

熊本県水産研究センター研究報告

第10号

目次

| | |
|--|-----|
| シカメガキ（クマモト・オイスター）の生産と選抜育種に関する研究（学位論文）..... | |
|永田大生 | 1 |
| クルマエビ養殖池の飼育水を利用したハマグリ中間育成..... | |
|中根基行, 三浦精悟, 鮫島守, 中野平二 | 113 |

平成29年8月

熊本県水産研究センター

シカメガキ（クマモト・オイスター） の生産と選抜育種に関する研究

永田大生*

※熊本県天草広域本部水産課

Studies on the seedling production and the selective
breeding in the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*

Taisei Nagata

目次

| | |
|--------------------------|----|
| 要旨 | 1 |
| 第1章 緒言 | |
| 1-1. 緒言 | |
| 1-1-1 シカメガキの生物学的特徴 | 3 |
| 1-1-2 シカメガキの歴史 | 4 |
| 1-1-3 熊本県における二枚貝養殖 | 4 |
| 1-1-4 シングルシード法によるカキ養殖の流れ | 6 |
| 1-1-5 カキ類の育種と分子マーカーについて | 7 |
| 1-1-6 本研究の目的 | 10 |
| 参考文献 | 10 |
| 第2章 シカメガキの幼生・採苗飼育 | |
| 第1節 浮遊幼生・採苗飼育 | |
| 2-1-1. 序論 | 22 |
| 2-1-2. 材料および方法 | 23 |
| 2-1-3. 結果 | 25 |
| 2-1-4. 議論 | 28 |
| 参考文献 | 30 |

| | |
|--|-----|
| 第2節 シカメガキの加温飼育による親貝養成 | |
| 2-2-1. 序論 | 39 |
| 2-2-2. 材料と方法 | 40 |
| 2-2-3. 結果 | 41 |
| 2-2-4. 議論 | 43 |
| 参考文献 | 45 |
| 第3節 種苗生産したシカメガキの性比について | |
| 2-3-1. 序論 | 53 |
| 2-3-2. 材料と方法 | 55 |
| 2-3-3. 結果 | 58 |
| 2-3-4. 議論 | 60 |
| 参考文献 | 63 |
| 第3章 <i>hsp70</i> cDNAおよび <i>ef1</i> cDNAの単離および発現解析 | |
| 3-1. 序論 | 73 |
| 3-2. 材料と方法 | 74 |
| 3-3. 結果 | 77 |
| 3-4. 議論 | 79 |
| 参考文献 | 80 |
| 第4章 シカメガキの <i>hsp70</i> mRNAの発現パターンについて | |
| 4-1. 序論 | 90 |
| 4-2. 材料と方法 | 91 |
| 4-3. 結果 | 93 |
| 4-4. 議論 | 95 |
| 参考文献 | 97 |
| 第5章 総合考察 | 105 |
| 参考文献 | 108 |
| 謝辞 | 111 |

要旨

本論文では、アメリカ等ですでにブランド化されているシカメガキ (*Crassostrea sikamea*) であるクマモト・オイスターを用いて、安定した稚貝量産技術、飼育特性、選抜育種のための選抜マーカーの単離とその有効性を明らかにしたものである。シカメガキは、天然海域での海面養殖において、高水温期に大量へい死が発生することから、高温耐性貝の生産が望まれている。そこで本論文では、高温耐性貝の選抜育種を目指して、一般的に高温処理により発現が急上昇することが知られている熱ショックプロテイン 70 (HSP70) に着目して研究を実施した。その結果、20-22 °Cで飼育した個体における *hsp70* mRNA の発現量は、10-12 °Cで飼育した個体と比べてより早く、高く上昇することが分かった。さらに、高温感受性個体における *hsp70* mRNA の発現量は、高温耐性個体と比べてより長期間上昇し続けたことから、*hsp70* mRNA の発現量が高温耐性個体の選別に有効であることを初めて明らかにした。学位論文は第1章から第5章から成る。

第1章では、研究の背景について記述し、シカメガキの生物学的な特徴、シカメガキの歴史、熊本県における二枚貝養殖の状況、シカメガキの養殖に至った経緯、カキ類の育種の有効性について既報の知見を元に述べている。

第2章では、シカメガキの新たな稚貝量産方法として、安定的な生産方法、選抜した継代貝を使用することが有効であることを明らかにした。親貝養成では、陸上加温飼育により積算水温約1100°C以上で卵量が約150万粒以上確保できることを示した。一方、親貝を安定して確保するためには性比のコントロールが必要であるため、その基礎的知見として1年貝及び2年貝における性比調査を組織学的観察により行った。その結果、1年貝では小型貝は雄に、大型貝

は雌の割合が高くなり、2年貝では雌に性比が顕著に偏ることを明らかにした。

第3章では、高温耐性貝の選抜育種のためのマーカー遺伝子として *hsp70* cDNAのクローニングを行い、発現解析を行っている。得られたcDNAから推定されたアミノ酸配列は、これまで報告されているカキ類のHSP70と非常に高い相同性を示した。また、鰓、外套膜、貝柱における *hsp70* mRNA の発現量は、コントロール個体では低く、高温処理後に有意に増加した。これらの結果から、得られたシカメガキのHSP70は、典型的なストレス誘導型のHSP70であることを明らかにした。

第4章では、高温耐性と *hsp70* mRNAの転写パターンとの関連性について把握するため、様々な条件における *hsp70* mRNA発現量の変化を解析した。シカメガキ *hsp70* mRNAの発現量は、20-22℃および10-12℃で飼育した個体を37℃で1時間処理したところ、前者は処理終了時点で発現量が最大になったのに対し、後者は処理後3時間で最大となった。これらの個体を42℃で1時間処理したときの生残率はそれぞれ62.5%および100%であった。また、20-22℃で飼育した個体を37および40℃で1時間処理した場合、その後42℃で1時間処理してもほとんどの個体が生き残り、無処理区と比較して *hsp70* mRNAの発現量も明らかに低かった。これらの結果より、*hsp70* mRNAの転写量が高温耐性個体の選別に有効であることが示唆された。

第5章では、総合的考察を行っている。

1-1. 緒言

1-1-1. シカメガキの生物学的特徴

シカメガキは、以前はマガキの地方種として分類されていたが (Amemiya, 1928)、現在では分子遺伝学的知見から、独立種と考えられている (Banks et al., 1994)。シカメガキはマガキとは異なった特徴を持っており、成長が遅いこと、サイズが小さいこと、殻のカップの深さが深いこと、殻の表面が波打っていることなどの違いが報告されている (Ahmed, 1975)。また、両者の交配実験において、マガキの雄とシカメガキの雌は交配可能であることや (Numachi, 1971; Banks et al., 1994; Usuki, 2002; Camara et al., 2008)、マガキの雌とシカメガキの雄は、低率ながら交配することも報告されており (Usuki, 2002; Camara et al., 2008)、天然環境において両者が自然交雑している可能性も報告されている (Usuki, 2002)。

天然分布しているマガキとシカメガキは外観ではほとんど区別できないことから、シカメガキの生息に関する情報はほとんどなかった。近年、分子マーカーの発達により、PCR-RFLP法を用いて両者を遺伝学的に区別できるようになっている (飯塚・荒西, 2007)。両者の天然分布が、シカメガキは河口の干潟に分布しているのに対して、マガキは広い生息環境で分布していることが報告されている (伊藤・松本, 2013)。これまでシカメガキの分布域は、有明海のみに分布すると報告されてきたが、現在では、八代海、島根県中海、福井県久々子湖、佐賀県伊万里湾にも分布していることが明らかとなった (Aranishi et al., 2007)。さらに、シカメガキは韓国の Suncheon Bay や中国の Haimen Bay、Jiangsu Bay にも分布していることも報告されている (Sekino et al., 2012)。

1-1-2. シカメガキの歴史

シカメガキは、アメリカの殻付きカキ市場において高い価値を有し、マガキ (*Crassostrea gigas*) と比較して高い価格で販売され、「Kumamoto oyster」の名で高級食材として養殖されている (Sekino, 2009)。

このシカメガキが、国際的なブランドになったきっかけは約60年前に遡る。熊本県は、1946年に中央水産業界福岡支所（当時）からの勸奨を受け、八代海で採苗したカキ種苗の対米輸出を実施することになった。その際、熊本県水産試験場職員が熊本県八代郡鏡町に駐在し、1949年に鏡町、竜北町、小川町、松橋町、不知火町の漁業者が「熊本県種牡蠣漁業協同組合」を結成し、その指導に当たる「輸出種牡蠣指導所」が新設された。カキ種苗の輸出先は米国サンフランシスコ等の西海岸で、この熊本県から輸出されたカキ種苗は、1952年当時の「輸出種牡蠣指導所」職員である太田扶桑男氏の報告で「熊本産マガキ、スミノエガキ共に生長が良く、米国のオリンピアガキ、イースタンガキの代用として注目されている。」とされている。しかし、輸出事業は価格の安さによる漁業者の生産意欲の減退からノリ養殖に移行する等で、昭和33年（1958年）をもって終了した。その後米国において、これら熊本県からのカキ種苗に含まれていたと考えられる、小型で殻幅が大きいシカメガキが「熊本産カキ・Kumamoto Oyster」として銘柄化・ブランド化され、今日に至っている（図1-1）(中野, 2007)。

1-1-3. 熊本県における二枚貝養殖

熊本県において二枚貝養殖は、アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) を用いた真珠母貝養殖と真珠養殖、ヒオウギガイ (*Mymachlamys nobilis*) 養殖が

営まれている。しかしながら、真珠養殖は、1996年頃にアコヤガイの赤変病が発生し、1993年に生産額が80億円あったものが、2010年には2億円にまで低下して、養殖規模が大幅に激減した（図1-2）。さらに、近年はヘテロカプサ赤潮による被害も発生し、真珠養殖経営は不安定化している。

一方、シカメガキ養殖の振興は、高級品であるシカメガキの安定生産による二枚貝養殖業者の新たな収入源の確保が期待できる。さらに、現在使用していない真珠養殖漁場や真珠養殖資材の再利用ができ、沿岸漁業の活性化が期待できる（図1-3）。また、現在ノリ養殖で大きな問題となっているノリの色落ちについても、ノリ養殖漁場近辺でシカメガキ養殖を行い、色落ち原因である大型珪藻プランクトンをシカメガキに摂餌させることで色落ち対策として利用できる可能性がある。このような理由から、シカメガキ養殖を本県で成功させることは、本県沿岸漁業を振興するうえで重要である。

著者らは、2004年からシカメガキ種苗生産試験に着手し、2006年には種苗1,200個の生産に成功し、2009年以降10万個単位での種苗生産に成功した。その後、葦北郡芦北町や天草市御所浦町、上天草市、苓北町などの養殖業者計11業者はクマモト・オイスター生産者協議会を立ち上げ、2011年に初めて県内限定で鮮魚店や飲食店、旅館などへ向けて1万1千個を出荷し、一定の評価を得ている。最近では年々参加業者の数が増え、2015年は18業者が養殖試験に取り組んでいる。ところが、2013年以降、各養殖地区で7月から10月の夏場にかけて大量死が発生し大きな問題となっている（中根ら, 2014）。へい死の原因としては、水温が上昇する6月～10月にかけて生殖巣の顕著な発達および放卵・放精が確認されており、性成熟に伴う活力の低下が大きな要因ではないかと考えている。そのような中で、2014年から養殖試験参加者と県の水産職員が一丸と

なってプロジェクトチームを立ち上げ、シカメガキの養殖成功に向けて全力で取り組んでいるところである（永田, 2015）。

1-1-4. シングルシード法によるカキ養殖の流れ

一般的にカキ養殖は、カルチと呼ばれホタテ殻を海に沈めて、天然海域で生育しているカキの浮遊幼生をカルチに付着させる方法で行う。この養殖法は、「カルチ式養殖法」と呼ばれる。

一方、シカメガキで使用する稚貝は、「シングルシード式」と呼ばれる方法で生産している。この方法は、人工飼育によって得られた成熟幼生を、細かく粉碎した基質（主にカキ殻）に付着させる方法である。シングルシード式の利点は、付着基質のサイズが成熟幼生とほぼ同じであるため、幼生が基質に付着しても、その後成長に伴い基質が外れるので、カルチ式養殖法で認められるカキ底辺部の付着痕がない。また、飼育中に波浪により飼育籠内で常時転がるため、殻の殻幅方向のサイズ（カップと呼ばれる）が深い形状となり、一粒カキとして外観性に優れた貝が生産出来るところである（鬼木, 2013）。殻付きカキ市場で付加価値の高いシカメガキは、シングルシード式で生産した稚貝を用いた養殖を行い、美しい外観となるようにする必要がある。

シングルシード式養殖法における、シカメガキの稚貝生産から出荷までの流れを図 1-4 に示した。

1-1-5. カキ類の育種と分子マーカーについて

現在、シカメガキ養殖において高水温期の大量死が大きな課題となっている（中根ら, 2014）。近縁種であるマガキにおいても夏場の大量斃死に関する報告は多く、その原因は、過剰な餌の摂取による生理障害、水温の上昇、溶存酸素量の低下、病原体への感染などが考えられている（Mori, 1979; Soletchnik et al., 2005; Sauvage et al., 2009）。この対策として、選抜育種はカキ類における大量斃死の課題を解決するために有効な方法であることが考えられている（Huvet et al., 2010）。

一般的に遺伝率は $0.2 h_s^2$ 以上あれば、その形質が次世代に遺伝するとされている（和田, 1979）。貝類で遺伝率を推定したこれまでの報告についてとりまとめた結果、成長については、マガキで完全同胞の分散分析における12ヶ月後において、殻高 $0.81 \pm .27 h_s^2$ 、殻長 $0.81 \pm .07 h_s^2$ 、殻幅 $1.17 \pm .05 h_s^2$ と非常に高い遺伝率が推定されている（Lannan, 1972）。また、*C. virginica* については、完全同胞の分散分析における幼生の成長は、受精6日目 $0.09 \sim 0.51 h_s^2$ 、受精後16日目 $0.60 h_s^2$ の遺伝率が推定されている（Newkirk et al., 1977）。重量については、マガキの完全同胞の分散分析において $0.33 \pm 0.19 h_s^2$

（Lannan, 1972）、半同胞の分散分析において $0.2 h_s^2$ （Hedgcook et al., 1991）、さらに、Ernand et al. (2004) は、飼育環境によって遺伝率が異なることを報告しており、高い栄養環境においては $0.04 \pm 0.24 h_s^2$ 、貧栄養海域では $0.60 \pm 0.39 h_s^2$ であることを報告した。また、*O. edulis* については、 $0.24 \pm 0.2 h_s^2$ （Toro et al., 1990）、*S. cucullata* は、 $0.28 \pm 0.06 h_s^2$ （Jarayabhand et al., 1995）、*M. mercenaria* は、 $0.43 \pm 0.06 h_s^2$ が報告されている（Hardly et

al., 1991)。

さらに、生残性についても高い遺伝率が報告されており、マガキにおいて生残性を指標とした選抜育種による次世代(G2)は、 $0.61 \pm 0.08 \sim 0.98 \pm 0.15 h^2$ で、さらに次世代(G3)は、 $0.55 \pm 0.18 \sim 0.81 \pm 0.13 h^2$ の遺伝率があることが報告されている (Degromont et al., 2010)。また、フランス政府が行っているマガキの選抜育種研究では、夏の大量斃死に耐性があるカキと、感受性があるカキの生理学的および免疫学的な調査を行った結果、耐性があるカキは夏の産卵に投資するエネルギーが少ないこと、ストレスに対する感受性が低いこと、細菌などに対する免疫活性が高いなどの特性を持っていることが報告されている (Samin et al., 2007)。

このような理由から、今後シカメガキの養殖を成功させるためには安定的な生産技術の開発と併せて、生残性の高い貝を選抜育種することが重要になってくることが考えられる。さらに、シカメガキは性成熟がこれまで報告されているカキ類の中で最も早いことが報告されているため (Martinetz et al., 2012)、次世代を早く作出できる可能性があり、選抜育種を行いやすい形質を有する好適な生物であるといえる。

遺伝子マーカーを利用した選抜育種は、より効率的にストレス耐性が増加した群の把握、特定の系統を把握するためにも役に立つと考えられている (Cnoney et al., 2006)。さらに、マーカー遺伝子は細胞内のストレス状態の反応を早く測定することができ、より初期のストレス反応を特定できる利点を持つ (Farcy et al., 2009)。これらの点から、シカメガキの選抜育種を進めていくうえで、利用できるマーカー遺伝子を特定することは極めて重要である。

そのため著者は、そのマーカー遺伝子の候補としてヒートショックプロテイン (以下 HSPs) に着目した。HSPsは細菌から植物、ヒトを含め、すべての生物

においてストレス反応を調節している (Srivastava, 2002)。HSPsは分子シャペロンとして、細胞ダメージから細胞を保護するためのタンパク質であり、環境ストレスによって誘導される (Feder and Hofman, 1999)。HSPsは分子量によっていくつかの主要なファミリーに分類される。例えば、HSP100, HSP90, HSP70, HSP27 などが存在する (Feder and Hofman, 1999)。

その中で、HSP70 ファミリーは、最も高く保存されている分子シャペロンである。HSP70 ファミリーは、構成的に発現する HSC70、ストレスによって高く誘導される HSP70 が存在する。両者は分子シャペロンとして細胞内で重要な役割を果たしている (Gething et al., 1992)。特に HSP70 はストレス状態の細胞反応や、生物の生残や回復のために重要な役割を果たしている (Sorensen et al., 2003)。HSP70 は、熱ストレスによって高く誘導されることが知られているが、他にも重金属、寄生虫、低酸素、塩分などのストレス要因によっても誘導されることから、様々な生物において、バイオマーカーとして使用されている (Sorensen et al., 2003)。

潮間帯に生息するカキ類を含めた生物は、厳しいストレス環境に適応しているため、ストレス耐性と HSP70 の関係を調べる実験材料として用いられている (Fabbri, 2008)。カキ類の HSP70 ファミリーには、HSC70 および HSP70 が存在し、マガキ (Boutet et al., 2003) およびヒラガキ (Boutet et al., 2003) では、両者で異なった発現パターンを示すことが分かっている。特にカキ類の HSP70 は、コントロールレベルでの発現がなく、ストレスの結果としてのみ高く誘導される。この発現パターンはカキ類で共通して認められることから、カキ類のストレス状態の有無を把握するための有効な指標であることが考えられている (Clegg et al., 1998; Piano et al., 2002; Patterson et al., 2014)。

これまで、カキ類においては、タンパク質レベルにおける HSP70 の発現解析

は行われてきているが、転写レベルの発現解析は少ない。また、熱耐性と HSP70 の転写レベルでの発現パターンについても明らかになっていない。したがって、これらの発現解析を行うことにより、HSP70 と熱耐性との関係性について理解でき、HSP70 が熱耐性を持った群を把握する際のマーカー遺伝子として利用できる可能性もある。

1-1-6. 本研究の目的

本論文では、アメリカ等で「Kumamoto oyster」としてすでにブランド化されているシカメガキの稚貝生産技術の確立、飼育特性の把握、選抜育種のための選抜マーカーの単離とその有効性を明らかにしたものである。シカメガキは、天然海域での海面養殖において、高水温期に大量へい死が発生することから高温耐性貝の生産が望まれている。そこで本論文では、高温耐性貝の選抜育種を目指して、一般的に高温処理により発現が急上昇することが知られている HSP70 に着目して研究を実施した。

参考文献

Ahmed M. Speciation in living oysters. *Adv. Mar. Biol.* 1975;13:357-397.

Amemiya I. Ecological studies of Japanese oysters, with special reference to the salinity of their habitats. *J. Coll. Agr. Univ. Tokyo* 1928;9:333-385.

Aranishi F., Iidzuka Y. Multiplex PCR diagnosis for *Crassostrea* oyster discrimination of *C. skamea* and *C. gigas*. *J. Fish. Aquat. Sci.* 2007;2:173-177.

Banks M.A., McGoldrick D.J., Borgeson W., Hedgcock D. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Mar. Biol.* 1994;2:127-135.

Boutet I., Tanguy A., Rousseau S., Auffert M., Moraga D. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chap.* 2003;8:76-85.

Boutet I., Tanguy A., Moraga D. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein (*hsp70*) genes. *Aquat. Toxicol.* 2003;65:221-225.

Camara M.D., Davis J.P., Sekino M., Hedgcock D., Li G., Langdon C.J., Evans S. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* neither rare nor threatened by hybridization in the northern Ariake Sea, Japan. *J. Shellfish Res.* 2008;27:313-322.

Cheney D., MacDonald B., Elston R. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *J. shellfish Res.* 2000;9:353-359.

Clegg J.S., Uhlingher K.R., Jackson S.A., Cherr G.N., Rifkin E., Friedman C.S., Induced thermotolerance and heat shock protein-70 family in Pacific oyster

Crassostrea gigas. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1998;7:21-30.

Degremont L., Bedier E., Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 2010;299:21-29.

Ernande B., Boudry B., Clobert J., Haures J. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 2004;17:342-358.

Fabbri E., Valbonesi P., Franzelliti S. HSP expression in bivalves. *ISJ* 2008; 5: 135-161.

Farcy E., Voiseux C., Lebel J.M., Fievet B. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chap.* 2009;14:371-380.

Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperons, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999;61:243-282.

Gething M.J., Sambrook L. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.

Hardley N.H., Dillon R.T., Manzi J.J. Realized heritability of growth rate in the

hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture* 1991;93:109-119.

Hedgecock D., Cooper K., Hershberger W. Genetic and environmental components of variance in harvest body size among pedigreed Pacific oysters *Crassostrea gigas* from controlled crosses. *J. Shellfish Res.* 1991;10:156.

Huvet A., Normand J., Fleury E., Quillen V., Fabioux C., Boudry P. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 2010;304:95-99.

伊藤輝昭，松本昌大 有明海における有用カキ 3 種の分布と採苗に関する研究 .
Bull. Fukuoka Fisheries Mar. Technol. Res. Cent. 2013;23:47-51.

Jatayabhand P., Thavornyutikarn M. Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture* 1995;138:111-118.

Lannan J.E. Estimating heritability and predicting response to selection for the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 1972;62:62-67.

Mori K. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 1979;53:361-369.

中根基行，鮫島守，永田大生，三浦精悟 熊本産クマモト・オイスターづくり事業Ⅱ（クマモト・オイスター養殖試験）。平成25年度熊本水研セ事報。

2014;88-89.

Nakano H. Kumamoto oyster no ohanashi (a piece of talk about Kumamoto oyster).

Kumamoto Suiken Center News 15:9 (in Japanese).

永田大生 クマモト・オイスターの過去・現在・未来 . 人吉球磨流域圏学会誌

2015:9;9-14.

Newkirk G.F., Haley D.L., Waugh and Doyle R. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 1977;41:49-52.

Martinetz J.C., Vasquez-Yeomans R., Guerrero-Renteria Y. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*). *Hidrobiologica* 2012;2:181-184.

Numachi K. Biological research on the oyster. In: Imai T Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture. *Koseisha Koseikaku Tokyo* 1971;82-105.

Patterson H.K., Boettcher A., Carmichael R.H. Biomarkers of Dissolved Oxygen Stress in Oysters : A Tool for Restoration and Management Efforts. *PLOS ONE* 2014;9:e104440.

Piano A., Asirelli C., Caselli F., Fabbri E. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chap.* 2002;7:250-257.

鬼木浩 マガキ・シングルシードの養殖と経営．月刊養殖ビジネス 2013 ;3:
21-23.

Samain J.F., Degremont L., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Havet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Soudant P., Nicolas J.L., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Bourdry P. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 2007;268 : 227-243.

Sauvage C., Pepin J.F., Lapegue S., Bourdry P., Renault T. Ostreid herpesvirus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 2009;142:181-187.

Sekino M., Sato S., Hong J. Contrasting pattern of mitochondrial population diversity between an estuarine bivalve, the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, and the closely related Pacific oyster *C. gigas*. *Mar. Biol.* 2012;159:2757-2776.

Sekino M. In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*(Amemiya, 1928) based on molecular markers: is the natural resource at stake?. *Fish. Sci.* 2009;75:819-831.

Sorensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 2003;6:1025-1037.

