れるまでの期間
3. 後期：卵黄から尾端が離れてから、孵化までの期間

第4項 測定方法

卵径および卵黄径の測定は、生時の標本 (ハモ、ニシン、アカアマダイ、ヒラメ) では、人工授精後、囲卵腔の形成された段階以降におこなった。卵の固定標本を測定する際には、すべて発生初期の卵を測定した。仔魚の体各部の測定は沖山 (1988) に従い、全長 (TL)、脊索長 (NL)、肛門全長 (PAL) を測定した。また、仔魚の全長に対する肛門前長の割合 (PAL/TL) を算出した。

固定標本の観察、測定およびスケッチは描画装置を取り付けた実体顕微鏡下 (Nikon SMZ 10, 10–40 倍または Nikon SMZ 800, 10–63 倍) でおこなった。測定には接眼マイクロメーターを用いた。

第2節 卵の形態と初期発生の記載

第1項 ニホンウナギ

卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は 1.39–1.61 mm (平均 ± 標準偏差 : 1.52 ± 0.06 mm, n = 20) だった (Fig. 2-2-1a)。卵膜は透明で表面は平滑だった。受精後約 1 時間の卵では透明な油球が多数あったが、受精後約 12 時間では集合して 1 個の油球となり、その直径は 0.31–0.34 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.32 ± 0.01 mm, n = 20) だった。卵黄には不明瞭な亀裂が認められた。囲卵腔は広く、卵黄径は卵径の 55.4–62.6% (平均 ± 標準偏差 : 58.7 ± 2.08%, n = 20) だった。卵内発生の過程を Fig. 2-2-1 と Table 2-2-1 に示した。受精から 1 時間 4 分後には囲卵腔が広がり胚盤も形成されていたが、卵割は起こっていなかった (Fig. 2-2-1a, Table 2-2-1)。12 時間 21 分後にはエピボリーが始まっており、胚盤葉が卵黄の約 50% を覆った (Fig. 2-2-1b)。17 時間 56 分後にはエピボリーが終了し、胚体が形成され、筋節は 4 本が数えられた (Fig. 2-2-1c)。受精後 26 時間 49 分、32 時間 40 分、33 時間 58 分、36 時間での筋節数はそれぞれ 18 本、33 本、37 本、42 本だった。24 時間 3 分後にはエピボリーが終了しており、眼胞と耳胞の形成が認められ、クッパー氏

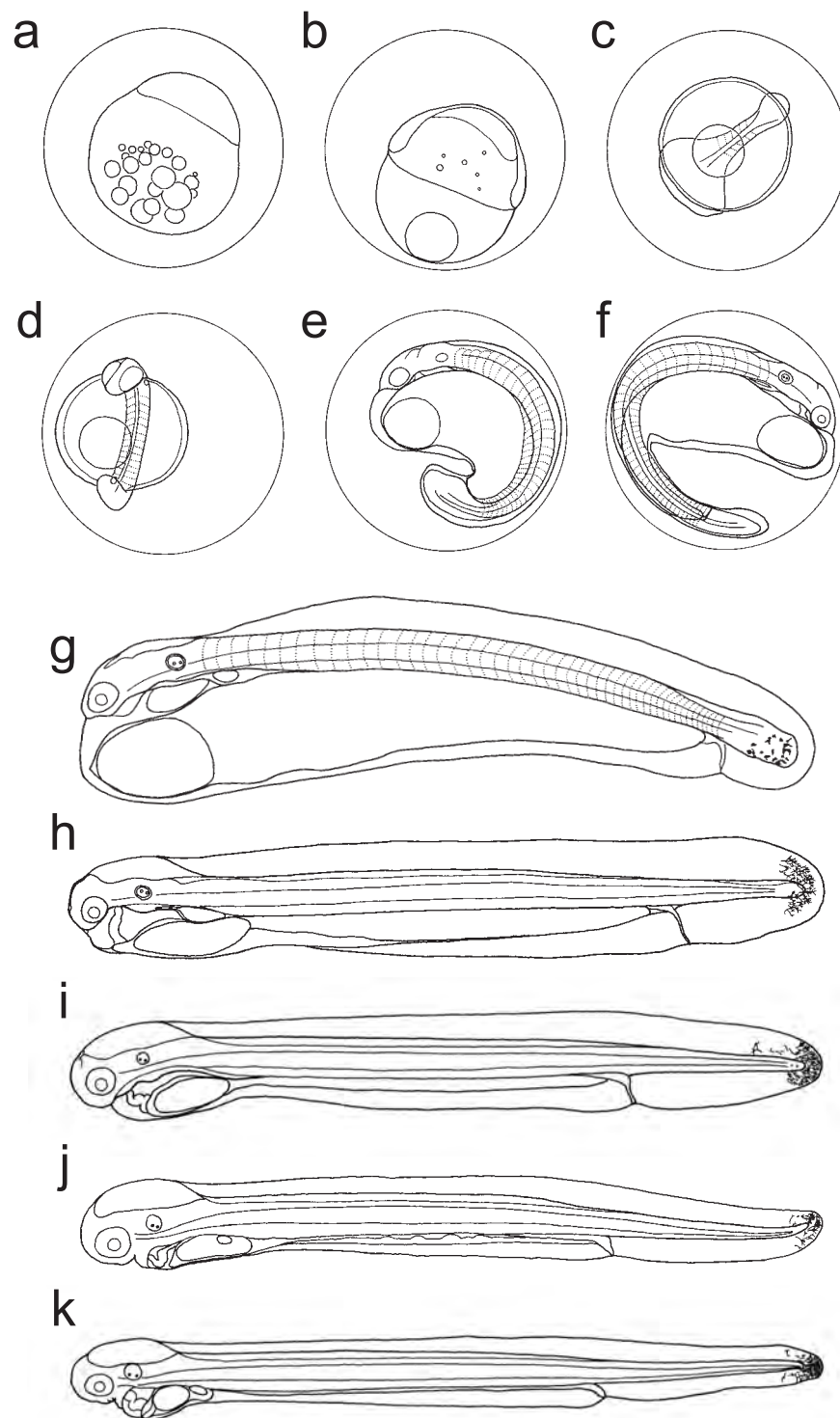


Fig. 2-2-1 Embryonic development of eggs and larval development of the Japanese eel *Anguilla japonica*. **a** Elevation of blastodisc, 1 h 4 min after artificial fertilization. **b** Appearance of blastocoel, 12 h 21 min. **c** Just before completion of epiboly, 4 myomeres present. 17 h 56 min. **d** Completion of epiboly, Appearance of optic, otic and Kupffer's vesicle, 16 myomeres present. 24 h 3 min. **e** Disappearance of Kupffer's vesicle, 32 h 40 min. **f** Appearance of lens and otolith, 42 myomeres present, 36 h. **g** Newly hatched larva, 3.03 mm in total length (TL), 47 myomeres. **h** 1 day larva, 4.35 mm TL, 75 myomeres. **i** 2 day larva, 5.01 mm TL, 108 myomeres. **j** 3 day larva, mouth opening, 5.92 mm TL, 114 myomeres. **k** 4 day larva, appearance of tooth bud, 5.94 mm TL, 112 myomeres

Table 2-2-1 Summary of embryonic and larval development of the Japanese eel, *Anguilla japonica* at water temperature of 22.0–24.0°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
1 h 4 min	Formation of perivitelline space and elevation of blastodisc	2-2-1a
12 h 21 min	50 % epiboly. Appearance of blastocoel, germ ring and embryonic shield	2-2-1b
17 h 56 min	Epiboly almost completed. Appearance of embryonic body. 4 myomeres present	2-2-1c
24 h 3 min	Completion of epiboly. Formation of optic vesicle and otic vesicle. Kupffer's vesicle appeared. 16 myomeres present	2-2-1d
26 h 49 min	End of tail separates from yolk. 18 myomeres present	
29 h 4 min	29 myomeres present	
32 h 40 min	Disappearance of Kupffer's vesicle. Formation of heart, gut and finfold. 33 myomeres present	2-2-1e
33 h 58 min	Beginning of heartbeat and embryo movement. 37 myomeres present	
35 h 10 min	Formation of a free neuromast on the head	
36 h	Lens and otolith observed. Enlargement of finfold. 42 myomeres present	2-2-1f
37 h	Mass hatching, 0 day larva. Melanophores present at tail tip. 47 myomeres present	2-2-1g
57 h 40 min	1 day larva. Melanophores present at tail tip. 7 pairs of free neuromasts observed. 75 myomeres present. 52 pre-anal myomeres (PAM)	2-2-1h
82 h 5 min	2 day larva. 107 myomeres present. 52 PAM	2-2-1i
107 h 10 min	3 day larva. Mouth opened at ventral side of head. Pectoral fin bud appeared. 7 free neuromast observed. Completion of myomere formation (114 myomeres). 51 PAM	2-2-1j
128 h 10 min	4 day larva. 8 free neuromast observed. Tooth bud formed	2-2-1k

胞も出現した (Fig. 2-2-1d). 26 時間 49 分後には尾端が卵黄から離れた. 32 時間 40 分後にはクッパー氏胞が消失し, 心臓, 腸, 膜鰭が形成された (Fig. 2-2-1e). 33 時間後には心臓の拍動と胚体の運動が観察された. 35 時間 10 分後には頭部に左右 1 対の遊離感丘が形成された. 36 時間後にはレンズと耳石が形成された (Fig. 2-2-1f).

受精から 37 時間後に孵化した. 孵化仔魚の全長は 2.45–3.05 mm (平均 ± 標準偏差: 2.77 ± 0.19 mm, n = 17) だった. 全長 3.03 mm の仔魚では筋節は 47 本が数えられた (Fig. 2-2-1g). 紡錘形の卵黄が全長の約 85% にわたって胚体の腹面に付着していた. 油球は卵黄の前端に位置した. 消化管の末端は膜鰭縁辺部に達した. 孵化仔魚は表層で頭を上方に向けて垂直に浮遊した. 孵化後 4 日齢まで卵黄の吸収, 体長の増大, 筋節数の増加がみとめられた (Fig. 2-2-1h-k). 卵黄は飼育期間を通じて吸収が進み, 4 日後にも少量が残った. 全長は日を経るに従い増大し, 1 日齢で 4.35 mm, 2 日齢で 5.72 mm, 3 日齢で 5.92 mm, 4 日齢で 5.94 mm となった. 筋節数も孵化後時間に伴い増加し, 1 日齢で 77 本, 2 日齢で 107 本, 3 日齢で 114 本が数えられ, 成魚の脊椎骨数とほぼ同数に達した. 2 日齢の仔魚では体側にも 7 対の遊離感丘が形成されていた. 口は 3 日齢で頭部下面に開き, 4 日齢では歯の原基が形成された. 孵化後, 肛門は体の前方へ移動し, PAL/TL は 0 日齢の 82.4–90.7% (平均 ± 標準偏差: 87.7 ± 1.91%, n = 17) から 4 日齢の 68.8–74.8% (平均 ± 標準偏差: 72.3 ± 1.88%, n = 10) まで減少した.

第2項 ハモ

観察した受精卵は, 産卵を確認した 2003 年 7 月 27 日午後 11 時 16 分の時点 (孵化 42 時間 17 分前) ですでに胞胚期に達していた (Fig. 2-2-2a, Table 2-2-2). ハモの卵は球形の分離浮性卵であり, 水槽の底層から中層に浮遊した. 卵内発生の過程を Fig. 2-2-2 と Table 2-2-2 に示した. 卵膜は透明で平滑であり, 直径は 2.08–2.20 mm (平均 ± 標準偏差: 2.14 ± 0.03 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-2a). 囲卵腔は広く, 卵黄径は 1.41–1.49 mm (平均 ± 標準偏差: 1.45 ± 0.02 mm, n = 30) で卵径の 64.5–70.3% (平均 ± 標準偏差: 67.8 ± 1.19%, n = 30) を占めた. 卵黄には細かく不規則な亀裂が認められた. 胞胚期では, 直径 0.01–0.12 mm の透明な油球が 74–122 個数えられ (n = 10), 植物極側に偏在した (Fig. 2-2-2b). また, 1 層の薄い内卵膜が卵膜のすぐ内側に認められた. 観察開始から 2 時間 46 分後には割腔が形成された (Fig. 2-2-2c). 5 時間 38 分後には割腔が拡大し, エピボリーが始まり (Fig. 2-2-2d), 8 時間 46 分後には卵黄のほぼ半分を (Fig. 2-2-2e), 11 時間 6 分後には卵黄のほぼ 80% を胚盤葉が覆った. 11 時間 51 分後には胚体 appeared (Fig. 2-2-2f). 14 時間 17 分後にはエピボリーが完了し, 筋節が 4 本形成された (Fig. 2-2-2g). 17 時間 5 分後には, 胚体が卵黄の外周の約 3/4 まで伸長し, 筋節は 21 本, 脳が分化し眼胞が形成された (Fig. 2-2-2h). 19 時間 49 分後には筋節が 25 本数えられ, 耳胞が形成された (Fig. 2-2-2i). 21 時間 22 分後には尾端が卵黄囊から分離し, クッパー氏胞 appeared (Fig. 2-2-2j).

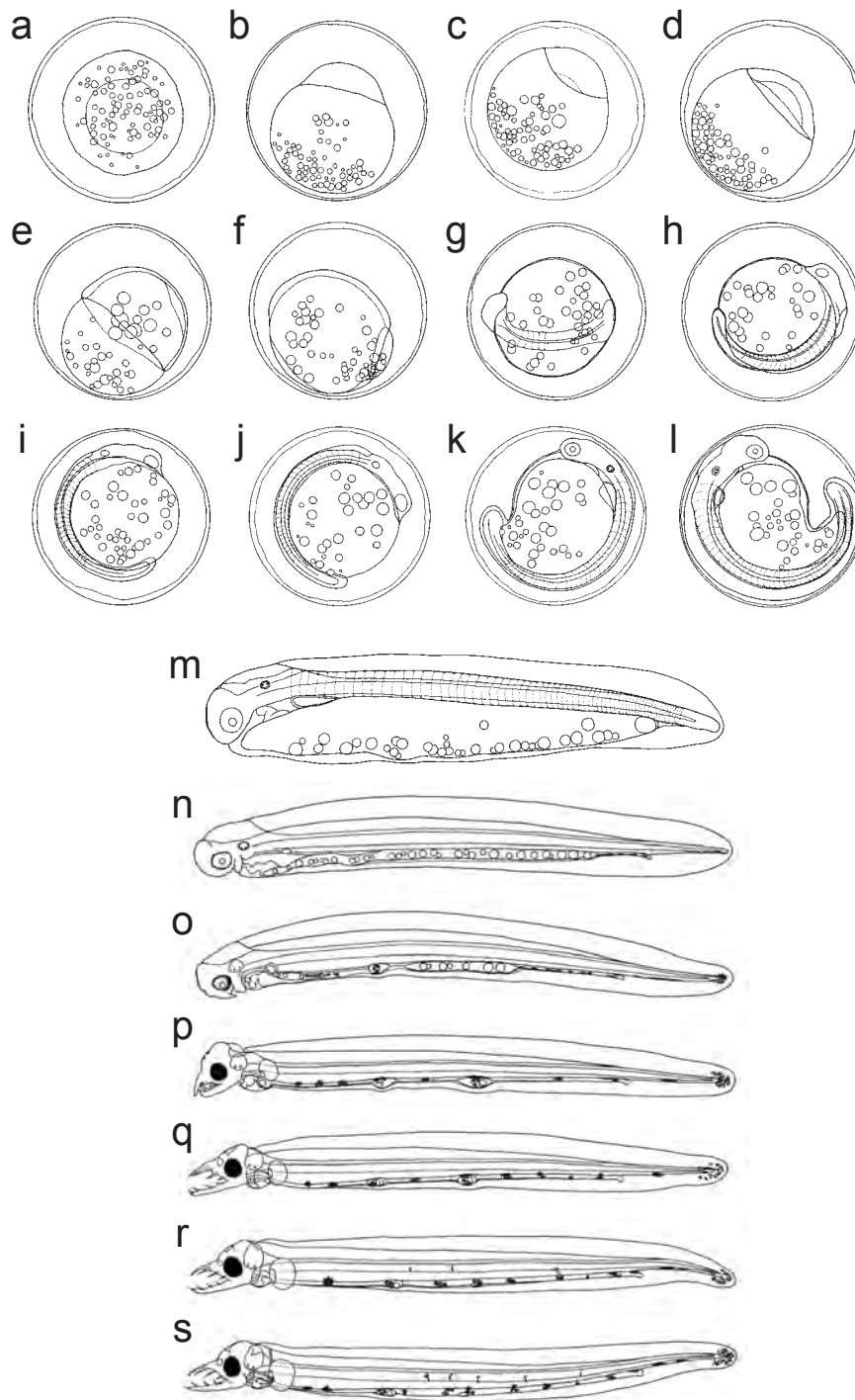


Fig. 2-2-2 Embryonic development and larval development of Pike eel *Muraenesox cinereus*. **a, b** Blastula, 0 h after collection. **c** Appearance of blastocoel, 2 h 46 min. **d** Beginning of epiboly, 5 h 38 min. **e** 50% epiboly, 8 h 46 min. **f** 90% epiboly, Appearance of embryonic body, 11 h 51 min. **g** Completion of epiboly, 4 myomeres, 21 h 22 min. **h** Appearance of optic and Kuppfer's vesicle, 21 myomeres, 17 h 5 min. **i** Appearance of otic vesicle, 25 myomeres. **j** 32 myomeres, 21 h 22 min. **k** Tail separation, appearance of lens and otolith, 39 myomeres, 25 h 42 min. **l** Disappearance of Kuppfer's vesicle, 59 myomeres. **m** Newly hatched larva, 5.2 mm in total length (TL), 91 myomeres. **n** 1 day larva, mouth opening, 8.1 mm TL, 122 myomeres. **o** 2 days larva, beginning of eye pigmentation, 9.0 mm TL, 146 myomeres. **p** 3 days larva, completion of eye pigmentation, 10.2 mm TL. **q** 4 days larva, 10.7 mm TL. **r** 5 days larva, completion of yolk absorption, 11.8 mm TL. **s** 6 days larva, 11.8 mm TL

Table 2-2-2 Summary of the embryonic and larval development of Pike eel, *Muraenesox cinereus* at water temperature of 24.1–25.0°C

Time after collection	Morphological characters	Figure no.
0 h	Multilayered blastodisc	2-2-2a, b
2 h 46 min	Appearance of blastocoel	2-2-2c
5 h 38 min	Beginning of epiboly	2-2-2d
5 h 54 min	Appearance of germ ring	
8 h 46 min	50% epiboly	2-2-2e
11 h 6 min	80% epiboly	
11 h 51 min	90% epiboly. Appearance of embryonic body	2-2-2f
14 h 17 min	Epiboly completed. 4 myomeres present	2-2-2g
17 h 5 min	Optic vesicle and Kupffer's vesicle appeared. 21 myomeres present	2-2-2h
19 h 49 min	Otic vesicle appeared. 25 myomeres present	2-2-2i
21 h 22 min	32 myomeres present	2-2-2j
25 h 42 min	End of tail started to separate from yolk. Lens and otolith visible. Formation of heart and gut. 39 myomeres present	2-2-2k
30 h 51 min	Kupffer's vesicle disappeared. Finfold appeared. 59 myomere present	2-2-2l
32 h 14 min	Elongation of the embryonic body. Prehatching	
42 h 17 min	Mass hatching. 9 pairs of free neuromasts observed. 91 myomeres present	2-2-2m
66 h 25 min	1 day larva. Mouth opened at ventral side of the head. Anus opened. Pectoral fin bud appeared. 122 myomeres present	2-2-2n
89 h 59 min	2 day larva. Beginning of eye pigmentation. Appearance of melanophores on ventral side of body and tail tip. Tooth bud appeared. Completion of myomere formation (146 myomeres)	2-2-2o
113 h 56 min	3 day larva. Eye completely pigmented. Jaws developed and mouth opening moved forward. Pectoral fin enlarged	2-2-2p
130 h 16 min	4 day larva. Movement of mouth opening completed. Guanophores appeared in the eye. Larvae swim actively	2-2-2q
156 h 44 min	5 day larva. Yolk completely absorbed	2-2-2r
180 h 44 min	6 day larva. Growth and development has stopped under non-feeding condition	2-2-2s

25 時間 42 分後には 39 本の筋節が数えられ、レンズと耳石が形成された (Fig. 2-2-2k)。また、この時点で心臓と嚢状の消化管が形成されており、28 時間 59 分後には心臓の拍動と胚体の運動が始まった (Table 2-2-2)。30 時間 51 分後には 59 筋節が数えられ、クッパー氏胞が消失し、脳と膜鰭が発達した (Fig. 2-2-2l)。油球の数は発生にともなって次第に減少し、32 時間 12 分後には直径 0.03–0.16 mm の油球が 24–48 個 ($n = 10$) 数えられた。孵化は約 39 時間後から始まり、42 時間 17 分後までに大部分が孵化した。孵化までに卵黄および胚体上に黒色素は出現しなかった。

孵化仔魚の全長は 4.4–5.4 mm (平均 ± 標準偏差 : 5.0 ± 0.27 mm, $n = 20$) だった。全長 5.2 mm の孵化仔魚では、筋節は 91 本が数えられ、紡錘形の卵黄が全長の約 80% にわたって胚体の腹面に付着しており、卵黄後端までの筋節数は 81 本だった (Fig. 2-2-2m)。油球は卵黄の下方全域にわたって分布した。消化管はまだ嚢状であり、躯幹部の前端に位置した。眼と耳胞の間に 1 対、体側には 8 個の遊離感丘が出現した。孵化仔魚は主に水槽の中層に、頭を上にして斜めになって浮いており、間欠的に遊泳した。1 日齢の仔魚では (全長 7.3–8.1 mm, 平均 ± 標準偏差 : 7.8 ± 0.21 mm, $n = 20$)、卵黄の吸収が進み、頭部腹面に口が開いた (Fig. 2-2-2n)。消化管が後方へ伸長し、肛門が開いた。第 5 筋節下に胸鰭原基が形成された。卵黄より後方の消化管腹面および後部背面と尾端部に樹枝状の黒色素胞が出現した。体側の遊離感丘が増加し、9–13 個が数えられた。2 日齢の仔魚 (全長 8.6–9.3 mm, 平均 ± 標準偏差 : 8.9 ± 0.20 mm, $n = 20$) ではさらに卵黄の吸収が進行し、数カ所に分離して残るのみとなった (Fig. 2-2-2o)。眼の黒化が始まった。上顎の先端が伸長し、歯の原基が形成された。樹枝状の黒色素胞が卵黄上の数カ所と脊索末端部に出現し、脊索末端周辺の膜鰭には放射状に配列した。筋節数はさらに増加し 146 本が数えられ、2 日齢で成魚の脊椎骨数 (142–158 個 : 波戸岡, 2000) とほぼ同数に達した (Fig. 2-2-2o)。3 日齢の仔魚 (全長 9.2–10.2 mm, 平均 ± 標準偏差 : 9.7 ± 0.26 mm, $n = 20$) で眼が完全に黒化した (Fig. 2-2-2p)。3 日齢において卵黄がほとんど吸収され尽くした。口が前方に向き、開口は眼の中央部直下に達した。吻端が伸長し、上顎には 2–4 対の、下顎には 4 対の歯の原基が形成された。躯幹部腹面に 6–10 ケ所、尾部腹面に 1–3 ケ所の樹枝状黒色素胞の集合がほぼ等間隔に出現した。4 日齢 (全長 10.2–10.9 mm, 平均 ± 標準偏差 : 全長 10.4 ± 0.19 mm, $n = 20$) で眼にグアニンの沈着が認められ、鼻腔が形成された (Fig. 2-2-2q)。上顎と下顎が前方へ突出し、上顎に 4 対、下顎に 4 対の針状歯が形成された。胸鰭が大きくなり、肩帯が形成された。肝臓が第 16–19 筋節下に出現した。活発に連続的に遊泳するようになった。5 日齢 (全長 11.1–11.8 mm, 平均 ± 標準偏差 : 11.6 ± 0.19 mm, $n = 20$) では腹面の黒色素胞がやや大きくなり、体側には筋隔に沿って数個の樹枝状の黒色素胞が出現した (Fig. 2-2-2r)。肝臓より後方の消化管はその前方よりも太くなった。6 日齢 (全長 11.4–12.0 mm, 平均 ± 標準偏差 : 11.7 ± 0.19 mm, $n = 20$) で胸鰭基部に 1 個の樹枝状黒色素胞が出現し、5 対目の針状歯が出現した。

無給餌条件下で仔魚は 9 日齢まで生存した。孵化から 5 日齢までは体長は増大したが、6 日

齢以降はほぼ一定となった。孵化後、肛門は体の前方へ移動し、全長 8–9 mm (3 日齢) で定位となった。6 日齢以降の仔魚 (Fig. 2-2-2s) では、体型の変化も認められなかった。

第3項 ニシン

ニシンの卵は球形の沈性粘着卵であり、卵膜の外側に粘着層が認められた。受精卵は網に、また互いに密着しており、多少歪形を呈した (Fig. 2-2-3a)。卵内発生の過程を Fig. 2-2-3 と Table 2-2-3 に示した。受精卵の直径は 1.33–1.46 mm (平均 ± 標準偏差: 1.38 ± 0.03 mm, n = 30) だった。卵黄には泡沫状の亀裂が認められ、直径 0.99–1.11 mm (平均 ± 標準偏差: 1.04 ± 0.03 mm, n = 30) で卵径の 71.2–79.9% (平均 ± 標準偏差: 75.3 ± 2.03, n = 30) を占めており、囲卵腔はやや広がった。油球はなかった。囲卵腔の形成と胚盤の隆起が受精から 1 時間 58 分後に、第 1 卵割が 3 時間 38 分後に認められ、5 時間 15 分後には 4 細胞期に達した (Fig. 2-2-3a)。卵割様式は典型的な盤割だった。17 時間 55 分後には胚盤葉が複数の細胞層から形成され、ドーム状に盛り上がった (Fig. 2-2-3b)。受精後 30 時間 13 分後にはエピボリーが始まり、42 時間 30 分後には胚盤葉が卵黄の約半分を覆い、胚下腔が認められた (Fig. 2-2-3c)。48 時間 28 分後には卵黄の約 70% を胚盤葉が覆い、胚環と胚体が認められ (Fig. 2-2-3d)、54 時間 20 分後には、卵黄のほとんどが胚盤葉で覆われた (Fig. 2-2-3e)。66 時間 22 分後にはエピボリーが完了し、眼胞が形成され、筋節は 10 本が数えられた (Fig. 2-2-3f)。72 時間 21 分後にはクッパー氏胞と 16 筋節が、78 時間 15 分後には眼杯と 21 筋節が認められた。90 時間 23 分後には尾端が卵黄から分離し、筋節は 30 本が数えられ、レンズと耳胞が形成された (Fig. 2-2-3g)。96 時間 5 分後にはクッパー氏胞が消失した。102 時間 32 分後では尾端の分離が進み、胚体が卵黄を 1 周巻き、尾端と吻端が接した (Fig. 2-2-3h)。鼻腔が形成され、胚体の運動と心臓の拍動が始まった。114 時間 28 分後には消化管が形成され、その末端は 126 時間 5 分後に膜鰭縁辺に達した。138 時間 28 分後では胚体が卵黄を 1 周半巻き、眼の黒化が始まり、耳石、胸鰭原基が形成された (Fig. 2-2-3i)。筋節は 58 本が数えられ、孵化仔魚の筋節数と同数に達した。186 時間 15 分後には眼にグアニンが沈着し、膜鰭が発達し、体表面には網目状の線状紋が出現した (Fig. 2-2-3j)。210 時間 40 分後に開口し、胚体の筋節腹面に腹中線をはさんで並ぶ 1 対の黒色素列が出現した (Fig. 2-2-3k)。216 時間 19 分後に消化管後半部の腹面にも 1 対の黒色素列と、消化管後部背面に 1 個の樹枝状黒色素が、234 時間 10 分後には脊索末端部に数個の樹枝状黒色素胞が出現し、孵化仔魚と同様の色素発現状態に達した (Fig. 2-2-3l)。264 時間 40 分後までに口が大きくなり、鰓弓も形成された。

孵化は 241 時間 58 分後に始まり、271 時間 45 分後までに大部分が孵化した。孵化仔魚の全長は 7.1–7.7 mm (平均 ± 標準偏差: 7.5 ± 0.15 mm, n = 20)、脊索長は 6.9–7.5 mm (平均 ± 標準偏差: 7.2 ± 0.15 mm, n = 20) であり (Fig. 2-2-3m)、筋節は 56–59 本が数えられた。躯幹部と

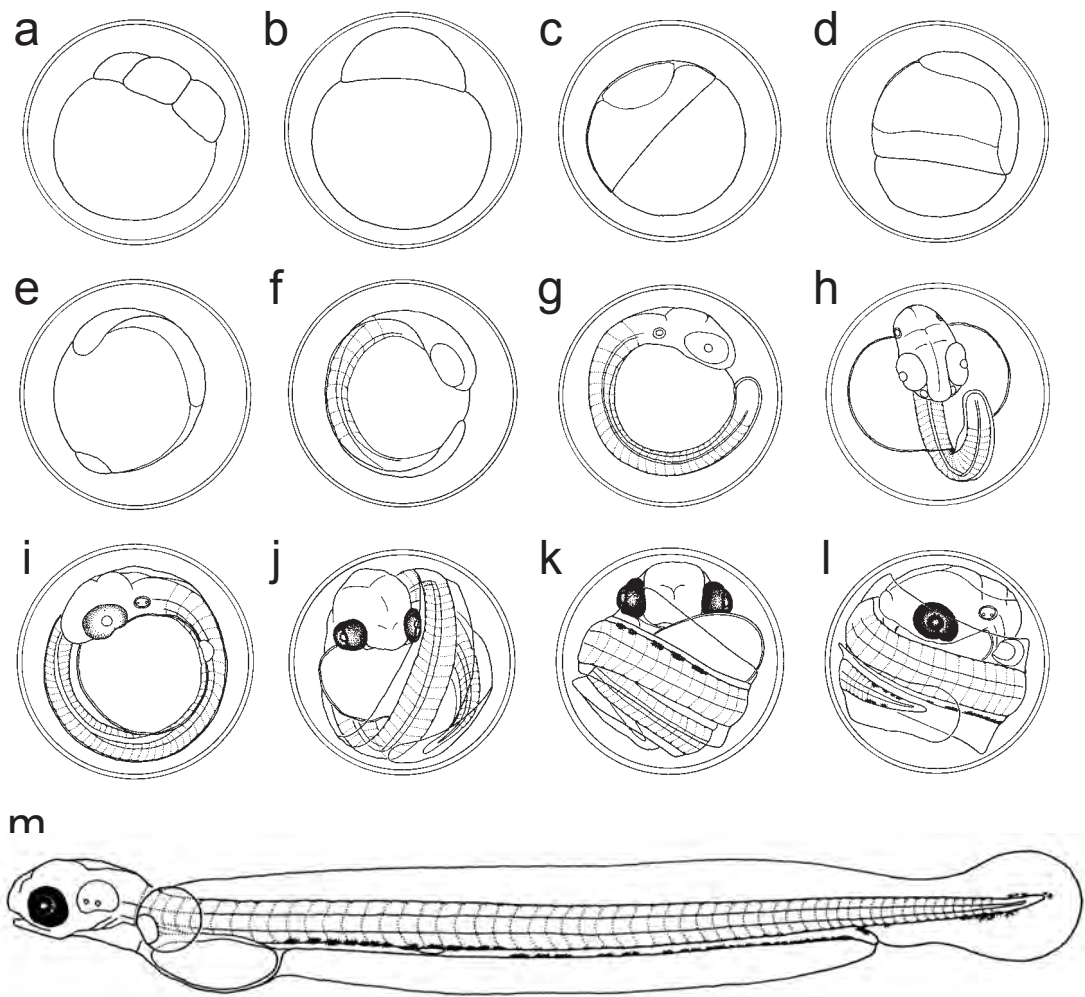


Fig. 2-2-3 Embryonic development of eggs and morphology of a newly hatched larva of *Pacific herring* *Clupea pallasii*. **a** Four-cell stage, 5 h 15 min after fertilization. **b** Blastula, 17 h 55 min. **c** 50% epiboly, 42 h 30 min. **d** 70% epiboly, 48 h 28 min. **e** 90% epiboly, 54 h 20 min. **f** Appearance of optic vesicle, 10 myomeres present, 66 h 22 min. **g** Appearance of lens and otic vesicle, 30 myomeres present, 90 **h** 23 min. **h** Beginning of body movements and heartbeat, 102 h 32 min. **i** Appearance of melanophores on the eye and pectoral fin rudiments, 138 h 28 min. **j** Appearance of guanophores on the eye, 186 h 15 min. **k** Melanophores appeared on the body, 210 h 15 min. **l** Appearance of melanophores on the caudal part, 234 h 10 min. **m** Newly hatched larva, 7.6 mm in total length, 271 h 45 min

Table 2-2-3 Summary of embryonic development of Pacific herring, *Clupea pallasii* at water temperature of 8.0–10.8°C

Time after fertilization	Morphological Characters	Figure No.
1 h 58 min	Formation of perivitelline space and elevation of blastodisc	
3 h 38 min	Meroblastic cleavage. 2 equal cells	
5 h 15 min	4 equal cells	2-2-3a
17 h 55 min	Multilayered blastodisc	2-2-3b
30 h 13 min	Beginning of epiboly	
42 h 30 min	50% epiboly. Appearance of germ ring, embryonic shield, subgerminal cavity	2-2-3c
48 h 28 min	70% epiboly. A subgerminal cavity disappeared	2-2-3d
54 h 20 min	90% epiboly	2-2-3e
66 h 22 min	Formation of optic vesicle. 10 myomeres present	2-2-3f
72 h 21 min	Kupffer's vesicle appeared. 16 myomeres present	
78 h 15 min	Evacuation of optic vesicle. 21 myomeres present	
90 h 23 min	End of tail separates from yolk. Appearance of lens and otic vesicle. 30 myomeres present	2-2-3g
96 h 5 min	Kupffer's vesicle disappeared	
102 h 32 min	Embryo wraps almost around the yolk sac and caudal end of embryo reaches to snout. Appearance of olfactory vesicle. Embryo movements and heartbeat begin	2-2-3h
114 h 28 min	Formation of intestine	
126 h 5 min	Embryo wraps 3/2 around the yolk. Anus opened	
138 h 28 min	Melanophores appeared on the eye. Otolith vesicle. Formation of pectral fin rudiments. Number of myomeres (56–59 with 10–12 pre-anal myomeres) reaches almost same number as hatched larvae	2-2-3i
186 h 15 min	Guanophores appeared on the eye. Embryo wraps twice the way around the yolk	2-2-3j
210 h 15 min	Two row of melanophores appeared on the ventral side of the body. Mouth opened	2-2-3k
216 h 29 min	Melanophores appeared on the gut. Hatching glands on the head became clearly visible	
234 h 10 min	Melanophores appeared on caudal part of the body	2-2-3l
264 h 40 min	Formation of branchial arches	
271 h 45 min	Mass hatching	2-2-3m

尾部の体表全域に網目状の線状紋が認められた。卵黄は楕円球形で、その長径は全長の10.6–13.1%（平均±標準偏差：11.7±0.62%，n=20）を占めた。肛門は体の後方、第44–46筋節下に開き、PAL/TLは80.5–83.8%（平均±標準偏差：81.9±0.61 mm，n=20）だった。孵化直後の時点ですでに開口しており、眼は完全に黒化し、胸鰭と鰓弓の形成が認められた。また、鰓が第16–18筋節下に存在した。腹中線をはさんで並ぶ1対の黒色素列が、躯幹部前半では卵黄が付着している部分を除く筋節腹面に、躯幹部後半では消化管腹面に存在した。また、消化管後部背面に1個の、尾部腹面と尾端部背腹面に数個の樹枝状黒色素胞が認められた。

第4項 オニオコゼ

受精卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は1.28–1.42 mm（平均±標準偏差：1.37±0.04 mm，n=30）だった（Fig. 2-2-4a）。卵膜は透明で、表面は平滑であり、特殊な構造はなかった。囲卵腔は狭い。卵黄径は1.04–1.28 mm（平均±標準偏差：1.18±0.061 mm，n=30）で、卵径の77.9–92.5%（平均±標準偏差：86.0±3.50%，n=30）を占めた。油球はなかった。卵内発生の過程をFig. 2-2-4とTable 2-2-4に示した。採集した時点で第2卵割が終了しており、4細胞期に入っていた。筋節が10本形成された段階では、すでにエピボリーが完了し、眼胞が形成され、クッパー氏胞が出現した（Fig. 2-2-4b）。この段階ではまだ黒色素胞は認められなかった。筋節が孵化仔魚とほぼ同数の29本に達した段階では、胚体が卵黄を約2/3周し、すでに尾端が卵黄から離れていた（Fig. 2-2-4c）。胚体には、レンズと鼻腔、耳胞、耳石、膜鰭、消化管が形成され、クッパー氏胞は消失した。消化管の末端は膜鰭縁辺に達した。また、胸鰭の原基が出現した。この段階では、胚体全体と卵黄表面に細い樹枝状の黒色素胞が散在していた。