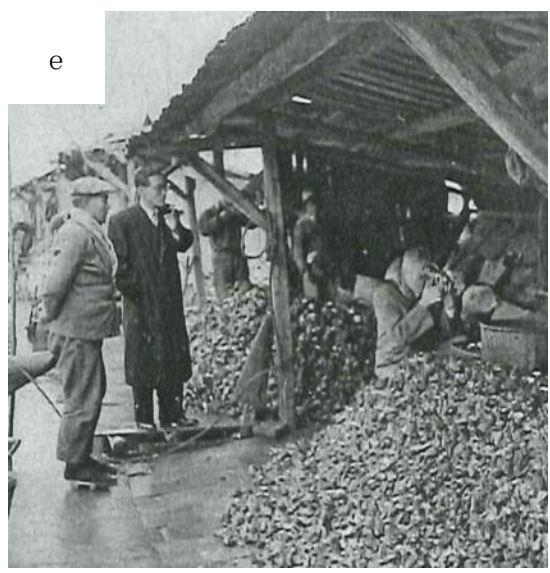
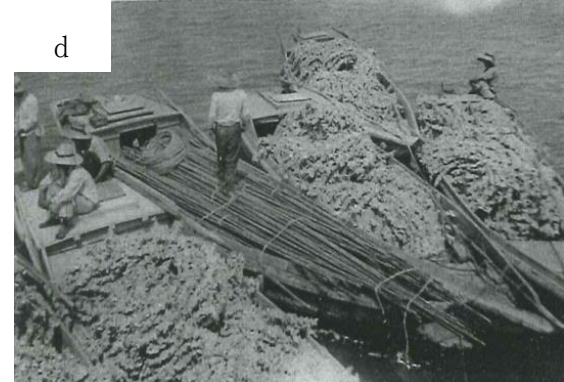
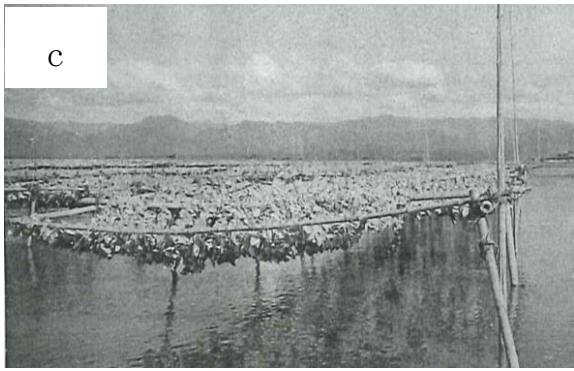
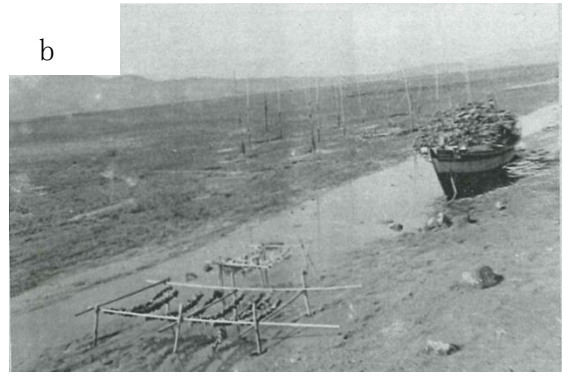
Soletchnik P., Lambert C., Costil K. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. shellfish Res.* 2005;24:197-207.

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:185-194.

Toro J.E., Aguila P., Vergara A.M., Newkirk G.F., Realized heritability estimates for growth from date on tagged Chilean native oyster (*Ostrea chilensis*). *World Aquaculture* 1994;25:29-30.

Usuki H. Evaluation of characteristics and preservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in view of the genetic resources. *Bull. Fish. Res. Agency* 2002;4:40-104.

和田克彦 量的形質の遺伝 水産生物の遺伝と育種 水産学シリーズ 26. 日本水産学会編. 恒星社厚生閣 東京 1979;pp11 .



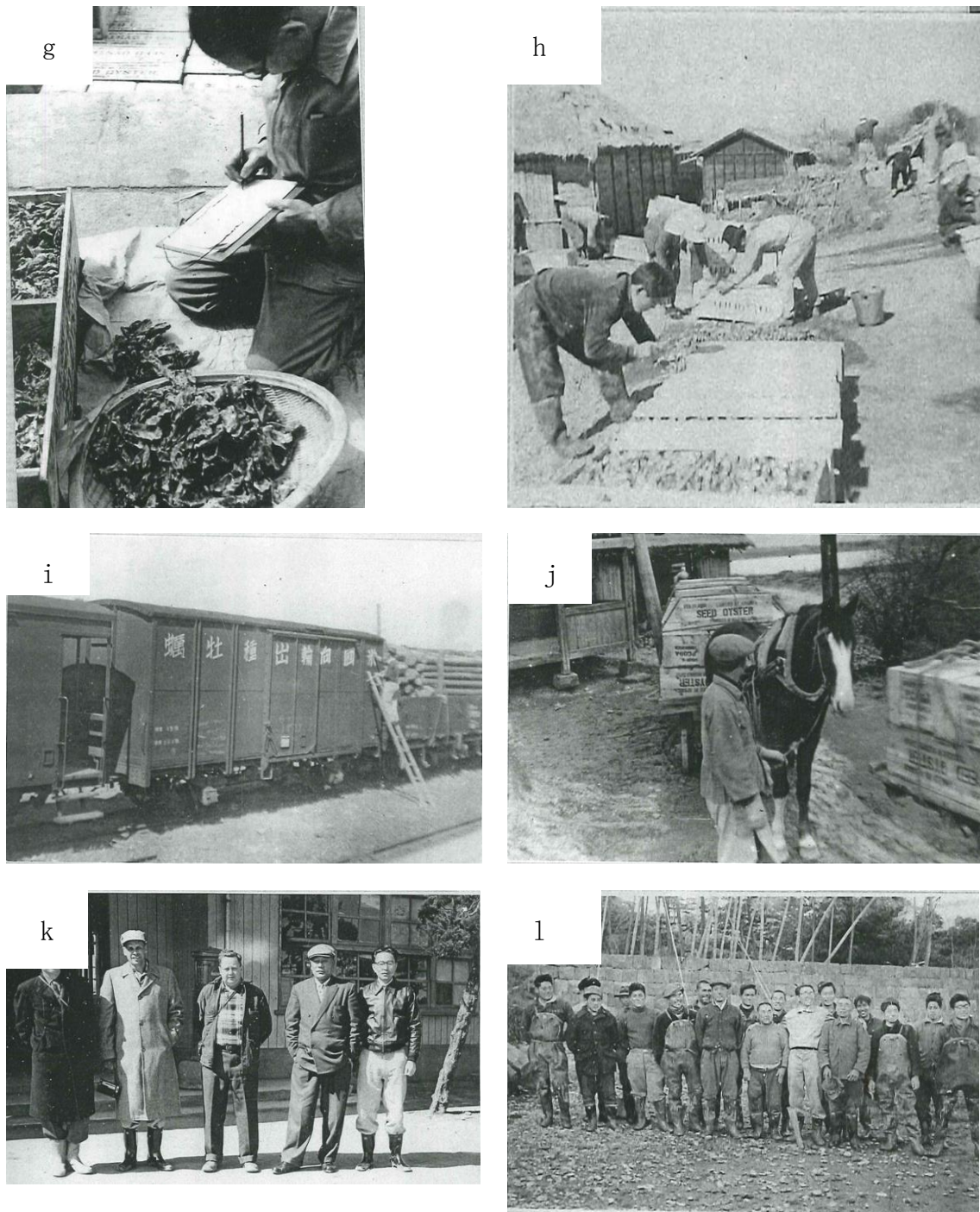


図 1-1. 戦後の対米カキ輸出事業の様子

(a) アメリカのシアトルの魚市場で販売されているクマモト・オイスター（マガキの約 1.5 倍程度の価格で販売されている）(b) 採苗時期を検討するために設置された棚 (c) 本格的な採苗風景 (d) 採苗後の採苗連を収穫する様子 (e), (f)

種牡蠣の選別風景 (g) 出荷検査を行う太田氏 (h) 種牡蠣の箱詰め作業 (i) 種牡蠣を運ぶ貨物列車 (j) 馬車で種牡蠣を駅まで運搬する様子 (k) アメリカの検査官と太田氏 (i) 当時種牡蠣輸出に携わった生産者組合の方々と太田氏の集合写真* これらの写真は当時水産試験場の職員で、種牡蠣輸出事業に携わった山本文市氏より提供いただいた。

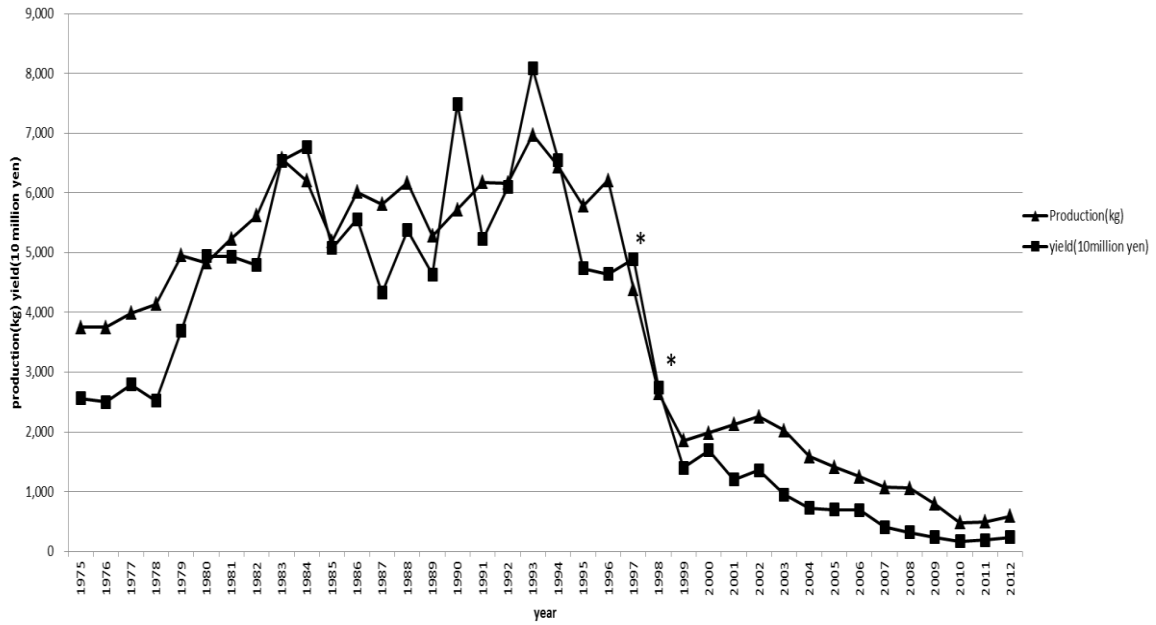


図 1-2. 熊本県における真珠の生産量と生産額の推移. (*は、アコヤガイの赤変病が発生し、生産量が減少した時期を表示) (熊本県農林水統計参照)

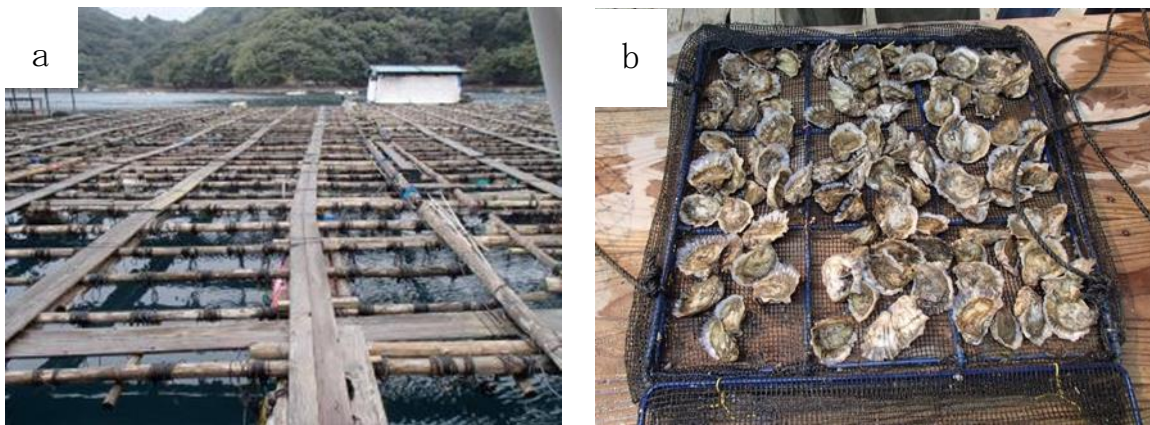


図 1-3(a). 本県の真珠養殖場の外観 (b). 真珠養殖場で生産されたシングルシード法によるシカメガキ (熊本県天草市御所浦町)

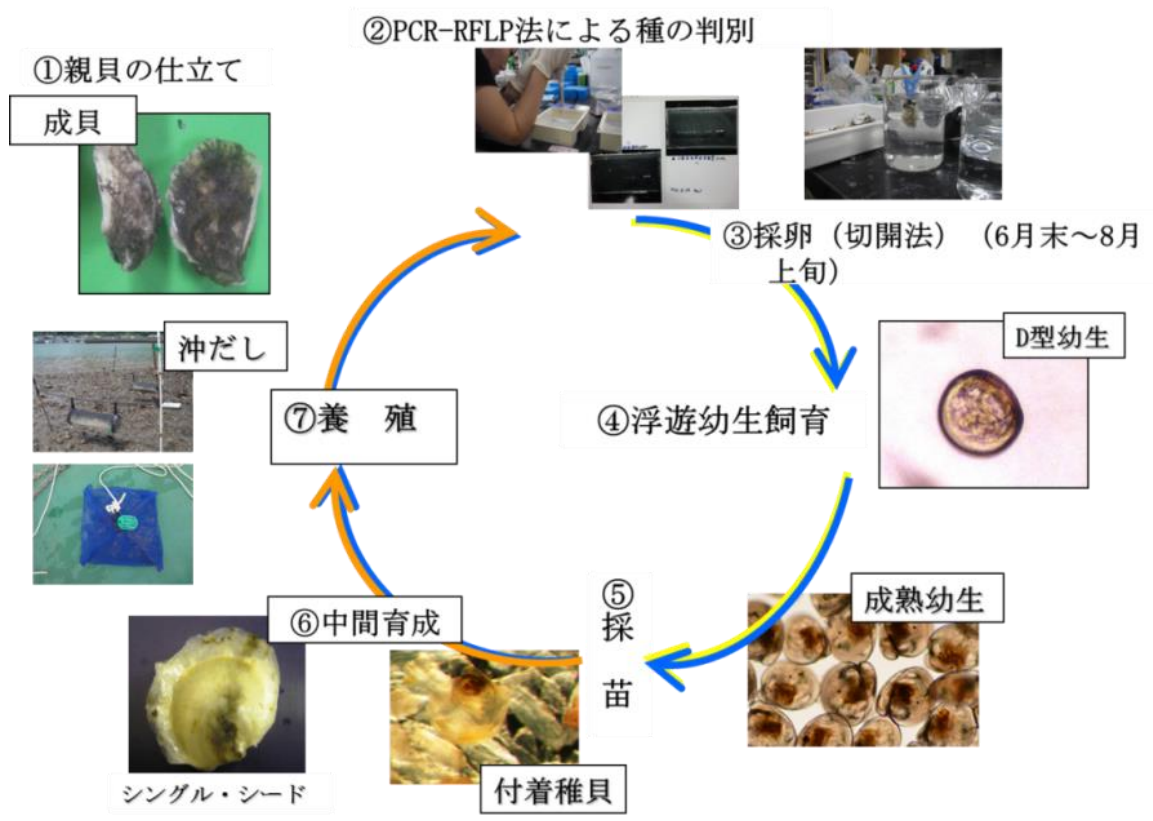


図 1-4. シカメガキ養殖の方法

第2章 第1節 シカメガキの幼生・採苗飼育

2-1-1. 序論

シカメガキで使用する稚貝は、「シングルシード式」と呼ばれる方法で生産している。この方法は、人工飼育によって得られた成熟幼生を、細かく粉砕した基質（主にカキ殻）に付着させる方法である。シングルシード式の利点は、付着基質のサイズが成熟幼生とほぼ同じであるため、幼生が基質に付着しても、その後成長に伴い基質が外れるので、カルチ式養殖法で認められるカキ底辺部の付着痕がない。また、飼育中に波浪により飼育籠内で常時転がるため、殻の殻幅方向のサイズ（カップと呼ばれる）が深い形状となり、一粒カキとして外観性に優れた貝が生産出来るところである（鬼木, 2013）。殻付きカキ市場で付加価値の高いシカメガキは、シングルシード式で生産した稚貝を用いた養殖を行い、美しい外観となるようにする必要がある。

著者らは、2004年からシカメガキのシングルシード式の種苗生産試験に着手し、2006年には同法による稚貝 1,200 個の生産に成功し、2009年以降10万個単位での人工稚貝生産に成功した。しかし、その後の生産において、浮遊幼生飼育の大量死や、成熟幼生を基質に付着させる（採苗）時の付着が不安定であり、さらなる量産化に向けて大きな課題を残している（永田ら, 2013）。そのため、採苗開始の指標として、浮遊幼生飼育時の眼点の出現率及び、浮遊幼生の採苗サイズに着目して稚貝の生産試験に取り組んだ。併せて、継代したシカメガキ 1 年貝（F2）を親貝として使用した稚貝生産を行い、これまでの結果との比較を行った。

2-1-2. 材料および方法

(1) 親貝の使用

親貝は、試験 1 では、2012年に八代市鏡町地先より天然採捕した貝（平均殻高 57.7mm）を種苗生産に使用するまで陸上で養成を行い使用した。試験 2 では、2013年に、天草市御所浦で養殖されていた第 1 世代 (F1) の 2 年貝（平均殻高 53.0mm）を稚貝生産に使用するまで陸上で養成を行い使用した。試験 3 では、2014年に天草市御所浦で養殖されていた、熊本県水産研究センターで継代した第 2 世代 (F2) の 1 年貝（平均殻高 38.0mm）を親貝として用いた。

(2) 親貝のPCR-RFLP法による種判別

使用したすべての親貝のシカメガキの判別は PCR-RFLP（制限酵素断片長多型）法（飯塚・荒西，2007）に基づき行った。

(3) 採卵方法

試験 1 では、2012年 8 月 3 日（以下、第 1 回飼育群と表記）および 8 月 10 日（以下、第 2 回飼育群と表記）に行った。試験 2 では、2013年 7 月 19 日に行った。試験 3 では、2014年 7 月 24 日に行った。採卵は切開法により、穴径 0.3 μ m のカートリッジフィルターで精密ろ過した海水（以下「精密ろか海水」と記載）を使用して受精に用いた。

(4) 幼生飼育

浮遊幼生は受精後 24 時間後に、40 μ m のメッシュネットで幼生を回収し、500L パンライト水槽に 80～250 万個体収容した。飼育水には精密ろ過海水を用い、エアストーンを用いて微量の通気を行った。飼育方法は、既報のマガキの幼生飼育方法によった（松原・田中, 2000）。換水は 2 日に 1 回 1/2～7/10 換水を行った。餌料は主に *Chaetoceros calcitrans*（キートセロス・カルシトランス 以下カルシトランスと表記）、*Chaetoceros gracilis*（キートセ

ロス・グラシリス（以下グラシリスと表記）と採苗前に自家培養した *Pavlova lutilis*（パブロバ・ルテリ（以下パブロバと表記））を給餌し、受精後～6日目は 0.5～1万細胞/日を、受精後7日～幼生飼育終了まで1～3万細胞/日を与えた。基本的に1日に4～5回に分けて給餌を行った。

(5) 採苗飼育

成熟幼生の眼点が見え始めてから、毎日各水槽あたり100個体について、眼点が出現している幼生の割合の観察を行った。試験1では、眼点の出現率が50%以上で、試験2では、眼点の出現率75%以上で、試験3では、眼点68%以上で224 μm のメッシュネットによる成熟幼生を回収し、採苗飼育へ移行した。採苗は、長さ180 μm 以上～300 μm 以下のマガキ殻粉末を用いてシングルシード方式により行い、60cmのダウンウェリング容器（底に口径180 μm のメッシュネットをセット）に約5万個体/カラムを収容して飼育した。（以下「カラム」と記載）。飼育水は精密ろ過海水を用いて、毎日1回全換水を行った。給餌は1日2回午前・午後に、主にカルシトランスとグラシリスを4万～10万cells/mlを給餌し、補助的にパブロバを給餌し、採苗後11日目に基質をカラムから外して、付着稚貝を重量法による計数を行った。基質に付着した稚貝から採苗に用いた成熟幼生数を割った値から付着率として算出した。

(6) 眼点の大きさの測定

眼点の大きさと浮遊幼生のサイズの関係性を把握するため、2015年に（公財）くまもと里海づくり協会で飼育中であった、シカメガキの幼生について採苗直前の幼生について眼点および殻高の測定をECLIPSE Ni(Nikon社製)で行った。

2-1-3. 結果

2-1-3-1. 眼点出現率 50% 以上での採苗（試験1）

試験 1 の稚貝生産総合結果を表 2-1-1 に示した。

(1) 幼生飼育

第 1 回飼育群は、受精卵の D 型移行率は 66.0%、平均殻高は 54.0 μ m であった。幼生収容数は 80 万個 / 槽で行った。No. 1 の水槽で平均殻高 279.2 μ m で、24 日目に全滅し飼育を終了した。No. 2 の水槽は、26 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生数は 18.3 万個であった。生残率は 22.9% であった。

第 2 回飼育群は、受精卵の D 型移行率は 76.0%、平均殻高は 54.6 μ m であった。幼生収容数は 250 万個 / 槽で行った。No. 3 の水槽では、25 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生数は 24.9 万個であった。生残率は 10.0% であった。No. 4 の水槽では、27 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生数は 26.0 万個であった。生残率は 10.4% であった。

(2) 採苗結果

第 1 回飼育群のうち、No. 2 では採苗に用いた成熟幼生として、眼点出現率 51.0%、平均殻高 349.5 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝は 5.2 万個であり、付着率は 28.4% であった。第 2 回飼育群のうち、No. 3 では採苗に用いた成熟幼生として、眼点出現率 85.0%、平均殻高 349.5 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝は 4.8 万個であり、付着率は 19.3% であった。No. 4 で採苗に用いた成熟幼生として、眼点出現率 66.0%、平均殻高 328.6 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝は 10.0 万個であり、付着率は 38.5% であった。

2-1-3-2. 眼点出現率 75% 以上での採苗（試験2）

試験 2 の稚貝生産総合結果を表 2-1-2 に示した。

(1) 幼生飼育

受精卵の D 型移行率は 26.3%、浮遊幼生飼育開始時の平均殻高は $56.1 \mu\text{m}$ であった。幼生収容数は 250 ～ 500 万個 / 槽で行った。No. 1 の水槽では、25 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 6.7 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 3.0% であった。No. 2 の水槽では、30 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 9.2 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 12.0% であった。No. 3 の水槽では、37 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 13.5 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 11.4% であった。No. 4 の水槽では、39 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 10.2 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 6.0% であった（表 2-1-4）。

飼育開始時の平均殻高は、 $56.1 \mu\text{m}$ で、10 日目に殻長 120-150 μm にかけて殻頂が膨出し、幼生は丸みを帯びてきた。各水槽 20 日目に殻長 260-320 μm で眼点が少しずつ見え始め、成熟幼生型の直前になった。28 日目には、300-394 μm になり、ほぼ成熟幼生型になり眼点の出現した個体が多く見られるようになり、この時期から、成長が鈍化した。受精後 40 日目には幼生飼育を終了した。幼生のへい死は、飼育期間中認められ、15 日目まで幼生の沈降が認められた。特に殻高 120-150 μm の殻頂が膨出してから、へい死が顕著に多かった（図 2-1-1, 図 2-1-2）。

眼点の出現は、すべての水槽で受精後 20 日目以降から認められ始め、その後徐々に増加していく傾向にあった。また、眼点の出現率が増加するとともに、平均殻高も増加する傾向が認められた（図 2-1-3, 図 2-1-4）。

(2) 採苗結果

No. 1の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 76.0%、平均殻高 364.9 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は 6.7 万個、付着率は 44.1% であった。No. 2の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 100.0%、平均殻高 385.1 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は 9.2 万個、付着率は 30.7% であった。No. 3の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率は 93.0%、平均殻高 381.1 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は 13.5 万個、付着率は 47.4% であった。No. 4の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 100.0%、平均殻高 368.7 μ m で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は 10.2 万個、付着率は 68.0% であった。

2-1-3-3. 継代した親貝 (F2) を用いた稚貝生産 (試験3)

試験 3 の結果を表 2-1-3 に示した。

(1) 幼生飼育

受精卵の D 型移行率は 61.8%、浮遊幼生飼育開始時の平均殻高は 60.1 μ m であった。幼生収容数は 250 万個 / 槽であった。No. 1の水槽は 39 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 10.0 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 2.0% であった。No. 2の水槽は 39 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 10.0 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 4.0% であった。No. 3の水槽は 45 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 29.0 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 11.6% であった。No. 4の水槽は 39 日間の飼育を行い、取り上げた成熟幼生の数は 12.6 万個であり、浮遊幼生飼育期間中の生残率は 5.0% であった。

(2) 採苗飼育

No. 1の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 96.4%、平均殻高 371.8 μm で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は10.0万個、付着率は100.1%であった。No. 2の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 89.4%、平均殻高 377.1 μm で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は13.2万個、採苗率は132%であった。No. 3の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 84.4%、平均殻高 360.2 μm で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は10.0万個、付着率は 41.7% であった。No. 4の水槽では、用いた成熟幼生として、眼点出現率 68.4%、平均殻高 379.4 μm で採苗を実施し、得られた付着稚貝数は10.0万個、付着率は 79.4% であった。

2-1-3-4. 成熟幼生の眼点の大きさおよび殻高の測定

図 2-1-4 に幼生の眼点の眼点の大きさと殻高の大きさを相関図に示した。殻高および眼点の大きさは、殻高は 282.3 ~ 373.3 μm の間であり、眼点の大きさは 5.7 μm ~ 22.6 μm であった。殻高と眼点の大きさでは、殻高が大きくなるとともに、眼点が大きくなる傾向であった（図2-1-5）。

2-1-4. 議 論

2-1-4-1. 眼点出現率を指標とした採苗率の安定化

シカメガキの稚貝生産において採苗を行った結果、眼点の出現率を高めることで、高く、安定した採苗率を得ることが明らかとなった。シングルシード式における採苗飼育への移行は、500Lパンライト水槽から、カラムへの集約的飼育へ移行するため飼育環境が一変し、採苗飼育期間は浮遊幼生飼育時よりも周囲の環境に影響を受けやすい。また、二枚貝の生活史の中で、この時期は、変

態のために大きなエネルギーを要するなど最も危険な時期であると考えられている(森, 2005)。さらに、基質に付着する前の成熟幼生は、変態時に粘液を出しながら底面をほふくするため、糞や餌料藻類などの汚れにまみれることが多く、病原性の細菌感染症など飼育環境の悪化による大量死のリスクが考えられている(鳥羽, 2003)。

したがって、採苗飼育に用いる幼生は、付着直前の幼生を用い、採苗飼育移行後すぐに基質に付着することが望ましいと考えられる。試験2では、眼点の出現率の増加とともに、殻高の成長も認められた(図2-1-4)。併せて、幼生の殻高と眼点の大きさについて測定を行った結果、殻高 285 μm から眼点が出始め、殻高 373 μm まで徐々に眼点が大きくなっていることが伺えた(図2-1-6)。採苗時に用いた成熟幼生の大きさとして試験1では平均殻高 343.4 μm 、試験2では平均殻高 375.0 μm と約20 μm 以上の大型な幼生を用いていた(表2-1-1, 2-1-2)。採苗後の観察結果から、試験2は試験1と比較して採苗飼育後に多くの個体が早い段階での付着が確認されている。このことは、より大型の幼生を用いたことで、採苗移行後すぐに付着するため採苗中の環境変化の影響を受けにくいと考えられる。今後、安定的な稚貝生産を行うためには、眼点と殻高を併せて観察することが重要であると思われる。

2-1-4-2. 継代貝を親貝とした稚貝生産の安定化について

試験3で、継代した1年貝を親貝として用いた結果、幼生の成長は試験2と比較してやや緩やかであったが、受精後31日目には成長がほぼ追いつき(図2-1-6)、幼生飼育で大きな問題はなかった。

一方、付着率は73.3%と試験2の47.5%と比較しても高い値を示した。この要因として、試験2で眼点の出現率と殻高の大きさを指標とした採苗による方

法を行ったことと加えて、手技の向上も考えられる。さらに、カキ類では、Newkirk et al. (1977) は、二枚貝の幼生の殻長における遺伝率が高いこと、さらにErnande et al. (2003) は、マガキにおいて、幼生の生残性や付着率に高い遺伝性があることを報告している。したがって、これらの結果は、継代した親貝を用いることにより、幼生飼育や採苗飼育がより安定化することを示しており、継代した親貝を使用した場合、飼育しやすい幼生を確保できているのではないかと考えられた。

参考文献

Ernande B., Clobert J., McConbie H., Boudry P. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *J. Evo. Biol.* 2003;16: 399-414.

平田靖, 田村義信, 長澤和也 マガキ成貝飼育海水へ浸漬した採苗器への幼生付着率に及ぼす幼生サイズおよび餌条件の影響. 日水誌. 2009;75:1036-1041.

飯塚裕輔, 荒西太士 九州に分布するイタボガキ科カキ類の分布. *Laguna* (汽水域研究) 2008;15:69-76.

松原 弾司, 田中 實 「特選広島かき」種苗生産(幼生飼育). 平成8年度広島栽協事報. 1997;16:56-61.

森勝義編 貝類・甲殻類・ウニ類・藻類 マガキ 水産増養殖システム3. 恒

星社厚生閣，東京 2005;171-267.

永田大生，中野平二，中根基行，松岡貴浩 新たなノリ色落ち対策事業Ⅰ．
平成23年度熊本水研セ事報．2013;110-116.

Newkirk G.F., Haley L.E., Waugh L., Doyle R. Genetics of larvae and spat growth
rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 1977;4:49-52.

鬼木浩 マガキ・シングルシードの養殖と経営．月刊養殖ビジネス
2013;3:21-23.

鳥羽光晴 アサリ種苗生産の現場基礎技術．千葉水産セ業績Ⅳ．2004;pp98.

表 2-1-1. 試験 1 の稚貝生産総合結果 (2012 年)

| 項目 | No. | 開始日 (月/日) | 開始個数 (万個体) | 水槽容量・密度 (L・個体/ml) | 飼育日数 (日) | 平均殻高 (μ m) | 成熟幼生数 (万個体) | 生残率 (%) | 眼点出現率 (%) | 付着数 (万個体) | 付着率 (%) |
|----|-----|--------------|---------------|----------------------|-------------|--------------------|----------------|------------|--------------|--------------|------------|
| 水槽 | 1 | 8/3 | 80 | 500・1.6 | 24 | - | 0.0 | 0 | - | 0.0 | 0 |
| | 2 | 8/3 | 80 | 500・1.6 | 26 | 349.5 | 18.3 | 22.9 | 51.0 | 5.2 | 28.4 |
| | 3 | 8/10 | 250 | 500・2.5 | 25 | 352.2 | 24.9 | 10.0 | 85.0 | 4.8 | 19.3 |
| | 4 | 8/10 | 250 | 500・2.5 | 27 | 328.6 | 26.0 | 10.4 | 66.0 | 10.0 | 38.5 |
| 平均 | | | - | 26 | 343.4 | 69.2 | 10.8 | 67.3 | 6.7 | 28.7 | |

表 2-1-2. 試験 2 の稚貝生産総合結果 (2013 年)

| 項目 | No. | 開始日 (月/日) | 開始個数 (万個体) | 水槽容量・密度 (L・個体/ml) | 飼育日数 (日) | 平均殻高 (μ m) | 成熟幼生数 (万個体) | 生残率 (%) | 眼点出現率 (%) | 付着数 (万個体) | 付着率 (%) |
|----|-----|--------------|---------------|----------------------|-------------|--------------------|----------------|------------|--------------|--------------|------------|
| 水槽 | 1 | 7/19 | 250+250 | 500・2.5 | 25 | 364.9 | 15.2 | 3.0 | 76.0 | 6.7 | 44.1 |
| | 2 | 7/19 | 2500 | 500・2.5 | 30 | 385.1 | 30.0 | 12.0 | 100.0 | 9.2 | 30.7 |
| | 3 | 7/19 | 2500 | 500・2.5 | 40 | 381.1 | 28.5 | 11.4 | 93 | 13.5 | 47.4 |
| | 4 | 7/19 | 2500 | 500・2.5 | 37 | 368.7 | 15.0 | 6.0 | 100.0 | 10.2 | 68.0 |
| 平均 | | | | 33 | 375.0 | 22.2 | 8.1 | 92.3 | 9.9 | 47.5 | |

表 2-1-3. 試験 3 の稚貝生産総合結果 (2014 年)

| 項目 | No. | 開始日 (月/日) | 開始個数 (万個体) | 水槽容量・密度 (L・個体/ml) | 飼育日数 (日) | 平均殻高 (μ m) | 成熟幼生数 (万個体) | 生残率 (%) | 眼点出現率 (%) | 付着数 (万個体) | 付着率 (%) |
|----|-----|--------------|---------------|----------------------|-------------|--------------------|----------------|------------|--------------|--------------|------------|
| 水槽 | 1 | 7/25 | 250+250 | 500・2.5 | 39 | 371.8 | 10.0 | 2.0 | 96.4 | 10.0 | 100 |
| | 2 | 7/25 | 250 | 500・2.5 | 39 | 377.1 | 10.0 | 4.0 | 89.4 | 13.2 | 100* |
| | 3 | 7/25 | 250 | 500・2.5 | 45 | 360.2 | 24.0 | 9.6 | 84.4 | 10.0 | 41.7 |
| | 4 | 7/25 | 250 | 500・2.5 | 39 | 379.4 | 12.6 | 5.0 | 68.4 | 10.0 | 79.4 |
| 平均 | | | - | 41 | 372.1 | 14.2 | 5.2 | 84.7 | 10.8 | 73.7 | |

表 2-1-4. 試験 2 における浮遊幼生飼育の成長推移

| 水槽番号(No.) | | 受精後日数(日) | | | | | | | | | | | | | 稚貝数 (万個) | 附着率 (%) | |
|-----------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|------------|------|
| | | 1 | 7 | 11 | 13 | 15 | 19 | 24 | 25 | 29 | 30 | 32 | 35 | 37 | | | 39 |
| 1 | 平均殻高(μm) | 56.1 | 106.6 | 154.8 | 182.2 | 218.7 | - | 363.8 | 364.9 | - | - | - | - | - | - | 6.7 | 44.1 |
| | 生残率(%) | 100.0 | 45.2 | 30.0 | | 22.8 | 18.8 | 8.4 | 8.4 | | | | | | | | |
| 2 | 平均殻高(μm) | 56.1 | 104.1 | 144.8 | 167.5 | 198.0 | - | 341.8 | 367.0 | 384.6 | 385.1 | - | - | | 9.2 | 30.7 | |
| | 生残率(%) | 100.0 | 86.8 | 34.4 | | 12.8 | 14.8 | 20.0 | | | 12.0 | | | | | | |
| 3 | 平均殻高(μm) | 56.1 | 100.7 | 149.1 | 166.8 | 206.9 | - | 327.3 | 324.6 | 351.3 | 347.1 | 361.4 | 378.5 | 366.4 | 381.1 | 13.5 | 47.4 |
| | 生残率(%) | 100.0 | 64.0 | 54.0 | | 31.6 | 26.4 | 32.8 | | 12.0 | | | | | | 11.4 | |
| 4 | 平均殻高(μm) | 56.1 | - | - | 182.4 | 208.6 | - | - | 339.2 | 346.1 | 354.5 | 348.4 | 367.4 | 368.7 | - | 10.2 | 68.0 |
| | 生残率(%) | 100.0 | | | 28.4 | | | | 32.0 | | | 10.0 | | 6.0 | | | |

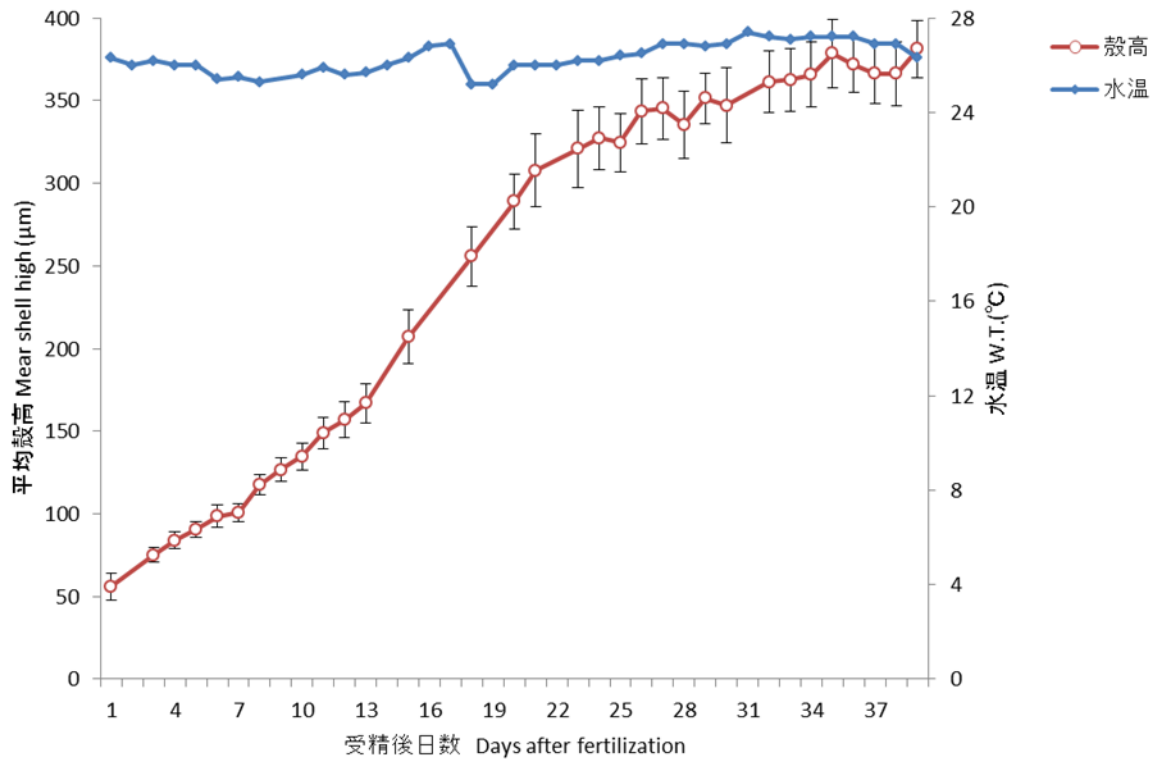


図 2-1-1. 試験 2 における水槽 No. 4 の飼育水温と殻高の推移 (N=30. ※バーは標準偏差を示す)

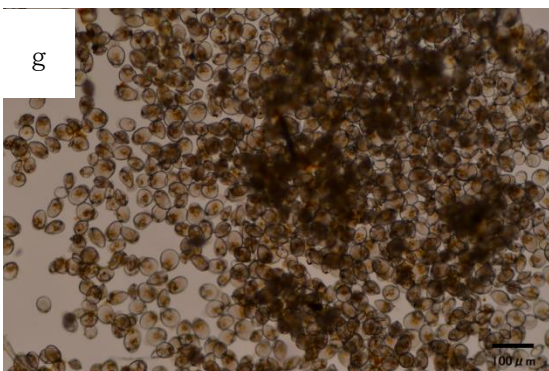
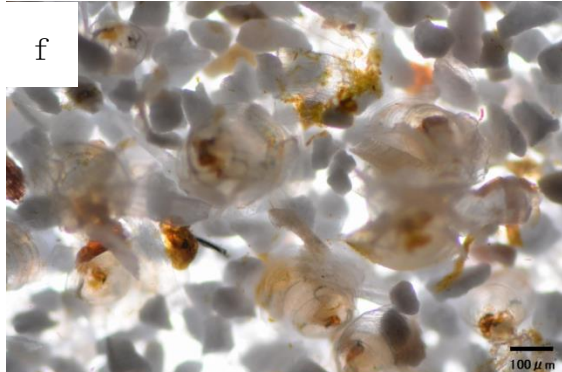
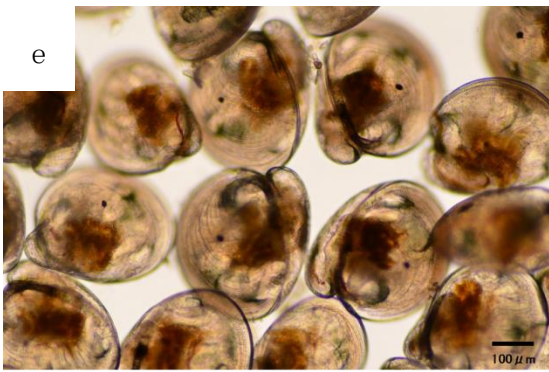
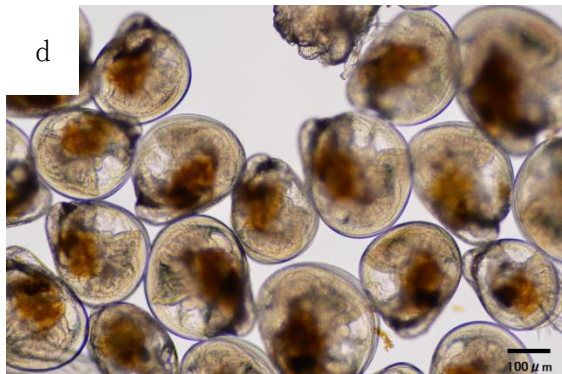
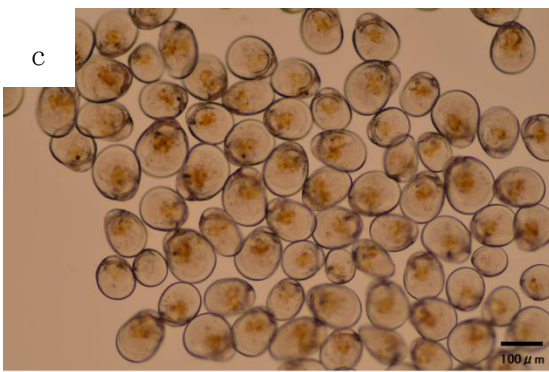
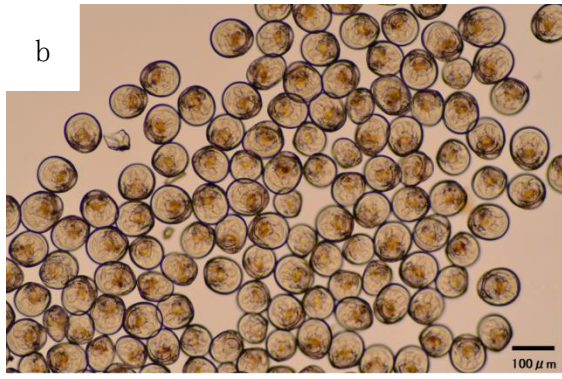
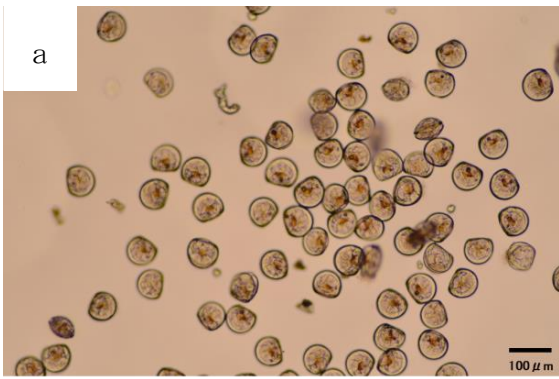


図 2-1-2. シカメガキの浮遊幼生および採苗飼育中の成長 (2014 年)

(a) 孵化後 2 日目 : D 型幼生 (殻高 $46 \sim 61 \mu\text{m}$) (b) 孵化後 6 日目 (c) 孵化後 11 日目 : 初期殻膨頂幼生 (殻長 $120\text{--}150 \mu\text{m}$) (d) 孵化後 20 日目 : 成熟幼生直前 (殻長 $260 \sim 320 \mu\text{m}$) (e) 孵化後 28 日目 : 付着直前の眼点が出現し始めた成熟幼生 (殻高 $340\text{--}420 \mu\text{m}$) (f) 孵化後 32 日目 : 付着直後の稚貝 (g) 孵化後 10 日目で多く見られたへい死 (殻長 $120\text{--}150 \mu\text{m}$)

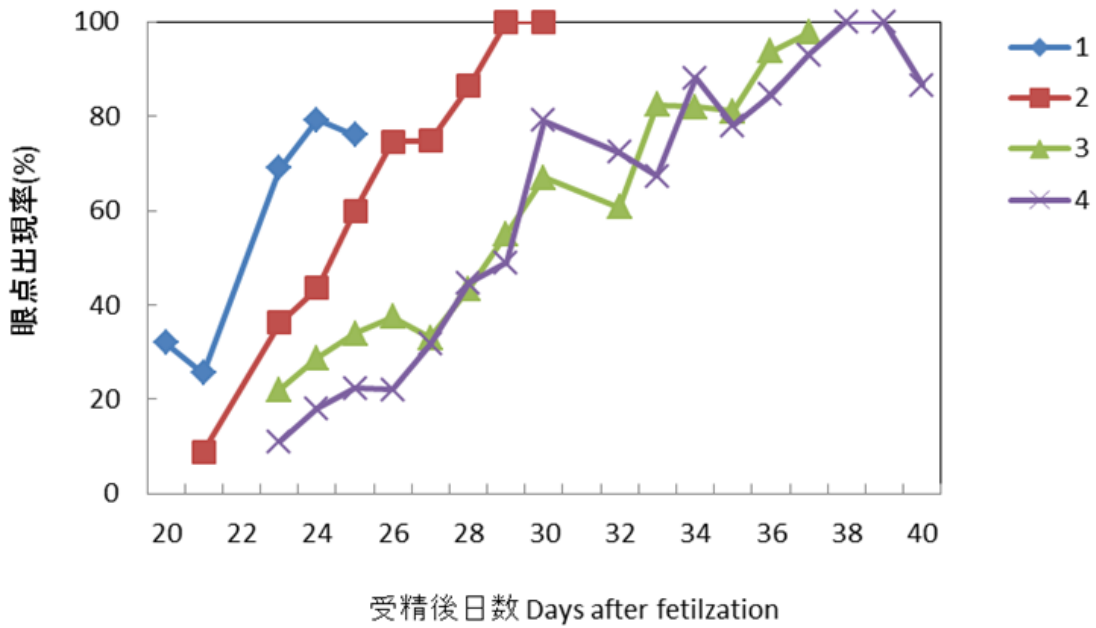


図 2-1-3. 試験 2 の各水槽の眼点出現率の推移（眼点が見られ始めた20日目以降から表示）

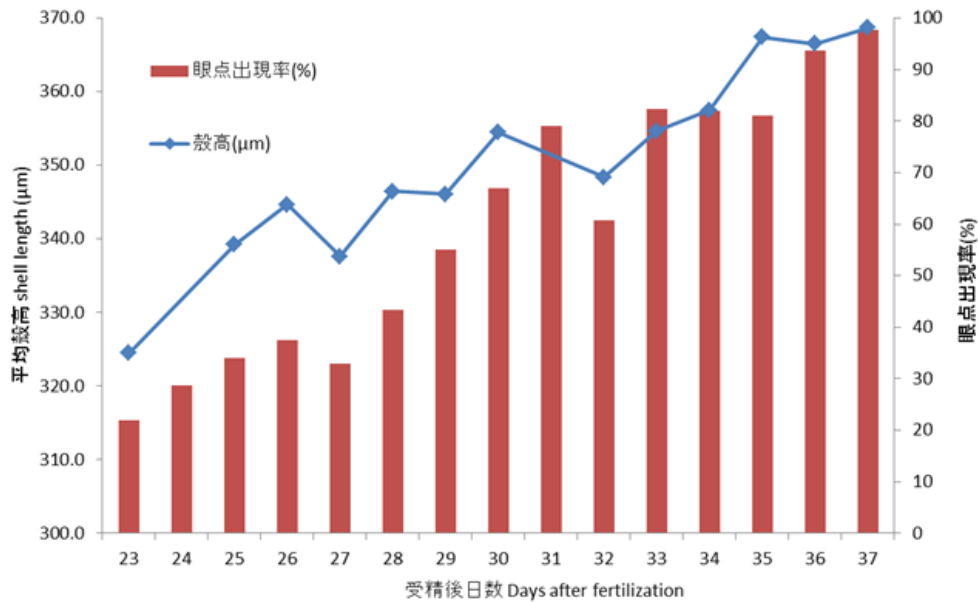


図 2-1-4. 試験 2 の水槽 No. 4 の眼点出現率と殻高の推移（眼点が見られ始めた23日目から表示）

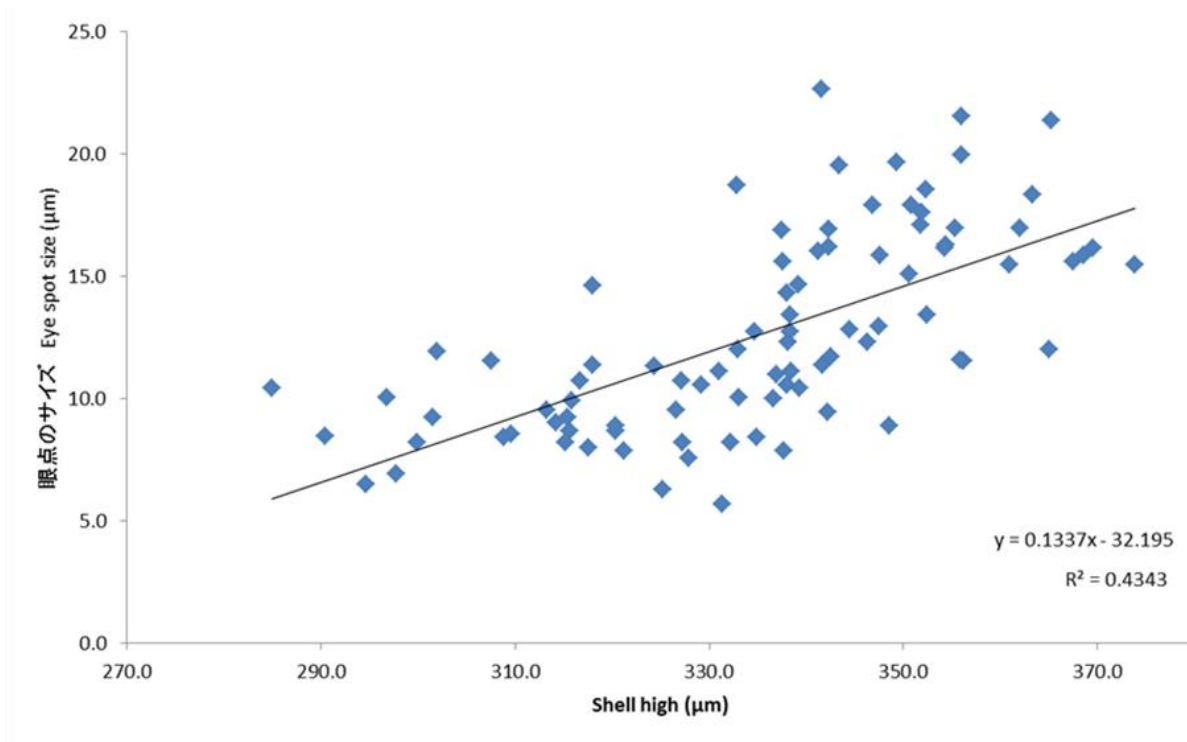


図 2-1-5. シカメガキの採苗直前の成熟幼生の眼点の大きさとサイズの相関
(N=90) (眼点のサイズと殻高の相関係数を R^2 として表示)