卵は産卵後1日で孵化した。孵化仔魚の全長は2.2–2.7 mm（平均±標準偏差：2.5±0.11 mm，n=30）、脊索長は2.1–2.5 mm（平均±標準偏差：2.3±0.10 mm，n=30）で、筋節は28–30本が数えられた（Fig. 2-2-6d）。卵黄は長楕円形で全長の39.1–52.1%（平均±標準偏差：45.9±3.89%，n=30）を占めた。肛門は体のほぼ中央、第10–12筋節下に、卵黄後端から約1筋節離れて開いており、PAL/TLは45.2–52.6%（平均±標準偏差：48.5±1.87 mm，n=30）だった。胸鰭原基は第3–5筋節下に位置した。頭部から尾端にかけての全域と、卵黄表面、胸鰭原基の基底部および消化管上に樹枝状の黒色素胞が認められた。これらの黒色素胞は特に頭部と胚体背面に多く認められた。孵化1日後に胸鰭が著しく増大し（Fig. 2-2-6e）、孵化後2日で全長は3.6–3.9 mm（平均±標準偏差：3.8±0.08 mm，n=30）、脊索長は3.4–3.7 mm（平均±標準偏差：3.5±0.07 mm，n=30）に達した（Fig. 2-2-6f）。体表面と卵黄上に出現していた黒色素胞がほとんど消失し、尾部腹面に2カ所の大きな樹枝状黒色素胞が出現した。また、尾部中央部の背面と脊索末端部に樹枝状の黒色素胞が認められた。胸鰭が発達して大きくなり、3個の大きな黒色素斑が出現した。孵化後5日で全長3.8–4.1 mm（平均±標準偏差：3.9±0.13 mm，n=15）、脊索長3.4–3.8 mm（平

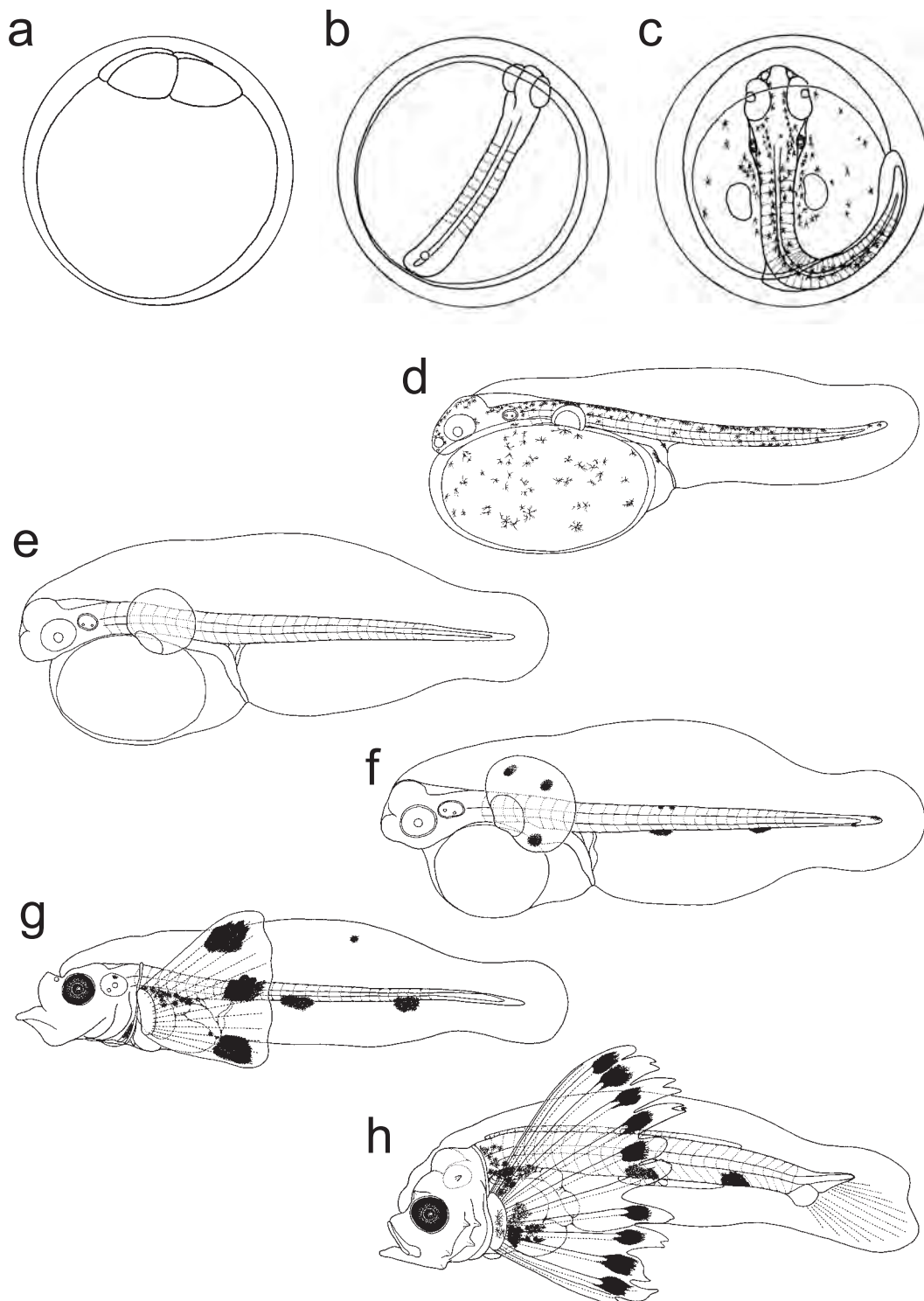


Fig. 2-2-4 Embryonic development and larval development of *Inimicus japonicus*. **a** 4-cell stage, 0 day after fertilization. **b** Formation of embryo, optic vesicle and appearance of Kupffer's vesicle, 1 day. **c** Formation of lens, olfactory pit, otic vesicle, otolith, intestine and pectoral fin rudiments, Disappearance of Kupffer's vesicle, Appearance of melanophores on the yolk and embryo, 1day. **d** Newly hatched larva, 2.6 mm in total length (TL), 29 myomeres with 11 pre-anal myomeres present. **e** 1 day larva, 3.40 mm TL. **f** 2 days larva, 3.9 mm TL, 28 myomeres with 9 pre-anal myomeres present. **g** 5 days larva, 4.1 mm TL. **h** 10 days larva, beginning of notochord flexion, 6.1 mm TL

Table 2-2-4 Summary of embryonic and larval development of *Inimicus japonicus* at water temperature of 21.2°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
0 day	4-cell stage	2-2-4a
1 day	Completion of epiboly. Optic vesicle and Kupffer's vesicle appeared. 10 myomeres present	2-2-4b
1 day	Tail separated from yolk. Kupffer's vesicle disappeared. Lens, otic vesicle, otolith and gut appeared. Pectoral fin bud formed. Number of myomeres (32) reaches almost to the number of vertebrae of adults	2-2-4c
1 day	Hatching. 0 day larva. Pectoral fin present. Appearance of melanophores. 29 myomeres	2-2-4d
2 day	1 day larva. Yolk absorption progressed. Pectoral fin enlarged	2-2-4e
3 days	2 day larva. Elongation of body. Progress in yolk absorption. Allignment of melanophores. Pectoral fin enlarged. Melanophores appeared in pectoral fin	2-2-4f
6 days	5 day larva. Mouth opening. Eye completely pigmented. Completion of yolk absorption	2-2-4g
11 days	10 day larva. Uplift of notochord tip. Formation of pectoral and caudal fin ray. Formation of pelvic, dorsal anal fin bud	2-2-4h

均 ± 標準偏差 : 3.6 ± 0.13 mm, $n = 15$) に達した。すでに開口しており、下顎は前方へ突出した (Fig. 2-2-6g)。眼が完全に黒化した。胸鰭には鰭条が形成され、3個の黒色素斑は大きくなった。肩帯が形成され、烏口骨の縫合部には1個の斑状黒色素胞が認められた。消化管は太くなって屈曲し、その背面は樹枝状の黒色素胞で覆われた。鰓蓋はまだ膜状だが、4本の鰓弓とその上に数本の鰓耙が形成された。孵化後10日で全長4.3–6.1 mm (平均 ± 標準偏差 : 5.2 ± 0.45 mm, $n = 26$)、脊索長3.8–5.4 mm (平均 ± 標準偏差 : 4.6 ± 0.40 mm, $n = 26$) に達し、脊索の上屈と下尾骨および尾鰭条の形成が始まった (Fig. 2-2-6h)。

孵化後は徐々に肛門が前方へ移動し、10日齢までにPAL/TLは32.0–36.8% (平均 ± 標準偏差 : $33.9 \pm 1.32\%$, $n = 26$) へ、肛門前筋節数は8–9本へと減少した。頭骨が発達し、下顎隅角部はとがり、耳胞棘、眼上棘、2本の前鰓蓋前縁棘、2本の前鰓蓋後縁棘が形成された。胸鰭はさらに発達し、胸鰭長は脊索長の27.5–49.5% (平均 ± 標準偏差 : $37.5 \pm 4.25\%$, $n = 26$) に達し、12本の軟条が形成された。外側の2本を除く各軟条の末端部には黒色素斑が1個ずつ認められた。また、頭頂部、消化管側面、胸鰭基底部の裏面にも樹枝状の黒色素胞が出現した。背鰭と臀鰭の原基が出現しており、それぞれで軟条基底の形成が始まった。腹鰭原基が胸鰭直下に形成された。

第5項 クエ

受精卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は0.93–0.96 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.93 ± 0.01 mm, $n = 30$) だった (Fig. 2-2-5a)。卵膜は透明で表面は平滑であり、特殊な構造はなかった。黄色みをおびた油球が1個あり、その直径は0.20–0.22 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.20 ± 0.01 mm, $n = 30$) だった。卵黄に亀裂は認められなかった。囲卵腔は狭く、卵黄は卵膜内側にほぼ接した。卵内発生過程をFig. 2-2-5とTable 2-2-5に示した。受精から17時間後にはエピボリーが終了した (Fig. 2-2-5b)。胚体は出現し脊索が形成されていたが、筋節や眼胞は形成されていなかった。受精から25時間30分後には眼杯が形成された (Fig. 2-2-5c)。筋節は17本が数えられ、尾端が卵黄から離れた。

受精から45時間30分後に孵化した。孵化仔魚の全長は2.2–2.5 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.4 ± 0.07 mm, $n = 20$)、脊索長は2.1–2.4 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.3 ± 0.07 mm, $n = 20$) で、筋節は25–27本が数えられた (Fig. 2-2-5d)。卵黄は楕円形であり、全長の37.1–48.3% (平均 ± 標準偏差 : $41.1 \pm 2.70\%$, $n = 20$) を占め、その後端に油球が位置していた。膜鰭は厚く、全体が顆粒状の構造で覆われていた。耳胞が形成されていた。肛門は体のほぼ中央、10–12筋節下に開き、PAL/TLは49.2–54.8% (平均 ± 標準偏差 : $52.7 \pm 1.38\%$, $n = 20$) であり、卵黄嚢に接して開いていた。樹枝状の黒色素胞が吻端と体の中央部の背面に2–3個ずつ出現した。まれに卵黄表面や直腸部に数個の黒色素胞が出現する個体もあった。

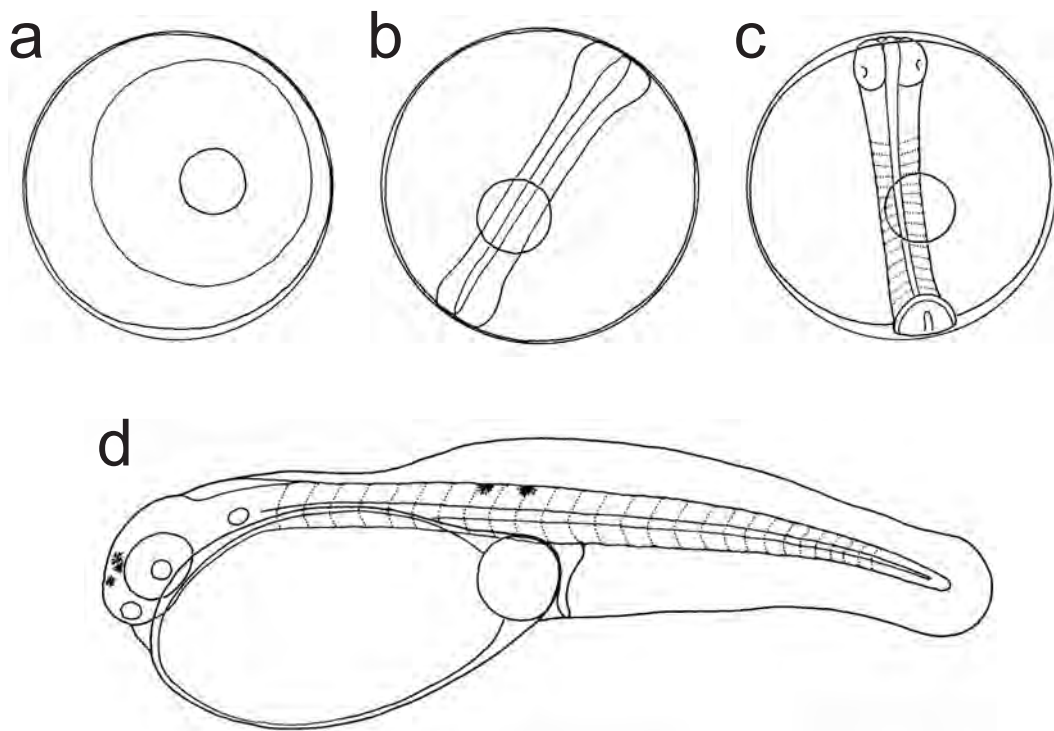


Fig. 2-2-5 Embryonic development and newly hatched larva of *Epinephelus bruneus*. **a** Elevation of blastodisc, 0 h after fertilization. **b** Completion of epiboly. Formation of embryo and notochord, 17 h. **c** Formation of optic cup. End of tail separates from yolk sac. 17 myomeres present, 25 h 30 min. **d** Newly hatched larva, 2.3 mm in total length, 26 myomeres with 11 pre-anal myomeres

Table 2-2-5 Summary of the embryonic development and morphology of newly hatched larvae of *Epinephelus bruneus*

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
0 h	Just after fertilization. Elevation of blastodisc	2-2-5a
17 h	Completion of epiboly. Appearance of embryonic body	2-2-5b
25 h 30 min	Optic vesicle appeared. 14 myomeres present	2-2-5c
45 h 30 min	Hatching. 0 day larva. Lens and otic vesicle appeared. Gut formed. Melanophores appeared on head and dorsal side of the body. 26 myomeres present and this number is as almost same as that of vertebrae in adults	2-2-5d

第6項 アカアマダイ

受精卵は球形の分離浮性卵だった。卵径は 0.83–0.91 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.87 ± 0.02 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-6a)。卵膜は透明で表面は平滑であり、特殊な構造はなかった。透明な油球が植物極側に 1 個あり、その直径は 0.17–0.18 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.18 ± 0.004 mm) だった。卵黄は均質だった。囲卵腔は狭く、卵黄は卵膜内側にほぼ接した。受精から 15 分後に囲卵腔が形成され (Fig. 2-2-6a)、卵内発生の過程を Fig. 2-2-6 と Table 2-2-6 に示した。受精から 49 分後で胚盤が隆起し (Fig. 2-2-6b)、1 時間 5 分後には第 1 卵割が起きた (Fig. 2-2-6c)。卵割様式は典型的な盤割だった。1 時間 36 分後には 4 細胞期 (Fig. 2-2-6d)、2 時間 5 分後に 8 細胞期 (Fig. 2-2-6e)、2 時間 35 分後に 16 細胞期 (Fig. 2-2-6f) に達し、4 時 10 分後には胚盤葉は複数の細胞層から形成されるようになった (Fig. 2-2-6g)。12 時間 15 分後にエピボリーが始まり (Fig. 2-2-6h)、17 時間 18 分後には胚盤葉は卵黄の約 30% を覆い、胚環と胚軸が形成された (Fig. 2-2-6i)。その後、18 時間後には胚盤葉が卵黄のほぼ半分を覆った。21 時間 13 分後には胚盤は卵黄の 80% を覆い、胚体が出現し、眼胞の形成が認められた (Fig. 2-2-6j)。このときに筋節は 3 本が数えられ、クッパー氏胞が出現した。24 時間 20 分後にエピボリーが完了し、筋節は 9 本が数えられた (Fig. 2-2-6k)。30 時間 43 分後には尾端が卵黄から分離した (Fig. 2-2-6l)。筋節は 16 本が数えられ、頭部および胚体上に点状の黒色素胞が認められた。クッパー氏胞が消失した。32 時間 26 分後には 19 筋節が数えられ、眼杯と鼻腔が形成され、卵黄上にも黒色素胞が出現した (Fig. 2-2-6m)。34 時間 35 分後には心臓、レンズ、耳胞が形成された (Fig. 2-2-6n)。胚体および卵黄上の黒色素胞は樹枝状に広がり、数が増加した。筋節数は 24 本が数えられ、孵化仔魚の筋節数とほぼ同数に達した。また、心臓の拍動と胚体の運動が始まった。36 時間 42 分後には消化管が形成され、耳石が出現しており、油球上に樹枝状の黒色素胞が認められた (Fig. 2-2-6o)。孵化は 41 時間 29 分後に始まり (Fig. 2-2-6p)、45 時間後までに 90% 以上の卵が孵化した。

孵化仔魚の生時の全長は 1.95–2.18 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.1 ± 0.05 mm, n = 20)、脊索長は 1.9–2.1 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.0 ± 0.05 mm, n = 20) だった (Fig. 2-2-6q)。筋節は 24–25 本が数えられた。卵黄は楕円球形で吻端よりやや前方へ突出し、全長の 46.4–52.0% (平均 ± 標準偏差 : 50.1 ± 1.47%, n = 20) を占め、その後端に油球が位置した。肛門は体の中央からやや後方、第 10 筋節下に開き、PAL/TL は 56.7–61.1% (平均 ± 標準偏差 : 58.6 ± 0.98%, n = 20) だった。膜鱗上には小胞状の構造が認められた。樹枝状の黒色素胞が、頭部から躯幹部の背面および尾部側面、また、卵黄の表面と油球表面に散在した。

第7項 ヒラメ

受精卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は 0.88–0.98 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.92 ± 0.02 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-7a)。卵内発生の過程を Fig. 2-2-7 と Table 2-2-7 に示した。卵膜は透明

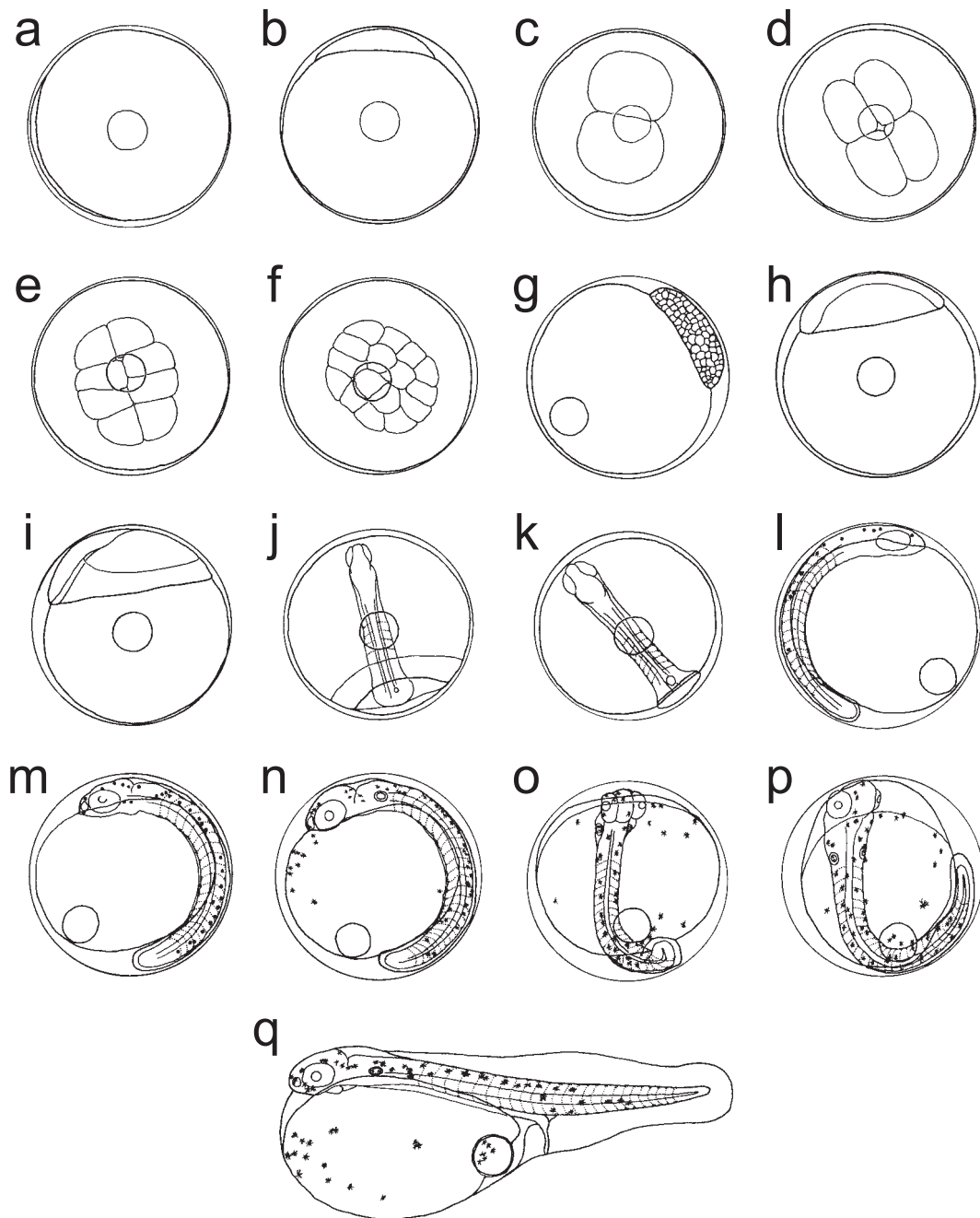


Fig. 2-2-6 Embryonic development and morphology of newly hatched larva of *Branchiostegus japonicus*. **a** Fertilized egg, 15 min after fertilization. **b** Elevation of blastodisc, 49 min. **c** 2-cell stage, 1 h 5 min. **d** 4-cell stage, 1 h 36 min. **e** 8-cell stage, 2 h 5 min. **f** 16-cell stage, 2 h 35 min. **g** Multilayered blastoderm, 4 h 10 min. **h** Beginning of epiboly, 12 h 15 min. **i** Formation of embryonic shield and germ ring, 17 h 18 min. **j** Formation of embryo, 3 myomeres present, 21 h 13 min. **k** Completion of epiboly, 9 myomeres, 24 h 20 min. **l** Tail lift. Appearance of melanophores on embryo, 16 myomeres, 30 h 43 min. **m** Formation of optic cup and olfactory pit, 32 h 26 min. **n** Appearance of melanophores on yolk, 34 h 35 min. **o** Formation of otolith, 36 h 42 min. **p** Prehatching, 41 h 29 min. **q** Newly hatched larva, 2.0 mm in total length. 24 myomeres with 10 pre-anal myomeres present

Table 2-2-6 Summary of the embryonic development and morphology of newly hatched larvae of *Branchiostegus japonicus* at water temperature of 19.7–20.8°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
15 min	Just after fertilization	2-2-6a
49 min	Elevation of blastodisc	2-2-6b
1 h 5 min	Meroblastic cleavage. 2 equal cells	2-2-6c
1 h 36 min	2nd cleavage. 4 equal cells	2-2-6d
2 h 5 min	3rd cleavage. 8 equal cells	2-2-6e
2 h 35 min	4th cleavage. 16 equal cells	2-2-6f
4 h 10 min	Multilayered blastodisc	2-2-6g
12 h 15 min	Epiboly started. Blastocoel observed. Germ ring and embryonic shield appeared	2-2-6h
17 h 18 min	30% epiboly. Germ ring and embryonic axis appeared	2-2-6i
18 h	50% epiboly	-
21 h 13 min	80 % epiboly. Embryonic body appeared. Optic vesicle and Kupffer's vesicle appeared. 3 myomeres present	2-2-6j
24 h 20 min	Completion of epiboly. 9 myomeres present	2-2-6k
30 h 43 min	End of tail separates from yolk. Melanophore appeared on the body. Kupffer's vesicle disappeared. 16 myomeres present.	2-2-6l
32 h 26 min	Evacuation of optic vesicle. Olfactory organ observed. 19 myomeres present	2-2-6m
34 h 35 min	Lens and otic vesicle appeared. Heart formed. Branched melanophores scattered on over body and yolk. Embryo movements and heart beat begin. Number of myomeres (24) reaches almost same number as in hatched as in hatched larvae	2-2-6n
36 h 42 min	Otolith and gut observed. Melanophores appeared on the oil globule	2-2-6o
41 h 29 min	Hatching started. Mass hatching occurred by 44 h	2-2-6p
45 h 10 min	0 day larva	2-2-6q

で表面は平滑であり、特殊な構造はなかった。卵黄は均質で、直径 0.75–0.88 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.81 ± 0.04 mm, n = 30) で卵径の 81.1–94.6% (平均 ± 標準偏差 : 88.1 ± 4.39%, n = 30) を占めた。直径 0.15–0.20 mm (平均 ± 標準偏差 : 0.18 ± 0.02 mm, n = 30) の黄色い油球が植物極側に 1 個あった。卵内発生を観察した卵は、飼育を開始した時点 (孵化 69 時間 15 分前) で既に胞胚期に達しており、割腔が形成されていた。飼育開始後 2 時間 26 分では割腔が拡大し、エピボリーが始まった (Fig. 2-2-7b)。6 時間 15 分後には胚盤葉が卵黄の 50% を覆い、割腔がさらに拡大し、胚環と胚盾も出現した (Fig. 2-2-7c)。21 時間 31 分後にはエピボリーが完了し、胚体が形成され、筋節は 11 本が数えられた (Fig. 2-2-7d)。胚体の長さは卵黄の外周の約 1/2 だった。眼杯が形成された。また、クッパー氏胞が出現した。胚体全域と卵黄の油球周辺部に点状の黒色素胞が出現した。胚体上の黒色素胞は頭部背面に多く、尾部では少なかった。31 時間 37 分後には尾端が卵黄から分離し、クッパー氏胞が消失した (Fig. 2-2-7e)。筋節が増加し、25 本が数えられ、レンズと耳胞が形成された。点状の黒色素胞は油球上にも認められた。45 時間 30 分後には胚体の伸長と尾端の分離が進み、筋節数も 34 本が数えられた (Fig. 2-2-7f)。また、鼻腔が形成された。樹枝状の黒色素胞が増加した。57 時間 9 分後には胚体はさらに伸長して卵黄をほぼ 1 周した (Fig. 2-2-7g)。筋節は 39 本が数えられ、孵化仔魚とほぼ同数に達した。膜鰭が発達しており、その表面に数個の樹枝状黒色素胞が出現した。消化管が形成され、その末端は膜鰭縁辺に達した。

採集から 69 時間 15 分後には大部分が孵化した。孵化仔魚の全長は 2.0–2.4 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.3 ± 0.11 mm, n = 30)、脊索長は 1.9–2.3 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.2 ± 0.10 mm, n = 30) で (Fig. 2-2-7h)、筋節は 37–39 本が数えられた。卵黄は楕円球形で、脊索長の 41.9 ± 3.44% (平均 ± 標準偏差) を占め、その後部腹面に油球が位置した。肛門は体の中央からやや後方に、第 12–14 筋節下に卵黄後端から約 2 筋節離れて開き、PAL/TL は 46.7–54.0% (平均 ± 標準偏差 : 49.4 ± 1.86%, n = 30) だった。樹枝状の黒色素胞が頭部から脊索末端の部分と、卵黄上、油球上に散在した。この黒色素は、頭部背面および体背面に多く認められた。また、背側および腹側の膜鰭上に外方へ向かって広がる樹枝状の黒色素胞が並んでいた。1 日齢の仔魚では卵黄の吸収が進み、全長は 2.7–3.1 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.9 ± 0.10 mm, n = 30)、脊索長は 2.6–2.9 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.7 ± 0.10 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-7i)。肛門はやや前方へ移動し (PAL/TL = 41.4–45.0%, 平均 ± 標準偏差 : 43.6 ± 0.92%), 卵黄後端から 3–5 筋節離れていた。胸鰭原基が出現した。体表、卵黄、油球に分布する黒色素胞の状態は孵化直後とほぼ同様だが、膜鰭上の黒色素胞は尾部中央部に対する部分に扇状に並んだ。

第 8 項 ババガレイ

受精卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は 1.58–1.66 mm (平均 ± 標準偏差 : 1.62 ± 0.018 mm,

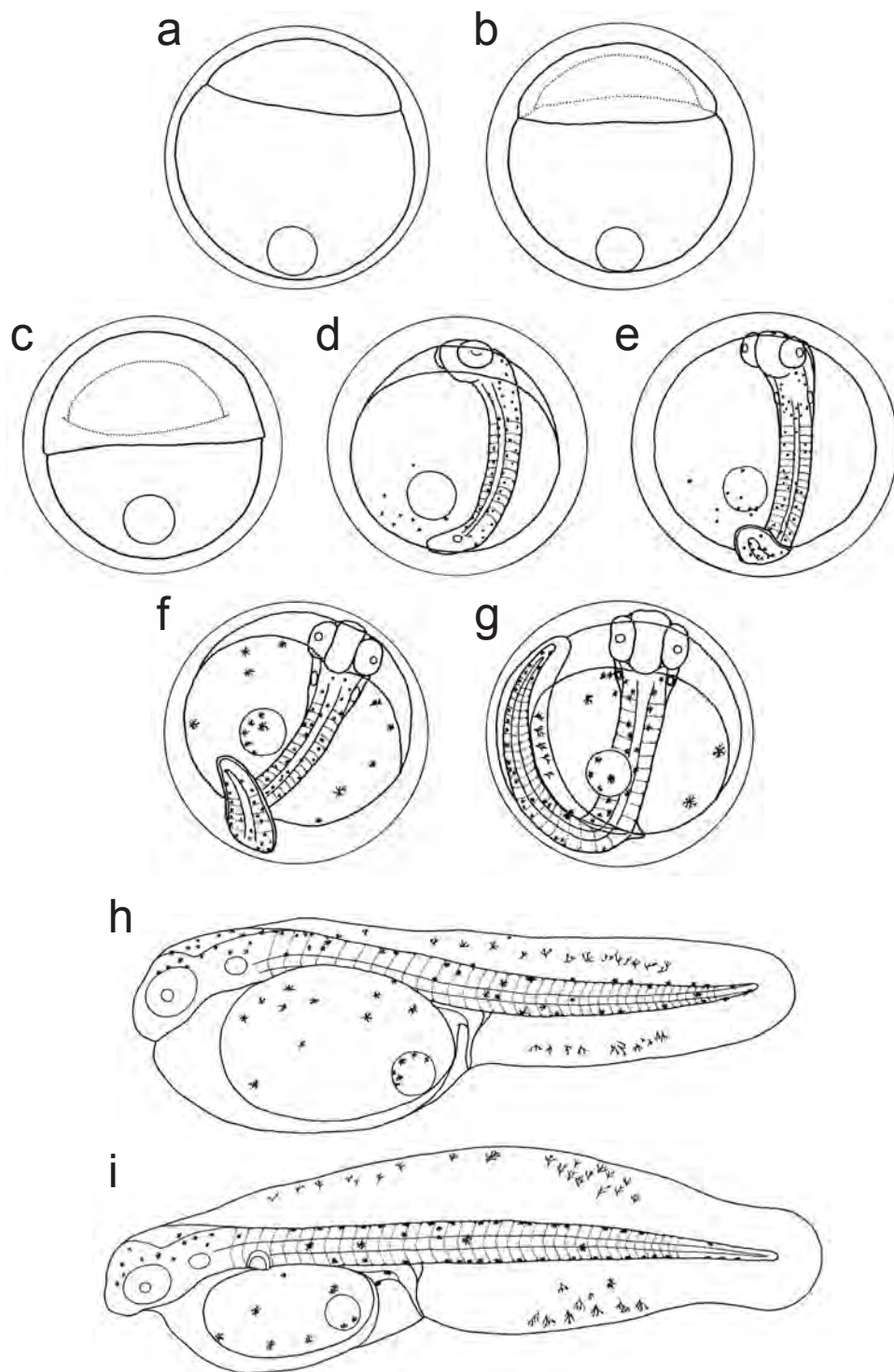


Fig. 2-2-7 Embryonic development and larval development of *Paralichthys olivaceus*. **a** Blastula, 10 min. after collection. **b** Beginning of epiboly, 2 h 26 min. **c** 50% epiboly, 6 h 15 min. **d** Formation of embryo, Appearance of melanophores on the yolk, oil globule and embryo, 11 myomeres present, 21 h 30 min. **e** Tail separation, 25 myomeres, 31 h 30 min. **f** Further separation of tail from yolk sac, 45 h 30 min. **g** Appearance of melanophores on finfold, 57 h 9 min. **h** Newly hatched larvae, 2.2 mm in total length (TL), 0 day. **i** 1 day larva, 2.9 mm TL

Table 2-2-7 Summary of the embryonic and larval development of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* at water temperature of 15.0–15.5°C

Time after collection	Morphological characters	Figure no.
10 min	Appearance of blastocoel	2-2-7a
2 h 26 min	Epiboly started	2-2-7b
6 h 15 min	50% epiboly. Appearance of embryonic shield and germ ring	2-2-7c
21 h 31 min	Formation of embryonic body. Optic vesicle already formed. Kupffer's vesicle appeared. Melanophores scattered over body and yolk sac. 11 myomeres present	2-2-7d
31 h 37 min	End of the tail separates from yolk. Appearance of lens and otic vesicles. Melanophores appeared on oil globule. 25 myomeres present	2-2-7e
45 h 30 min	Further separation of tailtip from yolk. Melanophore increased in number. 34 myomeres present	2-2-7f
57 h 9 min	Formation of finfold and gut. Melanophore appeared on finfold. Number of myomeres (39) reaches almost same number in hatched larvae	2-2-7g
69 h 15 min	Hatching. 0 day larva.	2-2-7h
93 h 27 min	1 day larva. Body elongated. Yolk absorption progressed. Pectoral fin bud appeared	2-2-7i

n = 33) だった (Fig. 2-2-8a). 卵膜は透明で表面は平滑であり, 特殊な構造はなかった. 卵黄は均質であり, 直径は 1.34–1.52 mm (平均 ± 標準偏差: 1.47 ± 0.033 mm, n = 33) で卵径の 83.8–93.8% (平均 ± 標準偏差: $91.2 \pm 3.14\%$, n = 33) を占めた. 油球はなかった. 卵と仔魚の発生過程を Fig. 2-2-8 と Table 2-2-8 に示した.

孵化仔魚は全長 4.2–4.4 mm (平均 ± 標準偏差: 4.3 ± 0.09 mm, n = 5), 脊索長 4.0–4.3 mm (平均 ± 標準偏差: 4.1 ± 0.12 mm, n = 5) で筋節は 46–48 本が数えられた (Fig. 2-2-8b). 卵黄は楕円形で, 全長の $36.8 \pm 1.36\%$ (平均 ± 標準偏差) を占めた. 肛門は体の中央よりもやや前方の第 12–14 筋節下を開き, PAL/TL は 38.6–41.0% (平均 ± 標準偏差: $39.5 \pm 0.95\%$, n = 5) だった. 開口はしていないが, すでに胸鰭原基が形成され, 眼の黒化が始まった. 仔魚の頭部から脊索末端の全域と, 卵黄表面, 後部消化管背面および肛門周辺に樹枝状の黒色素胞が認められた. 体表の黒色素胞は体側よりも背面と腹面に密に分布した. 膜鰭の縁辺部には外方へ広がる樹枝状の黒色素胞が背側に 6–11 個, 腹側に 7–12 個が分布した. 2 日齢 (全長 4.7–5.0 mm, 平均 ± 標準偏差: 4.8 ± 0.08 mm, n = 8) では卵黄の吸収が進み, 体が伸長した (Fig. 2-2-8c). 黒色素胞が増加し, 体背面と腹面の黒色素胞はほぼ 2 列をなした. 5 日齢 (全長 5.6–5.7 mm, 平均 ± 標準偏差: 5.6 ± 0.06 mm, n = 5) では卵黄がほぼ吸収され, 眼が完全に黒化し, 開口した (Fig. 2-2-8d). 消化管が太くなり, 屈曲が始まった. 体表に散在していた黒色素は大きくなり, 上顎と, 下顎の先端部には黒色素胞が出現した. また, 胴部の腹中線上には樹枝状の黒色素列が出現した. なお, 孵化から 5 日後までの仔魚の体型には大きな変化は認められなかった.

第9項 ヌマガレイ

受精卵は球形の分離浮性卵であり, 卵径は 0.94–1.08 mm (平均 ± 標準偏差: 1.01 ± 0.03 mm, n = 33) だった (Fig. 2-2-9a). 卵膜は透明で表面は平滑であり, 特殊な構造はなかった. 卵黄は均質であり, その直径は 0.80–1.00 mm (平均 ± 標準偏差: 0.90 ± 0.04 mm, n = 33) で卵径の 83.0–96.0% (平均 ± 標準偏差: $89.2 \pm 3.40\%$, n = 33) を占めた. 油球はなかった. 卵内発生の過程を Fig. 2-2-9 と Table 2-2-9 に示した. 受精から 24 時間後にはエピボリーが始まった (Fig. 2-2-9b). 48 時間後にはエピボリーが完了した (Fig. 2-2-9c). このとき胚体が形成されており, 筋節は 6 本が数えられた. 脳が分化し, 眼胞が形成された. また, クッパー氏胞が出現した. 点状の黒色素胞が胚体の背面にまばらに出現した. 72 時間後には胚体が伸長し, 卵黄を 2/3 周しており, 尾端が卵黄から分離した (Fig. 2-2-9d). レンズと耳胞が形成され, 胚体表面の黒色素胞が増加した. クッパー氏胞が消失した. 孵化直前の卵では, 胚体がさらに伸長して卵黄をほぼ 1 周し, 膜鰭が発達した (Fig. 2-2-9e). 消化管が形成され, その末端は膜鰭縁辺に達した. 卵内において胸鰭原基が出現した. 胚体表面の黒色素胞は樹枝状に広がった. 96 時間後には大部分が孵化した.

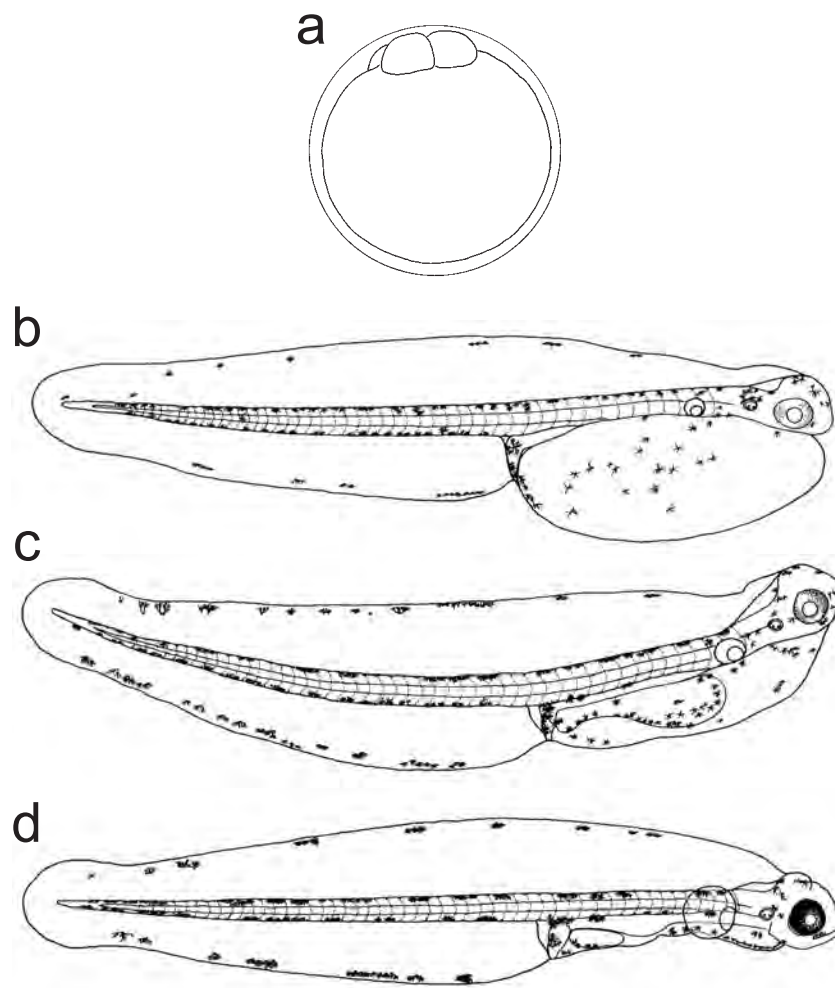


Fig. 2-2-8 Morphology of egg and larvae of *Microstomus achne*. **a** 4-cell stage. **b** Newly hatched larva, 4.3 mm in total length (TL). **c** 2 days larva, 5.0 mm TL. **d** 5 days larva, 5.7 mm TL

Table 2-2-8 Summary of the embryonic and larval development of slime flounder *Microstomus achne* at water temperature of 10°C

Days after fertilization	Morphological characters	Figure no.
0 day	4-cell stage	2-2-8a
16 days	Hatching. 0 day larva. Pigmentation on eyes started. Pectral fin buds and gut appeared. Otolith visible	2-2-8b
18 days	2 day larva. Elongation of body and progress in yolk absorption	2-2-8c
21 days	5 day larva. Yolk completely absorbed. Mouth opened. Eyes completely pigmented. Pectral fin enlarged	2-2-8d

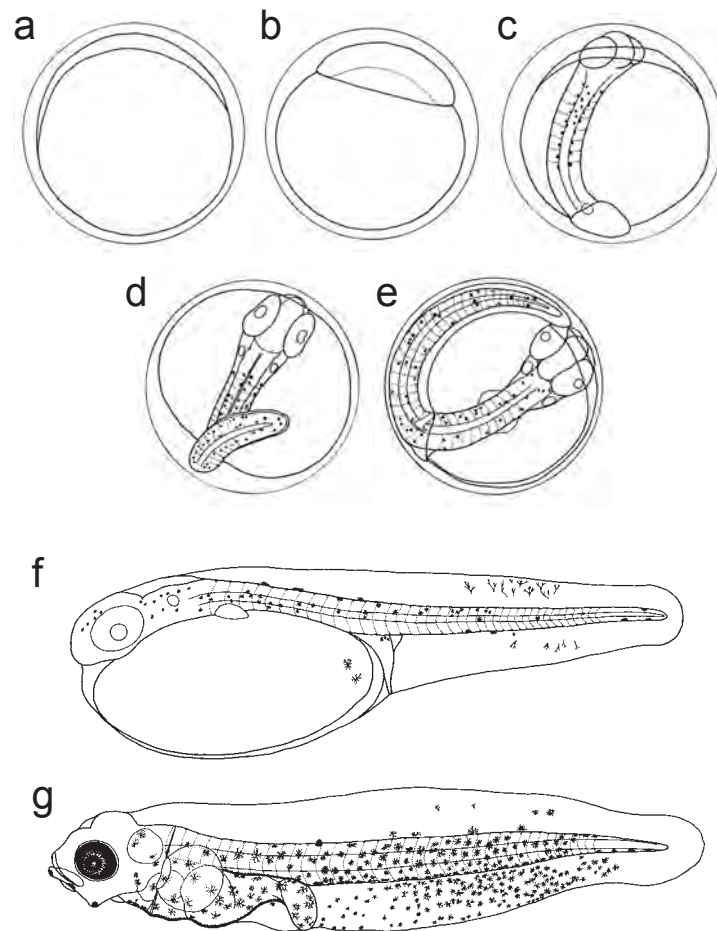


Fig. 2-2-9 Embryonic development and larval development of *Platichthys stellatus*. **a** Elevation of blastodisc, just after fertilization. **b** Beginning of epiboly, 24 h. **c** Formation of embryo, appearance of optic vesicle and Kupffer's vesicle. Melanophores scattered on the body. 6 myomeres present, 48h. **d** The end of the tail separates from the yolk. Formation of lens and otic vesicle and lens. embryo. 30 myomeres, 72 h. **e** Prehatching. Formation of pectoral fin rudiments, 96 h. **f** Newly hatched larva, 2.7 mm in total length (TL), 38 myomeres with 13 pre-anal myomeres. **g** 10 days larva, 5.1 mm TL, 37 myomeres with 11 pre-anal myomeres

Table 2-2-9 Summary of embryonic and larval development of *Platichthys stellatus* at water temperature of 15°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
0 h	Just after fertilization. Elevation of blastodisc	2-2-9a
24 h	Multilayered blastoderm	2-2-9b
48 h	Completion of epiboly. Embryonic body, optic vesicle and Kupffer's vesicle appeared. Melanophores appeared on the body. 6 myomeres present	2-2-9c
72 h	Tail separated from yolk. Lens and otic vesicle appeared. Kupffer's vesicle disappeared. 30 myomeres	2-2-9d
96 h	Just before hatching. Gut formed. Finfold enlarged	2-2-9e
96 h	Hatching. 0 day larva, 38 myomeres present	2-2-9f
336 h	10 day larva. Completion of yolk absorption. Mouth opened. Eye fully pigmented. 37-40 myomeres present and this number is as same as the adults vertebrae	2-2-9g

孵化仔魚は全長 2.4–2.7 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.5 ± 0.06 mm, n = 30), 脊索長 2.3–2.6 mm (平均 ± 標準偏差 : 2.4 ± 0.06 mm, n = 30) で, 筋節は 37–40 本が数えられた (Fig. 2-2-9f). 卵黄は楕円球形で全長の 38.8–50.0% (平均 ± 標準偏差 : 44.7 ± 2.56%, n = 30) を占めた. 肛門は体のほぼ中央, 第 12–15 筋節下に卵黄後端にほぼ接して開いた (PAL/TL = 49.5–53.5%, 平均 ± 標準偏差 : 51.9 ± 1.00%, n = 30). 開口はしていなかった. 頭部から脊索末端にかけて樹枝状の黒色素胞が散在し, 体背面と体側にやや多かった. さらに躯幹部背面には膜鰭上に広がる数個の樹枝状黒色素胞が認められ, 尾部中央部に対応する背腹の膜鰭上には外方へ向かって広がる樹枝状の黒色素胞が並んだ. 樹枝状の黒色素胞は卵黄後端と後部消化管背面にも認められた. 孵化から 10 日後には全長 3.9–5.1 mm (平均 ± 標準偏差 : 4.5 ± 0.30 mm, n = 30), 脊索長 3.7–4.9 mm (平均 ± 標準偏差 : 4.3 ± 0.28 mm, n = 30) に達し, 卵黄は完全に吸収され, 眼が完全に黒化した (Fig. 2-2-9g). 肛門前筋節数は 10–12 に減少し, 肛門の位置が前方へ移動した (PAL/TL = 34.4–41.3%, 平均 ± 標準偏差 : 39.6 ± 1.37%, n = 30). 胸鰭が発達して拡大し, 胸鰭長は約 0.5 mm で, 肩帯も形成された. 消化管が太くなってねじれ, その表面は樹枝状の黒色素胞によって覆われた. 躯幹部から尾部にかけての体側面は多数の樹枝状黒色素胞によって覆われ, 尾部腹面には 2 本の黒色素列が認められた. 喉部から肛門までの腹中線上に黒色素列が出現した. 耳胞内部, 下顎先端, 下顎中央部, 下顎隅角部および胸鰭基底部にもそれぞれ数個の樹枝状黒色素胞が認められた. 尾部背側の膜鰭上には数個の, 腹側の膜鰭上には多数の樹枝状黒色素胞が放射状に配列した.

第 10 項 マツカワ

受精卵は球形の分離浮性卵であり, 卵径は 1.63–1.83 mm (平均 ± 標準偏差 : 1.74 ± 0.05 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-10a). 卵膜は透明で表面は平滑であり, 特殊な構造はなかった. 卵黄に亀裂は認められず, 直径 1.37–1.50 mm (平均 ± 標準偏差 : 1.41 ± 0.032 mm, n = 30) で卵径の 75.9–86.5% (平均 ± 標準偏差 : 81.0 ± 2.85%, n = 30) を占めた. 油球はなかった. 卵内発生の過程を Fig. 2-2-10 と Table 2-2-10 に示した. 受精後 30 分で胚盤が形成され, 7 時間で 4 細胞期に達していた (Fig. 2-2-10b). 80 時間後にはエピボリーが終了しており, 筋節は 11 本が数えられ, 眼胞が形成されていた (Fig. 2-2-10c). 168 時間後には尾端が卵黄から離れ, レンズと耳胞が形成されていた (Fig. 2-2-10d). 胚体と膜鰭に分枝した黒色素胞が出現した. 腸が形成された. 筋節は 44–46 本が数えられ, 成魚の脊椎骨数とほぼ同数に達した. 216 時間後に孵化した.

孵化仔魚は全長 5.2–5.8 mm (平均 ± 標準偏差 : 5.5 ± 0.18 mm, n = 20), 脊索長 5.0–5.6 mm (平均 ± 標準偏差 : 5.3 ± 0.17 mm, n = 20) で筋節は 42–44 本が数えられた (Fig. 2-2-10e). 卵黄は楕円球形で全長の 29.9–34.8% (平均 ± 標準偏差 : 32.9 ± 1.41%, n = 20) を占めた. 肛門は体のほぼ中央 (PAL/TL = 40.4–43.9%, 平均 ± 標準偏差 : 42.5 ± 0.97%, n = 20), 第 14–16 筋節下に,

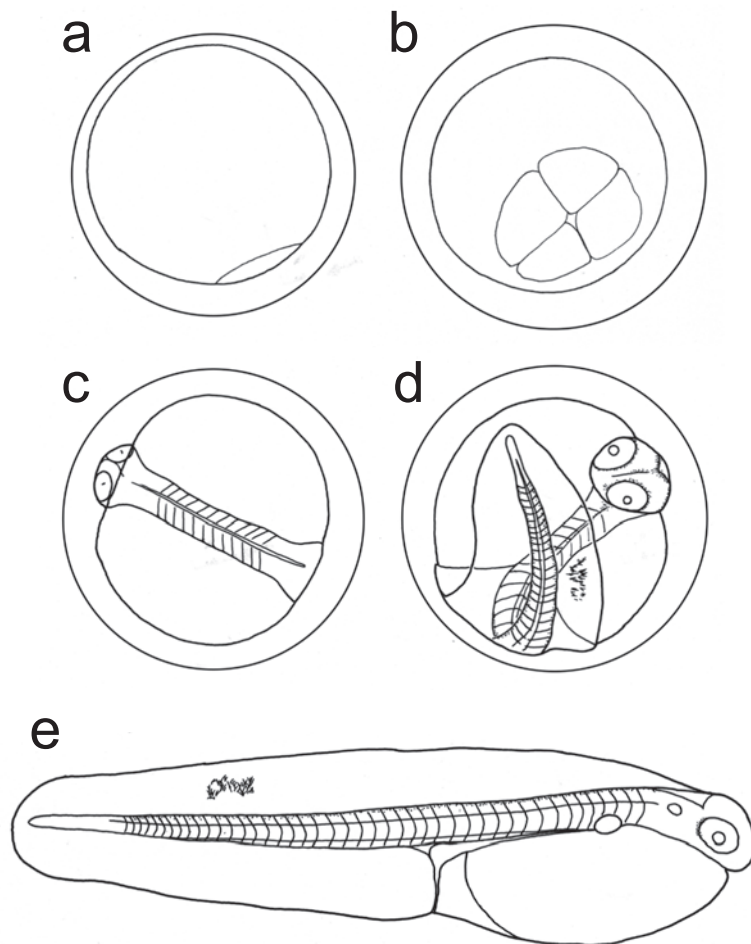


Fig. 2-2-10 Embryonic development and morphology of newly hatched larva of *Verasper moseri*. **a** Fertilized egg. Elevation of blastodisc, 0 day after fertilization. **b** Blastula. Formation of multilayered blastoderm and periblast, 1 day. **c** Completion of epiboly. Formation of embryo and optic vesicle. Appearance of Kupffer's vesicle, 6 myomeres present, 4 days. **d** 1 day before hatching, Formation of lens, otic vesicle, olfactory pit and intestine. Appearance of branched melanophores on embryo, yolk and finfold, 43 myomeres present, 7 days. **e** Newly hatched larva, 3.6 mm in total length, 44 myomeres with 15 pre-anal myomeres present

Table 2-2-10 Summary of the embryonic development of *Verasper moseri* at water temperature of 8–10°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
30 min	Just after fertilization. Elevation of blastodisc	2-2-12a
7 h 30 min	4-cell stage	2-2-12b
80 h	Completion of epiboly. Optic vesicle appeared. 11 myomeres present	2-2-12c
168 h	Tail separated from yolk. Lens, otic vesicles formed. Melanophores appeared on body and finfold. Gut formed. Number of myomeres (44–46) reaches almost same number of vertebrae in adults	2-2-12d
216 h	Hatching. Pectoral fin bud formed. 44 myomeres present	2-2-12e

卵黄後端から約2筋節離れて開いた。開口していないが、すでに胸鰭原基が形成されていた。脊索末端部を除く胚体の背面と、眼の後縁に点状の黒色素が薄く分布しており、尾部背側の膜鰭上に扇型に配列した樹枝状黒色素胞の集まりが認められた。

第11項 ホシガレイ

受精卵は球形の分離浮性卵であり、卵径は1.54–1.72 mm (平均 ± 標準偏差: 1.64 ± 0.05 mm, n = 30) だった (Fig. 2-2-11a)。卵膜は透明で表面は平滑であり、特殊な構造はなかった。卵黄に亀裂は認められず、直径1.40–1.68 mm (平均 ± 標準偏差: 1.58 ± 0.063 mm, n = 30) で卵径の86.4–100% (平均 ± 標準偏差: 96.3 ± 2.04%, n = 30) を占めた。油球はなかった。卵内発生の過程を Fig. 2-2-11 と Table 2-2-11 に示した。受精から1日後では卵割が進行し、複数の層からなる胚盤葉と、その縁辺部に周縁質が形成された (Fig. 2-2-11b)。受精から4日後にはエピボリーが終了した (Fig. 2-2-11c)。胚体が形成され、筋節は6本が数えられ、眼胞が形成された。クッパー氏胞が出現した。受精から7日後では胚体が伸長し、すでに尾端が卵黄から離れた (Fig. 2-2-11d)。レンズと耳胞、鼻腔、消化管が形成され、膜鰭が広がった。消化管の末端は膜鰭縁に達した。筋節は43本が数えられ、孵化仔魚の筋節数とほぼ同数に達した。クッパー氏胞は消失した。多数の樹枝状黒色素胞が出現しており、脊索末端部を除く胚体全域および卵黄上面が黒色素胞によって覆われた。受精から8日後に孵化した。

孵化仔魚は全長3.3–3.7 mm (平均 ± 標準偏差: 3.6 ± 0.13 mm, n = 18)、脊索長3.2–3.6 mm (平均 ± 標準偏差: 3.4 ± 0.12 mm, n = 18) で筋節は44–45本が数えられた (Fig. 2-2-11e)。卵黄は楕円球形で全長の39.9 ± 2.19% (平均 ± 標準偏差) を占めた。肛門は体のほぼ中央 (PAL/TL = 41.9–48.6%, 平均 ± 標準偏差: 44.9 ± 1.70%, n = 18)、第15–16筋節下に、卵黄後端から約1筋節離れて開いた。開口していないが、すでに胸鰭原基が形成された。膜鰭表面には、まばらな小胞状の構造が認められた。脊索末端部を除く胚体全体と卵黄上面が樹枝状の黒色素胞によって覆われ、尾部の後部では背腹の膜鰭上に扇型に配列する多数の樹枝状黒色素胞が認められた。また、後部消化管背面にも数個の樹枝状黒色素胞が認められた。

第3節 孵化後のPAL/TLと筋節数の変化

孵化0日以降の仔魚を観察した。ニホンウナギ、ハモ、オニオコゼ、ヒラメ、ババガレイ、ヌマガレイ、マツカワの肛門前長 (PAL) と全長 (TL) の比を比較したところ、マツカワを除く6種で、孵化後全長が大きくなるとPAL/TLは減少する傾向があり、孵化後のプロポーシヨンの変化が種ごとに異なっていた (Fig. 2-3-1)。ハモとオニオコゼでは、それぞれ全長8.5 mm以降と3.5 mm以降でPAL/TLがほぼ一定になり、肛門の位置が定まった。さらに、マツカワ

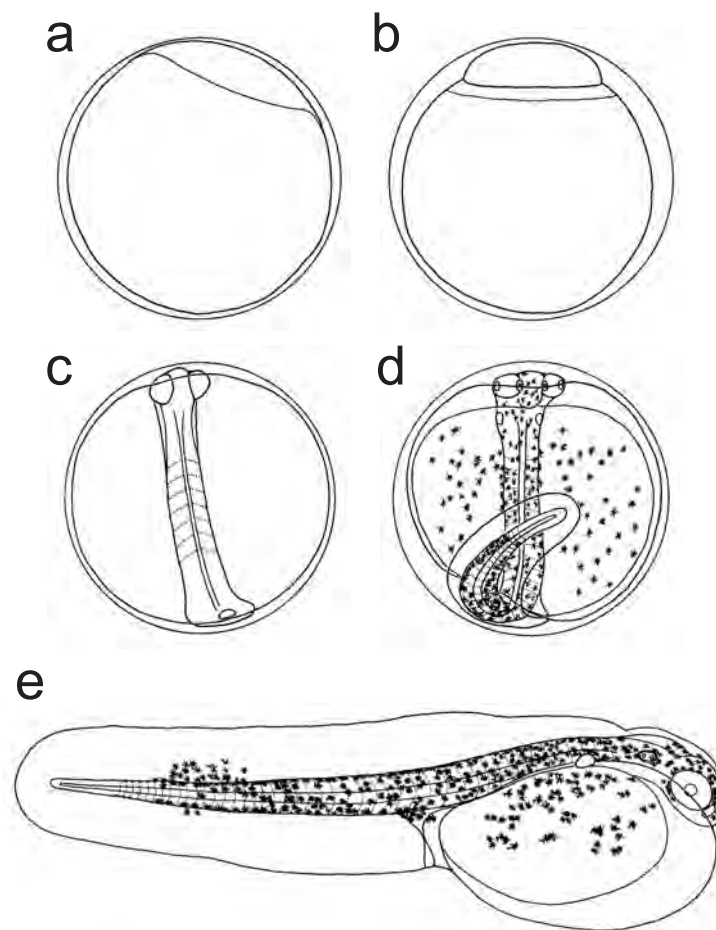


Fig. 2-2-11 Embryonic development and morphology of newly hatched larva of *Verasper variegatus*. **a** Fertilized egg. Elevation of blastodisc, 0 day after fertilization. **b** Blastula. Formation of multilayered blastoderm, 1 day. **c** Completion of epiboly. Formation of embryo and optic vesicle. Appearance of Kupffer's vesicle, 6 myomeres present, 4 days. **d** 1 day before hatching, Formation of lens, otic vesicle, olfactory pit and intestine. Appearance of branched melanophores on embryo, yolk and finfold, 43 myomeres present, 7 days. **e** Newly hatched larva, 3.6 mm in total length, 44 myomeres with 15 pre-anal myomeres present

Table 2-2-11 Summary of the embryonic development of *Verasper variegatus* at water temperature of 18°C

Time after fertilization	Morphological characters	Figure no.
0 day	Just after fertilization. Elevation of blastodisc	2-2-13a
1 day	Multilayered blastoderm	2-2-13b
4 days	Embryonic body already formed. Completion of epiboly. Appearance of Optic vesicle and Kupffer's vesicle. 6 myomeres present	2-2-13c
7 days	End of tail separates from yolk. Appearance of lens and otic vesicle, gut and melanophores. Disappearance of Kupffer's vesicle. Number of myomeres (43) reaches almost same number of vertebrae in adults	2-2-13d
8 days	Hatching. 0 day larva. Pectoral fin bud formed	2-2-13e

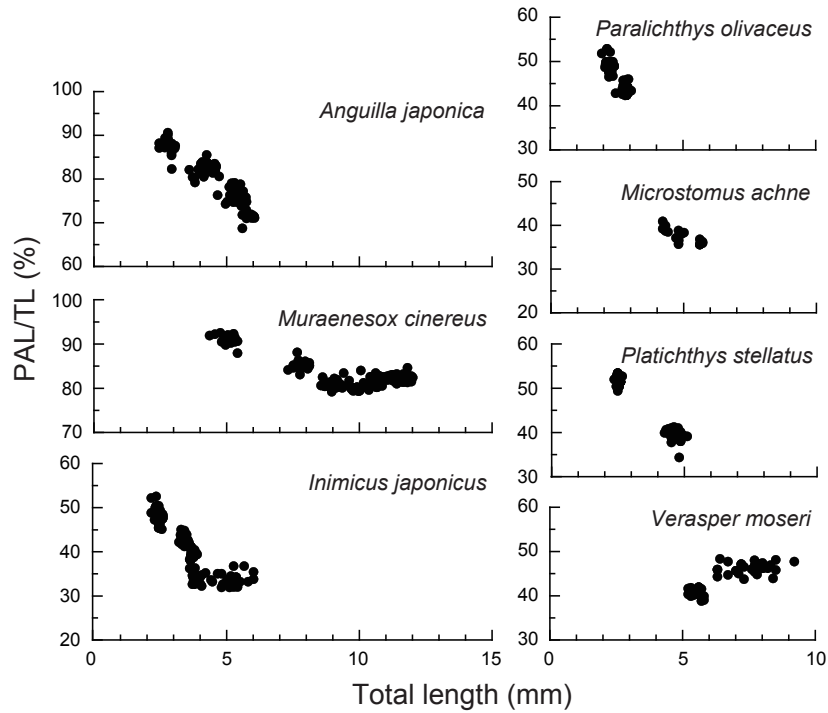


Fig. 2-3-1 Changes in ratio of Pre-anal length and Total length (PAL/TL) with growth in seven fish species, *Anguilla japonica*, *Muraenesox cinereus*, *Inimicus japonicus*, *Paralichthys olivaceus*, *Platicthys stellatus*, *Microstomus achne* and *Verasper moseri*

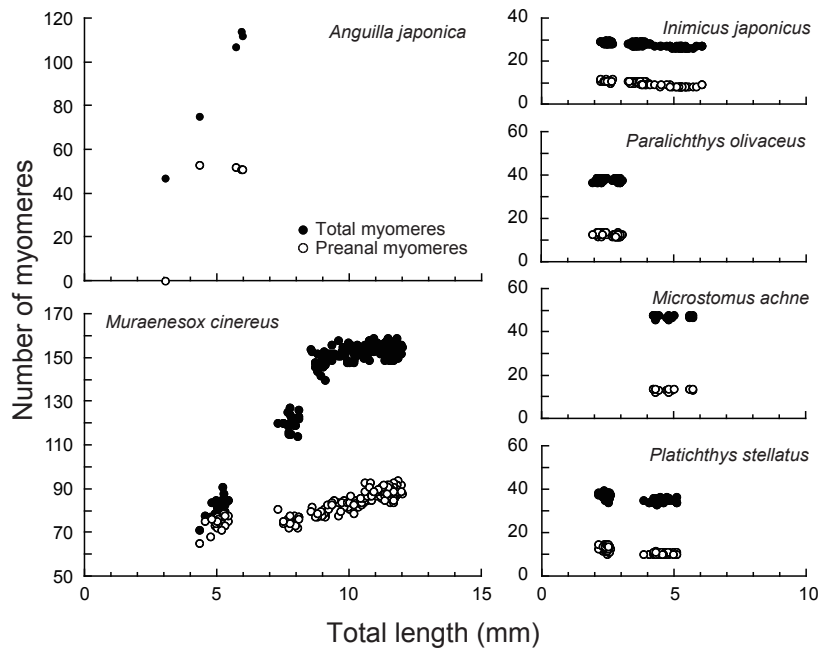


Fig. 2-3-2 Changes in number of myomeres with growth in six fish species, *Anguilla japonica*, *Muraenesox cinereus*, *Inimicus japonicus*, *Parolichthys olivaceus*, *Platicthys stellatus* and *Microstomus achne*

を除く6種で体成長に伴う筋節数の変化を比較したところ、ヒラメとババガレイでは孵化後も筋節数が一定であるのに対し、ヌマガレイとオニオコゼはそれぞれ全長3 mmと4 mmを境に肛門前筋節数と総筋節数が減少した (Fig. 2-3-2)。一方、ニホンウナギとハモでは筋節数の増加が孵化後も続き、それぞれおよそ全長8 mmと6 mm前後で成魚の脊椎骨数とほぼ同数に達し、その後は一定となった。ハモの筋節数は、総筋節数が孵化仔魚の71-91本から2日齢では140-154本と大きく増加したのに対し、肛門前筋節数の増加はこの期間で65-79本から77-82本であり、尾部での筋節数増加が大きかった。同様にニホンウナギでも、肛門前筋節数はほぼ一定だったものの、総筋節数は体成長に伴って大きく増加した。

第4節 考察

第1項 形態形質の安定性

池田・水戸 (1988) は分離浮性卵を同定する第1段階として、発生過程を通じてほとんど変化しない、油球の数、卵膜表面の特殊構造、卵黄の亀裂の有無および囲卵腔の広狭という4つの形質の組み合わせで類型的なグルーピングをおこなう方法を採用している。本章で卵の形態を観察した種では、すべて卵は球形であり、ニシンを除いて平滑な卵膜をもっていた。これらと卵径は、発生が進んでも変化が観察されなかったことから、これら卵の外形は卵期を通じて安定した形質だった。卵黄の亀裂も、発生によって消えたり新たに生じたりすることはなかった。囲卵腔の広さは、ホルマリン固定によって卵黄が収縮することが報告されており (池田・水戸, 1988)、今回観察したホルマリン固定卵ではやや広くなっていたと考えられる。しかしながら、発生期間を通じて囲卵腔の広さの大きな変化は観察できなかった。ただし、ニホンウナギ、ハモ、ニシンでは発生に伴い著しく胚体が伸長し、特にニホンウナギ、ハモでは卵黄が胚体のほぼ全体に沿って付着するため、このような胚の形態を示す種では初期の囲卵腔の広さを正確に推測することは難しいだろう。油球の有無も卵期を通じて変化することはなかったが、ニホンウナギでは発生初期に多数存在した油球が発生の進行に伴って1個に癒合した。このことは、Yamamoto and Yamauchi (1974) と Yamamoto et al. (1975) でも報告されている。ハモでも、発生後期では油球が初期よりも大きく、数も少なくなっており、ニホンウナギと同様に発生の進行に伴って癒合すると考えられた。トウゴロウイワシ科 Atherinidae などでも発生が進み油球が癒合することが報告されている (White et al., 1984)。このことから、油球の有無は安定した形質ではあるが、種によっては、数とサイズは発生段階によって変化することがありうると考えられた。以上のことから、池田・水戸 (1988) の類型的なグルーピングは有用であるが、種によっては適用できない可能性もあると考えられた。

第2項 形態形質の可塑性

魚卵の形態のうち、卵径は、産卵親魚のサイズや、水温などの環境条件によって変化する (Kamler, 2005)。実際に、カタクチイワシにおいては水温が低くなるほど大きな卵を産むことが報告されている (Imai and Tanaka, 1987)。卵径は魚卵を分類する際の重要な形質であり、変異の幅を知っておく必要があるだろう。本研究で観察した11種の卵のうち、クエを除く10種については過去に卵径の報告があり、それらを本研究の結果と比較しところ、本研究で観察された卵径は、ババガレイを除き、過去の報告とよく一致していた (Table 2-4-1)。本研究で観察されたババガレイ卵の卵径 (1.58–1.66 mm) は、過去の報告 (1.7–2.2 mm) (東北区水産研究所八戸支所, 1956) よりも小さかった。両方で飼育水温は同様であり (10°C と 9°C)、孵化仔魚のサイズもほぼ同じである (4.15–4.40 mm, 3.9–4.6 mm)。この卵径の差が生じた原因は定かではないものの、雌親魚のサイズや孕卵数が影響しているのかもしれない (Kamler, 2005)。また、本研究で得られたニホンウナギ卵の形態は、過去の報告 (Yamamoto and Yamauchi, 1974; Yamamoto et al., 1975) と同様だった。すなわち、球形で卵膜が平滑で油球があり、卵黄に亀裂が認められ、囲卵腔が広い。しかしながら、卵径は 1.39–1.61 mm と、本研究のほうが大きかった。これは Yoshinaga et al. (2011) が報告した天然ニホンウナギ卵の卵径 1.49–1.71 mm とほぼ同じ値だった。このことから、本章で記載した卵は、過去の発生の報告よりも天然での発生に近い結果が得られていると考えられる。卵径以外の卵の形態、油球の有無、卵膜の構造、卵黄の亀裂、囲卵腔の広さ、といった発生を通じて安定していた形質は、過去の報告とほぼ一致し、これらは種内で一定の形質であると言える。

しかしながら、孵化仔魚の形態が過去の報告と不一致である種もあった。ハモでは、今回得られた孵化仔魚の平均全長は 5.1 ± 0.27 mm で、筋節は 91 本が数えられた (Fig. 2-2-2a)。Umezawa et al. (1991) は本研究と同様に水温約 25°C で飼育し、孵化仔魚は全長 5.0 mm、86 筋節と同様の形態を報告している。一方、高井 (1979) は水温約 20.0–22.0°C で飼育し、得られた孵化仔魚は全長 3.1–3.4 mm と著しく小さかった。しかしながら、筋節数は 81–83 本であり、消化管も形成されていることから、孵化時の発達段階はほぼ同様であると推察される。ここで、両者が用いた卵の卵径を比較すると、Umezawa et al. (1991) が 1.8–2.1 mm と本研究と同様だったのに対し、高井 (1979) は 1.55–2.21 mm と比較的小さい卵も含まれており、孵化仔魚のサイズの違いは、卵サイズの違いによって生じたと考えられた。また、飼育水温が変化することで同種においても孵化時の体サイズが大きく変化することも示唆され、飼育に基づいた孵化仔魚の観察には水温を考慮する必要があると考えられた。また、オニオコゼでは、今回の孵化仔魚の全長は 2.20–2.65 mm で、過去に報告された 2.9–3.65 mm の範囲よりも小さい (藤田・中原, 1955; 水戸, 1966; Sha et al., 1981; 岩本, 1983)。また、28–30 本という筋節数は、藤田・中原 (1955)、水戸 (1966)、岩本 (1983) と同様だったが、Sha et al. (1981) が報告した 32–34 本よりも少なく、全長や筋節数には大きな変異が認められた。アカアマダイでも、今回の孵化仔魚の筋節数

Table 2-4-1 Comparisons of egg diameter of nine fish species described in the present study with previous study

Species	Egg diameter (mm)	References
<i>Anguilla japonica</i>	1.39–1.61	Present study
	ca. 1.3	Yamamoto and Yamauchi (1974)
	1.49–1.71	Yoshinaga et al. (2011)
<i>Muraenesox cinereus</i>	2.08–2.20	Present study
	1.55–2.21	Takai (1979)
	1.8–2.1	Umezawa et al. (1991)
<i>Clupea pallasii</i>	1.38–1.49	Present study
	1.3–1.6	Uchida et al. (1960)
<i>Inimicus japonicus</i>	1.28–1.42	Present study
	1.31–1.43	Fujita and Nakahara (1955)
	1.31–1.49	Mito (1966)
	1.22–1.58	Sha et al. (1981)
<i>Branchiostegus japonicus</i>	0.83–0.91	Present study
	0.86	Ikuta and Nishihiro (1978)
	0.92	Okumura and Imaizumi (1996)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	0.88–0.98	Present study
	0.90–1.05	Ishida and Tanaka (1976)
	0.83–0.98	Mito (1963)
	0.83–0.97	Kamiya (1916)
<i>Microstomus achne</i>	1.58–1.66	Present study
	1.7–2.2	Mito (1963)
<i>Platichthys stellatus</i>	0.94–1.08	Present study
	0.97–1.01	Yusa (1950)
<i>Verasper variegatus</i>	1.54–1.72	Present study
	1.56–1.63	Mito (1963)
	1.60–1.64	Takita et al. (1967)

は24-25本が数えられ、生田・西広(1978)が報告している29本に比べ少なかった。過去の報告と本研究では、採卵方法と飼育水温がそれぞれ異なっており、受精卵を得る方法と管理方法でもまた孵化仔魚の計量形質は変わりうることを示唆している。このような、種内での形態の可塑性を明らかにするような比較研究をおこなうことで、形態による分類の有効性も高まるだろう。

第3項 高次分類群における形態形質の共通性

形態による分類では、種レベルまで同定できない場合は属や科といった高次分類群で判断するが、魚卵の形態形質によって高次分類群に帰属させることができるかどうかについては議論がある。これまでに魚卵の形態が、科や属レベルの比較的近縁な分類群間で系統関係を示唆する可能性があることも指摘されている(水戸, 1979; 望岡・内海, 2001)。このような系統学的情報をもつ形態形質があれば、魚卵の分類にも役立つだろう。