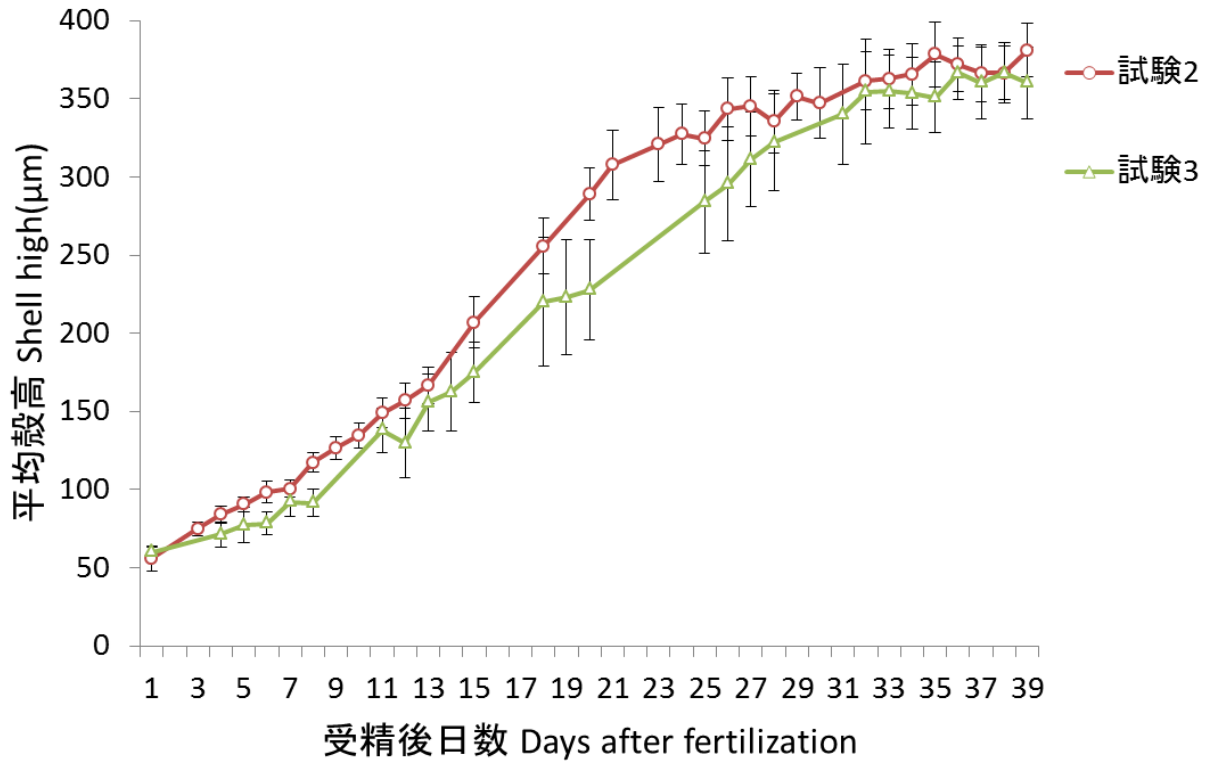


図 2-1-6. 試験 2 および 3 の各水槽の平均値による浮遊幼生の成長の推移

(N=30. ※バーは標準偏差を表示)

第2章 第2節 シカメガキの加温飼育による親貝養成

2-2-1. 序論

カキ類における性成熟の進行は、温度と餌の量（植物プランクトン等）がもっとも重要であることが報告されている (Gallager et al., 1986)。シカメガキの近縁種であるマガキでは、水温で性成熟の発達をコントロールできることが報告されている (Muranaka et al., 1984)。フランスやアメリカ、オーストラリアなどカキ養殖が産業化している地域では、天然海域における稚貝確保の不安定性から、稚貝を人工種苗生産で供給する体制がとられており、各稚貝生産場で水温と餌の量を調節して親貝管理を行っている (Utting, 1993)。フランスの稚貝生産場における親貝養成は12月から始まり、1月の終わりには生殖腺の発達した親貝が得られている (Chavez et al., 2002)。マガキは、8-11°Cの低い温度が生殖巣の発達の引き金になるという知見から、10°Cで一定期間飼育したカキを19°Cで7週間、貝に豊富な餌を与えて飼育する。また、日本においても、松原・田中 (2000) は、マガキで22°Cの温かい水温で一定期間豊富な餌を与えることで生殖巣の発達した親貝を得られることを報告している。

一方、シカメガキにおける親貝養成についての報告は、生海水のみでシカメガキを陸上飼育で1月から7月まで温度管理する報告があるのみである。その結果、性成熟の進行は認められたものの、その後の幼生飼育がうまくいかなかったことを報告している (Robinson, 1992)。

著者らのこれまでの試験結果から、天然海域のシカメガキを稚貝生産用の親貝として使用した場合、その年の海況などにより性成熟の発達に個体差が認められたり、すでに放卵した個体が存在するなど、毎年、天然海域から稚貝生産に適した親貝を確保することが大きな課題となっていた。また、シカメガキ稚貝の量産化のためには、稚貝生産の回数を増やす必要性があり、天然海域の個

体群を親貝とした生産計画では必要な幼生数を確保できないリスクが生じる。したがって、これらの問題を解決するためには、人為的に親貝を養成し、採卵に適した性成熟状態にする必要がある。

そのため、著者は今回シカメガキの親貝養成を行うため、天然海域より採捕した貝を、マガキで用いられている親貝養成の方法をもとにして養成を行った。

2-2-2. 材料と方法

(1) 供試貝

加温飼育用親貝（以下加温飼育群と記載）は2012年12月に八代海湾奥部より採捕したシカメガキ天然群を使用した。また、通常採卵用親貝（以下天然群と記載）は2013年5月に同場所より採捕した天然群を使用した。

(2) 飼育方法

1k1円形FRP製水槽および0.5k1円形水槽を使用し、親貝は、選別、洗浄した後ポケット籠（24～30個程度/籠）に入れ、1k1円形水槽に250個収容した。親貝養成は、2月中旬から開始し、飼育水温の調整は目標水温（22-23℃）になるまで（約100日間）1日に1～2℃ずつ加温した。水質悪化を防止するため、1日おきに水槽を交換する方式で行った。また、一部の産卵により全個体の産卵の誘発を予防するため飼育終了直前の5月22日から1K円形水槽1面から0.5k1円形水槽4面へ分割飼育した。天然群は、採捕後、自然水温で飼育を行い、加温飼育群と同様の方法で飼育を行った。

(3) 試験期間

加温飼育群：2013年2月12日～2013年6月3日（112日）

天然群：2013年5月27日～2013年7月25日（59日）

(4) 給餌方法

毎日、自家培養した *C. calcitrans* (キートセロス・カルシトランス) および *C. gracilis* (キートセロス・グラシリス)、*P. luteus* (パブロボ・ルテリ) を、1水槽当たり松原・田中(2000)の既報の知見を基に、20億細胞/個体/日を目安として給餌を行った。

(5) 測定項目

収容時と採卵日、月1回程度、10個体～30個体ずつ殻高、殻長、殻幅、全重量、むき身重量、目視による生殖巣の発達度の測定(平田, 2011)を行い、1～4に分類した(表2-2-1, 図2-2-1)。

また、ほぼ毎日水温、残餌量の測定も行った。さらに、親貝の養成の適採卵時期を把握するため、積算水温は、Ruiz et al. (1992) がマガキで報告した10℃から配偶子形成が開始されるという既報知見を基に飼育水温から10℃を差し引いて算出した。

(6) 採卵方法

加温飼育群は、5月23日、27日の計2回採卵を行った。天然群は、6月21日および7月21日の計2回採卵を行った。切開法により卵を採取し、その時回収した卵をすべて集め、卵量を計数し、穴径0.3 μmのカートリッジフィルターで精密ろ過した海水(以下「精密ろ過海水」と記載)を使用して受精に用いた。D型幼生への移行率は受精24時間後に、穴径40 μmのメッシュネットで幼生を回収した個体を計数することにより算出した。

2-2-3. 結果

(1) 水温と積算水温の推移について

親貝養成期間の水温の推移を図2-2-2(a)に示した。

加温飼育群の水温は 9.7℃(2月17日)-25.0℃(5月20日, 21日)で推移した。収容から飼育終了時までの積算水温は、1303.6℃×日であった。飼育終了前に自然放卵が計2回発生した。その時の積算水温は、1,216℃×日、1,303℃×日であった。

(2) 給餌量について

親貝養成期間中の給餌量を図2-2-2(b)に示した。

給餌量は、0(4月28日)～29.1億(3月8日)cells/ml・日を給餌した。平均で18.2億cells/ml・日であった。

(3) 全重量、殻高、むき身重量の推移について

親貝養成期間中の全重量、殻高、むき身重量について図2-2-3(a), (b), (c)に示した。

全重量は、14.6～24.5gで推移し、飼育開始が最も低く、飼育開始から徐々に増加傾向が認められ、放卵時が最も高い結果を示した。殻高は、43.6mm～52.1mmの間で推移し、飼育開始から徐々に増加していく傾向が認められた。むき身重量は、2.2g～4.64gの間で推移し、飼育開始から徐々に増加していく傾向が認められ、5月がもっとも高い値を示し、一方で放卵後減少した。

(4) むき身重量比と成熟度の発達について

親貝養成期間中のむき身重量比を図2-2-4に、成熟度の発達について図2-2-5に示した。加温飼育群のむき身重量比は、15.4(2月12日)～22.7(5月20日)%で推移し、収容後から徐々に増加した。5月27日、6月3日の自然放卵後にそれぞれ測定したデータでは顕著に低下した。生殖巣の発達は、収容から、約30日目は生殖巣の発達はほとんど認められなかった。収容から約60日目でわずかに性成熟の発達が認められるようになってきた。約90日目には

顕著に性成熟が発達し、生殖巣輸管の発達も明瞭になった。その後自然放卵後の観察結果では、生殖素輸管は消失していた。

(5) 採卵結果について

表 2-2-2 に採卵結果を示した。

加温飼育群は、計 2 回の採卵を行った。1 回目の採卵は 2013 年 5 月 23 日に行い、雌 34 個体を用い、切開法により得られた総卵量は 4,998 万粒であった。個体あたりの平均卵量は 147 万粒であった。受精後、D 型幼生へ移行した割合は 42.1% であった。2 回目の採卵は、5 月 27 日に行い、雌 50 個体を用い、総卵量は 12,000 万粒であった。個体あたりの平均卵量は 240 万粒であった。D 型幼生へ移行した割合は 58.3% であり両採卵結果ともに D 型幼生移行率は安定していた。一方、天然群は、計 2 回の採卵を行った。1 回目は 6 月 21 日に行い、雌 30 個体を用い、総卵量は 9,300 万粒であった。個体あたりの平均卵量は 310 万粒であった。D 型幼生への移行率は 20.5% と悪かった。2 回目は、7 月 21 日に行い、雌 52 個体を用い、総卵量は 2,808 万粒であった。個体あたりの平均卵量は 54 万粒であった。D 型幼生への移行率は 31.7% と両時期ともに加温飼育群と比較して低かった。

2-2-4. 議 論

著者らは、今回シカメガキをマガキの加温養成方法をもとに養成試験を行った。D 型幼生移行率は、親貝の卵質などを評価する際に重要な指標されており (Chavez et al., 2003)、加温飼育群は天然群に比べて高い D 型幼生移行率を示したことから、今回の親貝養成方法で安定的な親貝養成が可能となったと考えられる。

また、貝のむき身重量の増加や生殖巣発達の観察結果からも順調に親貝養

成ができたものと考えられ、親貝養成終了時に自然放卵も認められていることから性成熟のピークに達していた可能性があり、貝の性成熟が順調に進行してことを示している（図2-2-5）。

マガキにおいて水温は、性成熟を促進する大きな要因として考えられている（Fabioux et al., 2005）。近縁種であるマガキで、Ruitz et al., (1992) は、水温が10°Cになると性成熟が開始するとしている。また、松原ら（2002）は10°Cを性成熟の開始として飼育水温から10°Cを差し引いた値を積算水温として、適採卵時期を把握するための目安として利用している。

著者の結果では、積算水温が1100～1300°C×日の間で成熟の発達や自然放卵が認められ、この時期が採卵に利用する親貝として適していると考えられた。積算水温は、シカメガキの加温飼育による養成において、適採卵時期を把握するための重要な指標である。

Robinson(1992)は、アメリカで養殖されているマガキとシカメガキについて両者の性成熟の季節的な推移について調査した結果、シカメガキはマガキよりも性成熟の発達が遅い可能性を報告している。また、Sekino(2009)も、同海域に生息しているマガキとシカメガキは、お互いの産卵時期をずらすことで種の保存を行っている可能性があるとしている。松原・田中(2000)によると、マガキの親貝養成における、適採卵時の積算水温は600-900°C×日であるとしており、今回、シカメガキで得られた1100°C×日以上での適採卵時期の可能性は、マガキの報告よりも長期の飼育が必要であり、上述した報告と類似した結果を示した。

マガキの親貝養成においては、冬季に採卵を行うために、夏場から貝を冷却後、加温飼育を行い、良質な幼生が確保されることも報告されている（Chavez et al., 2002）。シカメガキについても、温度調整により性成熟をコ

ントロールできる可能性を示している。今後、稚貝の配付時期を人為的にコントロールするためや選抜育種の際に採卵する場合にも、この温度管理を行った親貝養成技術は非常に重要になると思われる。

Robinson(1992)は、1月から7月まで生海水のみによるシカメガキの長期加温飼育を行っている。その結果、性成熟は認められたものの、その後の幼生が成長しなかったことを報告しており、今回の試験結果と異なる結果を示しているが、この試験では生海水のみの飼育を行っており、栄養状態が悪かったためだと考えられる。今回、著者の試験ではマガキの既報の知見から、珪藻プランクトンを平均で1供試貝あたり20億細胞の給餌を行った結果、正常に孵化した幼生を手を得ることができた。このことから、良質な卵や幼生を得るためには十分量の餌料量が必要であると考えられる。また、飼育期間中のへい死数も4.8%と少ない結果であったことから(表2-2-2)、今回の飼育方法により安定的な親貝養成が可能となったと考えられる。

参考文献

Chavez V. J. Conditionnement experimental de l' huitre *Crassostrea gigas* Doctoral Thesis. Brest, French: *Universite de Bretagne Occidentale* 2001;186pp

Chavez J., Barret J., Mingant C., Claude J., Pennec M. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas* : a new approach. *Aquaculture* 2002;210:171-186.

Chavez V. J., Pommier J. J, Andriamiseza S, Pouvreau J. Batter J., Cochard C., Pennec M. L. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 2002;214:115-130.

Chavez V.J., Barret J., Mingant J., Cochard C., Pennec L. Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster *Crassostrea gigas*(Thunberg) at six production sites in France.

J. shellfish Res. 2003.

Fabioux C., Huvet A., Souchu P., Pennec M., Pouvreau S. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 2005;250:458-470.

Gallager S.M., Mann R. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria*(L.) and *Crassostrea virginica*(Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 1986;56:105-121.

平田靖，村上倫哉，赤繁悟 養殖水深の変更による養殖マガキの身入り促進効果．広島水技研報．2011;5:5-11.

松原 弾司，田中 實 「特選広島かき」種苗生産（親貝養成）．平成11年度広島栽協事報．2000;19:19-25.

Muranaka M.S., Lannan J.E. Broodstock management of *Crassostrea gigas* : environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 1984;39:217-228.

Utting S. Procedures for maintenance and hatchery conditioning of bivalve

broodstock. *World Aquaculture* 1993;24:78-82.

Robinson A. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto(Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodsstock oysters and larval culture.

Aquaculture 1992;106:89-97.

Ruiz C., Abad M., Sedano F., Garcia-Martin L., Sanchez-Lopez J. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas*(Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Ecol.* 1992;155:249-262.

Sekino M. In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*(Amemiya, 1928) based on molecular markers:is the natural resource at stake?. *Fish. Sci.* 2009;75:819-831.

表 2-2-1. 軟体部目視による生殖巣の発達度の分類表（平田ら, 2011）

| 生殖巣の特徴 | |
|--------|--------------------------------|
| 1 | 配偶子による白い部分は見えない。 |
| 2 | 配偶子による白い部分がわずかに見える。 |
| 3 | 配偶子による白い部分は多いが樹木状の生殖素輸管が明瞭でない。 |
| 4 | 配偶子による白い部分が多く樹木状の生殖素輸管が明瞭に見える。 |



図 2-2-1. シカメガキの生殖素および生殖素輸管

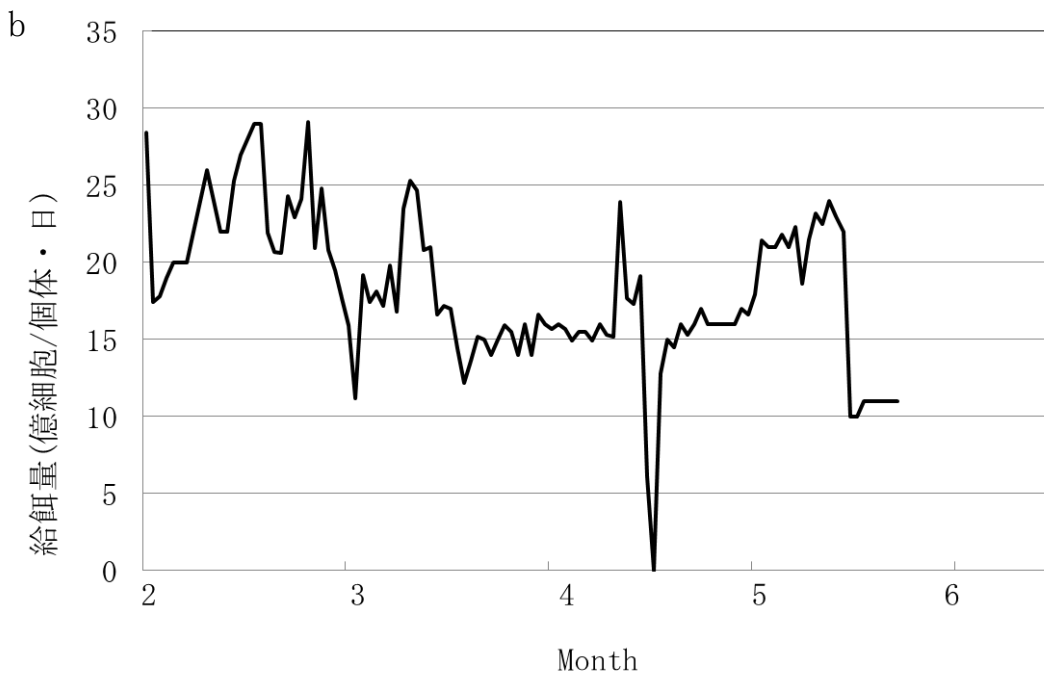
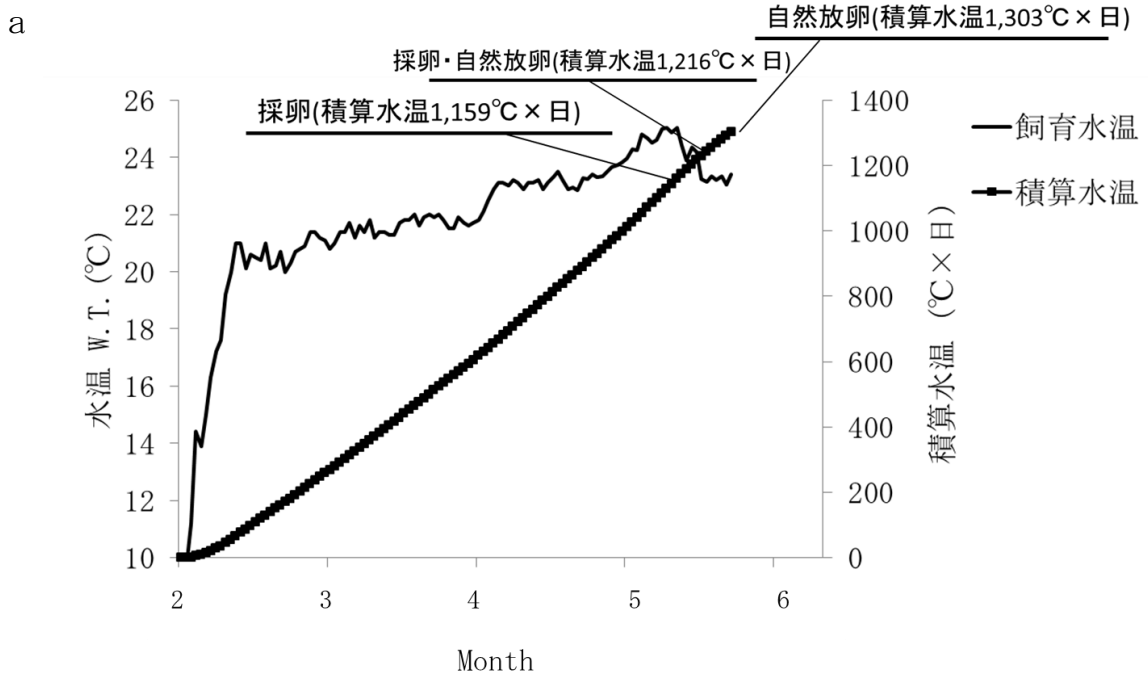


図2-2-2(a). 加温飼育期間中の水温および積算水温の推移。(放卵後は5月27日、積算水温1303°C・日の放卵後の状態を表示) (b). 加温飼育期間中の給餌量の推移.

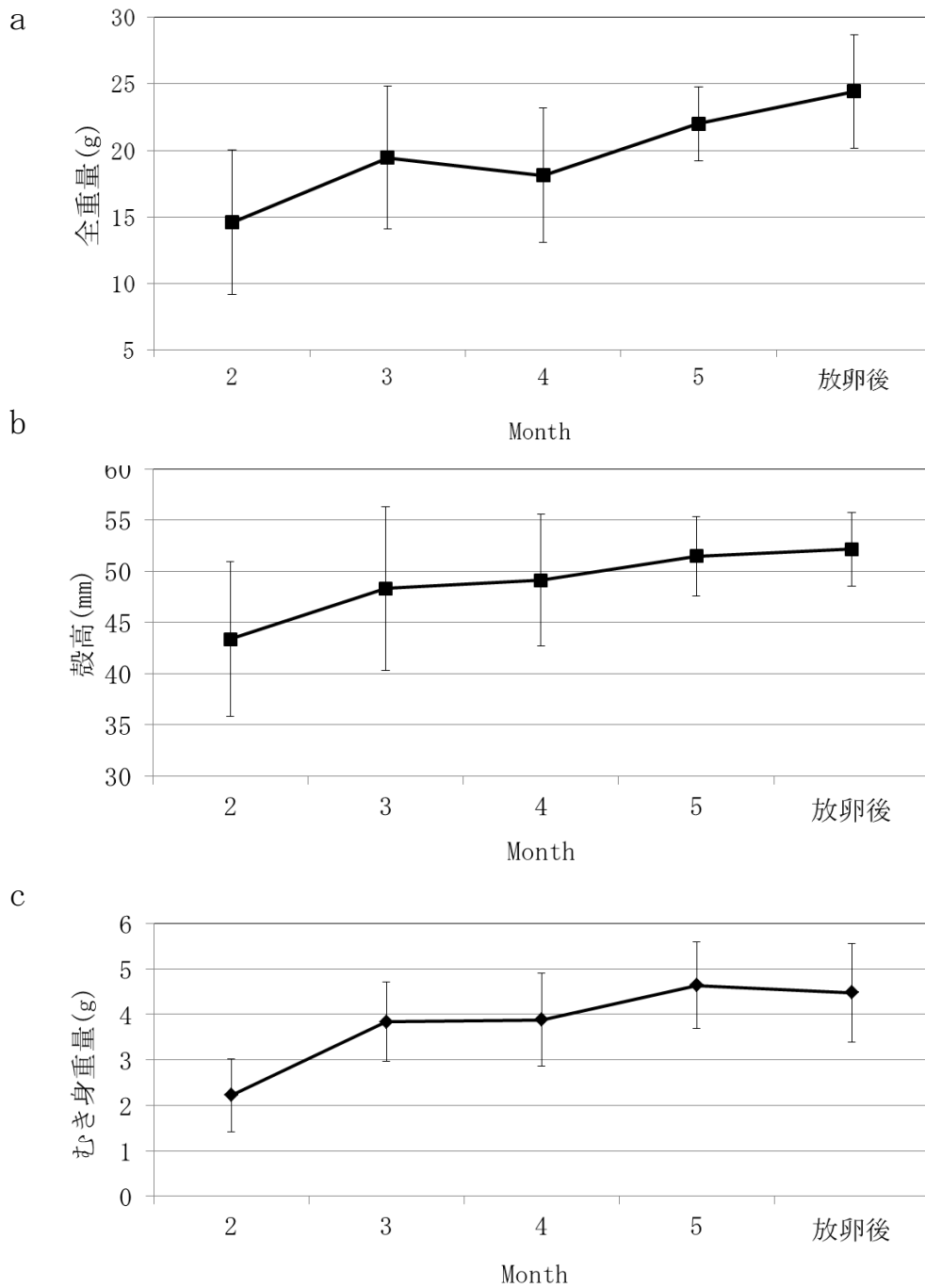


図 2-2-3. シカメガキの加温飼育期間中における生物学的データ (a). 全重量 (b). 殻高 (c). むき身重量を示している。(N=10 ~ 30. バーは標準偏差を示し、放卵後は5月27日、積算水温 $1303^{\circ}\text{C} \times \text{日}$ の放卵後の状態を表示)