本研究で得られた結果を近縁種間で比較したところ、同属種では類似した卵の形態を示すことがわかった。例えば、同属のマツカワとホシガレイでは卵の形態から孵化仔魚の形態まで酷似していた。しかしカレイ科全体では、ババガレイは卵の形態が似ていたものの、ヌマガレイでは油球をもつ、卵径が小さいといった明瞭な形態形質の違いが認められた。ニシン属においても、今回観察したニシンと同様に、同属の *Clupea harengus* の卵は沈性粘着卵であり、卵・孵化仔魚ともニシンと同様の形態的特徴が報告されている(Russell, 1976)。これらのことから、卵の性質や卵膜、油球、卵黄、孵化時の発達段階などの形質は、種内のみでなく、同属内においても高い類似性を示すと考えられた。しかしながら、卵の浮性、沈性の点からみると、ニシン亜科に属する魚類で沈性卵を産むのはニシン属のみであり、他は浮性卵を産む(McGowan and Berry, 1984)。また、ニシン卵は油球をもたないのに対し、同じニシン亜科に属するマイワシ *Sardinops melanosticus* やサツパ *Sardinella zunasi* の卵は油球を1個もつ(内田ほか, 1958; 田北, 1966)。このようにニシン亜科内になると、魚卵の形態や特性が種によって大きく異なると考えられた。このように、魚類の卵の形態は属レベルでは共通性が高いものの、科レベルでは多様になると考えられた。

様々な分類群で共通してみられる形態形質もあった。ヒラメ属ではヒラメの他に、*Paralichthys californicus* (Oda, 1991)、*P. dentatus* (Smith and Fahay, 1970; Martinez and Bolker, 2003)、*P. albigutta* および *P. lethostigma* (Powell and Henley, 1995) の4種で卵の形態について報告があり、ヒラメ属の卵では、球形の分離浮性卵であり、卵膜は平滑で、囲卵腔は狭く、卵黄に亀裂は認められず、油球を1個もつという形態的特徴が一致していた。しかしながら、これらの形質は、クエなどマハタ属魚類にも共通している(キジハタ *Epinephelus akaara*, 鶴川ほか, 1966; アオハタ *E. awoara*, 池田・水戸, 1988; ノミノクチ *E. trimaculatus*, 水戸, 1963a; ヒトミハタ

E. tauvina, Chen et al., 1977; ヤイトハタ *E. malabaricus*, 濱本, 1986; マハタ *E. septemfasciatus*, 北島, 1991; *E. marginatus*, Glamuzina et al., 1998; *E. costae*, Glamuzina et al., 2000; *E. striatus*, Powell and Tucker, 1992; *E. polyphkadion*, James et al., 1997). 形態による高次分類群の推定は、分類群によってできる可能性はあるものの、その形質で高次分類群を推定したとしてもまったく異なる系統の分類群をまとめてしまう可能性もある。結論として、魚卵の形態分類においては、卵の形態による信頼できる高次分類群の推定は難しいと考えられる。

第4項 新しい分類形質の探索

本研究の結果を過去の報告と比較し、新たな分類形質となる可能性のある形態について論じた。本研究の結果、ハモの卵には1層の薄い内卵膜が認められた。この形質は過去の報告(高井, 1979; Umezawa et al., 1991)には記載がない。内卵膜をもつ卵は、ウナギ目魚類の卵では2種類(ウミヘビ科 No.6 とウナギ目 No.9) について報告されているのみであり(水戸, 1961a), 内卵膜の存在がハモ卵の新たな識別形質となると考えられた。今回観察したホシガレイの孵化仔魚には膜鰭上全体に小胞状の構造が認められた。同様の構造が田北ほか(1967)によって報告されているものの、近縁のマツカワでは報告されていないことから(有瀧ほか, 2000), この形質はホシガレイに特徴的な形質である可能性がある。アカアマダイとクエでは、他の魚種と比較して、筋節のできるタイミングがそれぞれエピボリー終了の前と後ろにそれぞれずれていた(Fig. 2-4-1)。このように、発生段階によっては、形成されている形質の組み合わせが分類群を識別する特徴になると考えられる。しかしながら、これらの形質は、一時的にしか観察できないため、実際の使用範囲はごく限られるだろう。ヒラメとクエの卵では油球がやや黄色みを帯びており、透明な油球をもつ多くの魚卵から識別できる可能性があった。これらの形態は、これまでの研究で見逃された可能性もあり、今後、他魚種での観察とそれに基づいた比較、過去の報告の再検討が必要であると考えられる。

第5項 形態に基づく魚卵の分類

本研究の結果得られた5目8科11種の卵と孵化仔魚の形態を比較し、相互の識別形質を論じた(Table 2-4-2, 3, Fig. 2-4-2)。まず、ニシンの卵は沈性粘着卵であり、卵膜の外側に粘着層をもっていた(Table 2-4-2)。また、卵内発生の過程において胚体が著しく伸長し、眼の黒化や開口、胸鰭の形成が起きることもニシン卵に特徴的だった。これらの形態的特徴から、ニシン卵は他の種と明瞭に識別できる。ニシン以外の魚種の卵は、卵膜表面が平滑な分離浮性卵だった。池田・水戸(1988)に従い、油球の有無と囲卵腔の広さ、卵黄の亀裂の有無によって11種の卵をグルーピングすると、(1)油球を多数もち囲卵腔が広く、卵黄に亀裂が認められるハモ、(2)油球を1個もち囲卵腔が広く卵黄に亀裂がみられるニホンウナギ、(3)油球がなく囲卵腔の狭

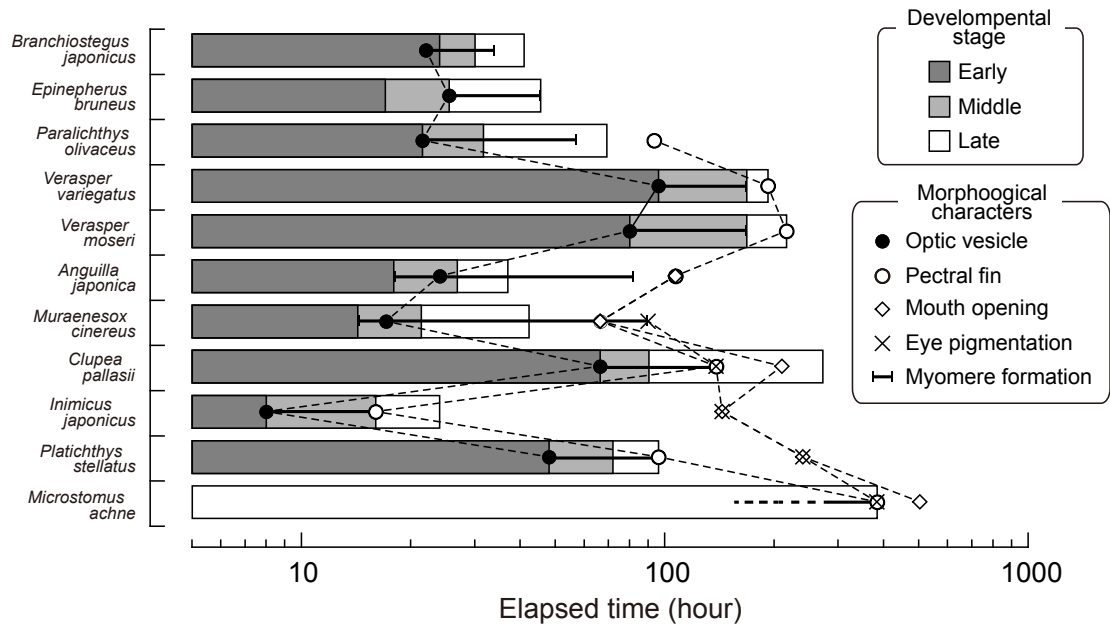


Fig. 2-4-1 Comparisons of occurrence timing of developmental event among eleven fish species, *Anguilla japonica*, *Muraenesox cinereus*, *Clupea pallasii*, *Inimicus japonicus*, *Epinephelus bruneus*, *Branchiostegus japonicus*, *Paralichthys olivaceus*, *Platichthys stellatus*, *Microstomus achne*, *Verasper moseri* and *V. variegates*. Each developmental stage was decided as: early, from fertilization to completion of epiboly; middle, from completion of epiboly to tail separation; late, from tail separation to hatching

いオニオコゼ, ババガレイ, ヌマガレイ, マツカワおよびホシガレイ, (4) 油球を1個もち囲卵腔の狭いクエ, アカアマダイおよびヒラメ, の4種類に区分された (Fig. 2-4-2).

ハモの卵は上記のように, 油球, 囲卵腔および卵黄の形態的特徴が他の種と明瞭に異なっていた. さらに, 内卵膜をもち, 卵径が2.08–2.20 mmと他の卵よりも大きかった. また, 卵内発生過程において多数の筋節が形成されることや, 卵黄が胚体のほぼ全長にわたって付着しているといった非常に特徴的な形態を示した. 以上のことから, ハモ卵はどの発生段階においても他の種と明瞭に識別できる.

油球をもたず囲卵腔が狭いグループとして分けられたオニオコゼとカレイ科4種の卵は, ヌマガレイが卵径0.94–1.08 mm, オニオコゼが卵径1.28–1.42 mmであることから, それぞれ1.58–1.66 mm, 1.63–1.83 mm, 1.54–1.72 mmと大きな卵径をもつババガレイ, マツカワおよびホシガレイと識別できた (Fig. 2-4-2, Table 2-4-2). さらに, オニオコゼは卵内において大きな胸鰭原基が形成されることでも他の種と識別できると考えられた (Fig. 2-2-4). しかし, ババガレイとマツカワ, ホシガレイの3種では卵径が重複しており, 発生初期における識別は不可能だった. しかしながら, 孵化仔魚の全長はそれぞれ4.15–4.40 mm, 5.2–5.8 mm, 3.30–3.72 mmと重複しなかった. また, 目の黒化はババガレイの孵化仔魚にのみみられるなど, これら3種の孵化仔魚は, 体型や肛門の位置, 全長, 筋節数, さらに黒色素胞の分布が明瞭に異なっていることから識別できることがわかった. なお, このグループの5種では, オニオコゼの卵が6–7月に出現するのに対して, ヌマガレイ, ババガレイ, ホシガレイの卵は2–3月に出現する (池田・水戸, 1988). マツカワの産卵も3月中旬に開始すると報告されている (渡辺・鈴木, 1999). また, 日本近海における成魚の主な分布域はオニオコゼが南日本 (中坊, 2000a), ホシガレイが本州中部以南, ヌマガレイが福井県以北および霞ヶ浦以北, ババガレイが日本海各地および駿河湾以北 (中坊, 2000b), マツカワが能登半島以北の沿岸や北海道周辺 (渡辺・南, 2000) と, 重複する海域は少ない. このように, すでに産卵期や産卵海域に関する知見がある種については, これらの生態的情報も, 調査海域や時期によっては, 形態が類似する他種の卵との識別点になりうると考えられた. しかしながら, ほとんどの魚種では卵の出現時期や出現海域が正確に把握されておらず, 形態が類似する多種の卵が同所的に出現することも考えられるため, 分類における生態的情報の有効性は非常に限られていると考えられる.

ニホンウナギとクエ, アカアマダイ, ヒラメの卵は油球が1個あるグループとして分けられた. このうちニホンウナギは卵径と広い囲卵腔, 卵黄に亀裂がみられることで他3種と識別することができた. しかし, クエとアカアマダイ, ヒラメの卵では卵径がそれぞれ0.93–0.96 mm, 0.83–0.91 mm, 0.88–0.98 mmと大きく重複し, 油球径もそれぞれ0.20–0.22 mm, 0.17–0.18 mm, 0.15–0.20 mmとほぼ同様の値を示した (Table 2-4-2). これら3種のうち, ヒラメ卵とクエ卵は油球が黄色を呈したことから, アカアマダイ卵と識別できる可能性はある. しかしながら, 油球の色については天然サンプルでの検討はまったくなされておらず, これら3種の発生初期に

Table 2-4-2 Comparisons of egg morphology among eleven fish species

Species	Morphology										
	Shape	Chorion	Diameter (mm, mean \pm SD)	Number of oil globule	Oil diameter (mm \pm SD)	Oil diam./Egg diam. (% \pm SD)	Perivitelline space	Yolk diameter (mm \pm SD)	Yolk diam./Egg diam. (% \pm SD)		
<i>Anguilla japonica</i>	Spherical	Smooth	1.39-1.61 (1.52 \pm 0.059)	1 ^a	0.31-0.34 (0.32 \pm 0.01)	21.2 \pm 1.33 (19.0-24.2)	wide	0.87-0.92 (0.89 \pm 0.016)	55.4-62.6 (58.7 \pm 2.08)		
<i>Muraenesox cinereus</i>	Spherical	Smooth	2.08-2.20 (2.14 \pm 0.034)	28-56 ^b	0.03-0.20		wide	1.41-1.49 (1.45 \pm 0.018)	64.5-70.3 (67.8 \pm 1.19)		
<i>Clupea pallasii</i>	Spherical	Adhesive	1.38-1.49 (1.42 \pm 0.026)	Absent			wide	0.99-1.11 (1.04 \pm 0.026)	71.2-79.9 (75.3 \pm 2.03)		
<i>Inimicus japonicus</i>	Spherical	Smooth	1.28-1.42 (1.37 \pm 0.037)	Absent			narrow				
<i>Epinephelus bruneus</i>	Spherical	Smooth	0.90-0.96 (0.93 \pm 0.014)	1	0.20-0.22 (0.20 \pm 0.006)	21.7 \pm 0.60 (20.8-23.4)	narrow				
<i>Branchiostegus japonicus</i>	Spherical	Smooth	0.83-0.91 (0.87 \pm 0.018)	1	0.17-0.18 (0.18 \pm 0.004)	20.2 \pm 0.35 (19.5-20.9)	narrow				
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Spherical	Smooth	0.88-0.98 (0.92 \pm 0.023)	1	0.15-0.20 (0.18 \pm 0.016)	19.6 \pm 1.73 (16.2-22.9)	narrow				
<i>Microstomus achne</i>	Spherical	Smooth	1.58-1.66 (1.62 \pm 0.018)	Absent			narrow				
<i>Platichthys stellatus</i>	Spherical	Smooth	0.94-1.08 (1.01 \pm 0.033)	Absent			narrow				
<i>Verasper moseri</i>	Spherical	Smooth	1.63-1.83 (1.74 \pm 0.049)	Absent			narrow				
<i>Verasper variegatus</i>	Spherical	Smooth	1.54-1.72 (1.64 \pm 0.045)	Absent			narrow				

^a Eggs just after fertilization have many small oil globules, but those oil globules coalesce into one big oil globule by gastrula stage.

^b At 50% epiboly. Oil globules reduce the number and increase in size through development.

Table 2-4-3 Comparisons of morphology of newly hatched larvae among eleven species

Species	Rearing temperature (°C)	Time to hatching	Total length (mm ± SD)	Myomeres		Pectral fin	Mouth opening	Pigmentation		Yolk	Oil globule	Finflod
				Total	Prenatal			Eye	Body			
<i>Anguilla japonica</i>	22.0–24.0	37 h	2.45–3.05 (2.77 ± 0.191)	47	0				x			
<i>Muraenesox cinereus</i>	24.1–25.5	42 h 17 min	4.35–5.40 (5.04 ± 0.271)	71–91 (82 ± 4.3)	65–79 (74 ± 3.5)							
<i>Clupea pallasii</i>	8.0–10.8	271 h 45 min	7.10–7.70 (7.47 ± 0.154)	53–56 (55 ± 1.0)	43–45 (44 ± 0.7)	x	x	x	x	x		
<i>Inimicus japonicus</i>	21.2	1 day	2.20–2.65 (2.46 ± 0.113)	28–30 (29 ± 0.6)	10–12 (11 ± 0.4)	x		x		x		
<i>Epinephelus bruneus</i>	-	45 h 30 min	2.2–2.5 (2.35 ± 0.07)	25–27 (26 ± 0.5)	10–12 (11 ± 0.4)			x				
<i>Branchiostegus japonicus</i>	19.7–20.8	41 h 29 min	1.95–2.18 (2.10 ± 0.05)	24–25 (24 ± 0.5)	10			x		x	x	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	15.0–15.5	69 h 15 min	1.93–2.45 (2.22 ± 0.116)	37–39 (38 ± 0.8)	12–14 (13 ± 0.5)			x		x	x	
<i>Microstomus achne</i>	10	16 days	4.15–4.40 (4.25 ± 0.094)	46–48 (48 ± 0.9)	12–14 (13 ± 0.9)	x		x		x		
<i>Platichthys stellatus</i>	15	96 h	2.35–2.65 (2.50 ± 0.062)	37–40 (38 ± 0.9)	12–15 (14 ± 0.7)			x		x		
<i>Verasper moseri</i>	18	216 h	5.2–5.8 (5.5 ± 0.178)	42–44 (43 ± 0.6)	14–16 (15 ± 0.4)							x
<i>Verasper variegatus</i>	8–10	8 days	3.30–3.72 (3.57 ± 0.125)	44–45 (45 ± 0.5)	15–16 (16 ± 0.5)	x		x		x		x

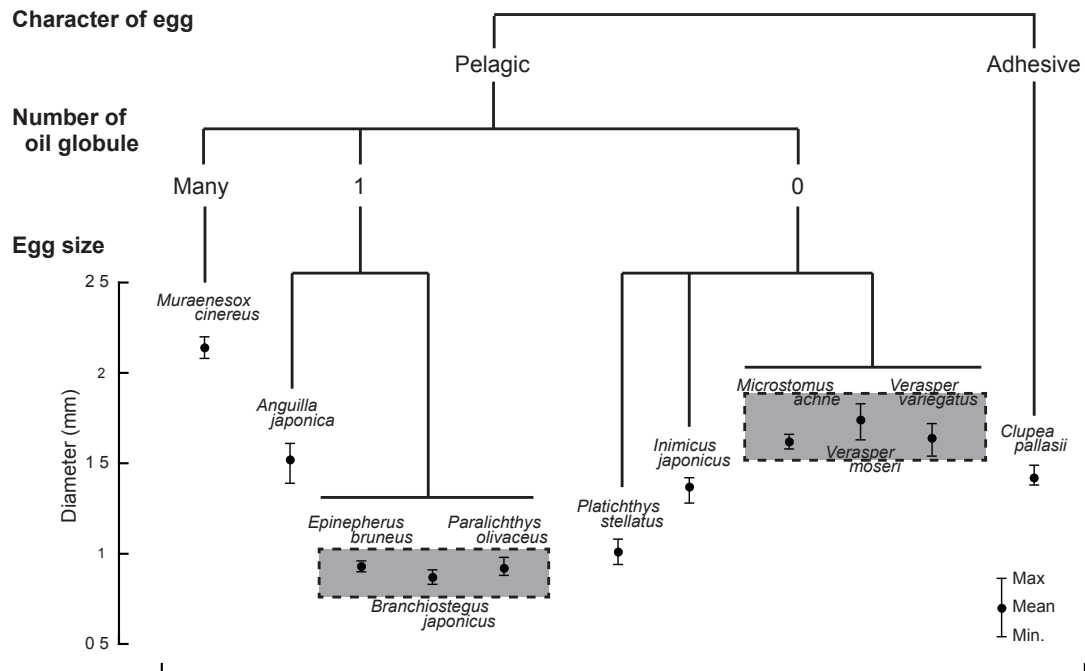


Fig. 2-24-2 Flow chart for species identification of eggs of eleven fish species (*Anguilla japonica*, *Muraenesox cinereus*, *Clupea pallasii*, *Inimicus japonicus*, *Epinephelus bruneus*, *Branchiostegus japonicus*, *Paralichthys olivaceus*, *Platichthys stellatus*, *Microstomus achne*, *Verasper moseri* and *V. variegates*) based on their morphology. Those eggs were first grouped into four morphological types using character of eggs and number of oil globule. Then the eggs further classified by egg diameter

おける分類は困難であると考えられた。しかもこれら3種の分布域は、クエが南日本（瀬能, 2000）、アカアマダイが本州中部以南（藍沢, 2000）、ヒラメが千島列島以南（中坊, 2000b）である。また、産卵期はクエが5-7月（岡田・澤田, 2000）、アカアマダイとヒラメはそれぞれ5-10月と1-5月（池田・水戸, 1988）であり、これら3種の卵は同所的に出現する可能性がある。孵化直前の卵および孵化仔魚での黑色素胞の発現状態を比較すると、ヒラメでは胚体全域、卵黄上、油球上および膜鰭上に樹枝状黑色素胞が散在するのに対し、アカアマダイでは膜鰭上に黑色素胞が認められないこと、またクエでは頭部と胚体中央部背面に数個の黑色素胞のみが認められることから識別できた（Table 2-4-2, 3）。また、孵化仔魚の体型は3種で類似していた（Fig. 2-2-5, 6, 7）。しかし、筋節数はクエとアカアマダイで重複するものの、ヒラメでは明瞭に異なった。以上のことから、これら3種は卵期の形態で分類することは困難であるものの、孵化仔魚の形態では識別可能であることがわかった。

第6項 形態形質による分類の限界

魚卵の場合は、その形態のみによって種に帰属させることは非常に難しいものの、今回観察した11種の卵は、安定した形態形質によって類型的なグルーピングが可能だった。しかしながら、そのグルーピングは特定の分類群とは必ずしも対応していなかった。このように、種と1対1で対応しない可能性はあるものの、類型的なグルーピングは、ある程度候補種を絞り込むために有効な手法だろう。しかしながら、本研究で扱ったわずか11種の中でさえ、卵期の形態、特に発生初期の形態で種を識別することは困難だった。正確な種査定には卵内発生が進んだ状態の卵や孵化仔魚の形態を詳細に比較することが必要であり、形態による魚卵の分類の限界が示された。

第3章 DNA 種査定法の検討

DNA 種査定法の結果は、バーコードとして使用する領域によって大きく影響される。そのため、これまでに様々な生物群で複数の領域がDNAバーコードとして提案されてきた。魚類の種査定には、主に mtDNA の cytochrome *b* 遺伝子 (Cyt *b*)、16S rRNA、12S rRNA 遺伝子 (12S rRNA) などが用いられてきた (Teletchea, 2009)。この中で、16S rRNA は系統推定に頻繁に使われてきたことから多くの魚種について塩基配列データが蓄積されており、また、種を識別する十分な変異を含むと考えられていることから、多くの研究で種査定の対象領域とされてきた (Tringali et al., 1999; Aoyama et al., 2000; Song et al., 2001; Karaïskou et al., 2003)。また、16S rRNA を野外で採集された魚卵の種査定に適用した研究例も多い (Aoyama et al., 2001; Akimoto et al., 2002; Bayha et al., 2008; Saitoh et al., 2009)。近年では COI が多くの生物群で種査定に有用であると報告されており、魚類でのデータの蓄積も急速に進んでいる (Ward et al., 2009)。そのため、魚類の種査定に用いる領域として、16S rRNA と COI が候補として考えられる。Ficetola et al. (2010) は 16S rRNA と COI、Cyt *b* の DNA バーコードとしての能力を既存の塩基配列データを用いて *in silico* で比較し、16S が最も種を識別する能力 (resolution capacity) が高いことを報告した。また、16S rRNA は、変異の大きい領域が保存的な領域に挟まれるという構造上の特徴のため汎用プライマーを作りやすく、PCR による増幅も安定している (Kocher et al., 1989; Meyer, 1993; Xia et al., 2012)。以上のことから本研究では、DNA による魚類の種査定に適した領域として 16S rRNA に着目した。

DNA バーコーディングでは、対象とする分類群の既知の遺伝情報を比較することにより種査定をおこなう。そのため、DNA 種査定法の確立には、既知の分類群を網羅したデータベースの構築が必要となる (Tautz et al., 2003)。同定できる分類群の数は既存のデータベースに登録されている分類群の数に完全に依存しており、既知の情報が不足していることにより種が特定できない可能性がある。また、どの程度の変異を種の基準とするかについては絶対的な基準は存在せず、多くの DNA バーコーディング研究では、出現する可能性のある種の種内変異と種間変異を調べて経験的に種を識別する基準を作成している (例えば、Ward et al., 2005)。本研究では魚類相に関する知見が圧倒的に不足しているマリアナ海域も対象としていることから、まず 16S rRNA の DNA バーコードとしての評価をおこなう必要があると考えた。

本章では、DNA データベースの探索と既存の塩基配列データの解析により 16S rRNA の DNA バーコードとしての有効性を評価した。さらに、浜名湖とマリアナ海域で採集した成魚の DNA ライブラリを作成し、遺伝的変異量の推定に基づき種を識別する最良の基準を提示した。以上

をまとめ、BLASTを使用した16S rRNAに適切な種査定法を提案した。

第1節 シークエンスデータの取得・解析方法

第1項 DNA データベースの探索

16S rRNA と COI の特性の解析には、NCBI Genome データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>) に登録されている条鰭類 (Actinopterygii) のミトコンドリアゲノムデータを用いた。2011年4月30日時点で登録されていた798種の条鰭類のミトコンドリアゲノムデータすべてをダウンロードし (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/OrganelleResource.cgi?taxid=7898>)、GenBankStrip.pl v. 2.0 (Bininda-Emonds, 2005) を用いて16S rRNA と COI の配列を切り出した。両方の領域の配列が切り出された793種から、交雑個体を除いた785種のデータセットを作成し、第4項の解析に供した。また、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) から、条鰭類の16S rRNA と COI の配列を検索してすべてをダウンロードし、GenBankStrip.pl v. 2.0 (Bininda-Emonds, 2005) を用いて16S rRNA と COI の配列を切り出し、データセットを作成した。その際、種レベルで分類群の記載がない配列は除外した。

第2項 魚類の採集と形態による同定

浜名湖において、2004年4月–2005年9月に、湖内で操業する袋網によって漁獲され、鷺津、入出、気賀、白州の各支所に水揚げされた魚類を採集した (Fig. 3-1-1)。マリアナ海域では、2010年7月28日–9月22日に実施された水産庁漁業調査船開洋丸のKY-10-02次航海において、西マリアナ海嶺南部海域の10°N–15°N、141°E–146°Eの範囲で、中層トロール網によって魚類を採集した (Fig. 3-1-1)。採集した魚類は中坊 (2000c) に基づいて形態により正確に分類した。種が同定できなかった場合は科または属の1種として扱った。浜名湖で得た15目55科85種142個体 (Table 3-1-1) と、マリアナ海域で得た7目20科32種類39個体 (Table 3-1-2) の筋肉、もしくは肝臓、胸鰭を99%エタノールで保存し、第3項のDNA解析に供した。

第3項 DNA の抽出と増幅および塩基配列の決定

浜名湖とマリアナで採集した魚類の組織片からキレックス、またはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用して粗全DNAを抽出した。キレックスでは、5%キレックス (Chelex-100 resin, Bio-rad) 溶液100–200 μ l 中で組織片を細かく砕いた後、98°Cで15分間加熱し、粗全DNAを抽出した。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) では、製品付属の説明書 (QIAGEN) に従って、粗全DNAを抽出した。

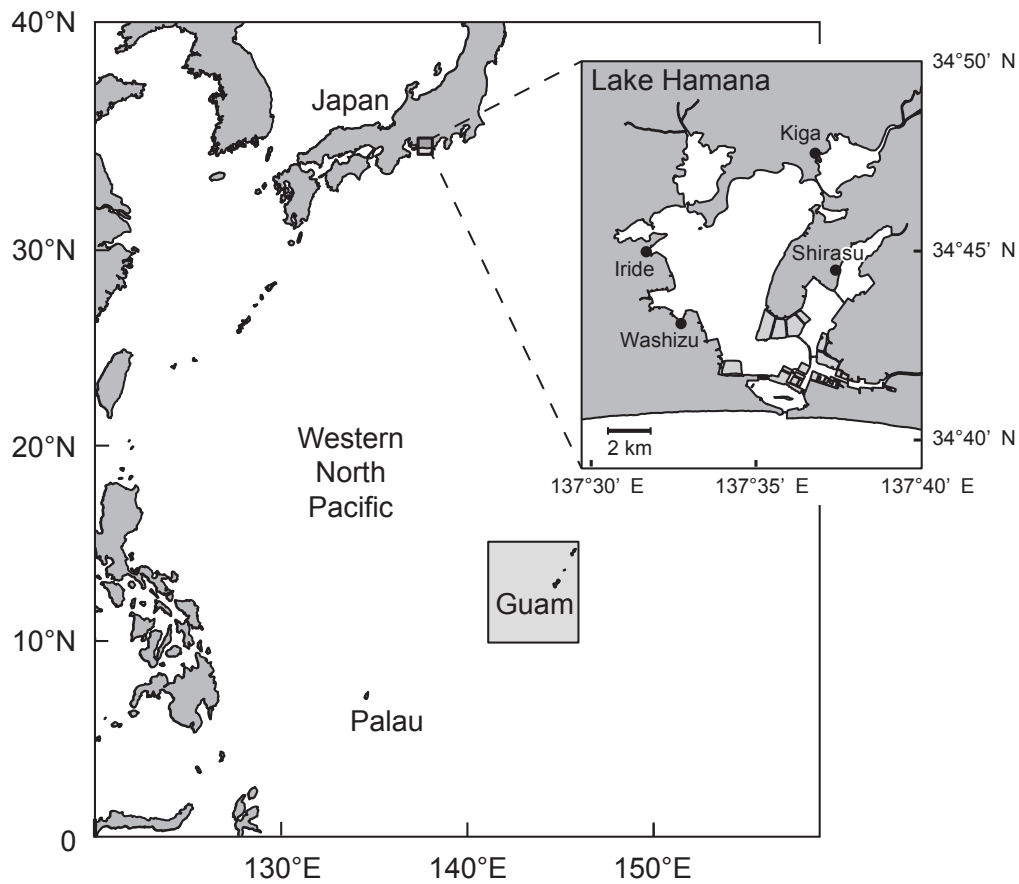


Fig. 3-1-1 Map showing the collection site of adult fishes in Lake Hamana from April 2004 to September 2005, and in the western North Pacific during the KY-10-02 cruise of the R/V Kaiyo Maru of the Fisheries Agency, Japan in 28 July to 22 September 2010. Black circles indicate the location of fish markets where adult fishes collected. Shaded square indicate the the area 10°N–15°N and 141°E–146°E where trawl net was towed to collect adult fishes

Table 3-1-1 Fishes collected in the Lake Hamana and sequenced for 16S ribosomal RNA gene analysis, with grey shading representing the species that 16S rRNA sequences have not been deposited in GenBank

Order	Family	Species	Specimen ID	
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	HMN152	
	Ophichthyidae	<i>Pisonodophis zophistius</i>	HMN172 HMN173	
	Congridae	<i>Conger myriaster</i>	HMN153 HMN206	
	Muraenesocidae	<i>Muraenesox cinereus</i>	HMN112	
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Etrumerus teres</i>	HMN207	
		<i>Konosirus punctatus</i>	HMN017	
		<i>Sardinella zunasi</i>	HMN030 HMN031 HMN129 HMN141 HMN142 HMN143	
		<i>Sardinops melanostictus</i>	HMN133	
		<i>Engraulis japonicus</i>	HMN036 HMN102 HMN103	
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Tribolodon hakonensis</i>	HMN055 HMN056 HMN151	
Siluriformes	Plotosidae	<i>Plotosus lineatus</i>	HMN132	
Salmoniformes	Plecoglossidae	<i>Plecoglossus altivelis</i>	HMN154	
Aulopiformes	Synodontidae	<i>Trachinocephalus myops</i>	HMN092	
Lophiiformes	Antennariidae	<i>Histrio histrio</i>	HMN032	
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Chelon affinis</i>	HMN005 HMN134 HMN150	
		<i>Mugil cephalus cephalus</i>	HMN028 HMN135 HMN136 HMN147	
Atheriniformes	Atherinidae	<i>Hypoatherina valenciennesi</i>	HMN037	
Beloniformes	Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus sajori</i>	HMN059 HMN137 HMN209	
	Belonidae	<i>Strongylura anastomella</i>	HMN171	
Gasterosteiformes	Syngnathidae	<i>Syngnathus schlegeli</i>	HMN006	
	Fistulariidae	<i>Fistularia commersonii</i>	HMN124	
Scorpaeniformes	Scorpaenidae	<i>Sebastes inermis</i>	HMN155 HMN175	
		<i>Sebastes marmoratus</i>	HMN128	
	Tetrarogidae	<i>Hypodytes rubripinnis</i>	HMN130 HMN194	
	Triglidae	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	HMN018	
	Platycephalidae	<i>Cociella crocodila</i>	HMN108 HMN187	
		<i>Platycephalus sp.2</i>	HMN034	
	Hexagrammidae	<i>Hexagrammos otakii</i>	HMN007 HMN164	
	Perciformes	Moronidae	<i>Lateolabrax japonicus</i>	HMN023
<i>Lateolabrax sp.</i>			HMN024	
Rachycentridae		<i>Rachycentron canadum</i>	HMN208	
Coryphaenidae		<i>Coryphaena hippurus</i>	HMN076 HMN077	
Carangidae		<i>Caranx sexfasciatus</i>	HMN039 HMN041 HMN057 HMN138 HMN178	
		<i>Seriola dumerili</i>	HMN165 HMN183	
		<i>Seriola quinqueradiata</i>	HMN168	
		<i>Seriolina nigrofasciata</i>	HMN075	
		<i>Trachurus japonicus</i>	HMN027	
		Leiognathidae	<i>Leiognathus nuchalis</i>	HMN044
		Lutjanidae	<i>Lutjanus bohar</i>	HMN093
		Lobotidae	<i>Lobotes surinamensis</i>	HMN204
		Gerreidae	<i>Gerres equulus</i>	HMN180
			<i>Gerres sp.</i>	HMN094 HMN095 HMN096
Haemulidae		<i>Plectorhinchus cinctus</i>	HMN016	
Sparidae	<i>Acanthopagrus latus</i>	HMN014 HMN148		
	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	HMN025 HMN026 HMN196		
		<i>Evynnis japonica</i>	HMN163	

Table 3-1-1 (continued)

Order	Family	Species	Specimen ID
Perciformes	Sparidae	<i>Pagrus major</i>	HMN197
		<i>Sparus sarba</i>	HMN198
	Sillaginidae	<i>Sillago japonica</i>	HMN100 HMN114
	Chaetodontidae	<i>Chaetodon auriga</i>	HMN053
	Teraponidae	<i>Rhyncopelates oxyrhynchus</i>	HMN029 HMN149
		<i>Terapon jarbua</i>	HMN105
	Oplegnathidae	<i>Oplegnathus punctatus</i>	HMN019
	Kyphosidae	<i>Kyphosus vaigiensis</i>	HMN184
	Microcanthidae	<i>Microcanthus strigatus</i>	HMN191 HMN192
	Girellidae	<i>Girella punctata</i>	HMN067 HMN158 HMN176 HMN193
	Centrolophidae	<i>Hyperoglyphe japonica</i>	HMN020 HMN179
		<i>Psenopsis anomala</i>	HMN086 HMN182
	Nomeidae	<i>Psenes pellucidus</i>	HMN015
	Labridae	<i>Halichoeres poecilopterus</i>	HMN189
	Callionymidae	<i>Repomucennus curvicornis</i>	HMN113 HMN170
		<i>Repomucenus valenciennei</i>	HMN010
	Odontobutidae	<i>Odontobutis obscura</i>	HMN106
	Gobiidae	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	HMN049 HMN140
		<i>Glossogobius olivaceus</i>	HMN051 HMN066 HMN144 HMN145
			HMN177
		<i>Gobiidae sp.</i>	HMN009
	Siganidae	<i>Siganus fuscescens</i>	HMN169
	Sphyraenidae	<i>Sphyraena forsteri</i>	HMN064 HMN088
		<i>Sphyraena pinguis</i>	HMN065 HMN091
		<i>Sphyraena sp.</i>	HMN167
	Trichiuridae	<i>Trichiurus japonicus</i>	HMN054
	Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	HMN202
Pleuronectiformes	Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	HMN021 HMN022 HMN109 HMN110
		<i>Pseudorhombus cinnamomeus</i>	HMN120
Pleuronectidae	<i>Kareius bicoloratus</i>	HMN002 HMN003 HMN004 HMN111	
	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	HMN188	
Cynoglossidae	<i>Paraplagusia japonica</i>	HMN118	
Tetraodontiformes	Triacanthidae	<i>Triacanthus biaculeatus</i>	HMN011 HMN050
		<i>Stephanolepis cirrhifer</i>	HMN174 HMN211
Tetraodontidae	Monacanthidae	<i>Thamnaconus modestus</i>	HMN210
		<i>Canthigaster rivulata</i>	HMN063
		<i>Takifugu pardalis</i>	HMN117
		<i>Takifugu porphyreus</i>	HMN008
		<i>Takifugu snyderi</i>	HMN212
	<i>Takifugu xanthopterus</i>	HMN126	

Table 3-1-2 Fishes collected in the western North Pacific during KY-10-02 cruise. Those were sequenced and used for 16S ribosomal RNA gene analysis, with grey shading representing the species that 16S rRNA sequences have not been deposited in GenBank

Order	Family	Species	Specimen ID		
Argentiniiformes	Microstomatidae	Microstomatidae sp.	KY12213	KY13604	
Stomiiformes	Gonostomatidae	<i>Diplophos taenia</i>	KY12409	KY12602	
		<i>Macrostomias pacificus</i>	KY13005		
	Stomiidae	<i>Melanostomias tentaculatus</i>	KY12603		
		<i>Photonectes albipennis</i>	KY12402		
		<i>Eustomias enbarbatus</i>	KY13606		
	Idiacanthidae	Melanostomiidae sp.	KY12203		
		<i>Idiacanthus fasciola</i>	KY13006	KY13607	
	Myctophiformes	Paralepididae	Paralepididae sp.	KY12401	
		Myctophidae	<i>Centrobranchus andreae</i>	KY13624	
			Myctophidae spp.	KY13608	KY13622 KY13623
Myctophum		<i>Myctophum asperum</i>	KY21802		
		<i>Myctophum spinosum</i>	KY12208		
		<i>Symbolophorus californiensis</i>	KY13625		
Tarletonbeania		<i>Tarletonbeania taylori</i>	KY13610		
		Lampridae	<i>Lampris guttatus</i>	KY23401	KY23402
Lophotidae			<i>Lphotus capellei</i>	KY23404	
Trachipteridae		<i>Zu cristatus</i>	KY13602		
	Polymixiiformes	Polymixiidae	<i>Polymixia japonica</i>	KY23403	
Stephanoberyciformes		Melamphaidae	<i>Poromitra crassiceps</i>	KY12205	
	<i>Scopelogadus mizolepis</i>		KY12206		
	Holocentridae		Holocentridae sp.	KY13611	
Perciformes	Acropomatidae	<i>Synagrops japonicus</i>	KY13603		
	Carangidae	<i>Decapterus tabl</i>	KY12601		
		Carangidae spp.	KY12801	KY21801	
	Leiognathidae	<i>Decapterus macarellus</i>	KY100908IK2		
		Leiognathidae sp.?	KY13616		
	Bramidae	<i>Brama orcini</i>	KY13627		
		<i>Pseudoscopelus</i> sp.	KY12408		
	Scombrobracidae	<i>Scombrobrax heterolepis</i>	KY12204		
	Gempylidae	Gempylidae sp.	KY13630		
	Unidentified	Perciformes sp.	KY13201		

得られた粗全 DNA を鋳型として、mtDNA の 16S rRNA の約 1,200bp の部分配列を L1854 (5'-AAA CCT CGT ACC TTT TGC AT-3') と H3058 (5'-TCC GGT CTG AAC TCA GAT CAC GTA-3') (Miya and Nishida, 1996 を改変) のプライマーセットを用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によって増幅した。PCR には Model 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) もしくは Takara PCR Thermal Cycler Dice (Takara) を使用した。

PCR 反応は、使用する酵素により以下の 3 種類の実験系のいずれかでおこなった。それぞれで得た PCR 産物で、臭化エチジウムを混合して作成した 1.0% アガロースゲルを用いて電気泳動をおこない、バンドの有無と増幅断片の長さを確認した。

1) ExTaq polymerase (TakaraBio Inc.)