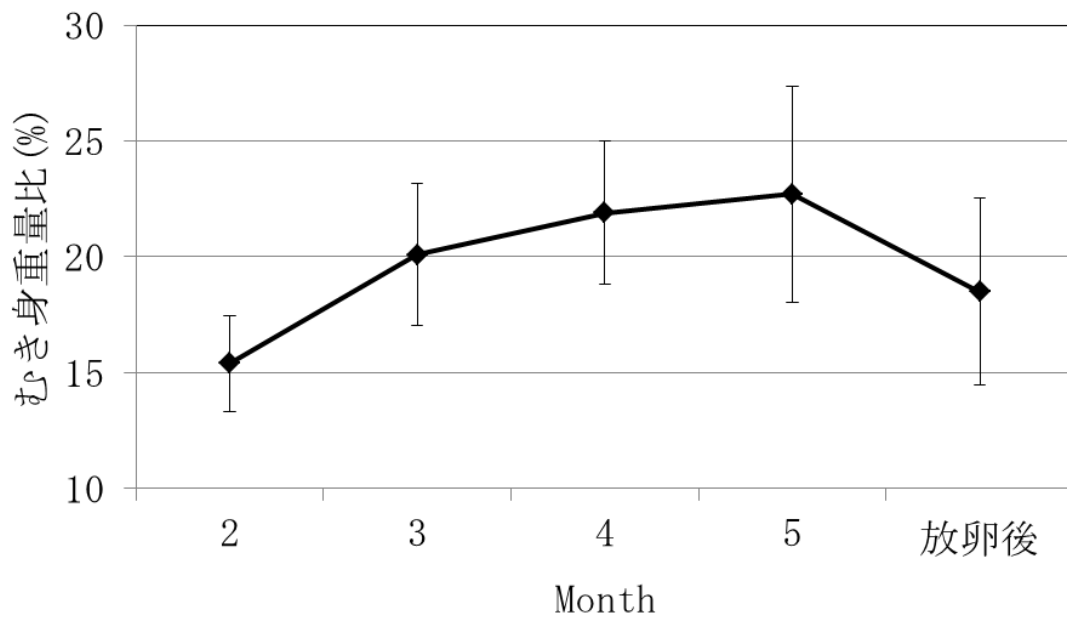


図 2-2-4. シカメガキの加温飼育期間中のむき身重量比の推移. (N=10 ~ 30. バーは標準偏差を表示 (放卵後は 5 月 27 日、積算水温 1303℃×日の放卵後の状態を表示))

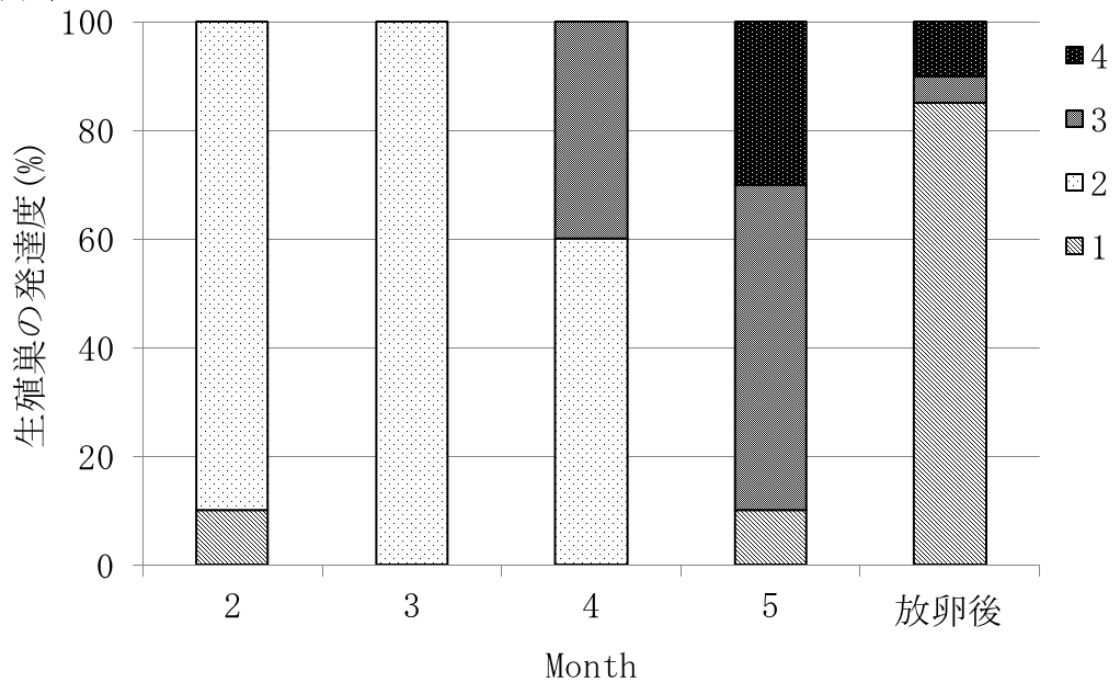


図 2-2-5. 加温飼育群の生殖巣の発達度の推移. 平田ら (2011) の軟体部目視による生殖巣の発達度の分類表により分類 (放卵後は 5 月 27 日、積算水温 1303℃×日の放卵後の状態を示す)

表 2-2-2. 加温飼育群および天然群の養成結果および採卵結果

| 收容日 | 採卵日 | 飼育日数 (日) | 積算水温 (°C×日) | へい死率 (%) | ♂ | ♀ | 総卵量 (万粒) | 平均卵量 (万粒) | D型移行率 (%) | |
|-------|-------|-------------|----------------|-------------|-----|----|-------------|--------------|--------------|------|
| 加温飼育群 | 2月12日 | 5月23日 | 100 | 1159.4 | 4.8 | 17 | 34 | 4,998 | 147 | 42.1 |
| | | 5月27日 | 104 | 1216.4 | | 20 | 50 | 12,000 | 240 | 58.3 |
| 天然群 | 5月27日 | 6月21日 | 25 | 346.9* | 0 | 16 | 30 | 9300 | 310 | 20.5 |
| | | 7月21日 | 55 | 761.8* | | 18 | 52 | 2808 | 54 | 31.7 |

*收容からの値

第2章 第3節 種苗生産したシカメガキの性比について

2-3-1. 序 論

カキ類は多くの種類が雄性先熟である考えられている (Coe, 1943; Galtsoff, 1964)。マガキも、雄性先熟と考えられているが、その性比は遺伝的要因 (genetic sex determination:GSD) と環境要因 (environmentally-governed sex determination:ESD) の両者によって決定されていると報告されている (図 2-3-1; Zhang et al., 2014)。

遺伝的要因として、Guo et al. (1998) および Zhang et al. (2014) は、マガキにおいて雌には一生涯雌として存在する個体と、途中で雌から雄へと変化する個体 (Fake Female)、雄は一生涯雄として存在する個体 (True Male) が存在する可能性を示唆している。また、その際に Cg-DMI, Cg-SoxE, Cg- β -catenin, Cg-FoxI2/Cg-FoxI2os などの特異的な遺伝子の発現が性決定に関連していることも報告されている (Santerre et al., 2013)。

環境要因としては、二枚貝や魚を含めた多くの動物において、餌の供給量、個体群の密度、温度などが考えられている (Pradeep et al., 2012)。温度で性が決定される温度依存的性決定を持つ生物においては、TSP (thermo-sensitive period) と呼ばれる発生時から一定期間に、性が温度に影響する重要な時期があることが報告されており、Naimi et al. (2009) はマガキで 18°C の水温で飼育した場合、受精後 45-60 日の間に温度で性が変化する時期があることを報告している。また、小笠原ら (1969) は、干出時間が長い貝ほど雄の出現率が高くなること、Fabioux et al. (2005) は、1 年間 8°C の低水温で飼育した貝の性比において雄の割合が高くなることを報告している。また、以前の研究では、餌料環境によっても性比に影響が出る事が報告されており、マガキでは餌料が少ない環境に従って雄の割合が多くなることも報告されている (Amemiya, 1935,

Egami, 1953)。

マガキにおいては、いくつかの現場で継続的に性を追跡した研究もいくつかあり、Guo et al. (1998)は、特定の群についての性比を3年間追跡したところ、雌の割合が1年目は37%、2年目は55%、3年目は75%と高くなり、雄から雌へ性転換している可能性を報告している。同様に、Chung et al. (1998)は、マガキにおいて、1年目の貝は雄の割合が高く(64%)、2年～3年貝になると雌の割合が高くなることを報告している。一方で、Park et al. (2012)は、特定の群についての性比を2年間追跡した結果、1年目は雌の割合は50%、2年目は26%と雌の割合が少なくなり、雄⇒雌⇒雄へとリズムカルに性が変化する可能性を報告しており、マガキにおける性決定についてはいくつかの報告があるものの、まだ不明な点が多いのが現状である。さらにシカメガキにおいては、性比に関する情報はほとんどなく、性決定がどのようにされるかについても全くわかっていない。

シカメガキで唯一存在する性に関する報告として、Martinetz et al. (2012)は、シカメガキを24℃で飼育し、受精後71日の平均殻高3.19mmの稚貝における性比を調査した結果、62.0%の稚貝において性成熟が認められることを報告した。この記録は、これまでカキ類で報告されている中で最も早い性成熟サイズであり、そのうち、80.0%が雄で、14.0%が雌であったと報告されている。したがって、シカメガキはマガキとは異なる性成熟特性がある可能性も考えられる。

2015の年シカメガキ稚貝生産において、親貝の性比が大きく雌に偏る状況が確認された。したがって、遺伝的多様性を持つ稚貝を継続的に生産するためには、一定数の親貝の確保が必須であり、親貝の性比が雌に偏る状況は健全な稚貝生産の障害になると考えられる。そこで、本研究では、シカメガキの性決定

について明らかにする第一歩として、種苗生産したシカメガキの性比を調査した。

2-3-2. 材料と方法

2-3-2-1. 種苗生産した成長が異なる貝の性比（孵化後 127 日目）

(1) 供試貝

2015年4月9日に人工種苗生産した平均殻高14.8mmまで飼育したシカメガキ80個を用いた。

(2) 調査日

2015年8月6日

(3) 飼育期間

2015年7月26日～2015年8月6日

(4) 飼育方法

表 2-3-1 により飼育を行った。

表 2-3-1. 飼育方法

| 飼育段階 | 期間 | 方法 |
|------|-------------|------------------------------|
| 通常飼育 | 6月17日～7月25日 | アップウエアリング式カラム 換水量 15回転/日 |
| 成長促進 | 7月28日～8月6日 | 海上中間育成施設（ヤンマー船用システム社製FTF-10） |

(5) 選別方法

海上中間育成施設飼育後、10, 12, 15, 18mmの円形の穴の篩で4段に選別した。

(6) 測定項目

各飼育区20個体をサンプリングし殻高、殻長、殻幅、全重量、むき身重量を測定した。また、性比については、貝軟体部を定法により Davidson固定し、生殖腺周辺の組織標本を作成後、定法によりHE染色を施した組織標本を光学顕微鏡で観察を行い、性比の判別を行った。

2-3-2-2. 種苗生産し高成長性で選抜後、飼育環境の異なった貝の性比（孵化後 363 ～ 420 日目）

(1) 供試貝

2014年5月23日に種苗生産したシカメガキを用いた。2014年10月2日に殻高を指標として大型群を選別し供試貝とした。

(2) 飼育期間

飼育方法別に陸上飼育を行う陸上区、海面飼育を行う非干出区および干出区を設けそれぞれの飼育期間は以下のとおりとした。

陸上飼育（陸上区）：2014年10月6日～2015年5月21日（227日間）

海面飼育（非干出区、干出区）：2014年10月6日～2015年7月17日（284日間）

(3) 調査日

陸上飼育：2015年5月21日 海面飼育：2015年7月17日

(4) 飼育方法

陸上飼育（陸上区）：カラムを用いたアップウェアリング式飼育装置を用いて飼育を行った。餌料は培養した *Chaetceros* sp. を適宜給餌した。飼育装置の洗浄を除き飼育期間中は非干出で飼育した（300個 / カラムを収容）。

海面飼育（非干出区、干出区）：熊本県水産研究センター屋外実験プール（潮汐により水位が変化するコンクリート製半築堤式：面積2600m²）に、垂下水深を0.5m（非干出区）および垂下水深1.5m（干出区：1日の干出時間14～15時間）にし、海水中に含まれるプランクトンを餌として飼育した（200個／籠を収容）。

(5) 調査項目

試験開始時と試験終了時に各区20～40個体をサンプリングし殻高、殻長、殻幅、全重量、むき身重量を測定した。また、成熟状況を確認するため、定法により貝軟体部をDavidson固定後、HE染色を施し光学顕微鏡下で性比の判別を行った。

2-3-2-3. 種苗生産に親貝として使用した養殖貝（孵化後736日目）および天然貝の性比

(1) 供試貝

養殖貝：2012年7月23日に種苗生産した貝を、熊本県天草市御所浦町地先の養殖場で飼育していた貝33個を用いた。

天然貝：平成25年に八代海鏡町地先より採捕した貝を、PCR-RFLP法（飯塚・荒西2007）により種判別後、166個を用いた。

(2) 調査日

養殖貝：2013年7月18日 天然貝：2013年6月19, 21日, 7月24日

(3) 飼育期間

養殖貝：2012年4月～2013年7月

(4) 飼育方法

養殖貝：熊本県天草市御所浦地先海面筏において、垂下水深4mにし、海

水中に含まれるプランクトンを餌として飼育した(100個 / 籠を収容)。

(5) 調査項目

養殖貝および天然貝ともに採捕後、殻高、殻長、殻幅を測定後、成熟した個体から生殖巣の一部を取り、顕微鏡観察で性比の判定を行った。

2-3-3. 結 果

2-3-3-1. 種苗生産した成長が異なる貝の性比 (孵化後 127 日目)

(1) 成長及び選別

各段階の成長状況を表 2-3-2 に示した。通常飼育終了時の平均殻高は 14.8mm、海上中間育成飼育で成長促進後の選別で①10mm選別群：平均殻高 15.0mm、②12mm選別群：平均殻高20.7mm、③15mm選別群：平均殻高23.1mm、④18mm選別群：平均殻高24.3mmに選別した。それぞれの日間成長率は①10mm 選別群：0.02mm/日、②12mm選別群：0.59mm/日、③15mm選別群：0.83mm/日、④18mm選別群：0.95mm/日であった。

(2) 群ごとの性比

各選別群の性比の割合を図 2-3-2 に、組織切片の観察結果を図 2-3-3 に示した。①10mm選別群の性比は、雌5%、雄 60%、雌雄の判別ができなかった個体が 35%であった。②12mm選別群の性比は、雌 25%、雄 75%であった。③15mm選群の性比は、雌 85%、雄 15%であった。④18mm選別群の性比は、雌 85%、雄 15%であった。

2-3-3-2. 種苗生産し高成長性で選抜後、飼育環境の異なった貝の性比（孵化後 363 ～ 420 日目）

(1) 選別結果

殻高を指標として大型群を選別した。殻高11.2mm以上の個体を供試貝として用い、これらの群は全体の4.2%であり、平均殻高は15.9mmであった（図2-3-4）。

(2) 成長

試験開始時、試験終了時の測定結果を表に示した（表2-3-3）。

殻高は平均で試験開始時が陸上区 15.90mm、非干出区 15.90mm、干出区 15.90mm、試験終了時の殻高は陸上区 38.10mm、非干出区 31.05mm、干出区 27.78mm であった。試験終了時の殻長は、陸上区 29.80mm、非干出区 24.96mm、干出区 22.65mm であった。殻幅は、陸上区12.9mm、非干出区 10.52mm、干出区9.75mmであった。全重量は、陸上区 7.50g、非干出区 4.59g、干出区 3.43g であった。むき身重量は、陸上区 1.82g、非干出区 0.41g、干出区 0.61g であった。

(3) 性比

各試験区の性比を図 2-3-5 に示し、組織切片の観察結果を図 2-3-6 に示した。陸上区は、雄0%、雌 90%、雌雄判別不可が 10% であった。非干出区は、雄5%、雌 95% であった。干出区は、雄2.5%、雌 95%、雌雄判別不可が 2.5% であり飼育方法に関わらず、雌の割合が著しく高かった。

2-3-3-3. 種苗生産に親貝として使用した養殖貝（孵化後 736 日目）および

天然貝の性比

(1) 貝の大きさ

天然貝および養殖の調査時の貝およびサイズを示した（表 2-3-4、図 2-3-7）。貝の大きさは養殖貝が、殻高は養殖貝雌 54.1mm、雄 53.9mm であった。天然貝雌 52.0mm、雄 48.9mm であった。殻長は、養殖貝雌 44.7mm、雄 44.1mm、天然貝雌 33.4mm、雄 32.3mm であった。殻幅は、養殖貝雌 21.4mm、雄 21.4mm、天然貝雌 23.1mm、雄 22.3mm であった。全重量は養殖貝雌 23.7g、雄 20.3g であった。天然貝雌 21.3g、雄 18.7g であった。むき身重量は、養殖貝雌 5.7g、雄 4.3g、天然貝雌 4.0g、雄 3.6 g であった。

(2) 貝の性比

天然貝および養殖の貝および性比を図 2-3-8 に示した。養殖貝の性比は雌 90.9%、雄 9.1% であった。天然貝の性比は雌 64.0%、雄 36.0% であった。

2-3-4. 議 論

シカメガキの性が、どのような要因で決定されるかについてはよくわかっていない。また、今後シカメガキの種苗生産を行ううえで、親貝を安定して確保するためには、性比のコントロールが重要である。一方、継代した親貝を使用した結果、その性比が顕著に雌に偏る現象が確認されている。このように、シカメガキの性決定機構を明らかにすることは重要であるため、本研究では、その第一歩として、種苗生産したシカメガキの性比を調査した。その結果、種苗生産した成長スピードの異なる貝の性比は、日間成長率の低い群は雄、日間成長率の高い群は雌の割合が高く、傾向を示し、成長が早い個体の性比は雌に偏る可能性が示された。

小笠原ら(1969)によると、マガキでは干出処理により成長を抑制された貝の性比は、雄の割合が高くなることが報告されているが、本試験では、シカメガキを同様に干出処理の有無による性比への影響を調査したが、影響は認められなかった。これらのことから、シカメガキとマガキにおける性決定機構は、少し異なっている可能性が考えられた。

また、種苗生産した孵化後 736 日目の養殖貝と天然貝の性比を調べた結果、養殖貝では雌の割合が 90.9%、雄 9.1%と性比が顕著に雌に偏っていた。一方で、天然貝では、雌が 64.0%、雄が 36.0%と養殖貝と比較して雄の割合が高くなった。今回、養殖貝として用いた貝は、養殖業者が成長の早い個体を選別してきたものである。この結果においても、サイズが大きい個体は雌に性比が偏ることが明らかとなった。これらの結果から、シカメガキでは、サイズが大きい個体が雌、小さい個体が雄であることが考えられた。

マガキにおける性決定については、遺伝的要因と環境要因の両者によって決定されているとの報告がある (Zhang et al., 2014)。マガキにおいて、性決定がなされる時期として、①受精後 45-60 日、②性成熟の終了から次の性成熟の発達の間にあるとされている (Santerre et al., 2013)。今回、受精後 45-60 日おける調査をしていないため議論できないが、干出処理における調査では、後者の性成熟終了から次の性成熟の発達の間当たる時期であったため、環境要因で性比が変化すると思われたが、その違いは認められなかった。したがって、シカメガキでは成長の早い個体は雌としてあり続け、成長の遅い個体は雄としてあり続けるのではないかと考えられた。マガキにおいて、Benjamin et al. (2002) は餌料となる植物プランクトンのブルームのような栄養環境が良好な状態の時に、雌が雄よりも大きくなることを報告している。これは、雌が成長により多くのエネルギーを貯蔵できる可能性があるためであるとしている。

二枚貝においては、卵の生産は、精子の生産と比較して 50% 以上多くのエネルギーを必要とすることが報告されている (Russel et al., 1979)。

今回、試験に用いた海上中間育成施設は、水温の低いアメリカの海洋環境において、効率的に海水中のプランクトンを集約し、二枚貝の成長を促進する装置として、一般的に用いられている (トバラ, 1996)。また今回、平均殻高 14.8mm の群を 9 日間飼育したが、最も大きな貝で殻高 29.1mm に成長し、日間成長率 1.5mm/日 と著しい成長を示した個体もあり、餌料環境が非常に良好であった可能性が考えられた。一方、そのような状況下においても、試験終了後の殻高が 12.2mm と収容後全く成長を示していない個体もいた。雌雄による大きな成長性の違いは、シカメガキの特徴なのかもしれない。

現在、シカメガキの種苗生産の親貝使用では、高成長性を重視した大型個体を親貝候補として選抜している。このため、シカメガキでは遺伝的に大きくなる形質を持つ個体が遺伝的に雌の割合が高い可能性や、後天的に大きいサイズの個体が雌になるのであれば、現在の選抜方法が雌の割合が高い原因と考えられる。安定的に稚貝生産を行うためには雄の確保が重要な課題である。そのため、稚貝の管理方法として、成長スピードが異なる貝を飼育管理する必要性があることが今回の調査で明らかとなった。

一方、今回検討できなかった受精後 45-60 日の性決定の重要な時期に、温度により性がコントロールできるかどうかについても今後、検討したいと考える。性のコントロールは、現在進めているシカメガキの選抜育種の取り組みにとって非常に重要な課題であるため、今後も性を制御する様々な要因について調べる必要があるだろう。

参考文献

Amemiya I. Effect of gill excision upon the sexual differentiation of the otster (*Ostera gigas*). *Rept. fop. Ass. Adv. Sd.* 1935;1025.

Benjamin C.B., Mitchell J.G. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster(*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquacult. Res.* 2002;33:1253-1263.

Chung E. Y., Seo Y. H., Park K. H. Sexual Maturation, Sex Ration and Hermaphroditism of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, on the West Coast of Korea. *J. Fish. Sci. Tech.* 1998;1:82-93.

Coe W. R. Sexual phase in the American oyster (*Ostrea virginica*). *Biol. Bull.* 1932;63:419-441.

Egami N. Studies on sexuality in the Japanese oyster, *Ostrea gigas*. VII. Effects of gill removal on growth and sexuality. *Annotate. Zoolog. Japan* 1953;26:145-150.

Fabioix C., Huvet A., Souchu P., Pennec M., Pouvreau S. Temperature and photoperiod drive *Crassotrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 2005;250:458-470.

Galtsoff P. S. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin U. S. Dept. of the Interior Washington DC.* 1964;64.

Guo X., Hedgecock D., Hershberger K., Cooper K., Standish K., Allen J. Genetic determinations of protandric sex in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 1998;52:394-402.

飯塚裕輔，荒西太士 九州に分布するイタボガキ科カキ類の分布。
Laguna(汽水域研究) 2008;15:69-76.

Manolakou P., Lavranons G., Angelopoulou R. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006;4:59.

Martinetz J.C., Vasquez-Yeomans R., Guerrero-Renteria Y. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster(*Crassostrea sikamea*) *Hidrobiologica* 2012;2:181-184.

Naimi A., Martinez A., Speq M., Mrac A., Diss B., Mathieu M., Sourdain P. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 2009;152:189-196.

Santerre C., Sourdain P., Marc N., Mingant C., Robert R., Martinez A. Oyster sex determination is influenced by temperature-first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. [A]* 2013;165:61-69.

小笠原義光，小林歌男，岡本亮，古川厚，久岡実，野上和彦 カキ養殖におけ

る抑制種苗の使用とその生産的意義． 内海水研業績． 1969;103:pp153.

Park J. J., Kim H., Kang S. W., An C. M., Lee S. H., Gye C. G., Lee J. S. Sex ratio and Sex Reversal in Two-year-old Class of Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalva:Ostreidae). *Dev. Reprod.* 2012;16:385-388.

Russell-Hunter W.D. The evolution of filter-feeding bivalves. In:A life of invertebrates. *New York:MacMillian Publishing* 1979;pp650.

トバ D.R., トンプソン D.S., チュー K.K., アンダーソン G.J., ミラー M.B. ワシントン州におけるアサリ養殖ガイドブック 水産増養殖業書 42. 日水資協. 東京 1996;pp114.

Zhang Na., Xu Fei., Guo X. Genomic Analysis of the Pacific Oyster(*Crassostrea gigas*) Reveals Possible Conservation of the Vertebrate Sex Determination in a Mollusc. *Genetics* 2014;4:2207-2217.