反応液の組成は、滅菌蒸留水 8.20 または 8.24 μl , 10 \times EX TaqTM Buffer (Takara Bio Inc.) 1.5 μl , dNTP (2.5 mM each) 1.2 μl , プライマー (5 μM) 各 1.5 μl , EX TaqTM (Takara Bio Inc.) 0.10 μl (0.5U) または 0.06 μl (0.3U), 鋳型 DNA 溶液 1.0 μl で、最終量を 15.0 μl とした。反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱した後、熱変性 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒, アニーリング 50–54 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒, 伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒の過程を 30–35 回繰り返す、最終伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間おこなった。

2) PrimeStar HS DNA polymerase (Takara Bio Inc.)

反応液の組成は、滅菌蒸留水 6.74 または 8.24 μl , 5 \times Primestar Buffer (Takara Bio Inc.) 3.0 μl , dNTP (2.5 mM each) 1.2 μl , プライマー (5 μM) 各 1.5 μl または 0.75 μl , PrimeStar (Takara Bio Inc.) を 0.06 μl (0.15U), 鋳型 DNA 溶液 1.0 μl で、最終量を 15.0 μl とした。反応は、98 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱した後、熱変性 98 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒または 15 秒, アニーリング 50–55 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒または 10 秒, 伸長反応 72 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分 – 1 分 30 秒の過程を 30–35 回繰り返す、最終伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間おこなった。

3) KOD Plus ver.2 (Toyobo Co., Ltd.)

反応液の組成は、滅菌蒸留水 5.5 μl , KOD Plus ver.2 Buffer (Toyobo Co., Ltd.) 1.0 μl , dNTP (2 mM each) 1.0 μl , MgSO₄ (25 mM) 0.6 μl , プライマー (5 μM) 各 0.3 μl , KOD Plus ver.2 (Toyobo Co., Ltd.) を 0.3 μl (0.3U), 鋳型 DNA 溶液 1.0 μl で、最終量を 10.0 μl とした。反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間加熱した後、熱変性 98 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒, アニーリング 50 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒, 伸長反応 68 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分 30 秒の過程を 35 回繰り返す、最終伸長反応を 68 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間おこなった。

得られた PCR 産物は、Exo-SAP IT (Amersham Bioscience Inc.) を用いて、または PEG 沈殿により余剰の dNTP およびプライマーを除去した後、BigDyeTM Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.), または BigDyeTM Terminator v3.1 Ready Reaction

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) を用いて Dye Termination 反応をおこなった。反応は製品付属の説明書 (Applied Biosystems Inc.) に従い、PCR と同じプライマーとサーマルサイクラーを使用しておこなった。反応産物は 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.)、または 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.) により泳動し、塩基配列を決定した。

得られたエレクトロフェログラムと塩基配列を EditView ver.1.0.1 (Applied Biosystems Inc.)、または 4Peaks (Griekspoor and Groothuis, 2005) を用いて目で確認し、不明瞭な領域を削除した。次に、AutoAssembler ver.2.1 (Applied Biosystems Inc.)、または eBioX (<http://www.ebioinformatics.org/ebiox/>) に実装された Kalign2 (Lassmann et al., 2009) を使用して得られた配列を連結した。得られた塩基配列の編集には DNASIS (Hitachi Software Inc.)、または eBioX を用いた。

第4項 シークエンスデータの解析

16S rRNA と COI における遺伝的変異量を明らかにするため、ミトコンドリアゲノムから切り出した 16S rRNA と COI のデータセットを使用し、それぞれの領域で p-distance を算出した。まず、得られたシークエンスデータを MUSCLE (Edgar, 2004) でアラインメントし、MacClade 4.08a (Maddison and Maddison, 2005) でアラインメントを編集し、MEGA5.05 for Mac OSX (Tamura et al., 2011) で補正なしの p-distance を計算した。p-distance は、アラインメントからギャップサイトを完全に削除する complete deletion と、ペアワイズ比較でギャップサイトがあったときに削除する pairwise deletion の両方で算出した。

種を識別する基準を明らかにするため、浜名湖とマリアナ海域で採集した魚類で種内と種間の相同性を比較した。本研究では、データの処理速度が速く大量のデータを比較できることから、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1997) を用いた相同性検索を採用した。両海域で得られたシークエンスを BLAST 2.2.25+ を使用して総当たりで相同性 (identity) を算出した。結果の解析には、短いアラインメントや偶然に相同性が高かった配列が含まれている可能性を除くため、e-value = 0 と表示された結果のみを用いた。さらに、種を識別する最良の基準を決定するため、BLAST 2.2.25+ の BLASTClust を用いてこれらの配列をクラスタリングし、クラスタと種の一致率を求めた。このときにクラスタリングの基準となる相同性は、0.97-1 まで、0.01 刻みで変化させて計算した。

第2節 既存データを用いた 16S rRNA と COI の比較

第1項 GenBank における 16S rRNA 領域と COI 領域の登録状況

2011 年 6 月 22 日時点で、塩基配列の登録件数は COI のほうが多く、16S rRNA で 13,221 件

の、COIで23,126件の配列がGenBankに登録されていた(Table 3-2-1)。登録されている分類群の数を比較すると、16Sのほうが多く、42目383科2,065属5,469種が登録されていたのに対して、COIでは43目360科1,794属4,412種の配列が登録されていた。分類学的・生態学的研究の基礎となる科、属、種の数に着目すれば、16S rRNAのほうが多くの分類群が揃っていた。さらに、海産魚と外洋性魚類を多く含み、浜名湖とマリアナ海域で卵の出現が予想されるダツ目 Beloniformes、ウナギ目 Anguilliformes、ニシン目 Clupeiformes、アカマンボウ目 Lampridiformes、スズキ目 Perciformes では16S rRNAのほうがCOIよりも登録種数が多かった。16S rRNAで最も登録数が多い分類群はスズキ目であり、2,286種について5,112件の配列が登録されており、種数では全体の41.8%、配列数では全体の38.7%を占めていた。その次に主に淡水産魚類を含む分類群であるナマズ目 Siruliformes (10.5%, 8.4%)、コイ目 Cypriniformes (8.8%, 8.5%)、カダヤシ目 Cyprinodontiformes (4.6%, 4.5%)が続いた。一方、主に中深層性魚類を含むワニトカゲギス目 Stomiiformes、ヒメ目 Aulopiformes、アシロ目 Ophidiiformes、ハダカイワシ目 Myctophiformes では登録種数が少なかった。このような登録状況はCOIでも同様だった。

登録されていた塩基配列の断片長は16S rRNAで16–1,735bpだった(Fig. 3-2-1)。500–600塩基の配列が最も多く、全体の56.2%を占めていた。また、16S rRNAでは、1,000bp以上の配列も比較的多く存在し(1,162件, 8.8%)、領域の全長に相当する1,600–1,700bpの配列も多かった(全体の2.9%)。COIで登録されていた断片長は4–1,564bpであり、DNAバーコーディングの対象領域となっている600–700塩基が圧倒的に多く、全体の82.9%を占めていた(Fig. 3-2-1)。一方で、1,000bp以上の配列はほとんど登録されていなかった(331件, 1.4%)。

第2項 アラインメントと遺伝距離

ミトコンドリアゲノムデータから得た793種の16S rRNAとCOIの全配列の配列長は、16S rRNAで1,587–2,692bp、COIで1,542–1,641bpであり、16S rRNAでは長さに大きな変異があった。最も長い配列(2,692bp)を持っていたマグロ属の3種(メバチ *Thunnus obesus*、キハダ *T. albacares*、ミナミマグロ *T. maccoyii*)を除くと、16S rRNAの配列は1,587–1,858bpだった。両者のデータセットのアラインメント長は、16S rRNAでは2,708bpとなりギャップを多く含んでいたのに対して、COIではギャップをほとんど含まない1,538bpとなり、16S rRNAのほうがアラインメントが困難だった。また、カレイ目12種とニホンウナギ *Anguilla japonica*を含めたアラインメント結果を16S rRNAとCOIで比較したところ、COIの変異は塩基置換のみだったのに対し、16S rRNAでは同じ目、または科に属する近縁種間であってもギャップがみられた(Fig. 3-2-2)。

両者で補正なしのp-distanceを算出したところ、挿入/欠失を含むpairwise deletionのデータを用いると、16S rRNAで0–0.321(平均±標準偏差, 0.202±0.033)、COIで0–0.307(0.203±

Table 3-2-1 Number of deposited sequences of 16S ribosomal RNA and COI gene in GenBank at 22 June 2011

Order	16S rRNA				COI			
	Family	Genus	Species	No. of sequences	Family	Genus	Species	No. of sequences
Acipenseriformes	2	6	27	57	1	2	13	97
Albuliformes	1	1	1	3	1	1	1	61
Amiiformes	1	1	1	2	1	1	1	3
Anguilliformes	13	47	91	425	15	39	69	317
Ateleopodiformes	0	0	0	0	1	2	2	4
Atheriniformes	8	27	41	116	7	24	54	137
Aulopiformes	8	12	20	20	14	29	55	146
Batrachoidiformes	1	7	11	26	1	4	5	18
Beloniformes	5	30	87	202	5	13	23	78
Beryciformes	5	7	9	16	7	16	44	174
Characiformes	14	110	273	532	12	75	174	670
Clupeiformes	5	45	87	414	4	34	76	855
Cypriniformes	5	184	483	1125	4	155	417	1962
Cyprinodontiformes	10	80	254	590	8	65	205	939
Dactylopteriformes	1	2	2	5	1	1	1	15
Elopiformes	2	2	5	8	2	2	5	21
Esociformes	2	4	10	30	2	3	6	89
Gadiformes	12	49	136	327	9	42	88	645
Gasterosteiformes	3	8	10	35	3	6	7	42
Gonorynchiformes	1	1	1	5	3	3	3	16
Gymnotiformes	5	6	24	51	2	2	4	11
Lampriformes	5	8	12	20	5	7	9	20
Lophiiformes	11	28	50	99	10	22	47	145
Mugilomorpha	1	6	24	214	1	7	22	185
Myctophiformes	2	32	60	83	2	24	74	201
Notacanthiformes	1	2	2	2	2	3	5	16
Ophidiiformes	2	7	9	27	3	18	24	73
Osmeriformes	7	35	82	246	8	32	49	361
Osteoglossiformes	6	28	49	89	5	14	20	99
Perciformes	146	823	2286	5112	128	707	1805	9945
Percopsiformes	3	3	3	6	2	2	2	10
Pleuronectiformes	10	85	173	566	10	69	137	752
Polymixiiformes	1	1	2	4	1	1	1	1
Polypteriformes	1	1	1	2	0	0	0	0
Salmoniformes	1	7	34	247	1	7	40	1221
Scorpaeniformes	32	100	284	842	22	101	284	1324
Semionotiformes	0	0	0	0	1	2	6	12
Siluriformes	21	158	575	1117	31	146	355	1605
Stephanoberyciformes	5	9	10	17	5	9	15	45
Stomiiformes	4	18	45	79	4	43	85	173
Synbranchiformes	2	2	4	34	2	3	30	84
Syngnathiformes	5	24	70	215	3	14	46	172
Tetraodontiformes	10	52	109	178	6	35	88	282
Zeiformes	3	7	12	33	5	9	15	100
Total	383	2065	5469	13221	360	1794	4412	23126

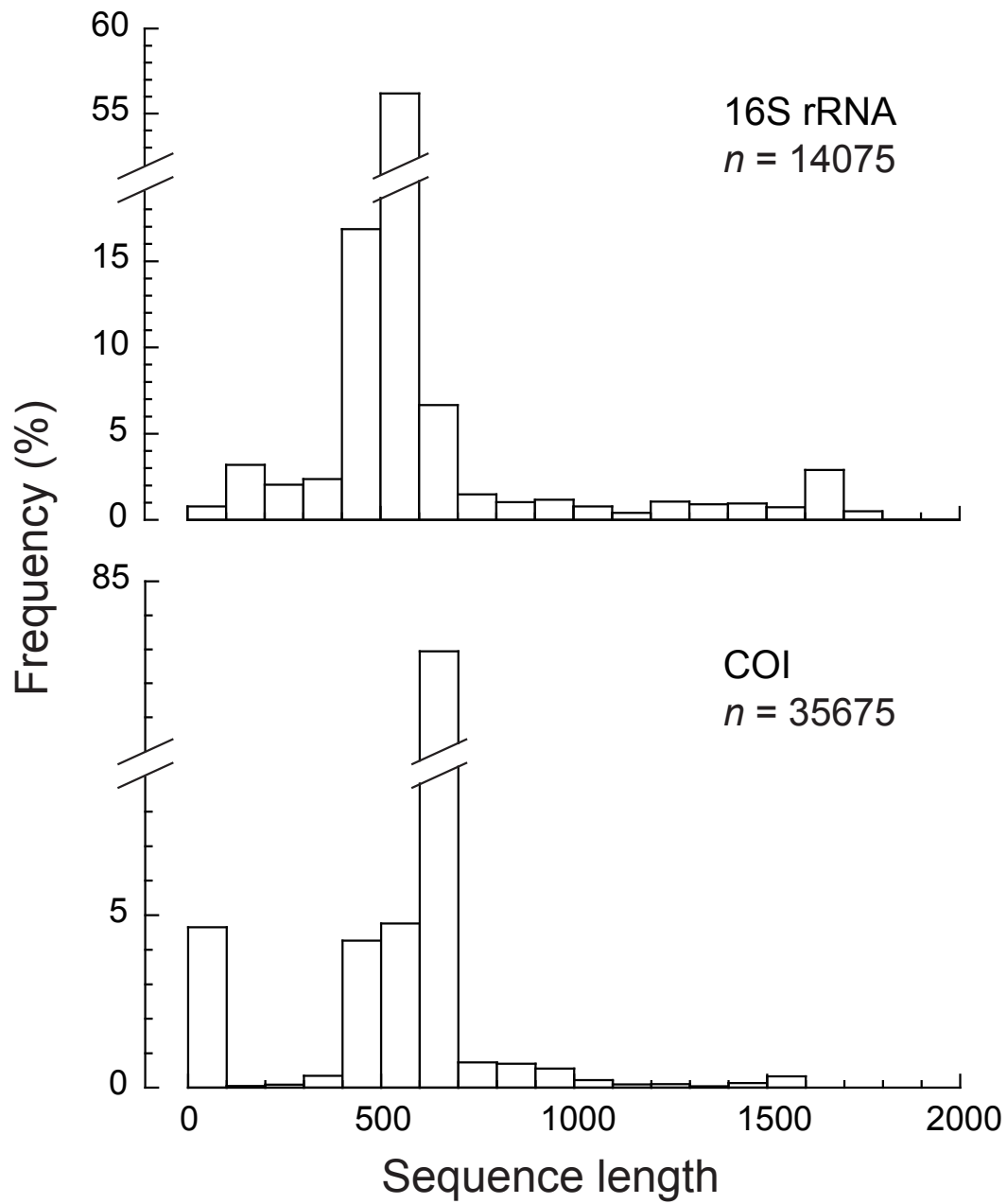


Fig. 3-2-1 Sequence length variation in deposited partial sequences of 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA, upper panel) and those of cytochrome c oxidase subunit I gene (COI, lower panel) in GenBank

0.019) となり、ほぼ同様の分布を示した (Fig. 3-2-3). しかし、挿入 / 欠失を削除した complete deletion のデータを用いると、p-distance は、16S rRNA では 911bp のデータセットを使って 0–0.249 (0.123 ± 0.028) となり、算出される変異量は大きく減少した (Fig. 3-2-2). 対して COI では、pairwise deletion とほぼ同数の 1,481bp の塩基を使って p-distance は 0–0.300 (0.197 ± 0.018) となり、ほぼ同じ変異量が得られた (Fig. 3-2-3).

第3節 成魚 DNA ライブラリの作成

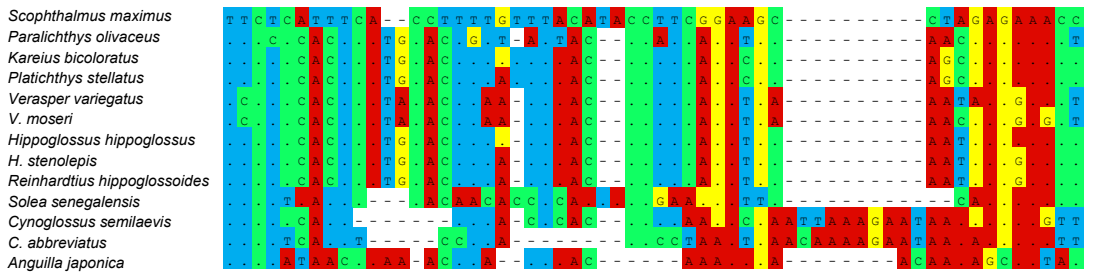
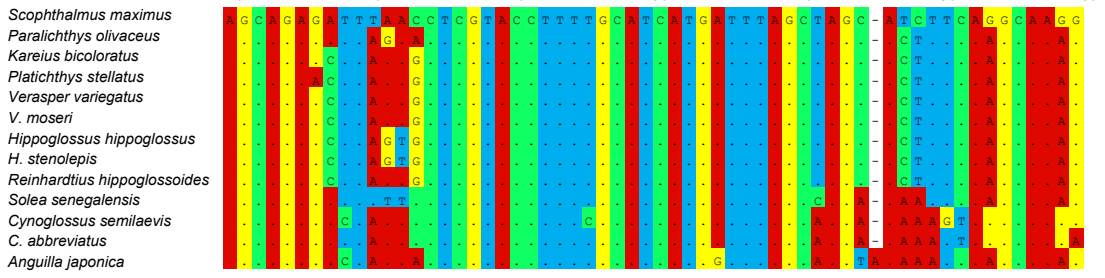
浜名湖で 85 種 142 個体の、マリアナで 32 種類 39 個体の成魚の 16S rRNA の部分塩基配列を得た (Table 3-1-1, 2). 得られた配列の長さはそれぞれ 778–1,226bp, 916–1,181bp だった. マリアナ海域で採集されたアジ科 Calangidae, ソコイワシ科 Bathylagidae, ハダカイワシ科 Myctophidae は形態によって種までの同定ができなかったため、それぞれ科または属の 1 種とした. これらのうち、浜名湖では 33 種、マリアナでは 12 種の配列はこれまで GenBank に登録がなく、新規にデータベースに追加することができた. これらの配列は BLAST 2.2.5+ で BLAST 検索用のデータベースとしてフォーマットし、ローカルで BLAST 検索をおこなえるようにした.

第4節 種内・種間の相同性

浜名湖で得た 142 個体のシークエンスと、マリアナ海域で得た 39 個体のシークエンスをそれぞれ BLAST を用いて総当たりで相同性を算出した. その結果、浜名湖では種内相同性は 98.35–100% ($n = 97$), 種間の相同性は 77.13–99.89% となり、両者の範囲が重複していた (Fig. 3-4-1). 種内で 98% 台の相同性がみられたのはボラ *Mugil cephalus* であり、種間で相同性が 99% を越えていた組み合わせはトラフグ属 3 種 (シヨウサイフグ *Takifugu snyderi*, ヒガンフグ *T. pardalis*, シマフグ *T. xanthopterus*) の組み合わせだった. また、これら 3 種とマフグ *T. porphyreus* との組み合わせも 98% 台の相同性を示した. そこで、変異の大きかった 1 個体のボラと、トラフグ属 4 種を除くと、種内相同性の最小値は 99.05%, 種間相同性の最大値は 97.27% となり重複はなくなった. マリアナ海域では、種内と種間の相同性はそれぞれ 99.81–100% ($n = 3$), 77.87–98.35% ($n = 188$) となり、両者の範囲は明瞭に分かれていた (Fig. 3-4-1).

これらの配列を用いて、BLASTClust により相同性に基づいたクラスタリングをおこなった. その結果、浜名湖では 98% と 99% を基準としたときに、マリアナ海域では 99% を基準としたときに、最もクラスタと種の一貫率が高かった (Table 3-4-1). 浜名湖では、98% の基準と 99% の基準でクラスタと種の一貫率は同じだったものの、クラスタの数は 99% では 84 個だったのに対し、98% では 82 個であり異なる種をまとめてしまう場合が多かった. 以上のことから、

16S rRNA



COI

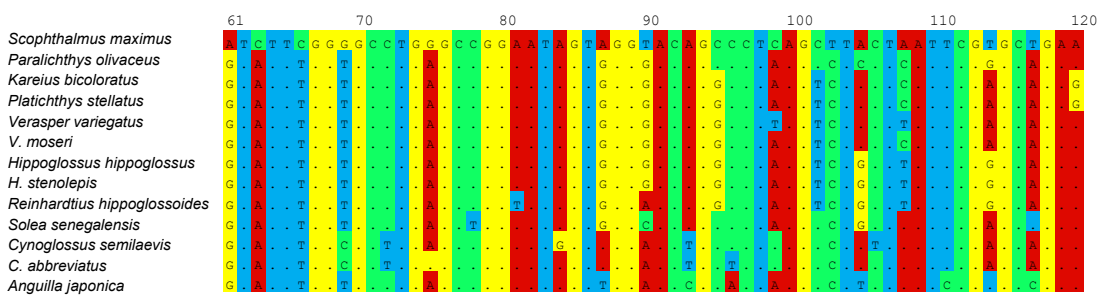
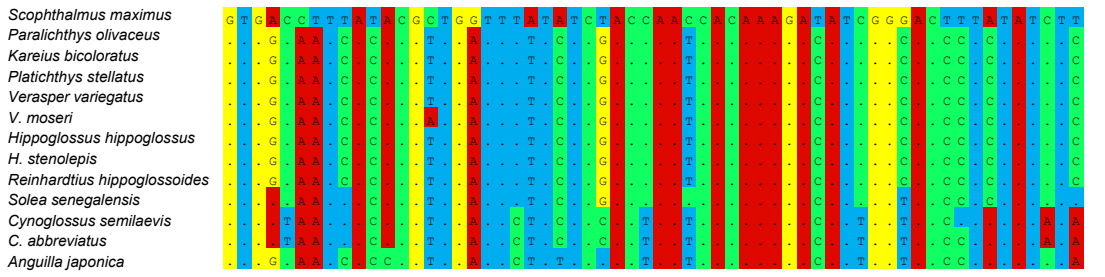


Fig. 3-2-2 Comparison of partial aligned sequences among twelve pleuronectiform species and *Anguilla japonica* as tested taxa between 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) and cytochrome oxidase subunit I gene (COI). Dots indicate nucleotides identical to those of *Scophthalmus maximus* on the top line and gaps show insertions/deletions. Dotted lines indicate the hybridized regions of universal primers (modified from Nishida and Miya 1996, and Ward 2005)

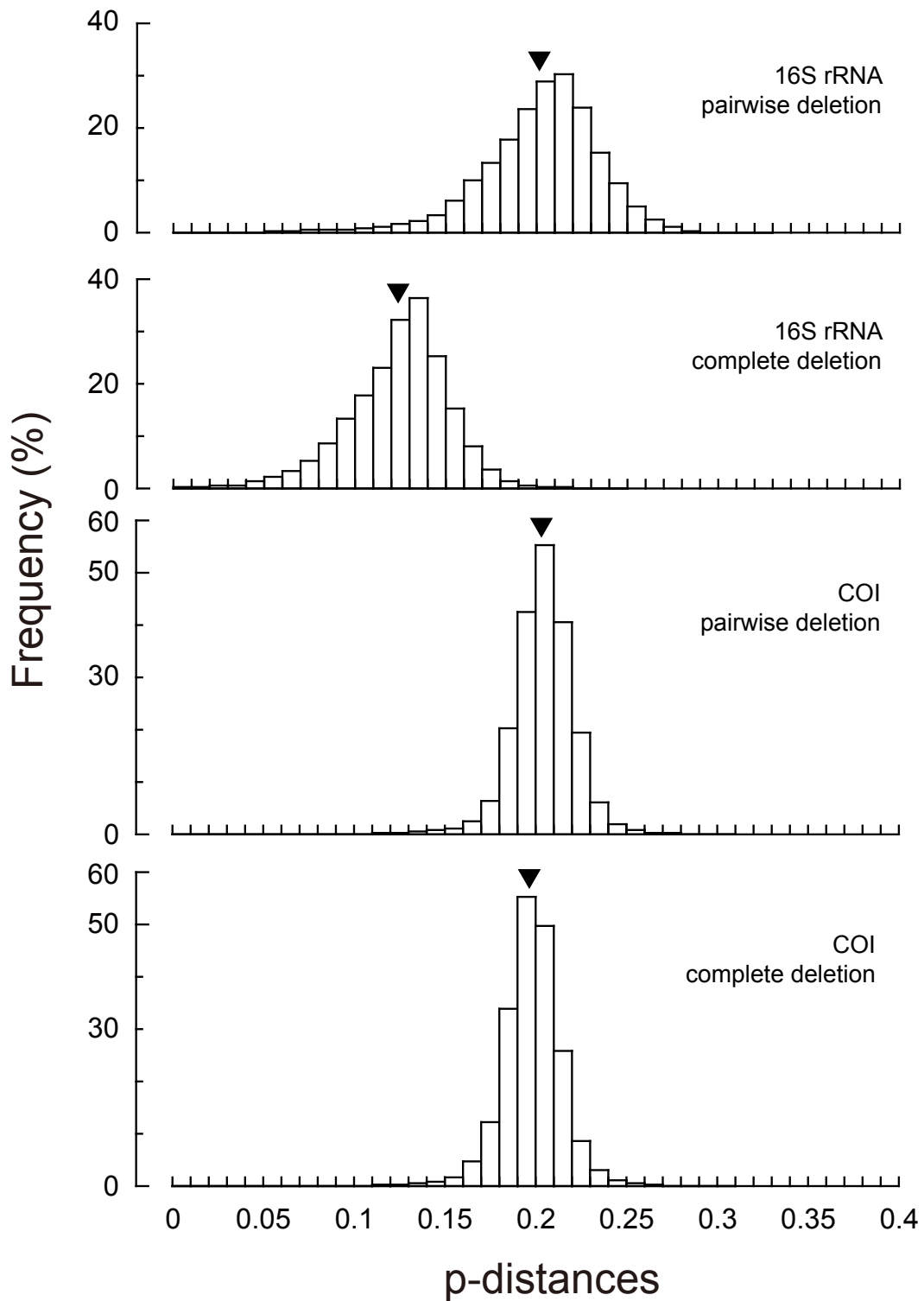


Fig. 3-2-3 Differences in frequency distribution of p-distance between 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) and cytochrome oxidase subunit I gene (COI). Uncorrected p-distance was calculated for each region using pairwise deletion and complete deletion of gap sites. Black triangles indicates the mean p-distance for each estimation

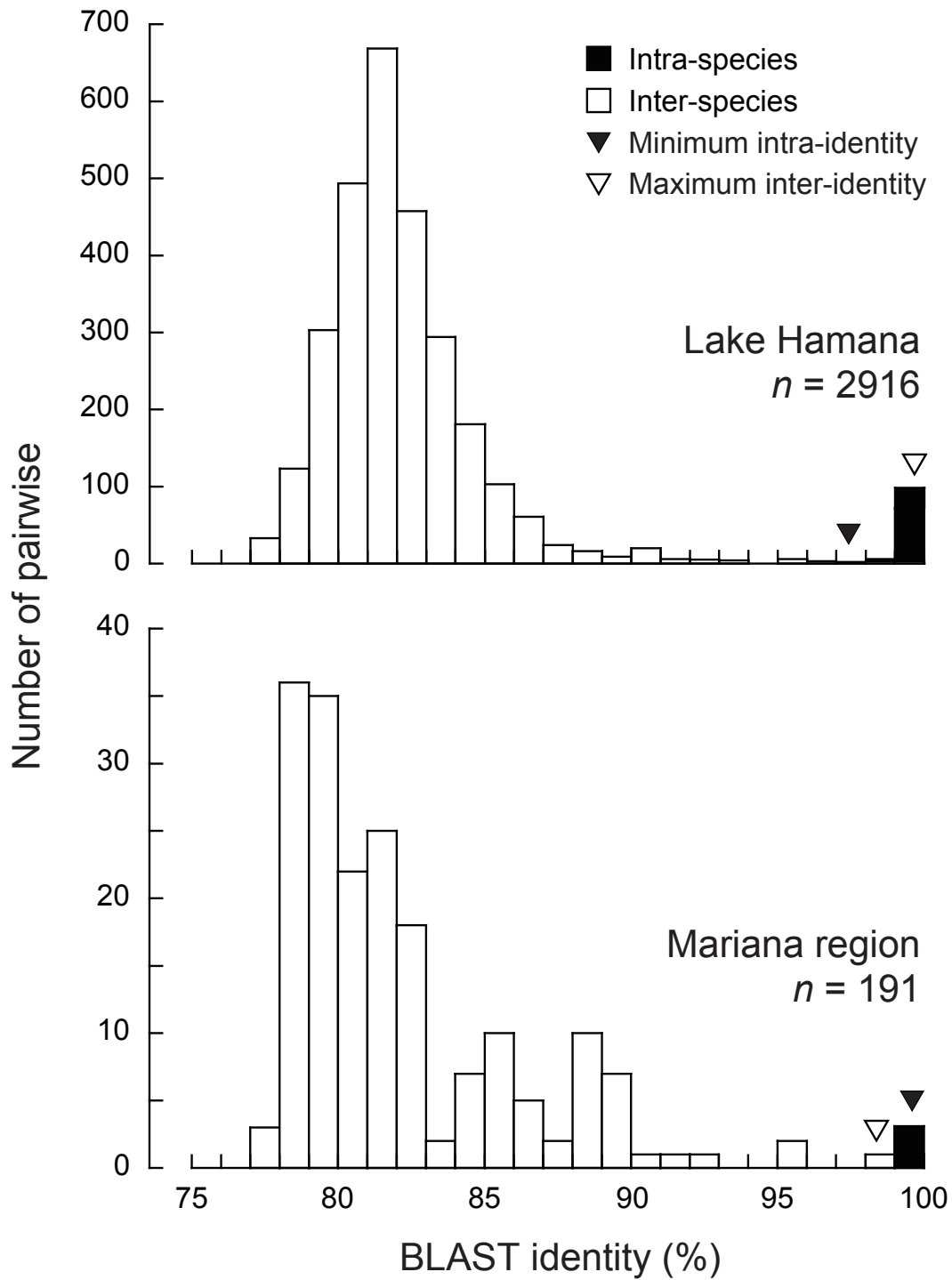


Fig. 3-4-1 Intra- and Inter- species identity of fishes collected in the Lake Hamana (upper panell) and the Mariana region (lower panell) calculated using BLAST. Black and white bars indicate intra-species identity and inter-species identity, respectively. Minimum intra-identity and maximum inter-identity were also indicated as black and white triangles, respectively

Table 3-4-1 Recover ratio of species by DNA clustering based on 16S rRNA sequences using BLASTClust. Nuber in the parenthesis indicate the number of recovered species/number of species analyzed

Threshold identity	HMN samples		KY samples	
	No. of clusters	Ratio of recovered species	No. of clusters	Ratio of recovered species
1	122	0.71 (60/85)	37	0.97 (28/29)
0.99	84	0.95 (81/85)	36	1 (29/29)
0.98	82	0.95 (81/85)	35	0.93 (27/29)
0.97	81	0.93 (79/85)	35	0.93 (27/29)

99%の相同性を基準とすれば、最も正確に種レベルでの識別ができると考えられた。

第5節 考察

第1項 対象領域の検討

DNA バーコーディングに使用する領域の基準として、Valentini et al. (2009) は理想的な DNA バーコーディングマーカの条件に、1) 種内ではほぼ均一であり、種間では異なっていること、2) 異なる分類群間でも比較できるように標準化されていること、3) 高次分類群に帰属させることができるように系統的な情報を含むこと、4) 保存的なプライミングサイトと DNA の増幅とシーケンスの信頼性をもち頑健であること、5) 配列が短いこと、の5つを挙げている。本研究で対象領域とした 16S rRNA は、魚類においては、過去に多くの系統学的研究に使われていること、また、種査定での実績もあることから、1と3の条件は満たしていると考えられる。また、保存的な領域を含み、汎用プライマーの設計が容易であるとされ (Kocher et al., 1989; Meyer, 1993; Xia et al., 2012)、実際に多くの汎用プライマーが存在することから、2と4の条件も満たしている。使用する配列長については、実験・解析においてはなるべく短い配列のほうが扱いが容易であり、質の悪いサンプルからも増幅が可能であると考えられる。しかし、より長い配列のほうが解像度が高い (Ficetola et al., 2010) ことが報告されており、相同性の比較においては、なるべく長い配列を比較したほうが取りうる値が多くなり精度も高まる。また、シーケンスエラーとアラインメント長の違いの影響も小さくできる。16S rRNA では 1,000bp 以上の配列も多く登録されており、なるべく長い配列を検索配列とすることで、蓄積されているデータを有効に使うことができるだろう。以上のことから、本研究で対象とした 16S rRNA の約 1,200 塩基は良い DNA バーコードであると考えられる。

もうひとつの対象領域の候補として、近年急速にデータの蓄積が進んでいる COI が考えられる。COI は 16S rRNA と比較したときに、挿入 / 欠失が稀でありアラインメントが容易であるという利点があり、多くの種で配列を比較した結果、種を識別できる十分な変異量を含むことも明らかとなってきた (Ratnasingham and Hebert, 2007)。また、方法が標準化されてからデータの蓄積が進んだために配列の長さや領域が揃っており、比較と結果の解釈が容易であるという利点がある。しかし、種を識別する能力については、既存データを用いた解析により、16S rRNA のほうが COI よりもやや高いことが報告されている (Ficetola et al., 2010)。また、本章の結果では、16S rRNA の DNA クラスタによる種の再現率は、99% の基準を採用したときに浜名湖で 95%、マリアナ海域で 100% となり、この値は、COI で過去に報告されてきた対象群における種の識別成功率 (95% 以上 : Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005; Hajibabaei et al., 2006) とほぼ同じである。

さらに、本研究で対象とするマリアナ海域においては、種組成が未知の母集団から由来した卵を種査定するため、現時点では、登録種数が多く、特にマリアナ海域のような外洋域に多く出現するだろうと予想されるダツ目やアカマンボウ目などデータが多く蓄積されている 16S rRNA を使うことが適切であると考えられた。

第2項 配列比較法の検討

DNA 種査定法において、ある配列を既知の種に帰属させる場合、データベース上の配列と遺伝距離もしくは相同性を計算する方法と、近隣結合樹を構築する方法がある。16S rRNA のデータの取り扱いにおいては、アラインメントがもっとも大きな問題である。実際に、785 種の配列でアラインメントをおこなったところ、ギャップが多く含まれていた。これは、データセットによりアラインメント結果が異なる可能性が大きいことを示している。さらに、同じデータセットであっても、挿入/欠失を除外することによって p-distance の値が大きく減少した。これは、変異の大きい領域が除外された結果、保存的な領域のみの比較で遺伝距離が計算されたためだろう。これらは COI にはない 16S 特有の問題である。16S rRNA をサンショウウオ科 Hynobiidae、また、南アフリカ周辺海域の魚類について DNA バーコードとして評価した研究においても、アラインメントの後に Kimura-2-parameter (K2P) を算出しており、16S rRNA では種レベルでの識別が難しいことが報告されている (Cawthorn et al., 2012; Xia et al., 2012)。このことから、16S を使う場合には、COI で提唱されているような K2P の算出と近隣結合樹に基づいた種査定法は、アラインメントを必要とするため、適していないと考えられる。