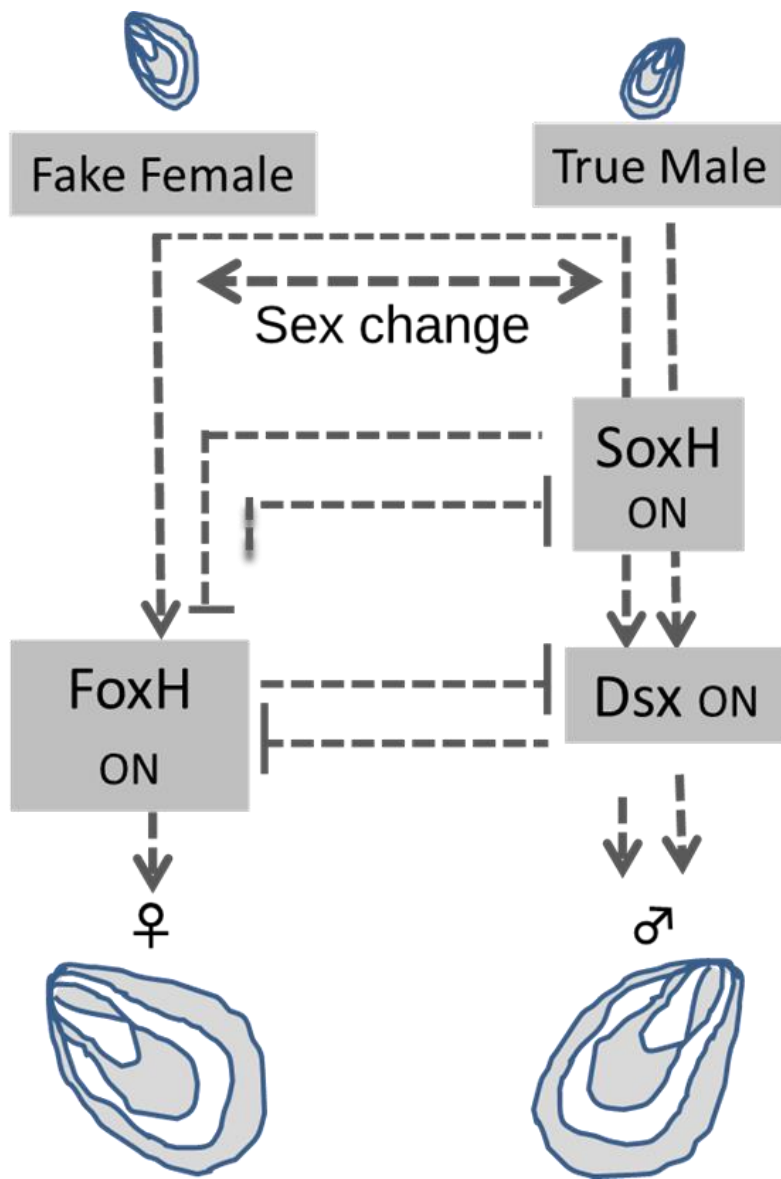


図 2-3-1. マガキ *Crassostrea gigas* の性決定の概念図。(Zhang et al., 2014)

表 2-3-2. 種苗生産した成長スピードが異なる貝の成長状況.

| | 試験開始時の殻高 | 海上中間育成施設による飼育後の殻高 | | | |
|-------------------|-------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | ① 10mm 選別群 | ② 12mm 選別群 | ③ 15mm 選別群 | ④ 18mm 選別群 |
| 平均殻高 (mm) | 14.8 | 15.0 | 20.7 | 23.1 | 24.3 |
| 殻高範囲 (mm) | 13.1 ~ 16.6 | 12.2 ~ 18.8 | 17.3 ~ 25.1 | 20.1 ~ 26.7 | 18.2 ~ 29.1 |
| 日間成長率 (mm / 日) | — | 0.22 | 0.59 | 0.83 | 0.95 |

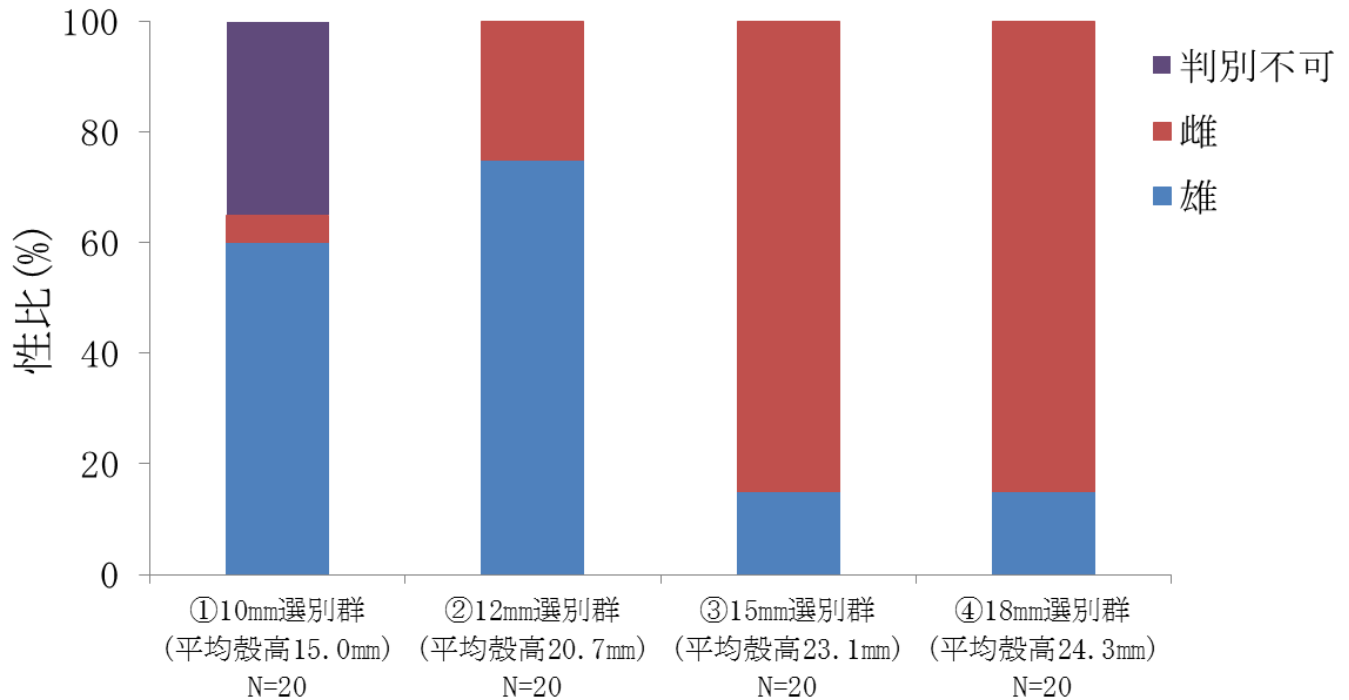


図 2-3-2. 種苗生産した成長スピードが異なる貝の性比.

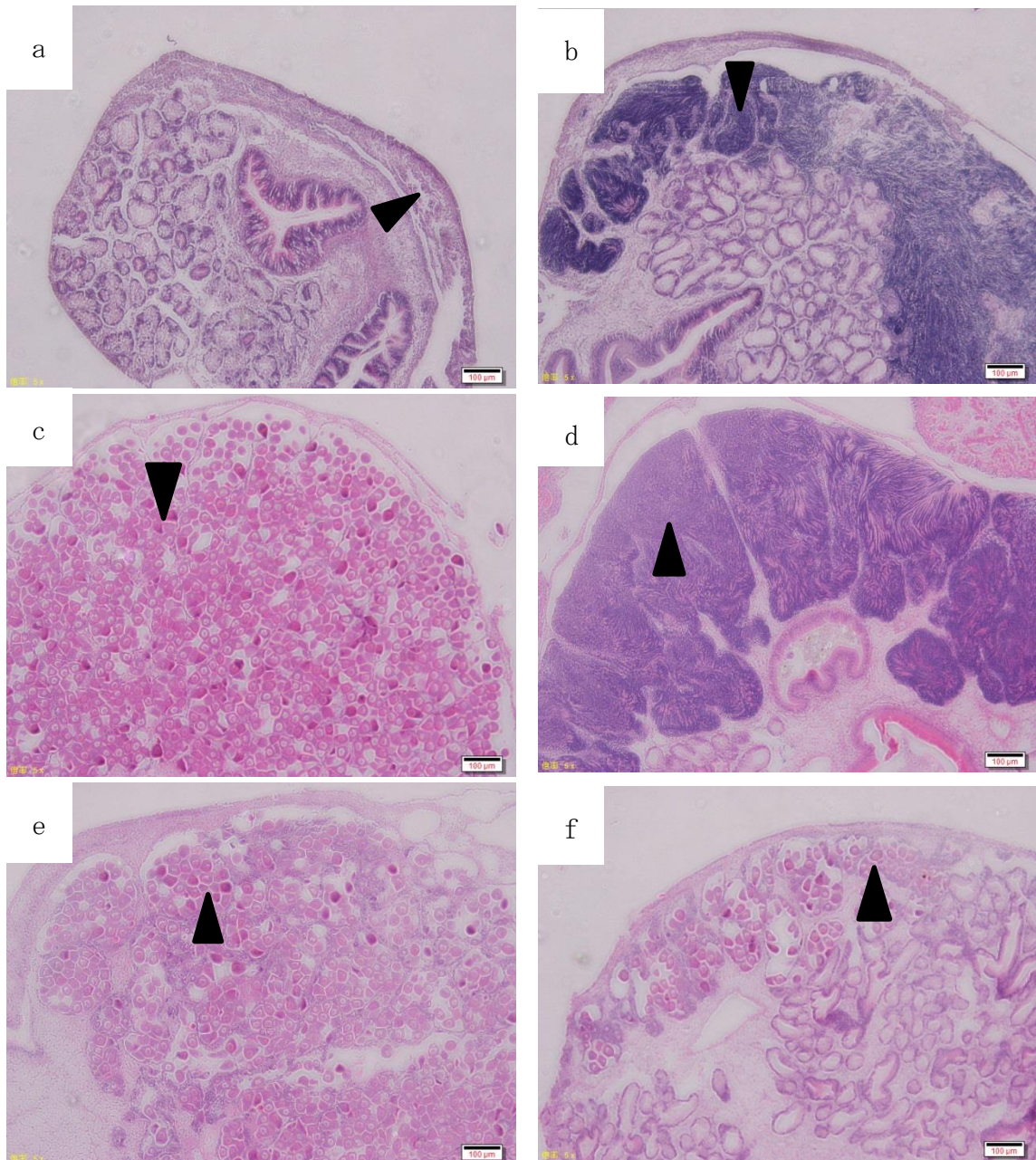


図 2-3-3. 種苗生産し海上中間育成装置で飼育後の成長が異なる貝の組織切片観察結果。(a)10mm 選別群の性比の判別不可の様子 (b)10mm 選別群の雄の生殖巣の様子 (c)12mm 選別群の雌の生殖巣の様子 (d)12mm 選別群の雄の生殖巣の様子 (e)15mm 選別群の雌の生殖巣の様子 (f)18mm 選別群の雌の生殖巣の様子 (※▲は卵巣および精巣を示す)

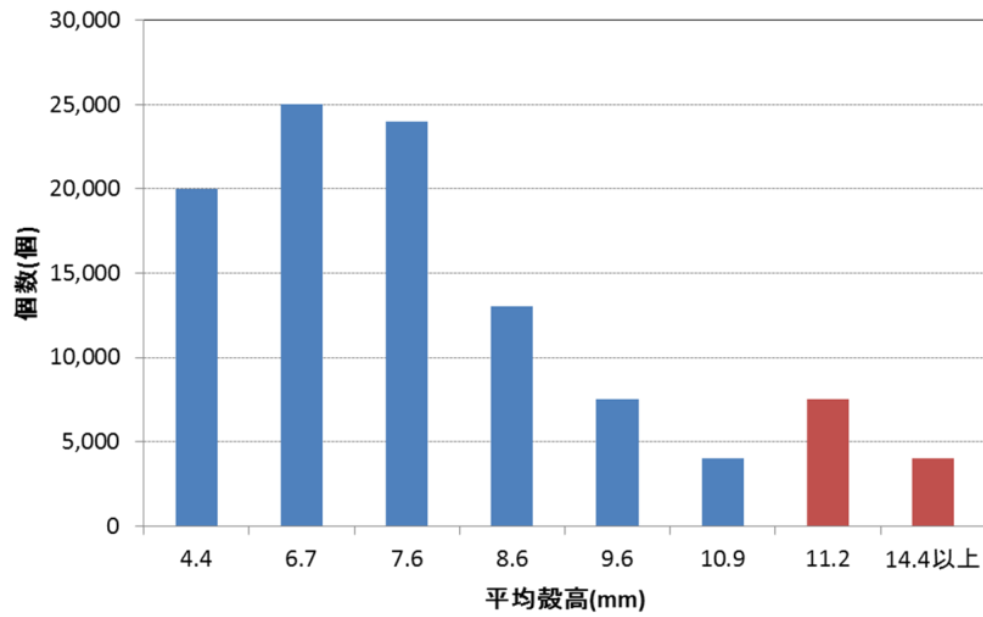


図 2-3-4. 試験に使用した高成長性で選抜した貝の選抜結果。(2014年5月23日に種苗生産し、2014年10月2日に高成長性で選抜したもの。赤い棒グラフが供試貝として用いた高成長性の群を表示)

表 2-3-3. 種苗生産し高成長性で選抜後、飼育環境の異なった貝の成長状況.

| | 陸上区 | | 非干出区 | | 干出区 | |
|-------------|------|------|------|-------|------|-------|
| | 開始時 | 終了時 | 開始時 | 終了時 | 開始時 | 終了時 |
| 平均殻高 (mm) | 15.9 | 38.1 | 15.9 | 31.05 | 15.9 | 27.78 |
| 平均殻長 (mm) | - | 29.8 | - | 24.96 | - | 22.65 |
| 平均殻幅 (mm) | - | 12.9 | - | 10.52 | - | 9.75 |
| 平均全重量 (g) | - | 7.50 | - | 4.59 | - | 3.43 |
| 平均むき身重量 (g) | - | 1.82 | - | 0.41 | - | 0.61 |

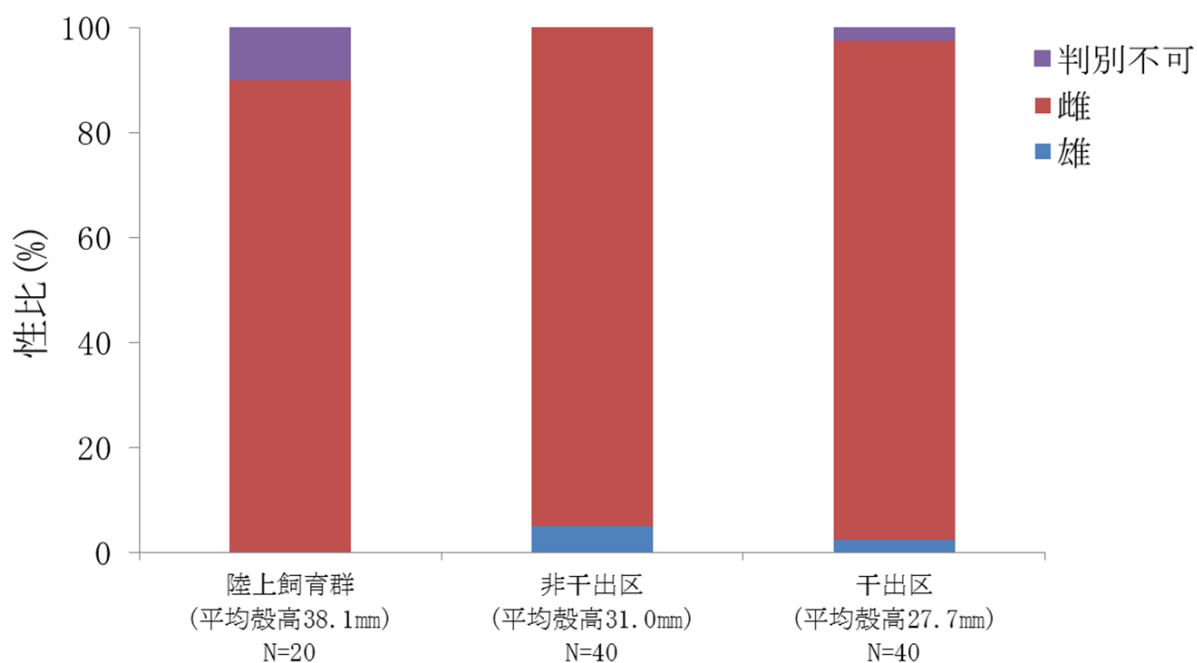


図 2-3-5. 種苗生産し高成長性で選抜後、飼育環境の異なった貝の性比.

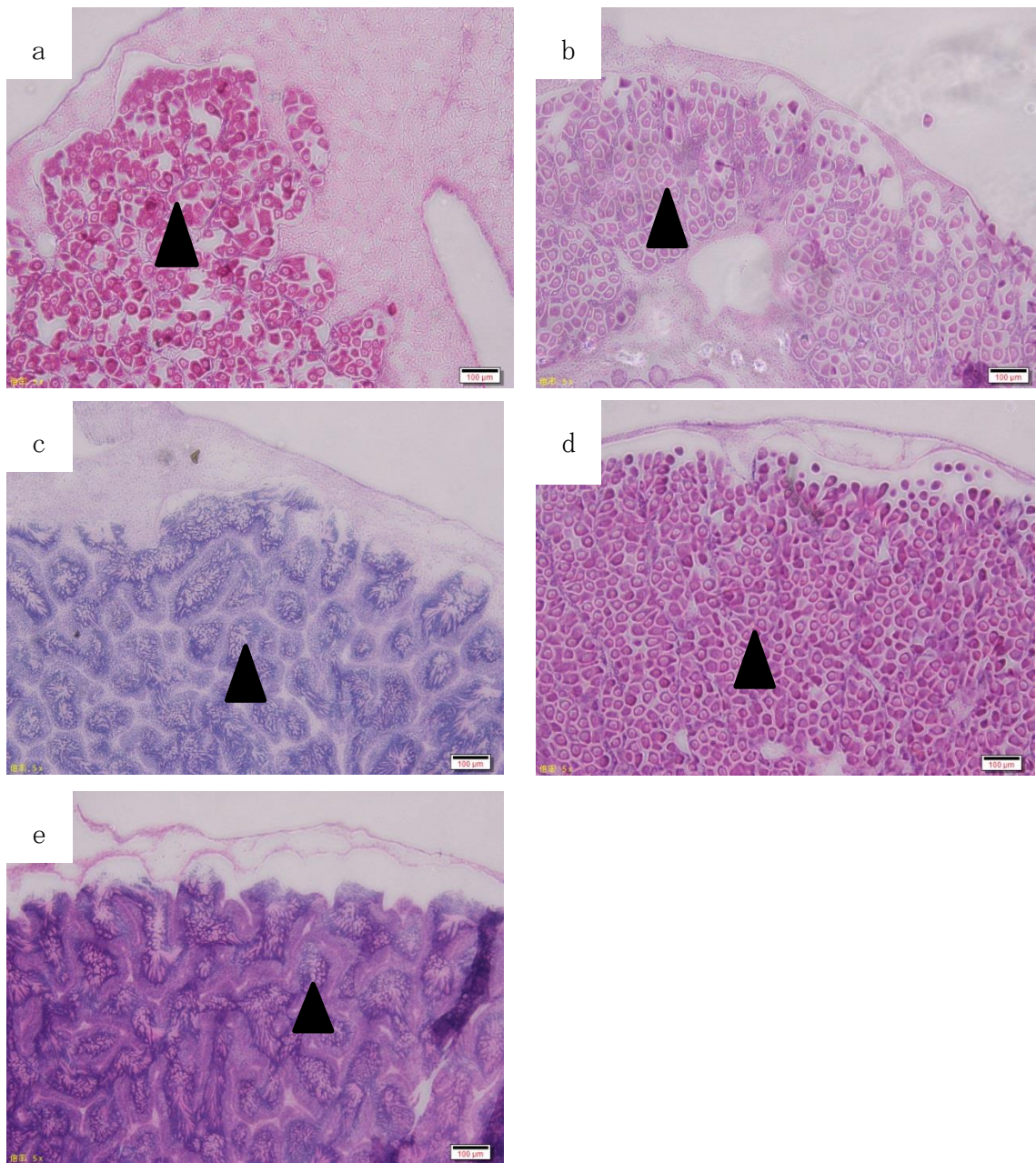


図 2-3-6. 各飼育群の組織切片観察結果. (a) 陸上飼育群の雌の生殖巣 (b) 非干出群の雌の生殖巣 (c) 非干出群の雄の生殖巣 (d) 干出群の雌の生殖巣 (e) 干出群の雄の生殖巣 (※▲は卵巣および精巣を示す)



図 2-3-7. 種苗生産した稚貝を用いて養殖していたシカメガキ（左）及び八代海地先に生息するシカメガキ天然群（右）（養殖貝は熊本県天草市御所浦の垂下水深4mで飼育していたもの）

表 2-3-4. 試験使用時の天然貝および養殖貝の大きさ．

| | 天然貝 | | 養殖貝 | |
|-------------|------|------|------|------|
| | 雌 | 雄 | 雌 | 雄 |
| 平均殻高 (mm) | 52.0 | 48.9 | 54.1 | 53.9 |
| 平均殻長 (mm) | 33.4 | 32.3 | 44.7 | 44.1 |
| 平均殻幅 (mm) | 23.1 | 22.3 | 21.4 | 21.4 |
| 平均全重量 (g) | 21.3 | 18.7 | 23.7 | 20.3 |
| 平均むき身重量 (g) | 4.0 | 3.6 | 5.7 | 4.3 |

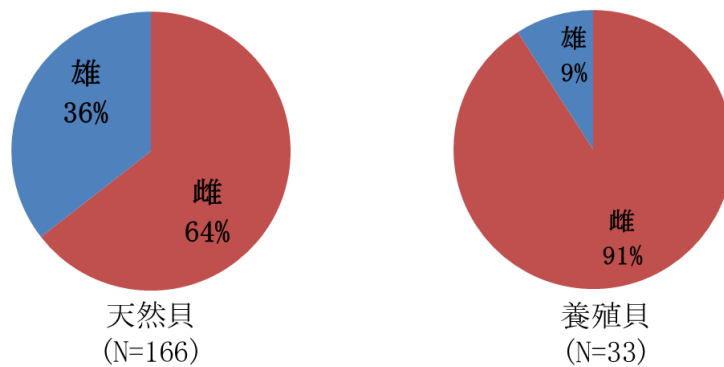


図 2-3-8. 天然貝および養殖貝の性比．

第3章 *hsp70* cDNAおよび*ef1* cDNAの単離および発現解析

3-1 序論

ヒートショックプロテイン（以下 HSPs）は、細菌から植物、ヒトを含め、すべての生物においてストレス反応を調節している（Srivastava, 2002）。HSPs は分子量によって分類されており（Feder et al., 1999）、環境ストレスによる細胞ダメージから、細胞を保護するためのタンパク質である。HSP70 ファミリーは最も高く保存されている分子シャペロンであり（Gething et al., 1992）、HSP70 ファミリーは、構成的に発現する HSC70 および、ストレス誘導型の HSP70 が存在する（Piano et al., 2002）。特に HSP70 は、ストレス状態の細胞内反応や、生物の生残や回復のために重要な役割を果たしている（Lindquist et al., 1986）。HSP70 の発現は、一般的に高温処理により発現が急上昇することが知られているが、他にも重金属、寄生虫、低酸素、塩分などのストレス要因によってもその発現が誘導されることから、様々な生物における、バイオマーカーとして広く使用されている（Sorensen et al., 2003）。

カキ類は、潮間帯のようなストレスの多い環境で生息していることから、しばしばストレス耐性と HSPs との関係性を調べる実験生物として使用されている（Fabbri et al., 2008）。カキ類の HSP70 ファミリーは、HSC70 および HSP70 が存在し、マガキ（Boutet et al., 2003）およびヒラガキ（Boutet et al., 2003）で、両者が異なった遺伝子配列によってコードされていることがわかっている。特にカキ類の HSP70 は、コントロールレベルでの発現がなく、高温処理後のみ発現する（Piano et al., 2002; Fabbri et al., 2008; Clegg et al., 1998; Piano et al., 2005）。そのため、カキ類のストレス状態の有無を把握するための有効な指標であることが考えられている（Clegg et al., 1998; Piano et al., 2005; Patterson et al., 2014）。

これまで、海洋生物の中で、特に二枚貝における、転写レベルでの発現量の測定などのアプローチは少ない (Boutet et al., 2003; Franzellitti et al., 2005)。HSP70 ファミリーの中で、カキ類を含めた二枚貝の利用できる遺伝子配列情報は、*C. gigas* (Boutet et al., 2003)、*C. virginica* (Rathinam et al., 2000)、*C. hongkongensis* (Zhang et al., 2013)、*M. galloprovincialis* (Franzellitti et al., 2005) などがある。

本章では、これまで利用できる遺伝子情報がなかった、シカメガキの *hsp70* cDNA および内部標準である *ef1* cDNA のクローニングを初めて行い、熱処理による発現解析を行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 *hsp70* cDNA および *ef1* cDNA のクローニング

(1) 供試貝

クローニングの際に用いたシカメガキは、2013年7月に熊本県天草市御所浦町の養殖場で飼育していた殻高 5-6cm の貝を用いた。

(2) 調査日

2013年7月に実施した。

(3) *hsp70* cDNA および *ef1* cDNA のクローニングおよびシーケンス

全 RNA は、シカメガキより ISOGEN (Nippon gene Co., Tokyo, Japan) を用いて抽出し、逆転写反応は、GeneAmp®RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA.) を使用して 42°C, 30分で行った。シカメガキから *hsp70* cDNAs および *ef1* cDNAs をスクリーニングするため、*hsp70* の特異的プライマーを他のカキ類の HSP70s に関係した報告を参考にした (Zhang et al., 2012, De Decker et al., 2011)。

hsp70 cDNAおよび*ef1* cDNAを単離するため、表 3-1 の特異的なプライマーを用いて行った。

表 3-1 *hsp70* cDNA および *ef1* cDNA の単離のために用いたプライマーセット

| プライマー名 | Sequences (5' -3') |
|------------------|------------------------|
| <i>hsp70</i> -S | AAAGTGGAAATCATCGCCAA |
| <i>hsp70</i> -AS | CCTTTGTCGTTGGTGATGGTGA |
| <i>ef1</i> -S | CATCAACATTGTCGTCATTGG |
| <i>ef1</i> -AS | CTACGATCGCATTCTC |

S:sense primer. AS:antisense primer.