このような 16S rRNA のもつアラインメントの問題は、BLAST によるペアワイズの相同性検索を用いることで回避できると考えられる。さらに BLAST は処理速度が速く、大量のデータと比較できる。あらかじめ母集団の種組成を想定できないマリアナ海域で用いるには、BLAST による大規模なデータベース探索と相同性の比較が適していると考えられる。

第3項 種を識別する適切な基準

浜名湖における一部の分類群（ボラ、トラフグ属）を除けば、BLAST による種内と種間の相同性は、浜名湖、マリアナ海域のいずれにおいても 99% を基準として分けることができた。この基準でクラスタリングをおこなったところ、DNA のクラスタと種の一致率は 95% 以上と他の基準よりも高かった。浜名湖では、基準とする値が 98% と 99% で種の再現率は同じだったが、クラスタの数は 98% で 82 個、99% で 84 個だった。DNA の相同性に基づいて種査定をおこなった場合、誤同定には、同種であるが別種としてしまう false-negative と、別種であるが同種としてしまう false-positive とがある。16S の配列に基づいてクラスタリングした結果、浜名湖とマリアナ海域のいずれでも基準値とクラスタの数は正比例しており、基準値を 99% より高めると

false-negative の、低めると false-positive の危険性が高まると考えられた。生態学的研究においては、複数の種をひとつにまとめてしまう false-positive のほうが結果を誤って解釈する原因となるだろう。よって、本研究では、false-negative の可能性をあえて許し、99% の相同性を種を識別する基準として採用した。

第4項 DNA に基づいた種査定法の提示

第2章の形態による分類と、本章での DNA 種査定法の検討をもとに、DNA に基づいた魚卵の分類法として以下の方法を考案した。

- (1) 卵を形態に基づいてタイプとして分ける。
- (2) それぞれに汎用プライマーの L1854 と H3058 を用いて、PCR 法により mtDNA 16S rRNA の約 1,200 塩基を増幅し、塩基配列を決定する。
- (3) BLASTClust により、DNA に基づいたクラスタリングをおこない、タイプを整理する。
- (4) 以上で決定した 1,200 塩基の配列に基づいて BLAST による相同性検索をおこない、既存の配列との相同性を算出する。その際、99% 以上の相同性を示す個体が属する種と同種とする。

以降の章における種査定では、本章で作成した成魚の 16S rRNA 配列のライブラリと、GenBank を参照データベースとし、得られた魚卵の配列を BLAST により検索した。

第4章 浜名湖に出現する魚卵の種組成と分布

第2章では形態形質の有効性を論じた。この結果から、類型的なグルーピングは可能であり、分類群によってはある程度有効であるものの、形態による魚卵の分類には手法として限界があることが分かった。また第3章では、DNAの解析をとり入れた種査定法を提示した。この方法の生態学的研究における有用性を示すためには、天然海域で採集した卵に適用し、検証する必要がある。本章では浜名湖に出現する魚卵を対象に、DNA種査定法を適用した。

本章で対象とした浜名湖は半閉鎖水域であり、湖内に出現する魚類は444種にのぼると報告されている（静岡県水産技術研究所, 2012）。また、千葉（1980）は、湖内における産卵親魚の出現から、コノシロ *Konosirus punctatus*、サツパ *Sardinella zunasi* など19種が湖内で産卵すると推測している。このことから、浜名湖は卵が出現する可能性のある魚種のDNAデータを網羅しやすく、半閉鎖水域であるがゆえに魚卵の流入も限られることが予想され、DNAによる種査定をもちいた生態学的研究のモデル海域として有用であると考えた。

浜名湖内での魚卵の出現に関しては、松下・能勢（1974）がコノシロ卵の湖内での分布を、片倉・二宮（1988）が不明卵を含む24種の卵の出現の季節的変動を報告している。しかしながら、これらは形態に基づいて分類をおこなっており、出現する卵の詳細な分布や季節性は明らかとなっていない。そこで本章では、浜名湖での周年調査によって採集した魚卵の種組成と分布、季節変化をDNA種査定法を用いて明らかにした。さらに、浜名湖でのDNA種査定法の有効性と、魚類の産卵と環境との関係も考察した。

第1節 材料と方法

第1項 浜名湖

浜名湖は静岡県西部に位置する汽水湖である。その総面積は74 km²、周囲はおよそ141 km、総容積は34×10⁷ m³である（松田, 1999）。水深は、湖南部はおおむね3 m以下と浅く、湖心部は10–15 mと比較的深い（千葉, 1980）。また浜名湖は、幅およそ200 mの狭い湖口の今切口で遠州灘とつながる半閉鎖的な水系であり、1回の潮汐で全湖水量の10–20%にあたる3,000–6,000万トンの海水の流入・流出があるとされている（松田, 1999）。しかし湖口が狭いため、流入水によって置換されるのは湖口部に近い水域のみであり、湖奥部では外海水の影響を受けにくく、流入河川の影響により淡水、汽水域を形成している（片倉・二宮, 1988）。また、湖西部沿岸に

は魚類幼稚魚期の生育に適したアマモ場も形成されている（片倉・二宮, 1988）。

第2項 魚卵の採集

浜名湖内の環境を網羅するように8ヶ所の調査定点（St. 1-8）を設定し、2004年8月から2005年11月にプランクトンネットによる魚卵の採集を実施した（Fig. 4-1-1）。調査は各月の大潮前後の最満潮時におこなった。曳網はプランクトンネット（口径56 cm）を平船の舷側に固定し、船速約2ノットで5分間または10分間表層で曳網した。2004年8月には目合い1.0 mmの、それ以降は目合い0.354 mmのネットを使用した。曳網開始時、もしくは終了時に水温と塩分を測定した。調査は原則として各定点で毎月1回ずつおこなったが、2004年10月はSt. 3-5のみでおこない、2004年9月、2005年3、5、7月は調査をおこなわなかった。濾水量は網口に取り付けたフローメーターの値から算出した。

今切口から約2 km湖内側に位置する第三鉄橋において、アンカーネットによる採集調査を2004年12月、2005年1、2、4、7-9月に実施した（Fig. 4-1-1, St. A）。採集は原則として毎月1回、大潮前後の日の最満潮前後と最干潮前後の両方で、夜間におこなった。採集には曳網調査と同じプランクトンネットを用いた。第三鉄橋では潮汐流が強く、ネットを水中に固定するだけで濾水することができる。そこで、約60kgのアンカーに取り付けたロープにプランクトンネットを取り付けて水中へ投入し、表層で採集をおこなった。1回あたりの採集時間は5分もしくは10分とした。採集開始時に水温と塩分を測定した。

以上で得られたプランクトンサンプルは直ちに東京大学大学院農学生命科学研究科付属水産実験所に持ち帰り、魚卵を肉眼でソーティングした。採集した魚卵は、デジタルカメラ（Nikon DXM1200、もしくはNikon DS-5M）を取り付けた実体顕微鏡下（Nikon SMZ1500、10-115倍、もしくはNikon SMZ-U、7.5-75倍）で写真撮影した後、99%エタノール、または5%ホルマリンで固定した。

第3項 形態によるタイプ分け

固定標本では生時とは形態が大きく変化するため、採集した魚卵の形態の観察と測定は写真に基づいておこなった。まず、油球の数、卵膜表面の特殊構造の有無、卵黄の亀裂の有無、囲卵腔の広さ、の4形質によってI.A-III.D群（池田・水戸, 1988）に分け、さらにこれらを卵の外形、卵径、胚体の形質などの形態的特徴に基づきタイプに分けた。形態の測定にはImageJ（Rasband, 1997-2011）を用いた。なお、明瞭な形態形質によってグルーピングできなかった卵はcomplexとして扱った。

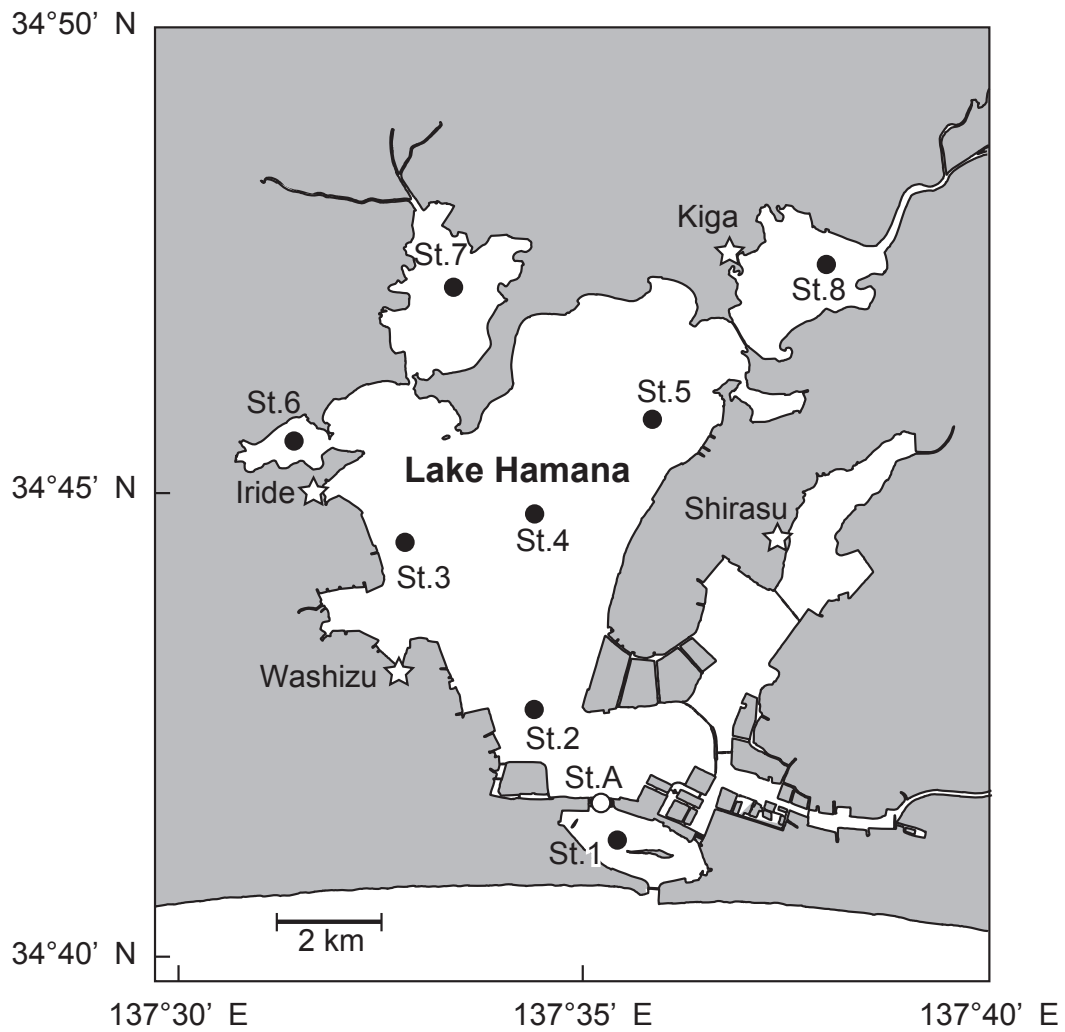


Fig. 4-1-1 Map showing the location of sampling site for pelagic egg collection (St. 1-8) and anchor net (St. A) from August 2004 to November 2005

第4項 PCR とシーケンス

形態によって明瞭にグルーピングできたタイプのエタノール標本の中からランダムに魚卵を選び、遺伝子解析に供した。なお、ホルマリン固定サンプルは、DNA の抽出、PCR による増幅、正確なシーケンスが難しいため (Karaiskou et al., 2007)、形態の観察のみとした。

粗全 DNA はキレックスを用いて抽出した。魚卵を 1 個ずつ、100 μ l の滅菌蒸留水の 5% キレックス 100 resin (Bio-Rad) の中でミンスし、混合溶液をヒートブロックを用い 98° で 15 分加熱した。上澄み液は続く PCR の鋳型 DNA として用いた。

得られた粗全 DNA を鋳型として、mtDNA の 16S rRNA の約 1,200bp の部分配列を L1854 と H3058 のプライマーセット (第3章第1節第3項参照) を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によって増幅した。PCR には Model 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) もしくは Takara PCR Thermal Cycler Dice (Takara) を使用した。

PCR 反応は、使用する酵素により以下の 2 種類の実験系のいずれかでおこなった。それぞれで得た PCR 産物で、臭化エチジウムを混合して作成した 1.0% アガロースゲルを用いて電気泳動をおこない、バンドの有無と増幅断片の長さを確認した。

1) PrimeStar HS DNA polymerase (Takara Bio Inc.)

反応液の組成は、滅菌蒸留水 6.74 または 8.24 μ l, 5 \times Primestar Buffer (Takara Bio Inc.) 3.0 μ l, dNTP (2.5 mM each) 1.2 μ l, プライマー (5 μ M) 各 1.5 μ l または 0.75 μ l, PrimeStar (Takara Bio Inc.) を 0.06 μ l (0.15U), 鋳型 DNA 溶液 1.0 μ l で、最終量を 15.0 μ l とした。反応は、98°C で 5 分間加熱した後、熱変性 98°C で 10 秒または 15 秒、アニーリング 50–55°C で 5 秒または 10 秒、伸長反応 72°C で 1 分–1 分 30 秒の過程を 30–35 回繰り返す、最終伸長反応を 72°C で 7 分間おこなった。

2) KOD Plus ver.2 (Toyobo Co., Ltd.)

反応液の組成は、滅菌蒸留水 5.5 μ l, KOD Plus ver.2 Buffer (Toyobo Co., Ltd.) 1.0 μ l, dNTP (2 mM each) 1.0 μ l, MgSO₄ (25 mM) 0.6 μ l, プライマー (5 μ M) 各 0.3 μ l, KOD Plus ver.2 (Toyobo Co., Ltd.) を 0.3 μ l (0.3U), 鋳型 DNA 溶液 1.0 μ l で、最終量を 10.0 μ l とした。反応は、94°C で 2 分間加熱した後、熱変性 98°C で 10 秒、アニーリング 50°C で 30 秒、伸長反応 68°C で 1 分 30 秒の過程を 35 回繰り返す、最終伸長反応を 68°C で 7 分間おこなった。

得られた PCR 産物は、Exo-SAP IT (Amersham Bioscience Inc.) を用いて、または PEG 沈殿により余剰の dNTP およびプライマーを除去した後、BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) を用いて Dye Termination 反応をおこなった。反応は製品付属の説明書 (Applied Biosystems Inc.) に従い、PCR と同じプライマーとサーマルサ

イクラーを使用しておこなった。反応産物は 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.) により泳動し、塩基配列を決定した。

得られた泳動像を 4 Peaks (Griekspoor and Groothuis, 2005) を用いてエレクトロフェログラムと得られた塩基配列を目で確認し、不明瞭な領域を削除した。次に、eBioX (<http://www.ebioinformatics.org/ebiox/>) に実装された Kalign2 (Lassmann et al., 2009) を使用して得られた配列を連結した。得られた塩基配列の編集には eBioX を用いた。

第5項 DNA に基づいた種査定

得られたシークエンスを BLASTClust によってクラスタリングし、卵をクラスタに分けた。クラスタリングの基準は 99% とし、area covering は 0.5 とした。次に、これらのシークエンスを BLAST を使用して GenBank に登録された種が既知のシークエンス (2011 年 7 月 25 日時点) と、さらに第 3 章で得られた浜名湖の成魚 DNA ライブラリ、それぞれを参照した相同性検索をおこない、99% の相同性基準を適用して既知の種と対応させた。GenBank の検索には NCBI BLAST の nucleotide BLAST を使った (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。コンタミネーションの可能性を避けるため、megablast を使って Nucleotide collection (nr/nt) を検索し、魚類だけに限らず生物群全体で比較した。Algorithm parameters は、Max target sequences (結果として表示されるアラインメントの数) を 250 にし、それ以外はデフォルトでおこなった。第 3 章で作成した DNA ライブラリとの比較は、BLAST 2.2.25+ による Local BLAST を用い、デフォルトの設定でおこなった。BLAST の結果は相同性スコア順で表示される。ここで相同性スコアとは、配列間で一致した塩基と、異なった塩基にそれぞれ与えられた得点の、アラインメント全体の総和として定義される (DDBJ, 2011)。よって、アラインメントの長さが短ければ、相同性がいくら高くても、相同性のやや低い、より長い配列の結果に比べてスコアが低くなってしまい、上位の結果によってマスクされてしまう可能性がある。そのため、Max target sequences の値を大きくした。極端に短い配列との組み合わせや、既存の配列と偶然高い相同性を示したことによる誤同定の可能性を排除するため、e-value = 0 と表示された結果のみで相同性を比較した。第 3 章で論じたように、99% 以上の相同性を示した配列をもっていた個体が属する種をその卵の候補種とした。

第6項 分布の解析

卵の採集密度を濾水量 1 m^3 あたりの採集個数として算出し、湖内各部間で Kruskal-wallis 検定により比較した。湖内の定点は、本章第 2 節で示すように、水温と塩分に基づいて湖口部 (St. 1, 2)、湖心部 (St. 3–6)、湖奥部 (St. 7, 8) に分けて比較した。post-hoc test には Dunn's multiple comparison を使った。この検定には PRISM 4.0c (GraphPad Software Inc.) を使用した。形態に

よるタイプと、DNA解析をおこなった卵のDNAによるクラスタが一致した場合は、タイプすべてを同種の卵であると判断して解析をおこなった。タイプとクラスタが一致しなかった場合については、DNA解析をおこなった卵のみで分布を示した。解析に十分な個数が採集されたイシガレイとカタクチイワシでは、それぞれ2005年1月と2005年9月の湖内各部での出現個数を χ^2 検定によって比較した。出現個数は湖内各部でまとめ、期待値は瀘水量の比から求め、Excel 2008 for Mac (Microsoft) の chitest 関数を用いて p 値を算出した。

第2節 各採集点の環境

湖内の水温は、調査期間を通して5.9°Cから30.8°Cまで変化した (Fig. 4-2-1)。8月をピークに水温は低下し、2月にほぼ最低の水温を記録し、その後上昇するという明瞭な季節的変動が認められた。各月の定点間の水温の差は、3定点でしか調査をおこなわなかった2004年の11月を除くと、4-11月で0.9-4.0°Cであり、定点間で水温はほぼ一定だった。しかし、12-2月には最も海側の St. 1, 2 と湖内側の St. 3-8 の水温差が大きくなり、1, 2月にはその差が7.5°C, 8.1°Cに達した。St. 1, 2 と St. 3-8 は水温の変動パターンは同じであるが、変動幅はそれぞれ12.9-30.8°C, 5.9-30.8°Cと大きく異なり、明瞭な水塊として分かれていた。

塩分は、調査期間を通じて定点間で2-37と大きく変化し、定点間の差も月ごとに8-31と大きかった (Fig. 4-2-2)。定点ごとに塩分の変動パターンは異なり、St. 1 と 2 は1年を通じ28-37とほぼ一定だったのに対し、St. 3-6 と St. 7, 8 での変動幅はそれぞれ14-36, 2-34と湖奥の定点ほどより低塩分になる傾向があった。

以上のことから、本研究で設定した定点は、外海水の影響が強い海側の St. 1 と 2、流入河川水の影響を受けて大きく塩分が下がる湖奥部の St. 7 と 8、その中間的な特徴を示す St. 3-6 の3つに分けることができると考えられた。以下では、これらの定点をまとめる際には、それぞれ湖口部 (St. 1, 2)、湖心部 (St. 3-6)、湖奥部 (St. 7, 8) とした。

アンカーネット採集時の水温は、最干潮時と最満潮時で、それぞれ7.3-26.2°Cと12.5-25.5°Cであり、12-2月には最満潮時の水温が高かった (Fig. 4-2-3)。塩分は最満潮時に最干潮時よりも高い傾向があり、それぞれの変動幅は33-35.2, 31.2-33.7だった (Fig. 4-2-4)。最干潮時には水温と塩分が低い傾向が認められ、これは湖内の湖口部と湖心部の差に相当したことから、アンカーネットでは、最満潮時に外海からの流入水を、最干潮時に湖心部からの流出水を瀘水していると考えられた。

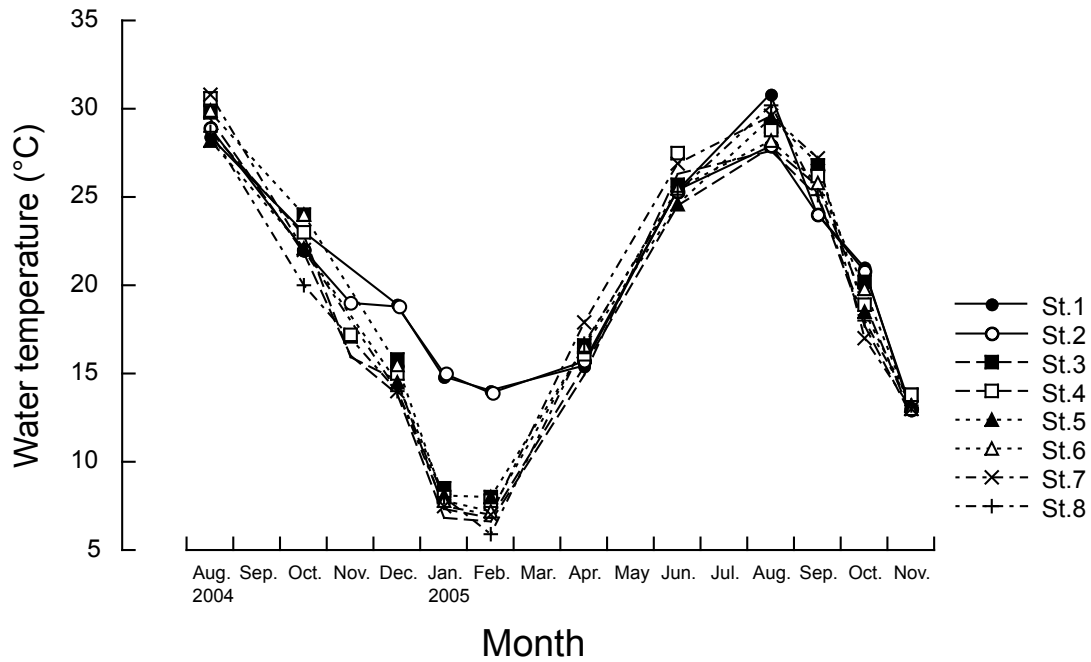


Fig. 4-2-1 Seasonal changes in surface water temperature in pelagic egg sampling stations at Lake Hamana during sampling period (from August 2004 to November 2005)

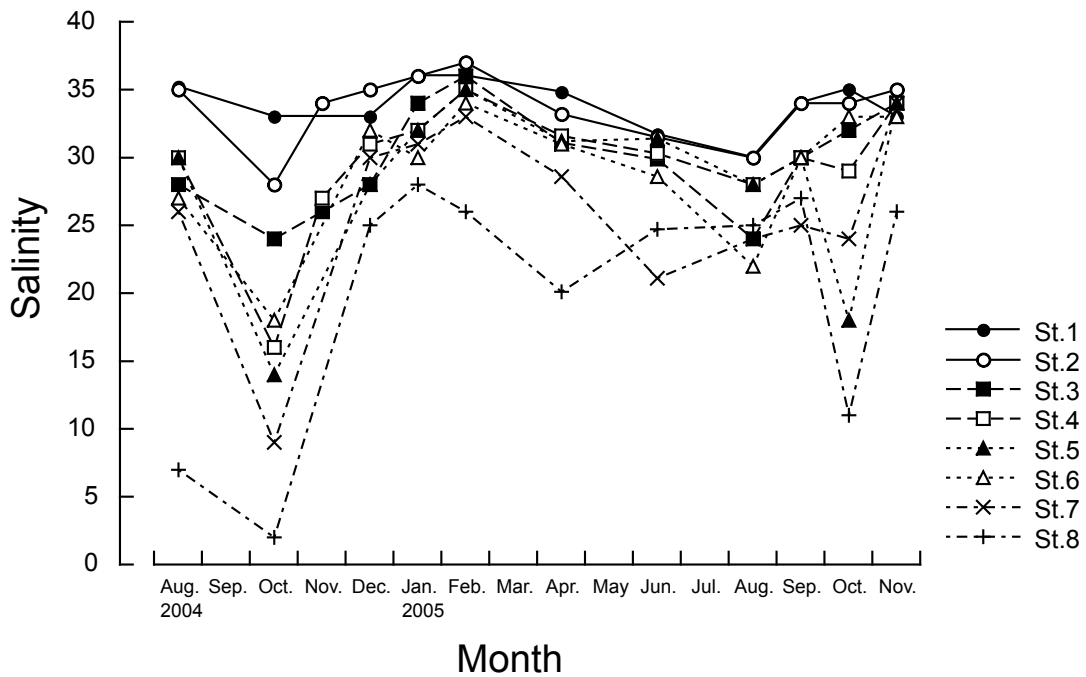


Fig. 4-2-2 Seasonal changes in surface salinity in pelagic egg sampling stations at Lake Hamana during sampling period (from August 2004 to November 2005)

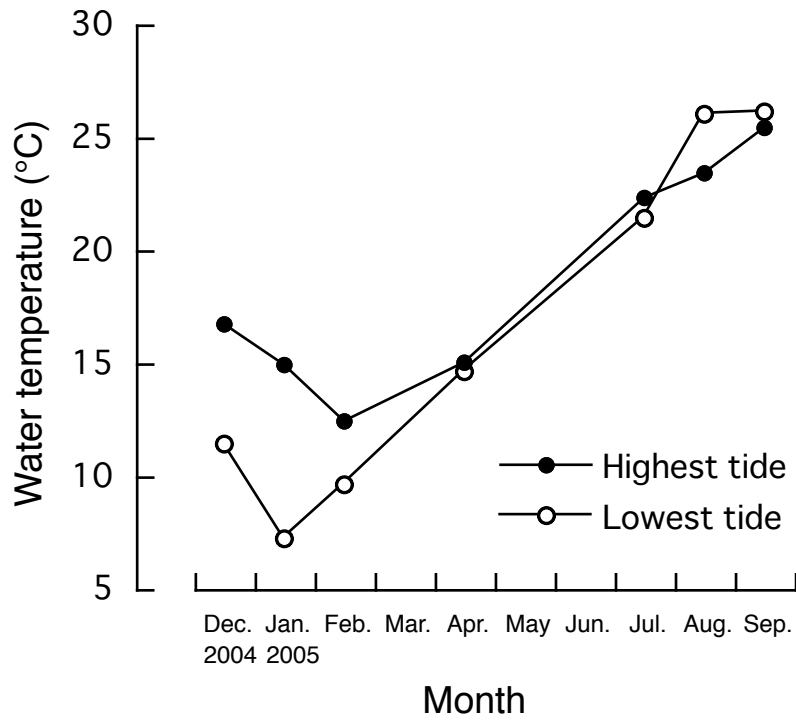


Fig. 4-2-3 Changes in water temperature at St. A in Lake Hamana where the anchor-net sampling was performed from December 2004 to October 2005

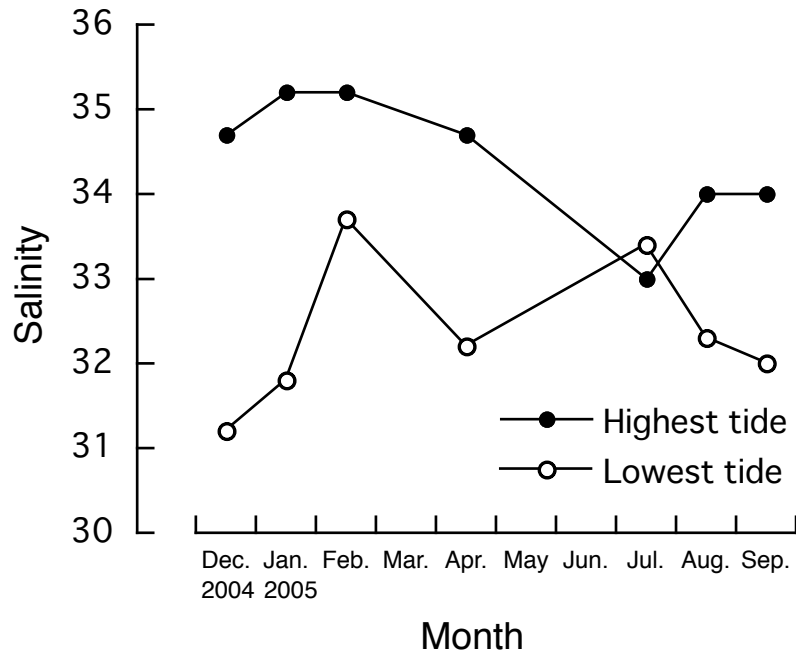


Fig. 4-2-4 Changes in salinity at St. A in Lake Hamana where the anchor-net sampling was performed from December 2004 to October 2005

第3節 採集個数と形態によるタイプ分け

プランクトンネットとアンカーネットによる採集で、計 6,425 個の魚卵が採集された。そのうち、プランクトンネットでは計 91 曳網で 5,284 個、アンカーネットでは計 14 回で 1,141 個が採集された (Table 4-3-1)。これらの卵は形態により 46 タイプに分けられた (巻末 Appendix 1 参照)。明瞭な形態形質によってグルーピングできなかった 586 個の卵は、油球の有無とサイズでわけ、それぞれ IC-complexA, IC-complexB, II-complex としてひとまとめに扱った。なお、サンプル処理中に孵化した卵は孵化仔魚とし、卵のタイプと対応がついた孵化仔魚に関しては採集個体数を卵と合計して扱った。プランクトンネットには 43 タイプ、アンカーネットには 28 タイプが出現し、17 タイプはプランクトンネットのみ、3 タイプはアンカーネットのみに出現した。

第4節 DNA による種査定の結果

第1項 DNA によるクラスタリング

採集した魚卵のうち、1 個ずつエタノール保存されている卵の中からランダムに選んだ 35 タイプ 340 個の卵で PCR とシーケンスをおこない、16S rRNA の部分塩基配列 (840–1,231bp) を得た。このうち、湖内で採集された卵は 328 個、アンカーネットで採集された卵は 12 個だった。これらの配列を 99% の相同性を基準として BLASTClust によりクラスタリングしたところ、45 クラスタに整理された。形態で分けたタイプのうち、21 タイプ (60%) がクラスタリングの結果と一致し、形態によるグルーピングが DNA によっても支持された。10 タイプはそれぞれ 2–4 個のクラスタに分割され、23 のクラスタを形成した。このうち 2 クラスタには形態的に別のタイプとした 2 タイプも含まれた。2 タイプは 1 個のクラスタにまとめられた。

第2項 出現種

BLAST の結果、45 クラスタのうち、26 クラスタ (58%)、299 個 (88%) の配列が既存配列と 99% 以上の相同性を示し、種が特定できた (巻末 Appendix 2 参照)。その他の 12 クラスタ 41 個の卵は高い相同性を示す配列が見つからなかった。この結果のうち、1 クラスタ (55 個) はカタクチイワシ *Engraulis japonicus* だけでなく、他のカタクチイワシ属 3 種の配列 (*E. australis*, *E. encrasicolus*, *E. eurystole*) とも 99% 以上の相同性を示した。しかし、カタクチイワシ以外の 3 種は日本に分布しない種であり、これらの卵はすべてカタクチイワシとして同定した。同様に、マイワシ *Sardinops melanostictus* と 99% 以上の相同性を示した卵 (14 個) がマイワシ属の他の 3 種の配列 (*S. sagax*, *S. neopilchards*, *S. ocellatus*) と、イシガレイ *Kareius*

Table 4-3-1 Summary of environmental condition and results of egg collection in the Lake Hamana from August 2004 to November 2005. In the parenthesis are catch rate of eggs per 1 m³

Station	Water temperature (C°)	Salinity	No. of eggs collected (catch rate/m ³)												Total				
			2004						2005										
			Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	
1	12.9-30.8	30-36	7 (<0.1)	-	16 (<0.1)	-	55 (0.6)	57 (0.6)	24 (0.7)	-	71 (1.0)	-	36 (0.4)	-	18 (0.2)	55 (0.7)	13 (0.2)	0	352
2	13.0-28.9	28-37	2 (<0.1)	-	0	29 ^a (0.4)	30 (0.3)	17 (0.4)	25 (0.4)	-	61 (0.8)	-	25 (0.4)	-	105 (1.0)	104 (1.2)	0	0	398
3	8.0-29.8	24-36	1 (<0.1)	-	29 (0.1)	6 ^a (0.1)	14 (6.9)	524 (6.9)	0	-	76 (1.4)	-	89 (1.0)	-	49 (0.4)	183 (2.4)	8 (<0.1)	0	979
4	7.8-30.6	16-35	0	-	0	15 ^a (0.2)	19 (5.7)	553 (<0.1)	2	-	11 (0.1)	-	176 (2.0)	-	119 (1.0)	41 (0.5)	209 (3.7)	0	1145
5	8.0-29.5	14-35	0	-	0	-	10 (0.1)	85 (0.9)	4 (<0.1)	-	205 (2.6)	-	102 (1.2)	-	222 (1.9)	15 (0.3)	213 (4.0)	0	856
6	7.2-29.9	18-34	0	-	16 (0.1)	-	12 (0.2)	90 (0.8)	0	-	122 (1.5)	-	51 (0.5)	-	353 (2.8)	77 (0.9)	2 (<0.1)	0	723
7	7.0-30.8	9-34	0	-	0	-	25 (0.2)	47 (0.4)	0	-	199 (2.5)	-	1 (<0.1)	-	36 (0.3)	399 (4.7)	2 (<0.1)	0	709
8	5.9-30.2	2-28	0	-	0	-	2 (<0.1)	1 (<0.1)	0	-	0	-	0	-	118 (1.1)	1 (<0.1)	0	0	122
A (Highest tide)	12.5-25.5	33-35.2	-	-	-	-	57 (0.8)	14 (0.5)	17 (1.3)	-	226 (4.7)	-	-	-	364 (8.0)	16 (7.3)	206 (7.3)	-	179
A (Lowest tide)	7.3-26.2	31.2-33.7	-	-	-	-	1 (<0.1)	167 (4.6)	3 (<0.1)	-	12 (1.4)	-	-	-	0 (0.3)	40 (0.3)	18 (0.3)	-	378
			10	-	61	50	225	1555	75	-	983	-	480	364	1076	1099	447	-	6425

^a Catch rate was not calculated because of failure to measure filtering volume.

bicoloratus と 99% 以上の相同性を示した卵 (42 個) のうち 1 個がカレイ科の *Psettichthys melanostictus* の配列と、コノシロと 99% 以上の相同性を示した卵 (50 個) のうち 1 個がコダラ *Melanogrammus aeglefinus* の配列と、それぞれ 99% 以上の相同性を示したが、これら 5 種も日本近海に分布しない種であったため、結果からは除外した。

同定された 26 種の卵のうち、12 種の卵 (セスジボラ *Chelon affinis*, カタクチイワシ, ムシガレイ *Eopsetta grigorjewi*, クロサギ *Gerres equulus*, メジナ *Girella punctata*, ササウシノシタ *Heteromycteris japonica*, イシガレイ, スズキ *Lateolabrax japonica*, ダイナンウミヘビ *Ophisurus macrorhynchus*, アラメガレイ *Tarphops oligolepis*, クロウシノシタ *Paraplagusia japonica*, ギマ *Triacanthus biaculeatus*) は DNA によるクラスタと形態によるタイプが一致した (Table 4-4-1)。これらの卵は、それぞれのタイプとして分けられた卵すべてを同定された種として扱った。残りの 14 種は、DNA によって 14 クラスタに分かれた 8 タイプの卵から検出された。例えば、ID-01 タイプとしていた卵にはコノシロ, サツパ, マイワシが含まれていた。同様に、IC-04 とした卵にはクロダイ *Acanthopagrus schlegelii* とキチヌ *A. latus* が、IC-05 とした卵にはアカササノハベラ *Pseudolabrus eoethinus* とホシササノハベラ *P. sieboldi* が、IIA-02 とした卵にはネズミゴチ *Repomucenus curvicornis* とハタタテヌメリ *R. valenciennei* が含まれていた。これらの卵では、形態のみでは近縁分類群間の識別ができていなかった。IC-04 と IC-05 については、以降のアンカーネットの解析ではそれぞれマダイ属 *Acanthopagrus* spp., ササノハベラ属 *Pseudolabrus* spp. として扱った。その他、IC-10 とした卵にはヒイラギ *Leiognathus nuchalis* とシロギス *Sillago japonica* が含まれるなど、同一の形態タイプの中に離れた分類群間の卵が混在する場合があった。

第5節 魚卵の分布

第1項 採集密度

卵は、1 曳網あたりの採集数は大きく変動したものの (0-553 個, 平均 ± 標準偏差: 58 ± 105 個), 周年出現した (Fig. 4-5-1, 2)。採集数は 2004 年 12 月に最も多く 1,374 個で、以下 2005 年 8 月の 1,020 個, 9 月の 875 個, 4 月の 745 個となり、この 4 ヶ月で全体の採集数の 76% を占めた。湖内で採集された 5,284 個のうち、3,703 個 (70%) は湖心部 (St. 3-6) で、750 個 (14%) が湖口部 (St. 1, 2), 831 個 (16%) が湖奥部 (St. 7, 8) で採集された (Table 4-3-1)。湖内各部での採集密度は、湖口部が $4.1 \times 10^{-1} \pm 0.35$ 個 / m^3 , 湖心部が $9.3 \times 10^{-1} \pm 1.04$ 個 / m^3 , 湖奥部が $4.3 \times 10^{-1} \pm 0.77$ 個 / m^3 となり、湖心部で湖奥部よりも採集密度が高かった (Kruskal-wallis 検定, $p < 0.05$)。

Table 4-4-1 Summary of the results of DNA species identification for eggs collected in the Lake Hamana

Order	Family	Species	Assigned type	Number of eggs		
				St.1-8	St.A	
Anguilliformes	Ophichthidae	<i>Ophisurus macrorhynchus</i>	IIID-02	1		
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Konosirus punctatus</i>	ID-01	50		
		<i>Sardinella zunasi</i>	ID-01	5		
		<i>Sardinops melanostictus</i>	ID-01	5	9	
	Engraulidae	<i>Engraulis japonicus</i>	IIB-01	55		
Aulopiformes	Synodontidae	<i>Saurida wanieso</i>	IIC-01	1		
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Chelon affinis</i>	IC-09	1		
Scorpaeniformes	Triglidae	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	IC-07	9	3	
	Platycephalidae	<i>Platycephalus</i> sp.	IC-01	7		
Perciformes	Moronidae	<i>Lateolabrax japonicus</i>	IC-06	5		
	Leiognathidae	<i>Leiognathus nuchalis</i>	IC-10	12		
	Gerreidae	<i>Gerres equulus</i>	IC-11	3		
	Sparidae		<i>Acanthopagrus latus</i>	IC-04	5	
			<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	IC-04	2	
	Sillaginidae	<i>Sillago japonica</i>	IC-10	1		
	Girellidae	<i>Girella punctata</i>	IC-12	2		
	Labridae		<i>Pseudolabrus eoethinus</i>	IC-05	3	
			<i>Pseudolabrus sieboldii</i>	IC-05	16	
			<i>Repomucenus curvicornis</i>	IIA-02	3	
		Callionymidae	<i>Repomucenus valenciennesi</i>	IIA-02	4	
	Pleuronectiformes	Paralichthyidae	<i>Tarphops oligolepis</i>	IC-03	34	
		Pleuronectidae	<i>Eopsetta grigorjewi</i>	II-hatched1	1	
<i>Kareius bicoloratus</i>			IIC-03	42		
Soleidae		<i>Heteromycteris japonica</i>	IIIB-01	17		
Cynoglossidae		<i>Paraplagusia japonica</i>	IIIC-01	1		
Tetraodontiformes	Triacanthidae	<i>Triacanthus biaculeatus</i>	IIC-05	2		
Unidentified				41		
				328	12	

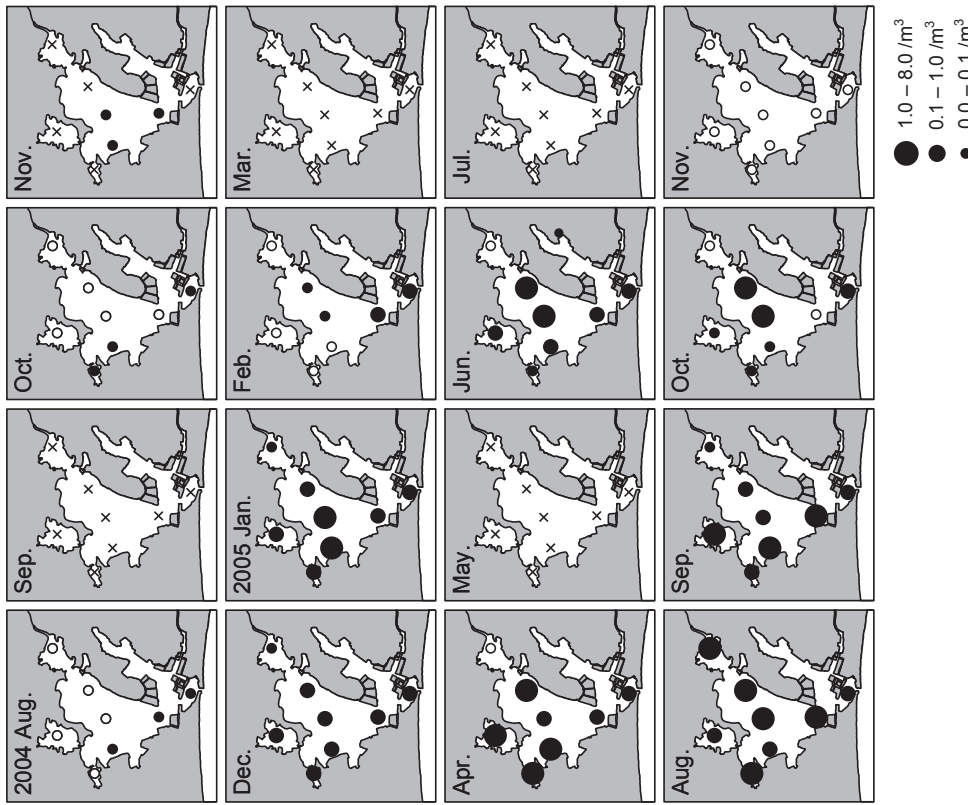


Fig. 4-5-2 Catch rate (number of egg collected/m³) of pelagic eggs in the Lake Hamana during the sampling period (from August 2004 to November 2005). White circles indicate stations where eggs present or absent, respectively. Crosses indicate stations where not investigated



Fig. 4-5-1 Number of pelagic eggs collected in the Lake Hamana during the sampling period (from August 2004 to November 2005). Black and white circles indicate stations where eggs present or absent, respectively. Crosses indicate stations where not investigated. Numerals indicate the number of eggs collected

第2項 種が判明した卵の分布

形態によるタイプ分けとDNAのクラスタが一致し、かつ種が同定できた12種の卵の分布を比較した。このうち、最も多く採集されたのはイシガレイ卵であり、計1,305個が採集された。イシガレイ卵の出現は明瞭な季節性を示し、その採集の99.9% (1,304個) が1月に採集された (Fig. 4-5-3)。同様に、スズキ (n=57)、クロサギ (n=29)、ササウシノシタ (n=55)、ギマ (n=89) の卵も出現に季節性が認められ、それぞれ12-2月、6-9月、8-9月、6-8月に出現が限られていた (Figs 4-5-4-7)。対して、カタクチイワシ卵 (n=1,282) とアラメガレイ卵 (n=119) はほぼ周年にわたって出現し、明瞭な季節性は認められなかった。その他5種の卵は採集数が少なく (1-6個)、季節性は明らかではないものの、ダイナンウミヘビが9月、セスジボラとメジナが4月、ムシガレイが2月、クロウシノシタが8-9月に出現した。

これらの卵の出現場所を比較したところ、イシガレイ卵は湖心に集中し、カタクチイワシ卵も湖心部と湖奥部に多く出現していたが、この2種は湖口部にはほとんど出現しなかった (Figs. 4-5-4, 9) (χ^2 検定, $p < 0.001$)。同様に、ギマ卵も湖内で採集された計89個のうち少数 (6個, 7%) しか湖口部で採集されなかった。一方、スズキ、ササウシノシタ、アラメガレイの卵は湖口部で96-100%が採集された (Figs. 4-5-5, 7, 10)。クロサギ卵は、6月に例外的に湖心部で採集されているものの、主な出現は湖口部だった (Fig. 4-5-6)。以上のことから、浜名湖内に出現する魚卵は、時間的空間的な分布パターンが種によって異なっていることが示された。

形態のタイプとクラスタが一致しなかったが、BLASTサンプルが種に同定された卵の出現を比較した (Figs. 4-5-16-18)。マダイ属2種の卵はどちらも湖口部に出現したものの、クロダイ卵が4月、キチヌ卵が9-10月と出現時期が異なっていた (Fig. 4-5-16)。同様に、ネズツポ属2種の卵も出現場所は湖口部から湖心部で重複するが、ネズミゴチ卵が12月、ハタタテヌメリ卵が4月に出現した (Fig. 4-5-17)。一方で、ササノハベラ属2種の卵は、アカササノハベラ卵もホシササノハベラ卵も11-12月の湖口部で出現し、場所も時期も重複していた (Figs. 4-5-16, 18)。また、湖心部から湖奥部には、コノシロ卵が長期にわたり、サッパ卵が6月と9月に、ヒイラギ卵が7-8月に、それぞれ出現していた (Figs. 4-5-16, 18)。その他の種では、ワニエソ *Saurida wanieso* とシロギスの卵が湖口部でのみ出現し、ホウボウ *Chelidonichthys spinosus*、マゴチ *Platycephalus* sp., マイワシの卵は湖口部から湖心部にかけて出現した。

第3項 不明卵の分布

DNA解析をおこなったものの、BLASTにより種が不明だった卵の分布を、クラスタごとに整理して示した。種が不明だったがクラスタによってグルーピングが支持されたタイプは9タイプあり、これらはすべて湖口部から採集された (Figs. 4-5-19)。DNAによるクラスタと一致しなかったタイプは10クラスタに整理され、やはりいずれも湖口部から採集された。 (Fig. 4-5-

	2004				2005												
	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.		Nov.
<i>Heteromycteris japonica</i>	1		0	0	0	0	0		0		0		3	51	0	0	55
<i>Engraulis japonicus</i>	0		43	21	41	0	7		9		0		8	720	433	0	1282
<i>Tarphops oligolepis</i>	0		6	12	22	9	16		33		0		0	10	11	0	119
<i>Lateolabrax japonicus</i>	0		0	0	4	51	2		0		0		0	0	0	0	57
<i>Kareius bicoloratus</i>	0		0	0	0	1304	1		0		0		0	0	0	0	1305
<i>Chelon affinis</i>	0		0	0	0	0	0		4		0		0	0	0	0	4
<i>Girella punctata</i>	0		0	0	0	0	0		2		0		0	0	0	0	2
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	0		0	0	0	0	0		0		85		4	0	0	0	89
<i>Gerres equulus</i>	0		0	0	0	0	0		0		22		2	5	0	0	29
<i>Paraplagusia japonica</i>	0		0	0	0	0	0		0		0		1	3	0	0	4
<i>Ophisurus macrorhynchus</i>	0		0	0	0	0	0		0		0		0	2	0	0	2
<i>Eopsetta grigorjewi</i>	0		0	0	0	0	0		0		0		0	0	1	0	1

Fig. 4-5-3 Seasonal presences of eggs of twelve fish species in the Lake Hamana, inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected



Fig. 4-5-4 Seasonal distribution of *Kareius bicoloratus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

Fig. 4-5-5 Seasonal distribution of *Lateolabrax japonicus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

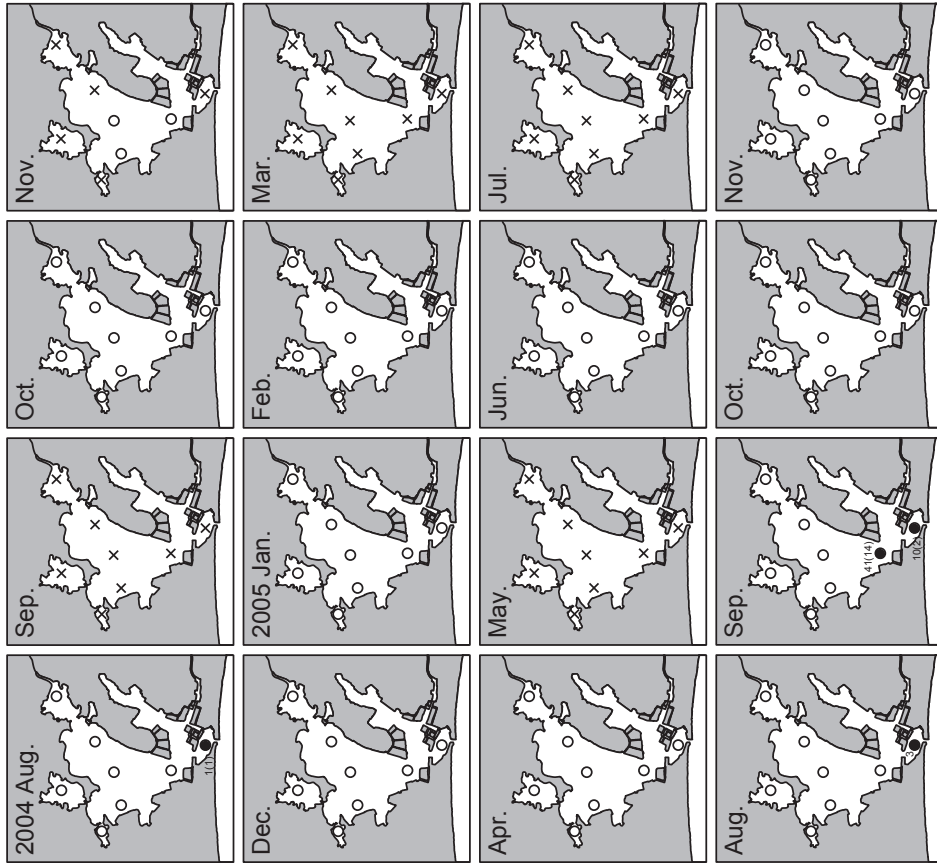


Fig. 4-5-7 Seasonal distribution of *Heteromycteris japonica* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

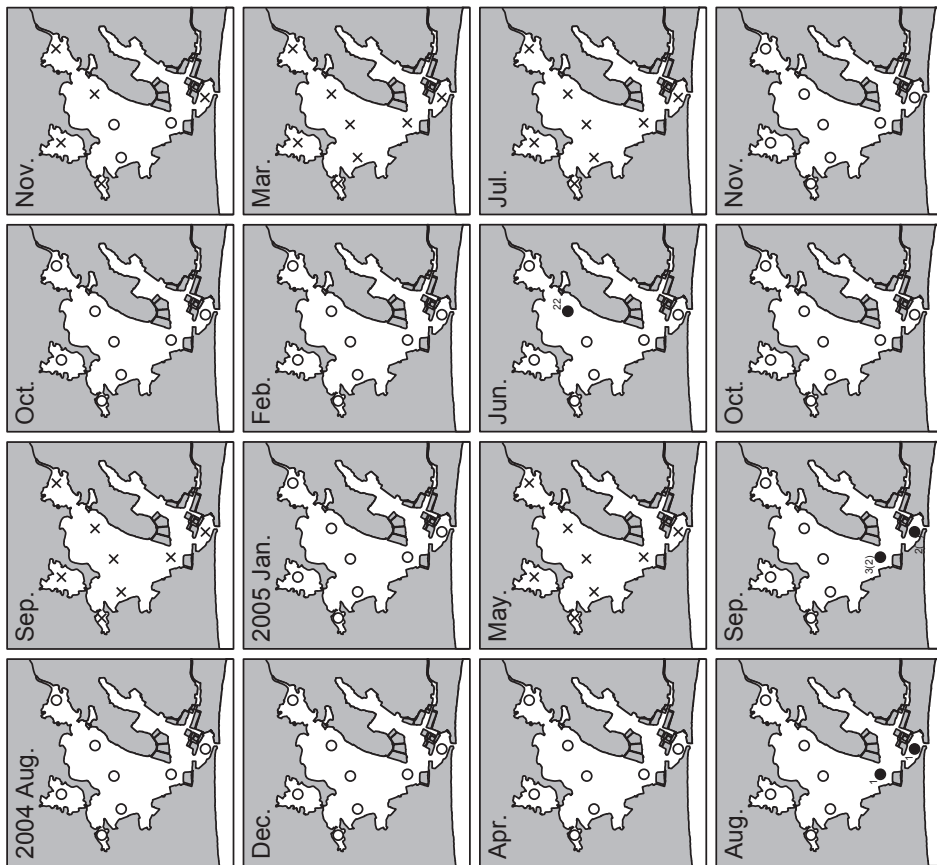


Fig. 4-5-6 Seasonal distribution of *Gerres equulus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

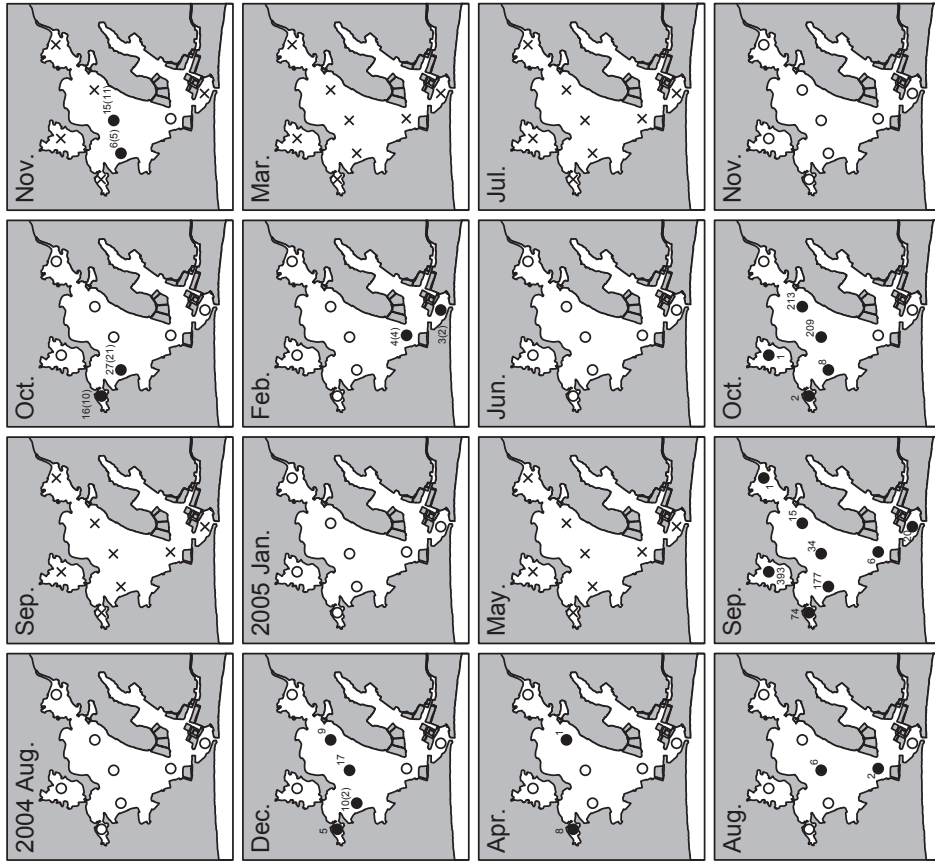


Fig. 4-5-9 Seasonal distribution of *Engraulis japonicus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated



Fig. 4-5-8 Seasonal distribution of *Triacanthus biaculeatus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

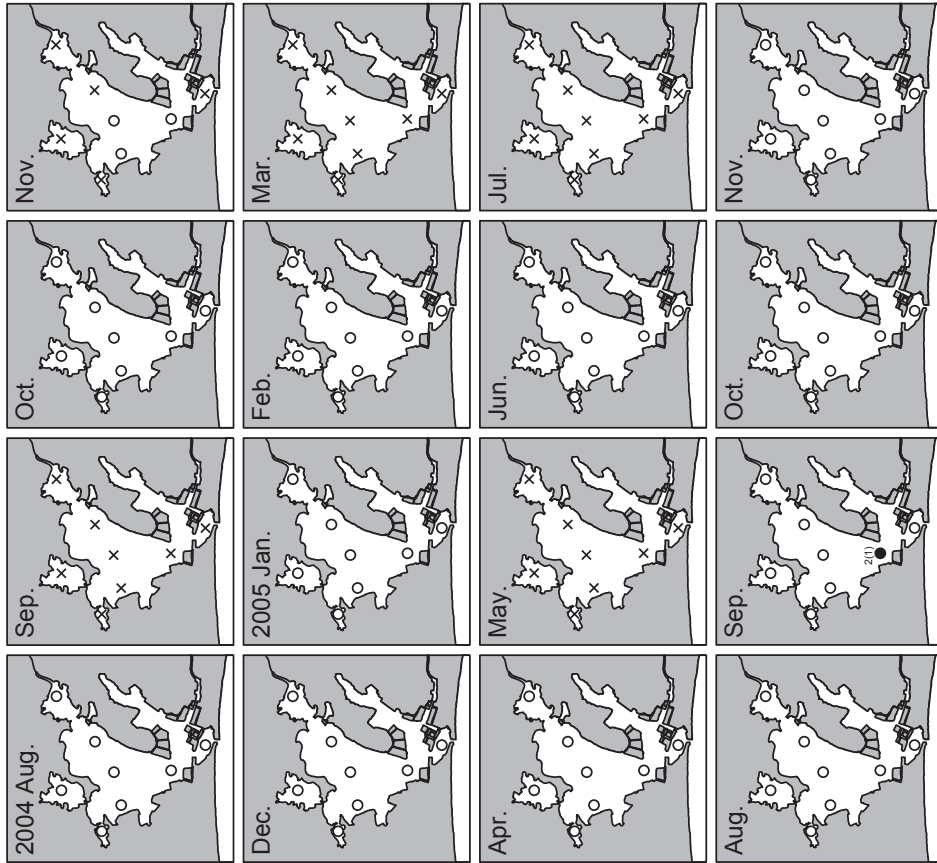


Fig. 4-5-11 Seasonal distribution of *Ophichthys macrorhynchus* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated



Fig. 4-5-10 Seasonal distribution of *Taphops oligolepis* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

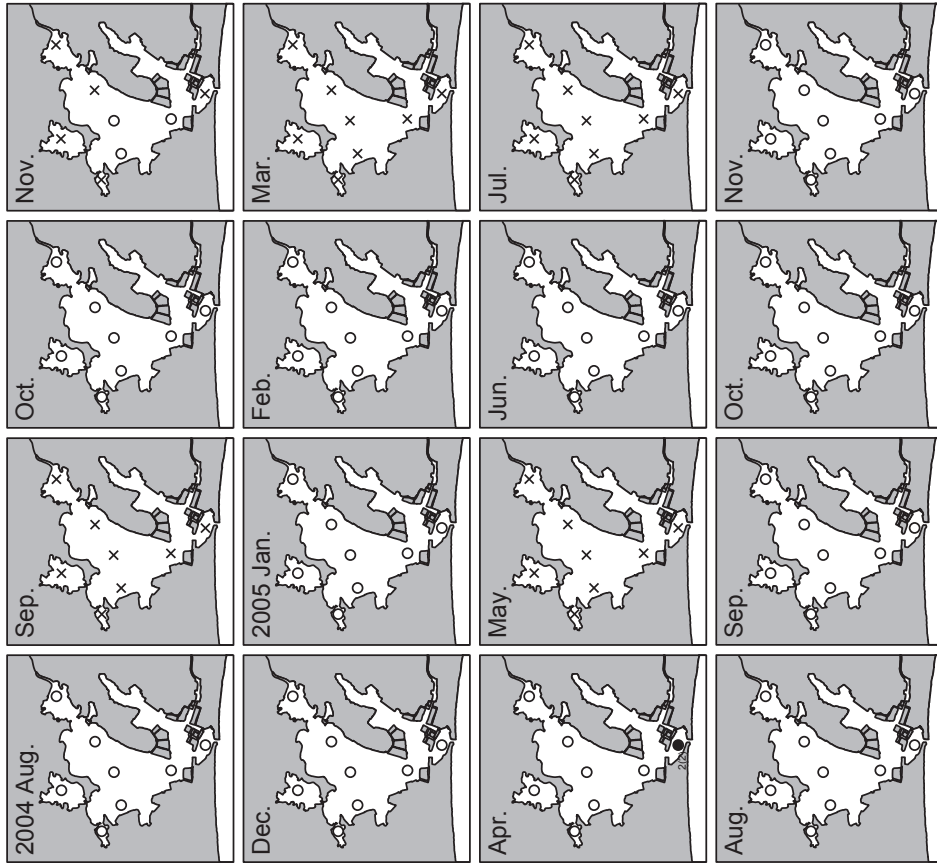


Fig. 4-5-13 Seasonal distribution of *Girella punctata* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

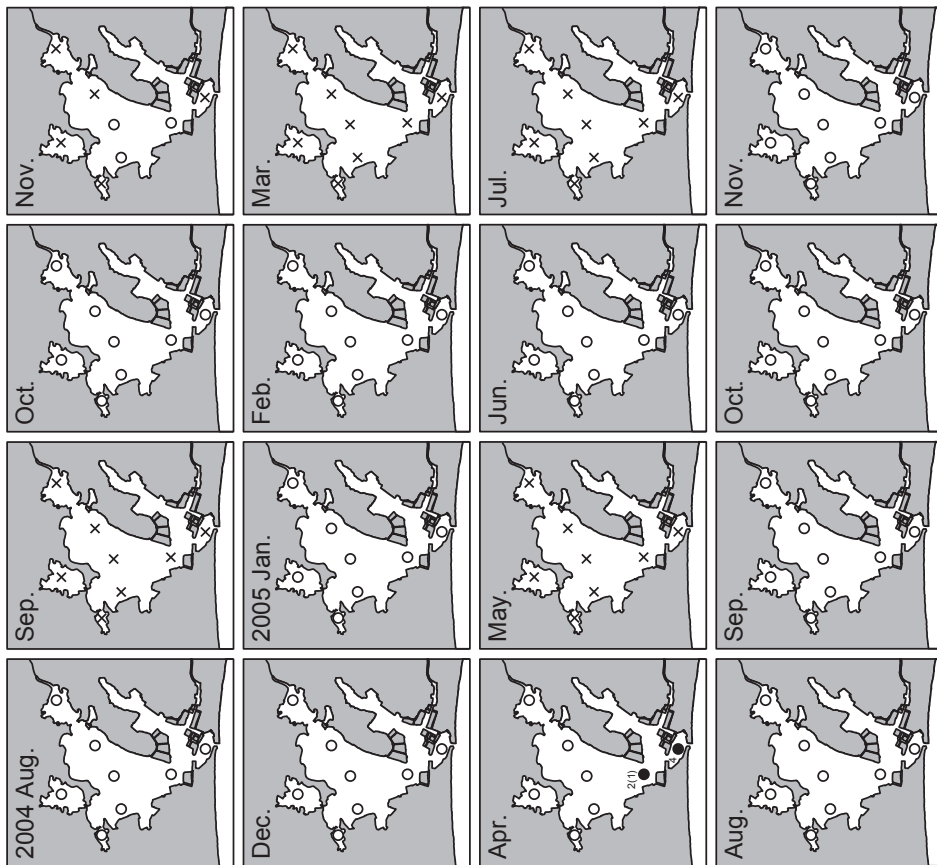


Fig. 4-5-12 Seasonal distribution of *Chelon affinis* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

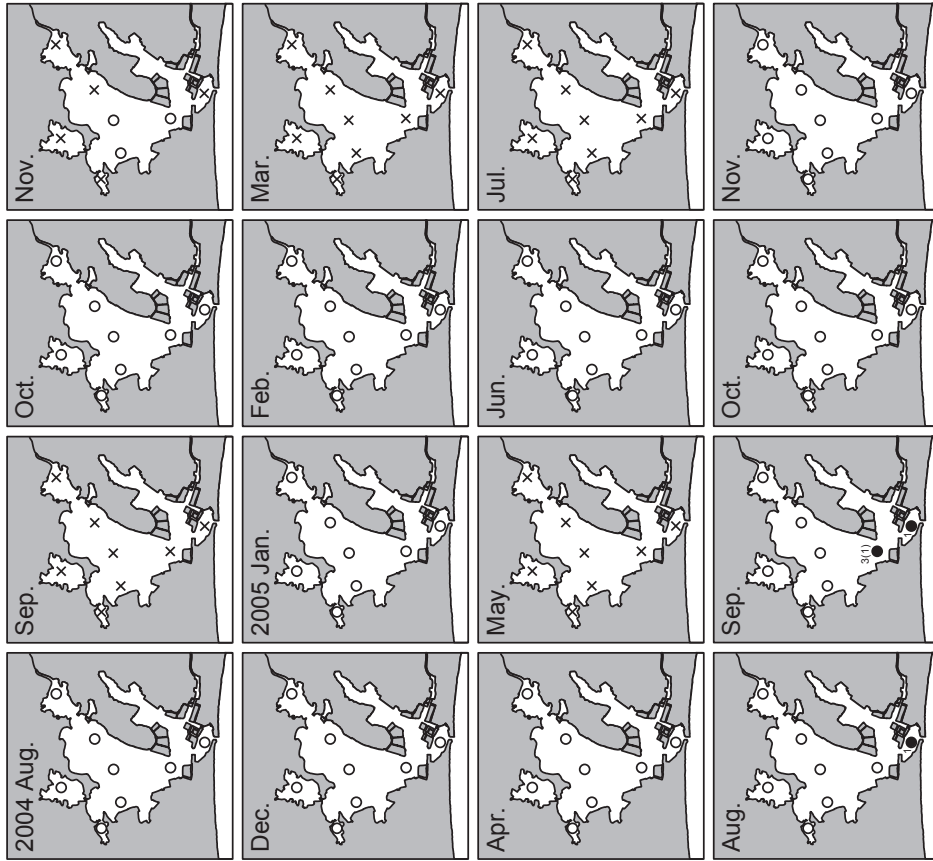


Fig. 4-5-15 Seasonal distribution of *Paraplagusia japonica* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated



Fig. 4-5-14 Seasonal distribution of *Eopsetta grigorjewi* eggs inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

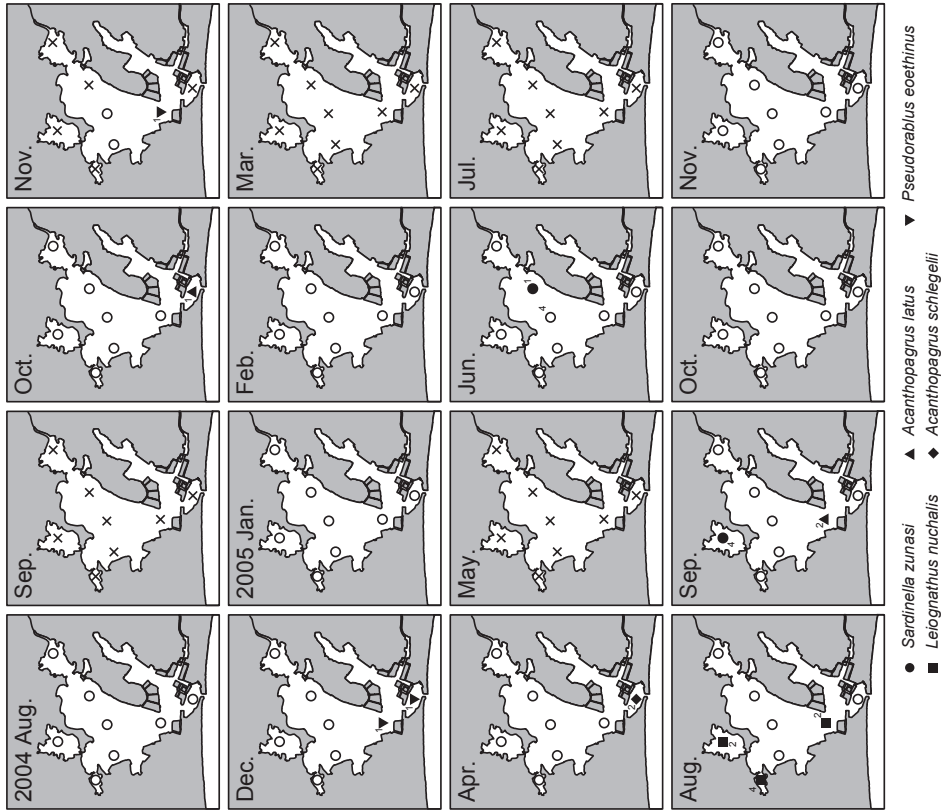


Fig. 4-5-17 Occurrence of eggs from five species, *Sardinella zunasi*, *Leiognathus nuchalis*, *Acanthopagrus latus*, *A. schlegelii* and *Pseudolabrus eoethinus*, inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Crosses indicate stations where not investigated

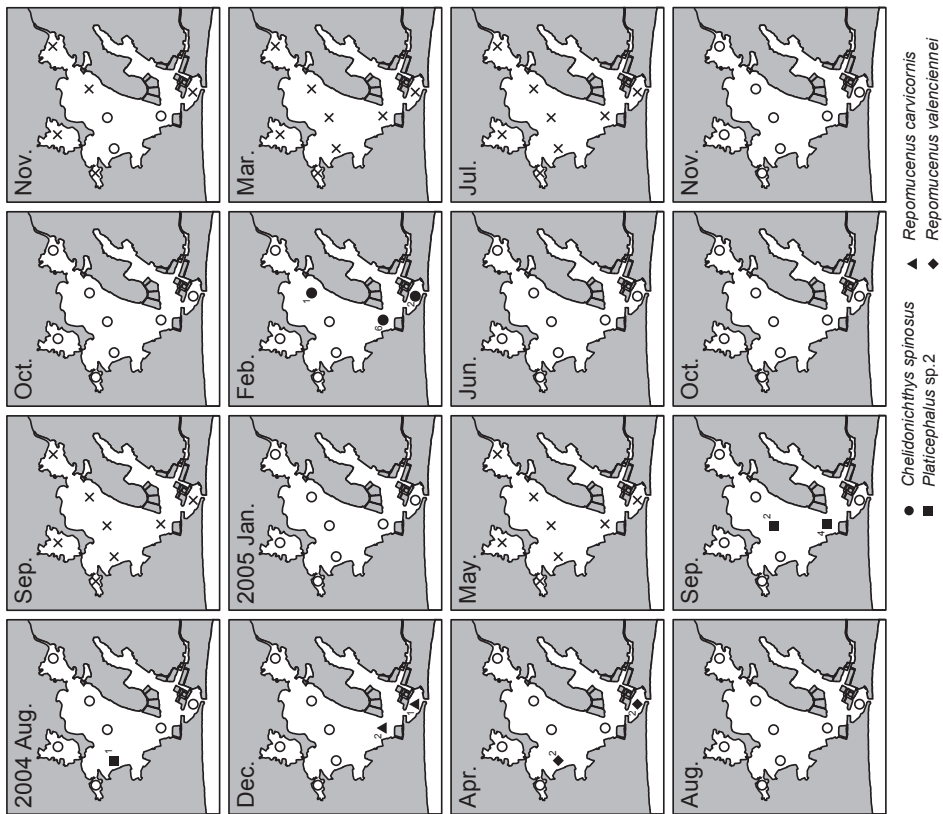


Fig. 4-5-16 Occurrence of eggs from four species, *Chelidionichthys spinosus*, *Platicephalus sp.2*, *Repomucenus carvicornis* and *R. valenciennei* inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Numerals are number of eggs collected. Crosses indicate stations where not investigated

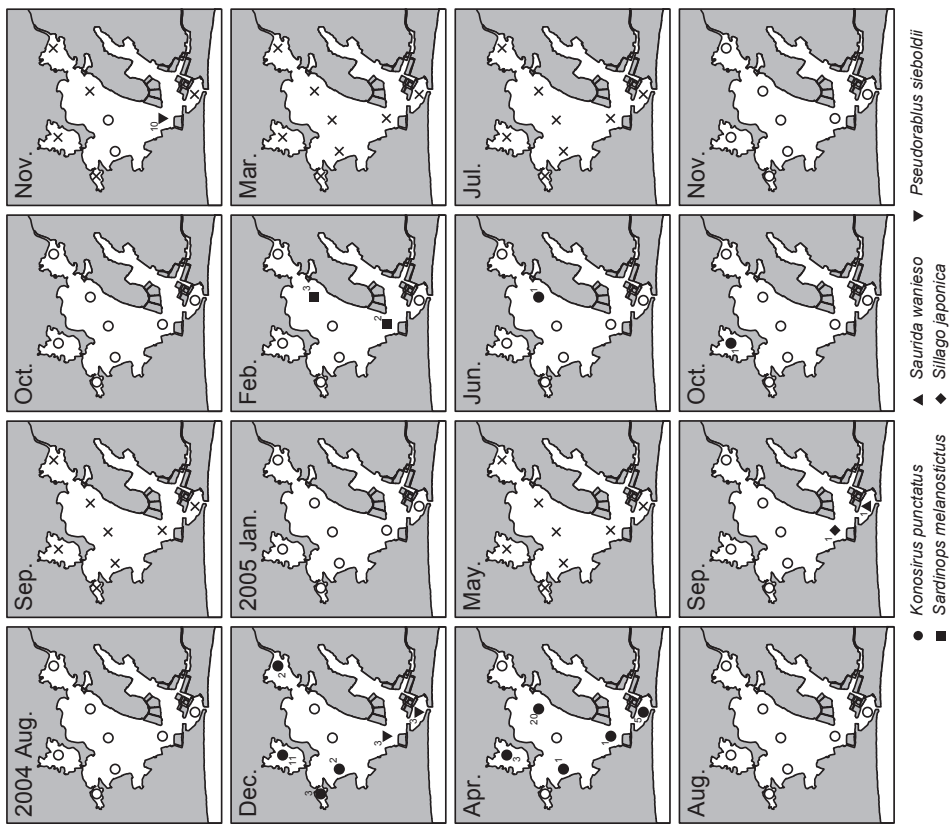


Fig. 4-5-18 Occurrence of eggs from five species, *Konosirus punctatus*, *Sardinops melanostictus*, *Saurida wanieso*, *Sillago japonica* and *Pseudolabrus sieboldii* inferred from DNA species identification using 16S ribosomal RNA gene. Crosses indicate stations where not investigated