PCR 混合液 (0.2mM dNTPs, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl;ph 8.3) 、 1.5mM MgCl₂ の中でテンプレートとしてcDNAを使用し、1ユニットのTaq DNA ポリメラーゼおよびAmpliTaq Gold® DNA Polymerase(Applied Biosystems)を使用した。そのPCRコンディションは以下のように行った。95°Cで10分間のプレヒート処理を行い、94°Cで30秒、57°Cで30秒の30サイクルのPCRを行い、PCRの生成物はpT7Blueベクター(Novagen)へサブクローニング後、GenomeLab™GeXP Genetic Analysis System(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を使用してシーケンスした。

(4) 相同性解析および系統樹の作成方法

HSP70 および EF1 の塩基配列の解析は、DDBJの Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索で行った。また、系統樹の作成は、シカメガキの HSP70 および EF1 のアミノ酸シーケンスと他のカキ類のものを、MEGA5.1 ソフトウェアを用いneighbor-joining法で行った。カキ類の HSC70 およびカキ

類以外の二枚貝の EF1 をそれぞれアウトグループとして用いた。

3-2-2. シカメガキの各組織の *hsp70* mRNA の発現解析

(1) 供試貝

発現解析に用いたシカメガキは、2013年7月に熊本県天草市御所浦町の養殖場で飼育していた殻高 5-6cm の貝を用いた。測定まで 20-22 °C の陸上水槽で飼育を行った。

(2) リアルタイム PCR による *hsp70* mRNA の相対的発現解析

全 RNA は ISOGEN (Nippon Gene) を使用してシカメガキの各組織 (鰓、外套膜、貝柱) より抽出し、cDNA は仕様書に従い ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo Co., Japan) を使用して全 RNA から合成した。 *ef1* が以前の報告で安定的な内部標準となることとして使用した (De Decker et al., 2011)。

リアルタイム PCR は、LightCycler 480 (Roche) の SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) でシーケンス結果より作成した特異的なプライマー (表3-2) : *hsp70* (DNA Data Bank of Japan [DDBJ] accession no. LC195299)、 *ef1* (DDBJ accession no. LC195300) を用いて測定した。

表 3-2 リアルタイム PCR に用いた特定のプライマーセット

| プライマー名 | Sequences (5' -3') |
|------------------|-----------------------|
| <i>hsp70</i> -S | GATAGTAAACGAACCCACAGD |
| <i>hsp70</i> -AS | TGAGTCGTCTCAGTGAACGG |
| <i>ef1</i> -S | ATGTTATCTCCGTGCCATCC |
| <i>ef1</i> -AS | TGGTATCTCGGCTAACGGAC |

S:sense primer. AS:antisense primer.

PCRの設定は95°Cで5分のプレヒート処理を行い、95°Cで10秒、55°Cで10秒、72°Cで10秒を45サイクル行った。結果は、*ef1*を内部標準として、熱処理前の貝の値をコントロールとして算出した。結果は、*ef1*を内部標準として、熱処理前の貝をコントロール値として算出した。

(3) 熱ショック処理

熱処理は、ThermoMinder (Taitec, Saitama, Japan) を用い、20-22°Cで飼育していた貝を、40°Cで1時間の熱処理を行った。

(4) サンプルング方法

貝は、熱処理前（コントロール）および熱処理後0時間で外套膜、鰓、貝柱を採取した。すべてのサンプルは使用するまで、採取後すぐに-80°Cで保存した。

(5) 統計処理法

各組織の遺伝子の発現レベルは、それぞれのコントロールレベルを1として比較した。また、コントロールレベルとの間に有意な差が存在するかは、student's t-test によって求めた。これによりP値が0.05以下のものを有意な差として認めた。各3個体ずつを統計処理に用いた。

3-3. 結果

3-3-1 *hsp70* cDNAおよび*ef1* cDNAのクローニング

得られた部分的な長さの*hsp70* cDNAは1461bp、487のアミノ酸ポリペプチドがコードされていた (DDBJ accession no. LC195299) (図3-1)。シカメガキのHSP70のアミノ酸配列は、他のカキ類のHSP70sとの相同性解析結果から、それぞれ *C. gigas* HSP70 (DDBJ accession no. BAD15286) と 99.0%、

C. hongkongensis HSP70 (DDBJ accession no. FJ157365) と 99.0%、
C. virginica HSP70 (DDBJ accession no. AJ271444) と 98.0% と非常に高い相同性を示した。一方で他のカキで報告されているHSC70sと 91.0%の相同性を示した。系統樹分析でも、シカメガキの *hsp70* は他のカキ類のHSP70sと非常に近縁であることは明らかとなった一方で、他のカキ類の HSC70 とは、区別されていた (図3-2)。アミノ酸シーケンスでは、HSP70 ではHSP70 ファミリーの特異的な配列である IFDLGGGTFDVSIL と VVLVGGSTRIPK (Guputa et al., 1994) や、グリコサイレーションドメインであるNKSIやNVSAを含んでいた (図3-3)。さらに、シカメガキの HSP70 はカキ類の HSP70 で特異的に保存されているATPaseドメイン中のセリン残基を含んでいた。しかし、カキ類のHSC70sの特異的な機能と対応するグリコサイレーションドメイン中のNQSQTetraペプチドは含んでいなかった (Laursen et al., 1997)。

得られた部分的な長さの *ef1* cDNAは、1128bp、376のアミノ酸ポリペプチドがコードされていた (DDBJ accession no. LC195300) (図3-4)。予想されたEF1のアミノ酸配列は、他のカキ類のEF1との相同性解析結果において、*C. gigas* EF1 (DDBJ accession no. AB122066) と 98.0%、*C. ariakensis* EF1 (DDBJ accession no. EF502000) と 97.0%、*O. edulis* EF1 (DDBJ accession no. EU651798) と 86%とこれまで報告されているカキ類のEF1と非常に高い相同性を示した。系統樹分析結果では、他のカキ類のEF1と非常に近い結果が示され、一方でカキ類以外の二枚貝とは区分されていた (図3-5, 図3-6)。

3-3-2 シカメガキの各組織の *hsp70* mRNAの発現解析

20℃で飼育していたシカメガキを40℃ 1時間の熱処理後、鰓、外套膜、閉殻筋の *hsp70* mRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定した。その結果、すべての

組織で、20-22℃で飼育していた貝では低い発現を示し、熱処理1時間後で、*hsp70* mRNAの発現量は鰓で515倍、外套膜で696倍、閉殻筋で1,234倍となり、閉殻筋>外套膜>鰓の順に高い結果を示すとともに、すべての組織で20-22℃で飼育していた個体と比較して有意に増加した(図3-7)。

3-4. 議論

本研究では、シカメガキから推定される487アミノ酸残基をコードしたcDNAを単離した。得られたアミノ酸配列は、アミノ酸相同性解析結果から、他のカキ類のHSC70sよりもHSP70sとより高い相同性を示した(図3-2)。加えて、シカメガキのHSP70はATPドメイン内に保存されているセリン残基を含んでいたが、カキ類のHSC70の特徴であるNQSQテトラペプチドは含んでいなかった(図3-3; Laursen et al., 1997)。これらの結果から、シカメガキより単離されたcDNAは*hsp70* cDNAであると考えられた。一方、シカメガキの*ef1* cDNAでは、380アミノ酸残基をコードしたcDNAを単離した。得られたアミノ酸配列は、アミノ酸相同性解析結果から、他のカキ類のEF1sと高い相同性を示し、今回得られたcDNAはシカメガキ*ef1* cDNAであると考えられた(図3-5, 図3-6)。

次に、20-22℃で飼育していた貝を40℃で1時間の熱処理後、鰓、外套膜、閉殻筋における熱処理後の*hsp70* mRNAの発現を測定した。その結果、すべての組織で20-22℃で飼育していた貝と比較して有意に高い発現が認められた(図3-7)。これらと同様な発現パターンは、*C. hongkongensis*(Zhang et al., 2012)や*O. edulis*(Piano et al., 2005)のストレス誘導型*hsp70* mRNAにおいても報告されている。これらの結果は、今回単離したシカメガキ*hsp70*が典型的なストレス誘導型の遺伝子であることが示された。

参考文献

Boutet I., Tanguy A., Rousseau S., Auffert M., Moraga D. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chap.* 2003;8:76-85.

Clegg J.S., Uhlingher K.R., Jackson S.A., Cherr G.N., Rifkin E., Friedman C.S. Induced thermotolerance and heat shock protein-70 family in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1998;7:21-30.

De Decker.S., Saulnier D. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 2011;34:939-945.

Fabbri E., Valbonesi P., Franzellitti S. HSP expression in bivalves. *ISJ5.* 2008;135-161.

Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperons, and the stress response: evolutionally and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999;61:243-282.

Franzellitti S., Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Physiol.* 2005;336: 1157-1163.

Gething M.J., Sambrook L. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.

Gupta R.S., Singh B. Phylogenetic analysis of 70kDa heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* 1994;4:1104-1114.

Laursen J.R, Liu H., Wu X.J., Yoshino T.P. Heat-shock response in a molluscan cell line : characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. *J. Invertebr. Pathol.* 1997;70:226-233.

Lindquest S.L. The heat-shock responses. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:1151-1191.

Patterson H.K., Boettcher A., Carmichael R.H. Biomarkers of Dissolved Oxygen Stress in Oysters: A tool for Restoration and Management Efforts. *PLOS ONE* 2014;9:e104440.

Piano A., Asirelli C., Caselli F., Fabbri E. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chap.* 2002;7:250-257.

Piano A., Franzellitti S., Tinti F., Fabbri E. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene* 2005;361:119-126.

Rathinam A.V., Chen T.T., Grossfeld R.M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70kDa heat shock Protein (Hsp70) of The American Oyster (*Crassostrea virginica*). *DNA Seq.* 2000;11:261-264.

Sorensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol.Lett.* 2003;6:1025-1037.

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:185-194.

Zhang Z., Zhang Q. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green. *Gene* 2012;49:172-180.

```

1   AAA GTG GAA ATC ATC GCC AAC GAC CAA GGA AAC AGA ACG ACG CCC AGT TAC GTC GCC TTC ACA GAC ACC GAC ACC
1   K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T D T
76  GAG AGA CTG ATA GGA GAT GCG GCT AAA AAC CAG GTA GCC ATG AAC GCC AAC AAT ACA ATC TTT GAC GCT AAG AGG
26  E R L I G D A A K N Q V A M N A N N T I F D A K R
151 CTG ATA GGA CGC AAG TTC AAC GAC GAC ACT GTA CAG TCC GAC ATG AAA CAT TGG CCG TTC ACG GTG ATC AAT GAT
51  L I G R K F N D D T V Q S D M K H W P F T V I N D
226 GGA GGA AAA CCC AAG CTA GAA GTG GAG TTC AAG AAC GAG AAA AAG AGA TTT ACC CCC GAA GAA ATC AGC TCA ATG
76  G G K P K L E V E F K N E K K R F T P E E I S S M
301 GTG CTG ACC AAA ATG AAG GAG ACA GCA GAA GCT TAC TTG GGA CAA ACT GTC CGA GAC GCA GTC ATC ACA GTT CCT
101 V L T K M K E T A E A Y L G Q T V R D A V I T V P
376 GCC TAT TTC AAC AAC GCC CAG AGA GAG GCC ACT AAA GAT GCC GGA GTG ATA GCC GGT CTC AAT GTT CTC AGG ATA
126 A Y F N N A Q R E A T K D A G V I A G L N V L R I
451 GTA AAC GAA CCC ACA GCT GCC GCT CTG GCC TAT GGT CTG GAT AAG AAC ATT TCC GGT GAG AAA AAC GTT CTC ATC
151 V N E P T A A A L A Y G L D K N I S G E K N V L I
526 TTT GAC CTC GGA GGT GGT ACA TTT GAC GTG TCC ATC CTT ACC ATT GAT GAG GGT TCC ATA TTT GAG GTT CGC TCC
176 F D L G G G T F D V S I L T I D E G S I F E V R S
601 ACT GCA GGG GAT ACT CAC CTG GGA GGT GAA GAT TTC GAC AAC AGA ATG GTC AAT CAC TTC GTG CAG GAA TTC AAG
201 T A G D T H L G G E D F D N R M V N H F V Q E F K
676 CGC AAG TAC AAC AAA GAC ATT TCC AAA AAT AAC CGT TCA CTG AGA CGA CTC AGG ACG GCT TGC GAG CGA GCC AAG
226 R K Y N K D I S K N N R S L R R L R T A C E R A K
751 AGA ACA CTG TCC AGC AGT TCT GAG GCC AAC ATT GAG ATC GAC TCG CTG TTT GAA GGA TTA GAC TTC TAC AGC AAA
251 R T L S S S S E A N I E I D S L F E G L D F Y S K
826 ATC ACA CGA GCT AGA TTT GAA GGA CTG TGT GCA GAT TTG TTT CGT GGA ACC CTA GAA CCC GTA GAG AAA GCC CTG
276 I T R A R F E G L C A D L F R G T L E P V E K A L
901 AGG GAC GCC AAA ATG GAC AAA TCT AAG ATT CAC GAG GTG GTT CTG GTT GGA GGG TCG ACA AGA ATT CCA AAG ATA
301 R D A K M D K S K I H E V V L V G G S T R I P K I
976 CAA AAA ATG CTG CAA GAC TTC ATG GGC GGA AAA GAA CTG AAC AAA TCT ATC AAC CCA GAT GAA GCT GTG GCC TAT
326 Q K M L Q D F M G G K E L N K S I N P D E A V A Y
1051 GGT GCC GCT GTC CAA GCG GCT ATT CTG AAG GGA GAT AAG AGT GAT GCC ATC AAG GAC GTT CTC CTG GTC GAT GTC
351 G A A V Q A A I L K G D K S D A I K D V L L V D V
1126 ACT CCA TTG TCT CTA GGC ATT GAA ACT GCT GGA GGG GTC ATG ACA AAG ATC GTC GAA CGA AAT GCC AAG ATT CCT
376 T P L S L G I E T A G G V M T K I V E R N A K I P
1201 ACC AAG GCA TCA CAG ACC TTT ACC ACA TAC TCC GAT AAC CAG CCC GGT GTA TCC ATT CAG GTG TTT GAA GGT GAA
401 T K A S Q T F T T Y S D N Q P G V S I Q V F E G E
1276 CGA GCC ATG ACA AAA GAC AAT AAC AAA TTA GGT ACC TTT GAA CTG AAT GGA ATT CCT CCA GCC CCT CGA GGT GTC
426 R A M T K D N N K L G T F E L N G I P P A P R G V
1351 CCA CAG ATT GAC GTG GAG TTT GAC ATT GAC GCC AAC GGT ATC CTG AAC GTA TCA GCC AAG GAC AAG AGC ACG GGA
451 P Q I D V E F D I D A N G I L N V S A K D K S T G
1426 AAG TCC AAC AAA ATC ACC ATC ACC AAC GAC AAA AGG
476 K S N K I T I T N D K G

```

図 3-1. シカメガキ HSP70 の部分的な遺伝子配列と推定されたアミノ酸シーケンス解析結果. 下線は HSP70 ファミリーの signature シーケンスを示し、二重線はグリコサイレシヨンドメインを示す。

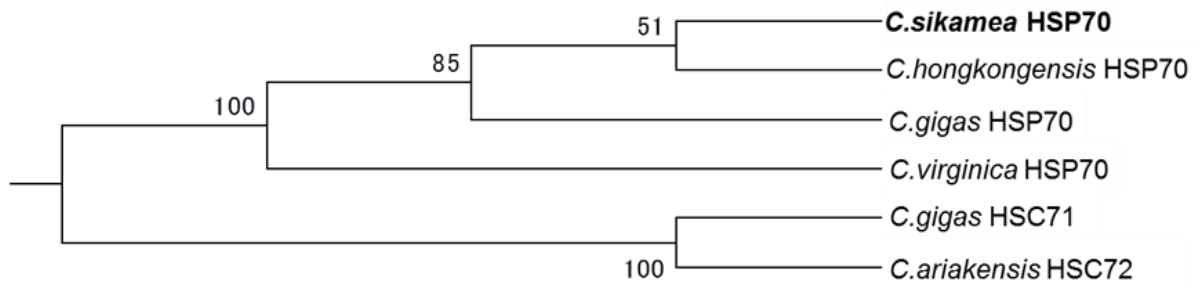


図 3-2. シカメガキ HSP70 と他のカキの HSP70 のアミノ酸シーケンスの系統樹解析結果。(アウトグループとして他のカキ類で報告されている HSC70s を使用し、系統樹は MEGA5.1 を使用して neighbor-joining 法で行った。各枝でブートストラップ値 (N=100) を示した。GeneBank データベースアクセスナンバーは、*C. sikamea* HSP70, LC195299; *C. gigas* HSP70, BJH818426; *C. hongkongensis* HSP70, FJ157365; *C. virginica* HSP70, AJ271444; *C. gigas* HSC71, AF14464; *C. ariakensis* HSC72, AA041703)

| | |
|---------------------------------|--|
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | KVEI I L A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T D T E R L I G D A A K N Q V A M N A N N T I F D A K R L I G R K F N D D T V Q S D M K H W P F T V I N D G G K P K L E 82 |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | -----S----- |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | -----S----- |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | -----S-----T-----E S - A -----V S ----- |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -----V-----P-----A S -----Q A S - M I K ----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -----G-----V-----P-----A S -----Q A S - M I K ----- |
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | V E F K N E K R R F T P E E I S S M V L T K M K E T A E A Y L G Q T V R D A V I T V P A Y F N N A Q R E A T K D A G V I A G L N V L R I V N E P T A A A L A Y G L D 164 |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | -----V----- |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | ----- |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | ----- |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -Y-G-E-T-SA-V-----N-----K-INN-V-----D S - Q -----T-S-----I-----I----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -G-E-T-SA-----N-E-----K-INN-V-----D S - Q -----T-S-----I-----I----- |
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | <u>K N I S</u> <u>***</u> <u>G E K N V L I F D L G G G T F D V S I L T I D E G S I</u> F E V R S T A G D T H L G G E D F D N R M W N H F V Q E F K R K Y N K D I S K N N R S L R R L 242 |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | <u>***</u> |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | <u>***</u> |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | <u>***</u> D |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -K V G N Q S Q - R -----E D - K - S -----I-----H K -----E - K - A V ----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -K V G N Q S Q - G R -----E D - K - S -----I-----H K -----E - K - A V ----- |
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | R T A C E R A K R T L S S S S E A N I E I D S L F E G L D F Y S K I T R A R F E G L C A D L F R G T L E P V E K A L R D A K M D K S K I H E V V L V G G S T R I P K 324 |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | -----M-----E M ----- |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | -----M-----E M ----- |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | -----T-----E-----A----- |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -----Q-S-----I-TS-----E-N-----M-----L-AQ-DI-L----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -----Q-S-----I-TS-----E-N-----M-----L-AQ-DI-L----- |
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | <u>I Q K M L Q D F M G G K E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L K G D K S D A I K D V L L V D V T P L S L G I E T A G G V M T K I V E R N A K I P T K A S Q T 406</u> |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | ----- |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | ----- |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | -----Q-----R-V-----I----- |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -----L-FN-----S-----E E V Q - L - L -----N L I K - T T -----Q T ----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -----L-FN-E-----G-S-----E E V Q - L - L -----N L I K - T T -----Q T ----- |
| <i>C. sikamaea</i> HSP70 | F T T Y S D N Q P G V S I Q V F E G E R A M T K D N N K L G T F E L N G I P P A P R G V P Q I D V E F D I D A N G I L N Y S A K D K S T G K S N N I T I T N D K G 487 |
| <i>C. gigas</i> HSP70 | -----R----- |
| <i>C. hongkongensis</i> HSP70 | ----- |
| <i>C. virginica</i> HSP70 | -----E----- |
| <i>C. gigas</i> HSC71 | -----L-Y-----L-K-T-----E-T-----V-----E-K----- |
| <i>C. ariakensis</i> HSC72 | -----L-Y-----L-K-T-----E-A-----V-----E-K----- |

図 3-3. シカメガキの HSP70 と他のカキ類の HSP70s および HSC70s のアミノ酸の相同性解析結果。(ATPase 中に保存されているセリン残基 (S) は四角で囲い、HSP70 ファミリーの特異的な配列を一重線で、グリコサイレシヨンドメインは二重線を引いている。NQSQ テトラペプチドは灰色の四角で囲った。GeneBank データベースアクセス番号は、*C. gigas* HSP70, BAD15286; *C. hongkongensis* HSP70, FJ157365; *C. virginica* HSP70, AJ271444; *C. gigas* HSC71, AF14464; *C. ariakensis* HSC72, AA041703)

```

1   CAT CAA CAT TGT CGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG AAA ATC AAC CTC CAC TGG CCA TCT CAT TTA CAA ATG TGG
1   I   N   I   V   V   I   G   H   V   D   S   G   K   S   T   S   T   G   H   L   I   Y   K   C   G
76  TGG TAT TGA CCA GAG AAC CAT CCA AAA GTT CGA GAA GGA AGC TGC TGA GAT GGG AAA GGG TTC TTT CAA ATA CGC
26  G   I   D   Q   R   T   I   Q   K   F   E   K   E   A   A   E   M   G   K   G   S   F   K   Y   A
151 CTG GGT GTT GGA CAA ACT GAA GGC AGA GCG TGA ACG TGG TAT CAC CAT TGA CAT TGC TCT GTG GAA GTT CGA AAC
51  W   V   L   D   K   L   K   A   E   R   E   R   G   I   T   I   D   I   A   L   W   K   F   E   T
226 CAC CAA GTA CCA TGT CAC CAT TAT TGA TGC TCC CGG CCA CAG AGA TTT CAT CAA GAA CAT GAT TAC AGG AAC TTC
76  T   K   Y   H   V   T   I   I   D   A   P   G   H   R   D   F   I   K   N   M   I   T   G   T   S
301 ACA GGC TGA CTG TGC TGT GTT GAT CAT TGC TGC TGG TAC TGG TGA ATT TGA AGC TGG TAT CTC GGC TAA CGG ACA
101 Q   A   D   C   A   V   L   I   I   A   A   G   T   G   E   F   E   A   G   I   S   A   N   G   Q
376 AAC CCG TGA ACA CGC CTT GTT GGC TTT CAC TTT GGG AGT AAA GCA GCT CAT CAT TGG TGT CAA CAA AAA GGA CAG
126 T   R   E   H   A   L   L   A   F   T   L   G   V   K   Q   L   I   I   G   V   N   K   M   D   S
451 CAC TGA ACC ACC ATA CAG TGA GAG TCG ATT CAA TGA AAT CAA GGG TGA AGT AGA GAA GTA CAT CAA GAA GAT TGG
151 T   E   P   P   Y   S   E   S   R   F   N   E   I   K   G   E   V   E   K   Y   I   K   K   I   G
526 ATA CAA CCC CAA GGC TGT CCC CTT TGT CCC CAT CTC TGG ATG GCA CGG AGA TAA CAT GAT TGA GGC TTC CAC AAA
176 Y   N   P   K   A   V   P   F   V   P   I   S   G   W   H   G   D   N   M   I   E   A   S   T   K
601 GAT GGA GTG GTT CAA GGG ATG GTC CAT TGA GAG GAA AGA AGG AAA TGC CAG CGG AAA GAC CCT TTT GGA AGC TTT
201 M   E   W   F   K   G   W   S   I   E   R   K   E   G   N   A   S   G   K   T   L   L   E   A   L
676 GGA TTC TAT CCT GCC ACC AAA GAG ACC AAC TGA CTT ACC TCT TCG TCT TCC ACT TCA GGA TGT CTA CAA GAT TGG
226 D   S   I   L   P   P   K   R   P   T   D   L   P   L   R   L   P   L   Q   D   V   Y   K   I   G
751 AGG TAT TGG AAC AGT GCC AGT TGG TAG AGT GGA AAC TGG TAT TAT CAA ACC AGG TAT GGT TGT CAC CTT TGC TCC
251 G   I   G   T   V   P   V   G   R   V   E   T   G   I   I   K   P   G   M   V   V   T   F   A   P
826 ACC CAA CAT CAC CAC TGA GGT AAA ATC TGT GGA AAT GCA CCA CGA ATC TCT CCC AGA GGC TGT CCC TGG TGA CAA
276 P   N   I   T   T   E   V   K   S   V   E   M   H   H   E   S   L   P   E   A   V   P   G   D   N
901 TGT TGG CTT CAA CAT CAA GAA CGT GTC CGT TAA GGA AAT CCG TCG TGG AAA TGT CTG TGG AGA CAG CAA AAA TGA
301 V   G   F   N   I   K   N   V   S   V   K   E   I   R   R   G   N   V   C   G   D   S   K   N   D
976 TCC ACC AAA GGG CGC TAA GAA CTT CCT TGC CCA GGT CAT CAT CTT GAA CCA CCC TGG TGA GAT CAA GAA TGG ATA
326 P   P   K   G   A   K   N   F   L   A   Q   V   I   I   L   N   H   P   G   E   I   K   N   G   Y
1051 TGC GCC TGT CCT TGA TTG CCA CAC TGC TCA CAT TGC CTG CAA GTT TGT TGA AAT CAA AGA GAA ATG CGA TCG TCG
351 A   P   V   L   D   C   H   T   A   H   I   A   C   K   F   V   E   I   K   E   K   C   D   R   R
1126 TAG
376 S

```

図3-4. シカメガキ EF1 の部分的な遺伝子配列と推定されたアミノ酸シーケンス解析結果.