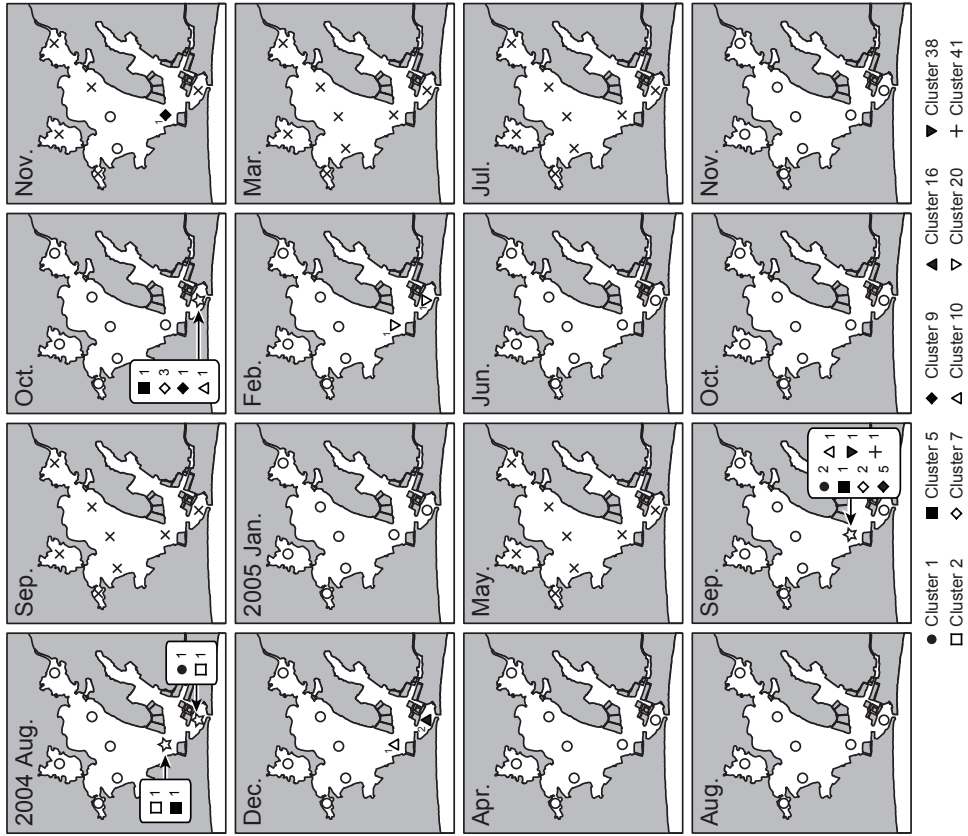


Fig. 4-5-20 Occurrence of eggs grouped into ten different clusters based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Those eggs were not identified by DNA species identification and morphological types did not recover. Numerals are number of eggs collected. Crosses indicate stations where not investigated

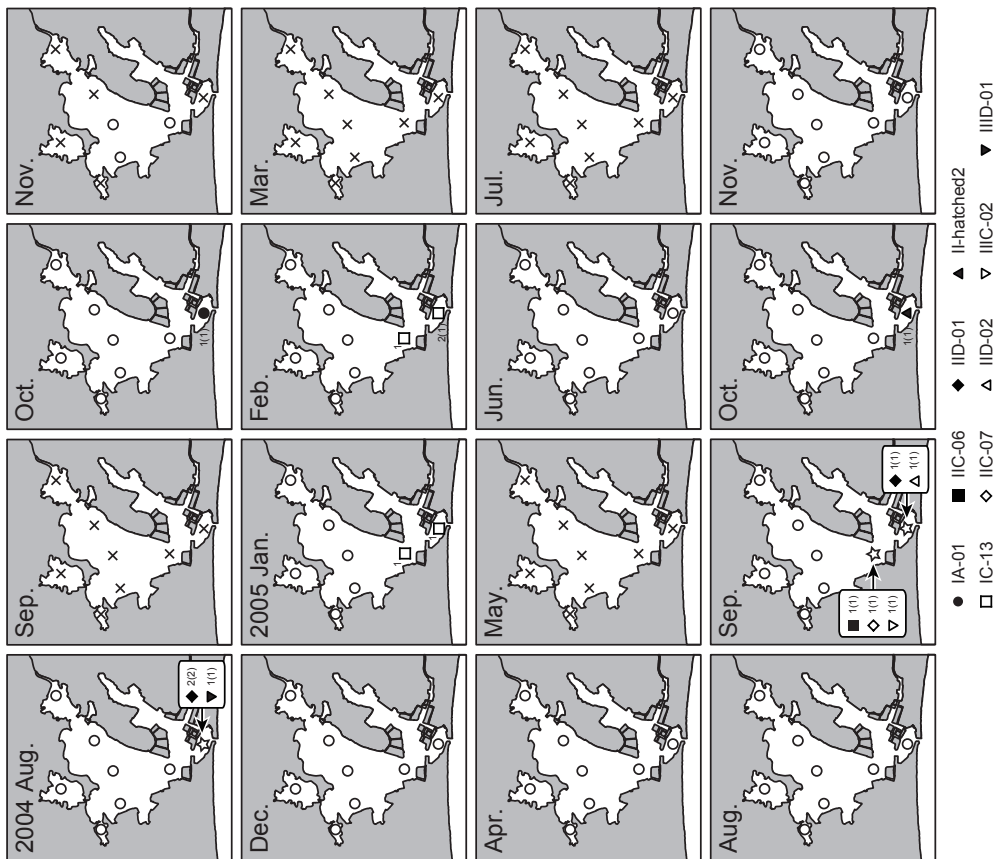


Fig. 4-5-19 Occurrence of nine morphological type eggs. Those morphological types were each corresponds to DNA clusters. Numerals are number of eggs collected. Numbers of BLASTed eggs are shown in the parenthesis. Crosses indicate stations where not investigated

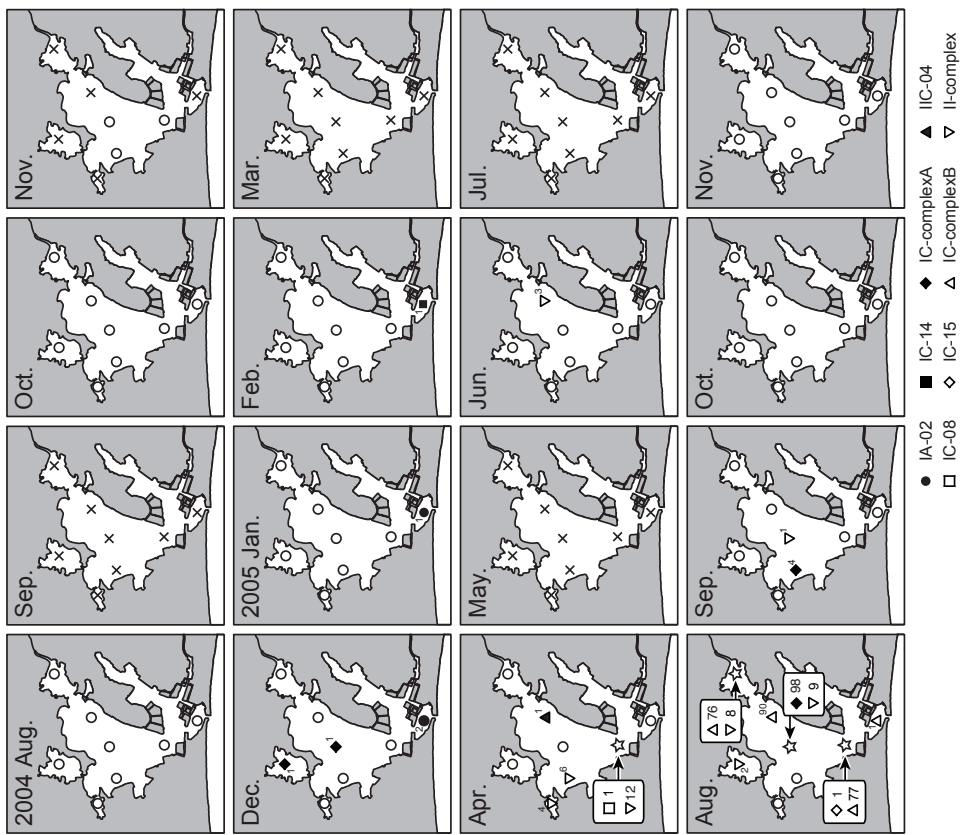


Fig. 4-5-21 Occurrence of eggs grouped into eight morphological types. Those eggs were not subjected for DNA sequencing. Numerals are number of eggs collected. Crosses indicate stations where not investigated

20). その他DNA解析をおこなわなかった8タイプは、主に complex としてわけたタイプから成り、湖口部から湖奥部にかけて出現していた (Fig. 4-5-21). このように、湖口部にのみ出現した卵には多くの種類が含まれたが、その多くがDNA解析をおこなっても種に帰属させることができなかった。

第6節 アンカーネットで採集された魚卵

アンカーネットでは、最干潮時に241個、最満潮時に900個が採集され、採集密度も2005年1月を除いて最満潮時のほうが高く、湖内からの流出水よりも外海からの流入水に魚卵が多く含まれていることを示していた。(Table 4-3-1, Fig. 4-6-1). 分類群が明らかとなった卵の採集結果を比較したところ、採集数の多かったマダイ属卵 ($n = 179$) は4月の最満潮前後に、クロサギ卵 ($n = 172$) は7月の満潮時に採集が集中していた (Table 4-6-1). アラメガレイ卵も主に満潮時に採集されたが、その出現は湖内と同じく12月-9月とほぼ周年にわたった。一方、イシガレイ卵 ($n = 168$) は1月の最干潮前後のネットに集中した。種によって卵の流入のパターンが異なっていた。その他の種の採集数は2-9個と少なく、湖内において採集数が多く、湖心部から湖奥部に主に出現したカタクチイワシとギマの卵も、湖口のアンカーネットではわずかしら採集されていなかった。

第7節 出現環境

本章で採集をおこなった定点すべての結果をまとめ、採集数の多かったイシガレイ、ササウシノシタ、クロサギ、ギマ、カタクチイワシ、アラメガレイ、スズキの7種の卵の出現と水温・塩分との関係を比較した (Fig. 4-7-1, 2, Table 4-7-1). その結果、明瞭な季節性をもって出現したイシガレイ、ササウシノシタ、クロサギ、ギマの卵は出現定点の水温範囲が比較的狭く、最低水温と最高水温の差は6.4-7.7°Cだった (Fig. 4-7-1, Table 4-7-1). 一方、卵がほぼ周年出現したカタクチイワシとアラメガレイの卵では出現する水温範囲が広く、およそ15°Cの差があった (Fig. 4-7-2). スズキ卵が出現する水温範囲は11.1°Cと両者の中間にあった (Fig. 4-7-2). 出現環境の塩分範囲は、湖内の広範囲に出現したカタクチイワシ卵でその幅は19であったが、他の種では比較的狭く、イシガレイが8とやや広かったものの、他5種では4-5.4の範囲におさまった (Table 4-7-1).

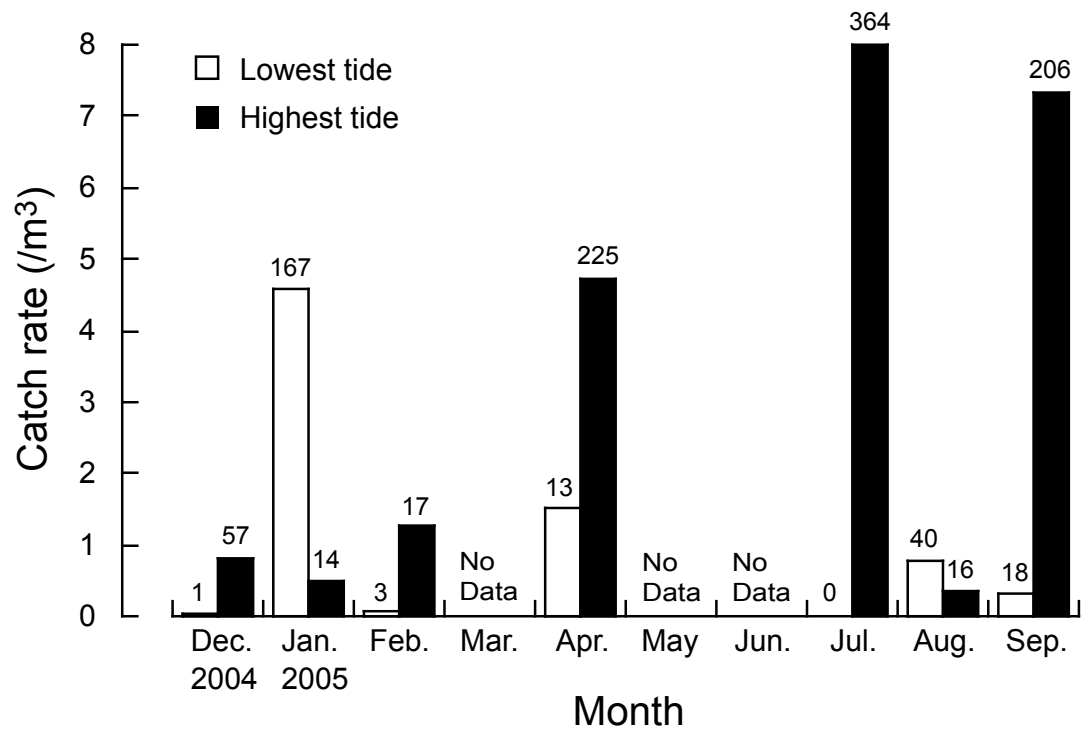


Fig. 4-6-1 Catch rate (number of eggs/m³) of eggs collected by anchor-net at St. A. Numerals indicate the number of eggs collected

Table 4-6-1 Results of anchor-net sampling at St. A. Only the results of identified clusters are shown

Inferred species	Tide	Month										Total
		2004		2005								
		Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	
<i>Sardinops melanostictus</i>	Highest	0	0	8	-	0	-	-	0	0	0	8
	Lowest	0	0	1	-	0	-	-	0	0	0	1
<i>Engraulis japonicus</i>	Highest	0	0	0	-	5	-	-	1	0	0	6
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	4	5	9
<i>Chelidonichthys spinosus</i>	Highest	0	0	3	-	0	-	-	0	0	0	3
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Highest	4	2	0	-	0	-	-	0	0	0	6
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
<i>Gerres equulus</i>	Highest	0	0	0	-	0	-	-	162	6	4	172
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
<i>Acanthopagrus</i> spp.	Highest	0	0	0	-	174	-	-	0	0	5	179
	Lowest	0	0	0	-	10	-	-	0	0	0	10
<i>Pseudolabrus</i> spp.	Highest	2	0	0	-	0	-	-	0	0	0	2
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
<i>Tarphos oligolepis</i>	Highest	30	9	4	-	22	-	-	3	0	16	84
	Lowest	0	0	2	-	0	-	-	0	0	0	2
<i>Kareius bicoloratus</i>	Highest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0
	Lowest	1	167	0	-	0	-	-	0	0	0	168
<i>Heteromycteris japonica</i>	Highest	0	0	0	-	0	-	-	1	2	3	6
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	1	1	2
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	Highest	0	0	0	-	0	-	-	1	0	3	4
	Lowest	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0

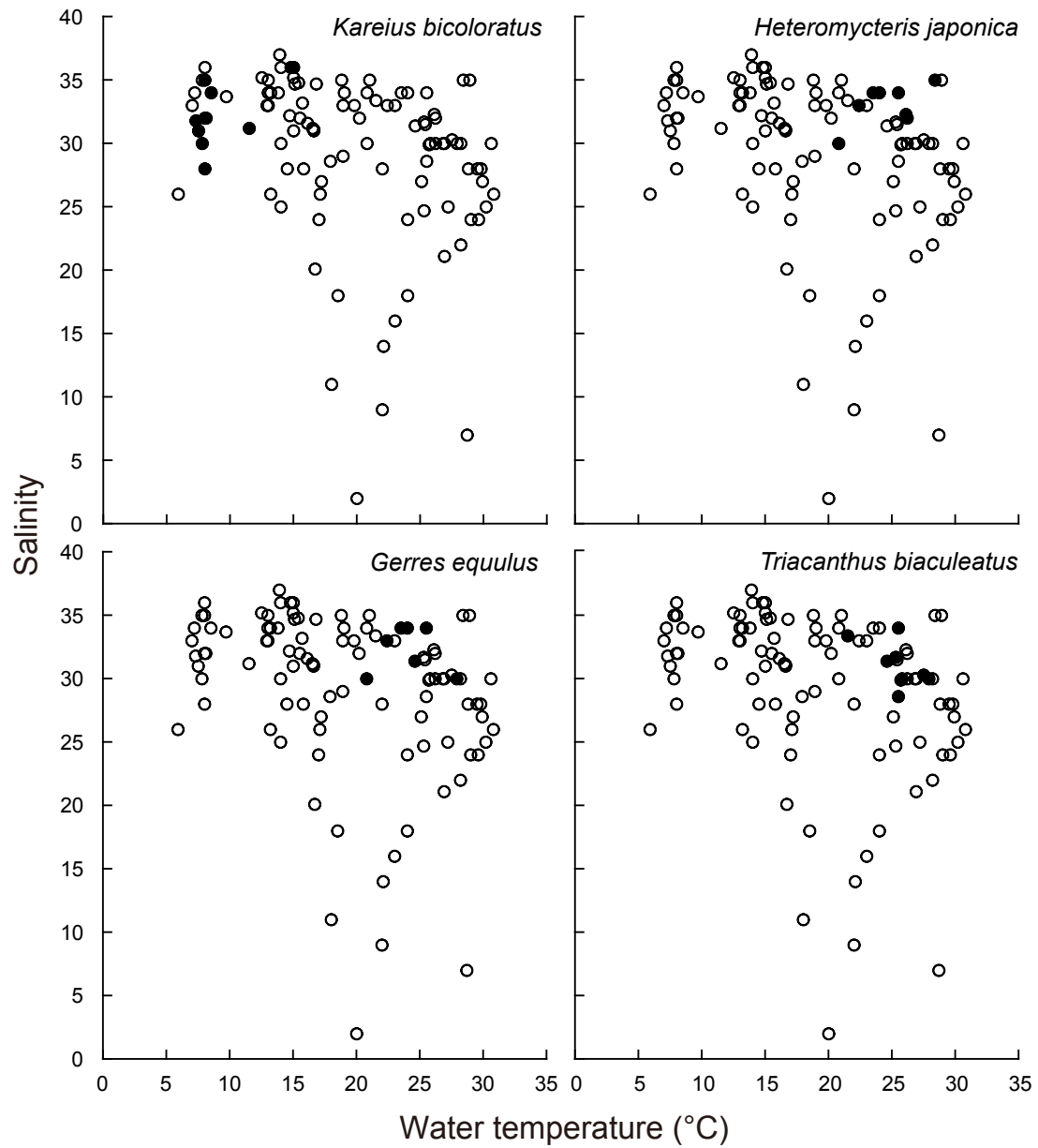


Fig. 4-7-1 Relationship among occurrence of *Kareius bicoloratus*, *Heteromycteris japonica*, *Gerres equulus* and *Triacanthus biaculeatus* eggs, water temperature and salinity in the Lake Hamana during the sampling period (from August 2004 to November 2005) Black and white circles indicate the stations where eggs are present and absent, respectively

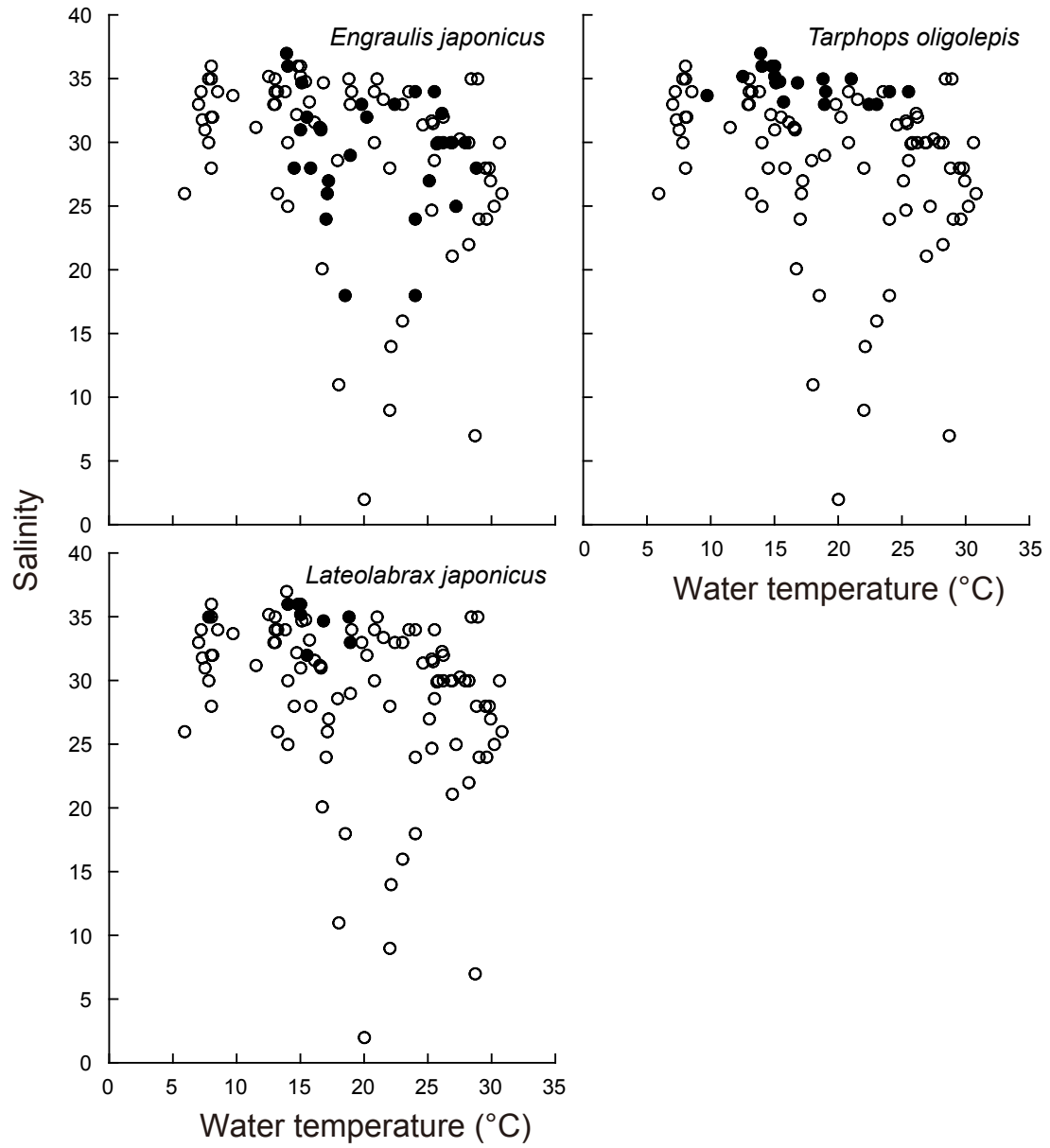


Fig. 4-7-2 Relationship among occurrence of *Engraulis japonicus*, *Tarphops oligolepis* and *Lateolabrax japonicus* eggs, water temperature and salinity in the Lake Hamana during the sampling period (from August 2004 to November 2005) Black and white circles indicate the stations where eggs are present and absent, respectively

Table 4-7-1 Water temperature (W.T.) and salinity and its range among the stations where eggs of seven fish species collected. Mean values are indicated in parenthesis

Species	W.T. (°C)		Salinity	
<i>Kareius bicoloratus</i>	7.3–15	(7.7)	28–36	(8)
<i>Heteromycteris japonica</i>	20.8–28.4	(7.6)	30–35	(5)
<i>Gerres equurus</i>	20.8–27.9	(7.1)	30–34	(4)
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	21.5–27.9	(6.4)	28.6–34	(5.4)
<i>Engraulis japonicus</i>	13.9–28.8	(14.9)	18–37	(19)
<i>Tarphops oligolepis</i>	9.7–25.5	(15.8)	33–37	(4)
<i>Lateolabrax japonicus</i>	7.8–18.9	(11.1)	32–36	(4)

第8節 考察

第1項 浜名湖における DNA 種査定の有効性と問題点

16S rRNA を解析した結果、配列によって分けられた 45 クラスタのうち、58% のクラスタが 26 種に同定された。解析した卵の個数で見れば 88% もの卵で種が同定でき、非常に高い成功率を示した。過去に浜名湖で魚卵の出現を調査した片倉・二宮（片倉・二宮, 1988）は、形態分類に基づき、種まで同定できた 13 種と、不明卵を含む 24 種類の卵の出現を報告した。本研究では 16S rRNA を用いることで、実に 2 倍以上の種の卵が湖内に出現することを明らかにした。この結果は、浜名湖のような、半閉鎖水域であるがゆえに外海との生物の行き来が限られ、出現する可能性のある種がよく推定できる水域において、DNA による種査定法の有効性が高いことを示している。同定された種のうちホウボウ、クロダイ、ネズミゴチ、ハタタテヌメリ、マゴチの 5 種は、第 3 章で追加した浜名湖成魚の DNA ライブラリを参照することにより、新たに同定された。一方で、今回得られた 45 クラスタのうち 19 クラスタでは高い相同性を示す種が見つからなかった。今後、参照可能な DNA データが増えればさらに同定できる種が増すと考えられる。

BLAST による相同性検索の結果、卵から得られた DNA の配列が複数種と 99% 以上の相同性を示す場合があった。カタクチイワシと 99% 以上の相同性を示した配列はカタクチイワシ属の別種と、また、マイワシと 99% 以上の相同性を示した配列はマイワシ属の別種と、それぞれ高い相同性を示した。本研究では、これらを分布域によって出現する可能性のない種を除外することで 1 種に帰属させた。ニシン科においては、属レベルであればミトコンドリア DNA の Cyt *b* 領域を用いて識別が可能であると報告されている（Jerome et al., 2003）。今回の BLAST の結果でも、別属の種と混同する危険性はみられず、16S rRNA を用いてもニシン科で属レベルは間違いなく識別できるだろう。しかしながら、16S rRNA の変異だけではカタクチイワシ属とマイワシ属を種レベルで識別することはできず、これらに属する種を識別するにはより変異の大きい配列を適用する必要があると考えられた。一方で、イシガレイと高い相同性を示した配列は同じカレイ科で別属の *Psettichthys melanostictus* と高い相同性を示し、別属の種間であっても 16S rRNA の配列が類似していた。このように、DNA を種査定に用いる場合は、近縁種間で変異量が少ないことや、遠縁でも変異量が飽和してしまうことにより見かけ上相同性の高い配列を持つてしまう可能性が十分にある。この問題を解決するためには、DNA データの蓄積により種のグループに含まれるハプロタイプの量や変異量の幅を正確に推定し、種を識別するより適切な基準を検討する必要がある。

配列がコノシロの配列と高い相同性を示した卵のうち 1 個は、分類群がまったく異なるタラ目のコダラの配列とも 99% 以上の相同性を示した。しかしコダラは、北大西洋の沿岸域にしか

分布せず、日本近海には分布しない (Froese and Pauly, 2011). このコダラの配列 (GU581265) と、GenBank に登録されている他のコダラ (6 個), また、コノシロ (4 個) の 16S rRNA 配列を BLAST で比較したところ、他のコダラの配列との相同性は 77-78% と非常に低かった (アラインメント長 = 474-1313bp). 一方でこの配列は、コノシロの配列と 99% 以上の相同性を示した (アラインメント長 = 507-1268bp). このことから、コダラの配列として登録されている GU581265 は、実際にはコダラから由来した配列ではないと考えられる. このようにデータベースの登録に間違いがあることは、タイセイヨウサバ *Scomber scombrus* の配列でも報告されている (Kawakami et al. 2010). データベース上の間違いは誤同定の原因となるため、DNA による種査定法を実施する際には、DNA の相同性のみでなく、分布と形態を考慮して種を判断することも必要だろう.

本研究で 16S rRNA の解析をおこない、DNA によるクラスタとして識別できたものの、種に同定できなかった卵は、湖口部周辺に出現しているタイプである場合が多かった. これは、浜名湖内に生息し、湖内で産卵もおこなう種は限られており、既存のデータベースと第3章で作成した成魚の DNA ライブラリによって網羅できたものの、外海から入ってくる多様な種類の卵と対応させるには、それらデータの量が不足していたことを示している. 本研究では、アンカーネット調査により、外海と湖内の間で卵の流入が起きていることが明らかとなった. 浜名湖のような完全に出現候補種が既知、もしくはそれに近い状態の水域では DNA により確実な種査定がおこなえるものの、生物相の異なる海域との間で個体の移入 / 移出がある場合には偶来種が増え、DNA 種査定法の有効性は減少し、false-positive や false-negative といった結果の解釈も難しくなると考えられる. しかし、データベースに存在しない配列が得られた場合でも、その配列を既存配列との比較で属や科といった高次分類群に正確に帰属させることができる (Wilson et al., 2011). 系統学的な情報が含まれている領域を DNA バーコードとして用いれば、このようなアプローチも可能である. 完全な DNA ライブラリを得ることが難しい海域においては、属や科といった高次分類群を再現する領域を使って近隣結合樹で解析するなど、tree-based の方法も検討する必要があるだろう.

第2項 浜名湖産魚類の産卵生態

16S rRNA の解析の結果、26 種の卵が湖内に出現することが明らかとなり、さらに種には同定できなかったものの 19 のクラスタが遺伝的に識別できた. 加えて、DNA 解析はおこなっていないものの、形態学的に識別可能な 11 タイプの卵もあった. これらのことから、浜名湖内には、片倉・二宮 (1988) が報告した 24 種類よりもはるかに多くの、1 年間でおおよそ 56 種類の魚卵が出現すると考えられた.

上述のように、湖内では 50 種類以上の魚種が産卵していると想定されるものの、多くの種の

卵は湖口部に出現しており、湖内産卵の証拠を示した種は少なかった。魚卵の分布を比較したところ、イシガレイとカタクチイワシの卵は湖心部から湖奥部にかけて多く出現した。この2種の卵は湖内で大量に採集されたのに対し、アンカーネットでは、カタクチイワシ卵はほとんど採集されず、イシガレイ卵も最干潮時に大量に採集され湖外への流出が示されたものの、流入はみられなかった。これらのことから、イシガレイとカタクチイワシの卵は外海から流入したのではなく、この2種は湖内で産卵すると考えられた。ギマ卵も湖心部で採集されるものの、湖口部とアンカーネットではごくわずかしき採集されず、ギマも湖内で産卵をおこなうと考えられた。一方で、卵が湖口部周辺に集中して出現した、もしくは満潮前後のアンカーネットで大量に採集されたアラメガレイ、スズキ、ササウシノシタ、クロサギは、湖口部周辺で産卵する、もしくは外海で産卵し、卵が潮汐によって湖内に流入していると考えられた。同様に、採集数が少なかった、もしくは種が同定できなかった卵でも湖口部の定点のみに出現するというパターンを示す場合が多く、多くの種は湖口部周辺や外海で産卵すると考えられた。浜名湖内で成魚の成熟状態を調べた千葉(1980)は、19種が湖内で産卵していることを示唆した。千葉(1980)が述べた19種のうち、浮遊性魚卵を産むことが知られている種は、コノシロ、サッパ、セスジボラ、ヒイラギ、キス、シマイサキ、ネズミゴチ、ハタタテヌメリ、イシガレイの9種である。本研究で得られた魚卵の分布からも、塩分のやや低い汽水域である湖心部と湖奥部で産卵をおこなう魚種は、カタクチイワシやイシガレイなど、少数の種に限られることが示唆された。

浜名湖内での魚類の産卵生態に関しては、千葉(1980)が袋網で漁獲された種を調べた他は、コノシロ(松下・能勢, 1974)とトビヌメリ(Zhu et al., 1989, 1991)でしか報告がない。松下・能勢(1974)は湖内におけるコノシロ卵の分布も調査し、コノシロは湖奥で産卵し、その卵は4月下旬から5月中旬に湖内全域に出現することを報告した。本研究で採集された卵では、ID-01とした形態タイプがコノシロに相当した。この卵の形態はコノシロの既報の卵の形態と一致したが、DNA種査定の結果、この形態タイプにはコノシロだけではなく、マイワシとサッパも混じることが明らかとなったためDNA解析した卵のみで分布をみた。本研究の調査でコノシロ卵が最も多かったのは4月であり、松下・能勢(1974)の報告と一致していた。しかし、本研究では10月と12月にもコノシロ卵が出現した。コノシロの産卵期は一般的に4月から7月と報告されているが(池田・水戸, 1988)、浜名湖においてはより長い産卵期をもつ可能性もある。

第3項 浜名湖での卵の流出入

アンカーネットの採集結果から、最満潮時と最干潮時で採集個数、採集密度、卵の出現種が異なっていたことがわかった。例えば、167個のイシガレイ卵が採集された2004年1月と2005年8月を除き、最満潮時のほうが最干潮時よりも採集個数、密度ともに高い傾向にあった。また、

出現種を比較すると、最満潮時にはマダイ属、クロサギ、アラメガレイの卵が、最干潮時にはイシガレイの卵が採集されるという違いがみられた。このことから、マダイ属、クロサギ、アラメガレイの卵は湖内に流入する傾向が、イシガレイの卵は湖外へ流出する傾向が強いと考えられた。同じ調査日の連続した上げ潮と下げ潮時でも、採集された内容物は大きく異なっており、潮汐による浜名湖での卵の流出と流入は非対称であることが明らかとなった。

このような卵の非対称な流出と流入は、浜名湖の海水交換の様式が原因で生じると考えられる。浜名湖では、上げ潮時に流入してきた高密度の外海水が湾口を通過した後、低密度の湖内水の下に潜り込むタイダル・トラッピング (tidal trapping) が起きる (松田, 1999)。そのため、満潮時までは外海水が湾内に流入するが、干潮時には表層にある湖内水が湖外へ流出する (松田, 1999)。浮遊性魚卵は水の流れてから受動的に分散するため、外海水とともに湖外から流入してきた卵はタイダル・トラッピングにより底層に沈み込み表層から取り除かれ、最干潮時に採集されなかったと考えられる。また、流入した外海水は、湖口部周辺までしか到達せず、湖心部まで至らない (松田, 1999)。このため、外海から流入した卵は湖口部周辺に留まり、湖内に分散しないのだろう。このように、浜名湖では、湖内の卵は流出しやすいものの、湖外からの卵は流入しても分散しにくく、生残も低いと予想でき、湖外から流入する卵が湖内の個体群の維持に貢献する割合は低いと考えられた。

第4項 環境と産卵の関わり

湖内のプランクトンネットとアンカーネットの採集結果をまとめ、種が同定され、かつ個数も多く採集された7種について出現環境を比較したところ、出現する環境幅が広い種と狭い種とに分かれた。一般に魚類の成熟は光周期や水温などの外的要因を引きがねとして誘起され、成熟後に産卵期が始まる (赤川, 2010)。出現に明瞭な季節性があったイシガレイなどは水温の幅が狭く、対して、ほぼ周年出現したカタクチイワシとアラメガレイは水温の幅が広がった。アラメガレイは、若狭湾と九州南西海域において春と秋の年2回の産卵期をもつことが報告されており (Kamisaka et al., 1999; Manabe and Shinomiya, 2001)、浜名湖周辺の個体群も同様の生活史をもつことが明らかとなった。また、これらの魚種では塩分によって産卵場所が規定されていると考えられた。湖心部から湖奥部まで広い範囲に出現したカタクチイワシ卵は広い塩分環境下で出現しており、対して湖口部に集中したアラメガレイ卵は比較的高い塩分条件下で出現した。湖心部に集中して出現したイシガレイ卵は比較的低い塩分の狭い範囲の環境下で出現した。浜名湖においては水温と塩分の変動パターンによって湖口部、湖心部、湖奥部を分けることができ、このような環境変化の幅の多様さにより、様々な産卵に適した環境が多くの魚種の産卵場として利用されている可能性がある。逆に、このような環境変異が産卵場を狭い範囲、時期に規定し、半閉鎖性の流体環境とあいまって周囲と交流のない小規模な産卵個体群が形成

されていることも予想できる。浜名湖での漁業資源の保全や、保護区域を設定する際に、本研究で得られた卵の分布に関する知見は重要な情報となるだろう。