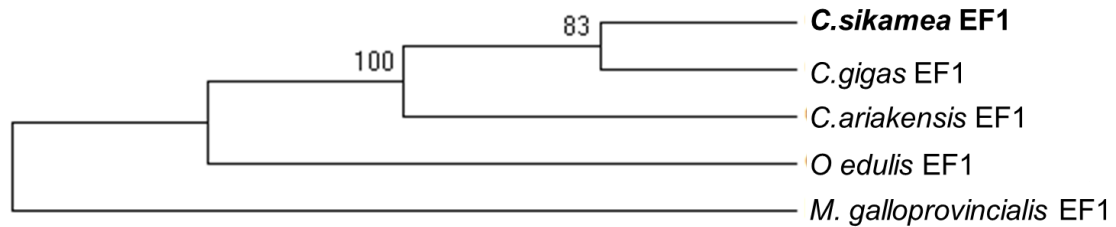


図 3-5. シカメガキ EF1 と他のカキの EF1 のアミノ酸シーケンスの系統樹解析結果。(アウトグループとしてカキ類でない二枚貝である *O.edulis* および *M.galloprovincialis* の EF1 を使用 (系統樹は MEGA5.1 を使用して neighbor-joining法で行った。各枝でブートストラップ値 (N=100) を示した。GeneBank データベースアクセスナンバーは、*C.sikamea* EF1, LC195300; *C.gigas* EF1, AB122066; *C.ariakensis* EF1, EF502000; *O.edulis* EF1, EU651798; *M.galloprovincialis* EF1, AB162021)

```

C. sikamea EF1 INIVVIGHVDSGKSTSTGHLIYKCGGIDQRTIQKFEKEAAEMGKGSFKYAWWLDKKAER 60
C. gigas EF1 -----
C. ariakensis EF1 -----
O. edulis EF1 -----T-----E--A-----

C. sikamea EF1 ERGITIDIALWKFETTKYHVTTIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIIAAGTGEFEAGI 121
C. gigas EF1 -----
C. ariakensis EF1 -----
O. edulis EF1 -----A--I-----V-----

C. sikamea EF1 SANGQTRHALLAFTLGVKQLIIGVNMKMDSTPEPPYSESRFNEIKGEVEKYIKKIGYNPKA 181
C. gigas EF1 -----A-----
C. ariakensis EF1 -----S-----
O. edulis EF1 -----K--T-----T

C. sikamea EF1 VPFVPISGWHGDNMIEASTKMEWFKGWSIERKEGNASGKTLLEALDSILPPKRPTDLPLR 241
C. gigas EF1 -----A-----
C. ariakensis EF1 -----P-----V-----
O. edulis EF1 -A-----Q-----NV-----F-LQ-----A--

C. sikamea EF1 LPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGIIKPGMVVTFAPPNITTEVKSVMHHESLPEAVPGDN 301
C. gigas EF1 -----
C. ariakensis EF1 -----
O. edulis EF1 -----M--I-----T-----

C. sikamea EF1 VGFNIKNSVKEIRRGNVCGDSKNDPPKGAKNLAQVILNHPGEIKNGYAPVLDCHTAH 361
C. gigas EF1 -----
C. ariakensis EF1 -----
O. edulis EF1 -----I-----

C. sikamea EF1 IACKFVEIKEKCDRRS 376
C. gigas EF1 -----
C. ariakensis EF1 -----
O. edulis EF1 -----R-----

```

図 3-6. シカメガキの EF1 のアミノ酸配列結果とこれまで報告されているカキ類とのアミノ酸相同性解析結果。(GeneBank データベースアクセスナンバーは、*C. gigas* EF1, AB122066; *C. ariakensis* EF1, EF502000; *O. edulis* EF1, EU651798)

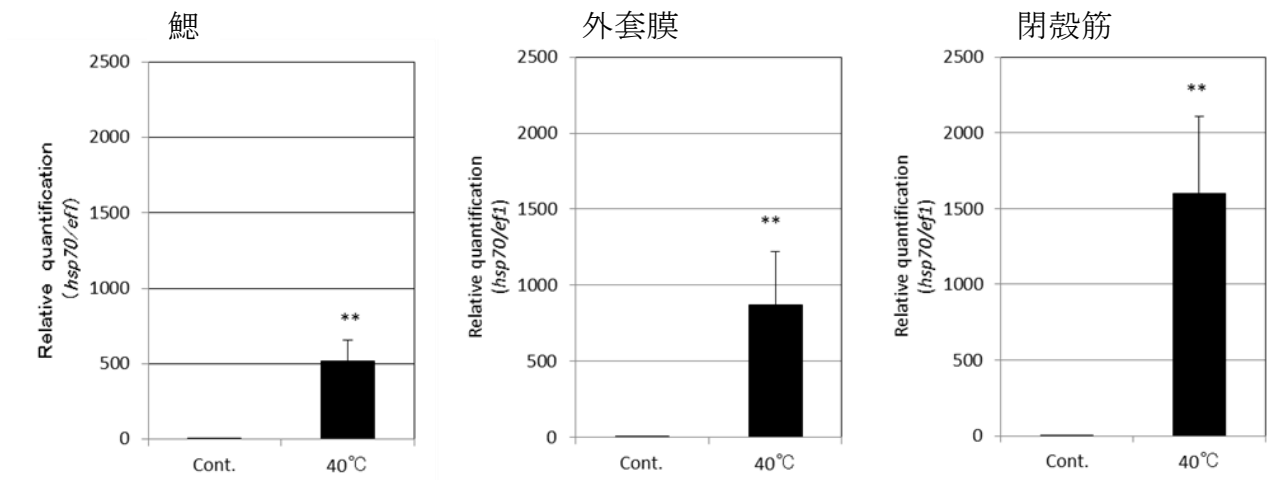


図3-7. シカメガキの鰓、外套膜、閉殻筋のコントロールレベル (20 °C) および高温処理 (40 °C 1時間) 後 0 時間における *hsp70* mRNA の発現解析結果 (すべてのサンプルは *ef1* を内部標準とし、コントロール値を基本値として算出. バーは 3 サンプルの標準誤差を示す. バーの上のアスタリスクはコントロールと比較した有意差を示す. 統計処理は student' s t-test により検定 (**P<0.01))

第4章 シカメガキの*hsp70* mRNAの発現パターンについて

4-1 序論

カキ類において事前の熱処理はHSP70を誘導し、より高い熱耐性をもたらすことが報告されており (Shamseldin et al., 1997; Hamdoun et al., 2003; Jackson et al., 2011)、また病原体への感染へも耐性をもたらす (Encomio et al., 2007)。そのため、事前の熱処理は養殖しているカキの熱耐性を改善するための効果的な方法になる可能性がある。しかしながら、カキ類における*hsp70* mRNAの発現と熱ストレスとの関連性については明らかとなっていない。

シカメガキは、アメリカのハーフシェル市場で非常に高い価値を持ったカキである (Usuki, 2002)。シカメガキはマガキの亜種の一つとして考慮されており、形態的に異なり、成長が遅く、サイズが小さく、深いカップが特徴である (Imai et al., 1961; Numachi 1971)。シカメガキとマガキの16S rDNAの比較では、7塩基の違いがあることが報告されている (Banks, 1993)。現在、シカメガキが天然に分布する海域で養殖が行われているが、成功事例はほとんどなく、夏に大量死が発生し大きな課題となっている。また、シカメガキの近縁種のマガキにおいても夏の大量死の事例は多く、成長や生残性に関して高い遺伝性があることが報告されている (Beattie et al., 1980; Degremont et al., 2005; Deremont et al., 2010)。そのため、選別育種はカキ類の夏の生残性を向上させる可能性がある。一方、シカメガキの性成熟がこれまでカキ類で報告されている記録の中で最も小型で早い時期に起こることが報告されたていることから (Martinetz et al., 2012)、シカメガキは選抜育種には適した種類であると考えられる。

第4章では、シカメガキにおける高温ストレスの下での発現パターンを調査し、シカメガキの熱耐性と*hsp70* mRNAの関係性について把握することを目的と

した。

4-2 材料と方法

(1) 供試貝

シカメガキは、実験1のカキの鰓の*hsp70* mRNAの発現のタイムコース分析では、2013年7月および2014年1月に、天草市御所浦町の養殖場で飼育されていた殻高5-6cmの貝を採取した。実験2の*hsp70* mRNAの発現と生残性のための分析では、2014年12月に熊本県上天草市水産研究センターで飼育されていた殻高2-3cmの貝を用いた。実験3の事前の熱処理後のカキの*hsp70* mRNAの発現と生残率のための分析では、2015年3月に熊本県上天草市水産研究センターで飼育されていた、殻高2-3cmの貝を用いた。すべての貝は、分析まで、20-22℃および10-12℃の飼育水温の元で飼育した。

(2) 熱処理

カキの熱処理は、Thermo Minder (Taitec, Saitama, Japan) で水温をコントロールした水槽で行った。実験1では、カキは37℃で1時間の熱処理を行った。熱処理後、飼育水槽に戻した。実験2では、26, 30, 34, 38, 42, 46℃に設定した水槽に1時間の熱処理を行い、処理後飼育水槽に戻し、併せて、その後各処理における1週間の生残性を調査した。実験3では、事前の熱処理を37℃および40℃で行い、熱処理5日後に42℃での熱処理を行い、熱処理後飼育水槽に戻した。加えて、各処理における1週間の生残率を調査した。

(3) サンプルの採取および準備

実験1では、熱処理前（コントロール）と熱処理後0, 3, 8, 24, 48時間にそれぞれ鰓を採取した。実験2では、熱処理前（コントロール）と各熱処理後

0 時間における鰓を採取した。実験 3 では、熱処理前（コントロール）と熱処理後 0, 3, 8, 24, 48 時間に各処理における鰓を採取した。すべてのサンプルは採取後、使用するまで -80°C で保存した。

(4) *hsp70* mRNAの相対的発現解析

全 RNA は ISOGEN (Nippon Gene) を使用してシカメガキの鰓より抽出し、cDNA は仕様書に従い ReverTra Ace[®] qPCR RTKit (Toyobo Co., Japan) を使用して全 RNA から合成した。リアルタイム PCR は、LightCycler 480 (Roche) の SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) でシーケンス結果より作成した特異的なプライマー（表4-1）：

hsp70 (DNA Data Bank of Japan [DDBJ] accession no. LC195299)、*ef1* (DDBJ accession no. LC195300) を用いて測定した。

表 4-1. リアルタイム PCR に用いた特定のプライマーセット

| プライマー名 | Sequences (5' -3') |
|------------------|-----------------------|
| <i>hsp70</i> -S | GATAGTAAACGAACCCACAGD |
| <i>hsp70</i> -AS | TGAGTCGTCTCAGTGAACGG |
| <i>ef1</i> -S | ATGTTATCTCCGTGCCATCC |
| <i>ef1</i> -AS | TGGTATCTCGGCTAACGGAC |

PCR の設定は 95°C で5分のプレヒート処理を行い、 95°C で10秒、 55°C で10秒、 72°C で10秒を45サイクル行った。結果は、*ef1* を内部標準として、熱処理前の貝の値をコントロールとして算出した。

(5) 統計処理法

各組織の遺伝子の発現レベルは、それぞれのコントロールレベルを1として比較した。また、コントロールレベルとの間に有意な差が存在するかは、Turkey's multiple comparison testにより求めた。これによりP値が0.05以下のものを有意な差として認めた。

4-3. 結果

4.3.1. 10-12℃および20-22℃で飼育したカキの鰓を用いた*hsp70* mRNAのタイムコース分析（実験1）

10-12℃および20-22℃で飼育したカキの鰓を用いた*hsp70* mRNAのタイムコース分析の結果を図4-1-aおよびbに37℃、1時間の熱処理後、元の飼育温度に戻して0, 3, 8, 24, 48時間後にシカメガキの鰓を採取し、*hsp70* mRNAの発現量をリアルタイムPCRを使用して測定した。10-12℃で飼育していたカキの*hsp70* mRNAの発現は、熱処理後3時間でコントロールレベルよりも有意に増加し、24時間後にコントロールレベルまで低下した（図4-1-a）。一方、20-22℃で飼育していたカキは、熱処理後0時間でコントロールレベルよりも有意に増加し、熱処理後8時間で大きく低下し、24時間後にコントロールレベルまで低下した（図4-1-b）。*hsp70* mRNAの発現は、10-12℃で飼育したカキと比較して20-22℃で飼育したカキのピークがより高く、早く発現した。その後、両飼育区ともに熱処理後24時間でコントロールレベルまで低下した。

4-3-2. 熱ショックによるシカメガキの生残率と*hsp70* mRNAの発現解析（実験2）

10-12℃および20-22℃で飼育したカキの鰓を用いた*hsp70* mRNAの発現解析

と生残率の解析結果を図 4-2-a および b に示した。10-12 °C および 20-22 °C で飼育したカキの生残率と *hsp70* mRNA の発現パターンを調査するため、26, 30, 34, 38, 42 または 46 °C で 1 時間の熱処理したシカメガキの鰓を使用し、リアルタイム PCR により *hsp70* mRNA の発現量を測定した。10-12 °C で飼育していたカキの *hsp70* mRNA の発現量は、コントロールと比較して、42 °C、1 時間の熱処理後だけで有意に増加した (図 4-2-a)。一方で、20-22 °C で飼育していたカキの *hsp70* 発現量は、34 °C から 42 °C、1 時間の熱処理まで増加し続けた (図 4-2-b)。一方、10-12 °C で飼育した貝の熱処理後の生残率は、38 °C、1 時間の熱処理で 100%、42 °C、1 時間の熱処理で 100%、46 °C、1 時間の熱処理で 0% であったが、20-22 °C で飼育していた貝の熱処理後の生残率は、38 °C、1 時間の熱処理で 83.3%、42 °C、1 時間の熱処理で 63.3%、46 °C、1 時間の熱処理で 0% であった。これらの結果から、20-22 °C で飼育していた貝の *hsp70* mRNA の発現パターンは、10-12 °C で飼育していた貝と比較して、より素早く、より高かった。また、全体的な生残率は、10-12 °C で飼育していた貝よりも 20-22 °C で飼育していた貝の方が低かった。

4-3-3. 事前の熱処理を行った貝の *hsp70* mRNA の発現と生残率の分析 (実験 3)

シカメガキを 37 °C および 40 °C、1 時間の事前の熱処理を行い、20-22 °C の飼育水温に戻した。事前の熱処理後 5 日目に、これらのカキに 42 °C、1 時間の熱処理を与え、生残率を調査した。事前の熱処理後においては、各処理区ともにへい死は発生しなかった。1 週間後の生残率は、37 °C、1 時間の事前の熱処理を行った貝は 95.8%、40 °C、1 時間の事前の熱処理を行った貝は 100%、事前の熱処理を行っていない貝は 62.5% であった (図 4-3-a)。事前の熱処理を行った貝の生残率は事前の熱処理を行っていない貝と比較して明らかに高かった。

一方、*hsp70* mRNAの発現レベルは、事前の熱処理を行った貝と比較して、事前の熱処理を行っていない貝がより高く、長いピークが認められた（図4-3-b）。

4-4. 議論

hsp70 mRNAのタイムコース分析では、20-22℃で飼育した貝は、10-12℃で飼育した貝と比較して、*hsp70* mRNAの発現が素早く、そして高く発現した。両飼育区共に、*hsp70* mRNAの発現がコントロールと比較して熱処理後すぐに、有意に高くなり、熱処理後8時間でコントロールレベルまで低下する発現パターンを示した。同様の発現パターンは他のカキ類においても報告されている

(Piano et al., 2005; Zhang et al., 2012)。ストレス誘導性のHSP70の発現は、潮間帯に生息する生物の急速な環境変化に適応するための戦略であることが考えられている (Fabbri et al., 2008)。したがって、この*hsp70* mRNAの急速な反応は、カキ類の共通の特徴になるかもしれない。

20-22℃で飼育していたカキの*hsp70* mRNAの発現は、10-12℃で飼育していたカキよりもより早く発現した（実験1）。さらに、生残率は20-22℃で飼育した貝は10-12℃で飼育した貝と比較してより低かった（実験2）。これらの結果は、20-22℃で飼育していた貝は低い熱耐性を示し、10-12℃で飼育していた貝は高い熱耐性を示すのとは対照的に、低い熱耐性の貝は、高い熱耐性の貝と比較して*hsp70* mRNAの発現パターンがより高く、素早いことが明らかとなった。異なったHSP70の発現レベルが、マガキの2つの異なった系統において報告されている (Samin et al., 2007)。夏の大量死するマガキの系統では、抵抗性のある貝と比較して、低酸素ストレスに対してより高いHSP70の発現が示されている。同じように、巻貝の一種である*Pomacea canaliculata*では、雌雄で熱ストレスに対する異なった感受性を持つことが示されており、雌よりも雄が熱ス

トレスに対する感受性が高く、*hsp70* mRNAの発現は、雌よりも雄がより素早く上昇する ((Song et al., 2014))。そのため、熱処理後*hsp70* mRNAの素早く、高い発現パターンは、カキ類の低い熱耐性の重要な指標となる可能性がある。

マガキやバージニアカキでは、事前の熱処理はHSP70の量を増やし、熱耐性を誘導することが報告されている (Shamseldin et al., 1997; Hamdoun et al., 2003; Jackson et al., 2011)。さらに、バージニアカキでは、事前の熱処理は熱耐性だけでなく、寄生虫の *P. marinus* への耐性を付与することが報告され (Encomio et al., 2007)、事前の熱処理は多様なストレスへの耐性を付与すると考えられている (Fabbri 2008)。この研究の中で、生残率は1時間の事前の熱処理を行った貝は無処理の貝と比較してより高く、*hsp70* mRNAの発現レベルは無処理の貝と比較して低く (実験3)、1時間の事前の熱処理は貝の熱耐性を誘導し、熱に対する感受性を低くすることができる。それゆえ、この方法は、養殖している貝の熱耐性を誘導するために役に立つ可能性がある。近年、この現象は、細菌からヒトまで幅広生物種において、細胞防御の一機構として働いていると考えられている (Fabbri et al., 2008)。事前の熱ショック処理は、HSPのレベルがすでに高いため、細胞内の防御機構がより早く起動するため、異なったタイプのストレスに曝された場合、転写、スプライシング、翻訳などのような細胞をすばやく保護していると考えられている (Fabbri 2008; De Maio, 1995)。

夏の大量死が発生している Kumamoto oyster であるシカメガキが養殖中の大きな課題である。この研究の中で、著者は、20-22℃の温かい水温で飼育した貝の低い熱耐性と、*hsp70* の発現に対する高い感受性があることを実証した。このように、シカメガキは温度が高い状況下で、ストレスが高い状態であることが考えられる。したがって、今後は、*hsp70* mRNAの発現をバイオマーカーと

して利用することで、高温への低い感受性の貝の選抜育種を実施し、これらの貝を養殖に使うことで夏の大量死を削減できる可能性が考えられる。

参考文献

- Banks M.A. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for subunit rRNA. *Mol. Mar. Bio. Biotech.* 1993;2:129-136.
- Beattie J.H., Kenneth K., Chew K., William K., Harshberger K. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceed. Natio. Shell. Accoc.* 1980;70:184-189.
- Degremont L., Bedier E., Soletchnik P., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samin J.F., Bourdry P. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 2005;249:213-229.
- Degremont L., Bedier L., Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II . Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 2010;299:21-29.
- Encomio V.G., Chu L.E. Heat shock protein (hsp70) expression and thermal tolerance in sublethally heat-shocked eastern oysters *Crassostrea virginica* infected with the Parasite *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.* 2007;76:251-260.

Fabbri E., Valbonesi P., Franzellitti S. HSP expression in bivalves. *ISJ5*. 2008; 135-161.

Hamdoun A.M., Cheney D.P., Cherr G.N. Phenotype plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 2003;205:160-169.

Imai T., Sakai S. Study of breeding the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J. Agric. Res.* 1961;12:125-171.

Jackson S.A, Uhlinger K.R., Clegg J.S. Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of hsp/hsc70 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 2011;317:168-174.

Maio D. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999;1:11-12.

Martinetz J.C., Vasquez-Yeomans R., Guerrero-Renteria Y. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) *Hidrobiologica* 2012;2:181-184.

Numchi N. Biological research on the oyster. In: Imai T *Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture. Koseisha Koseikaku Tokyo* 1971;82-105.

Piano A., Franzellitti S., Tinti F., Fabbri E. Sequencing and expression pattern

of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene* 2005;361:119-126.

Samin J.F., Degremont J., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Havet A., Bacca H., Wormhoudt V., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Soudant P., Nicolas J.L., Roux F.L., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Bourdry P. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 2007;268:227-243.

Shamseldin A., Clegg J., Friedman C., Cherr N., Pillai C. Induced thermotolerance in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 1997;16:487-491.

Song H.M., Mu X.D., Gu D.E., Luo D., Yang Y.X., Xu M., Luo J.R., Zhang J.E., Hu Y.C. Molecular characteristics of the HSP70 gene and its differential expression in female and male golden apple snails (*Pomacea canaliculata*) under temperature stimulation. *Cell Stress Chap.* 2014;19:579-589.

Usuki H. Evaluation of characteristics and preservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in view of the genetic resources. *Bull. Fish. Res. Agency* 2002;4:40-104.

Zhang Z., Zhang Q. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green. *Gene* 2012;49:172-180.

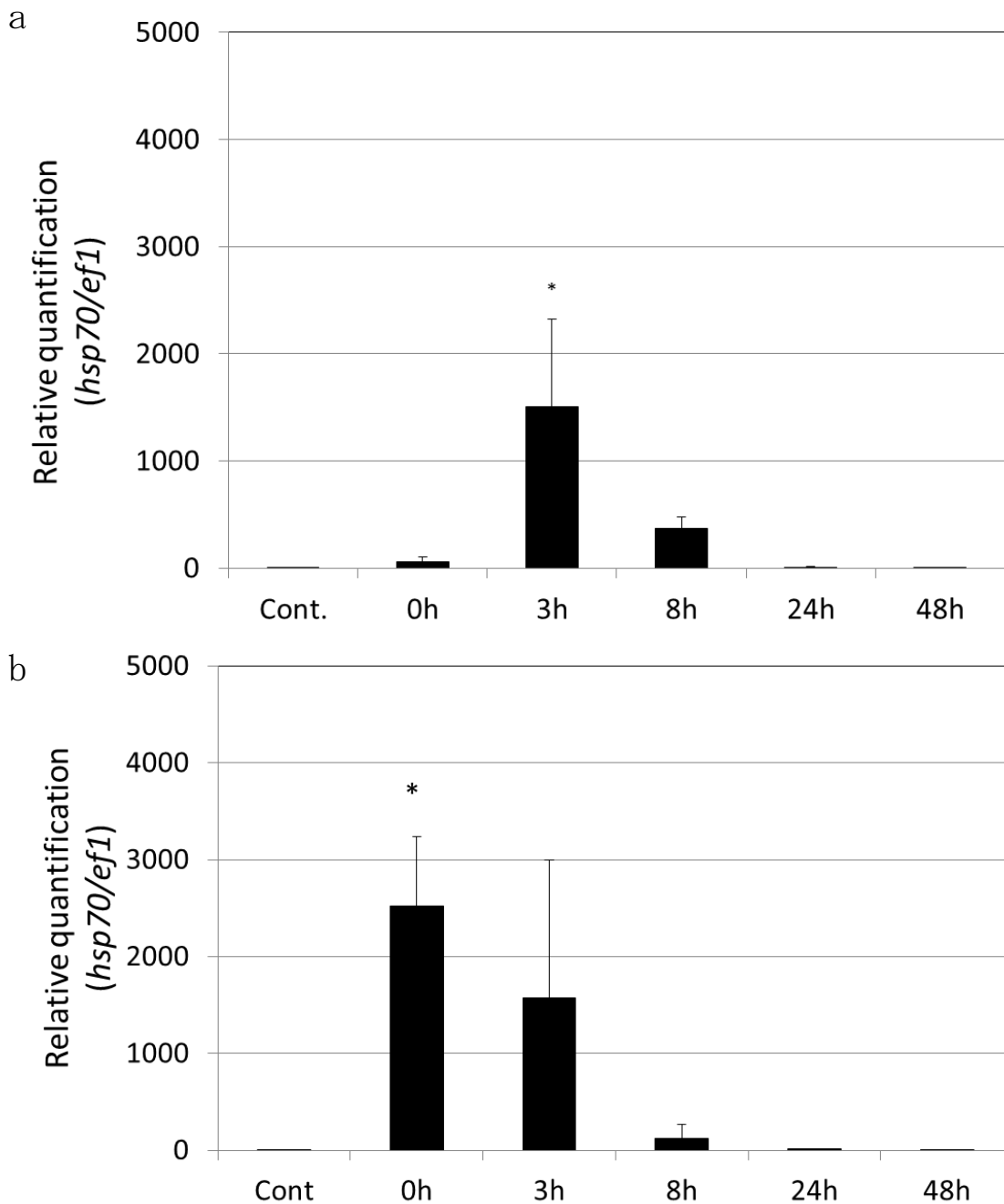


図4-1. 10-12°Cで飼育した貝 (a). 20-22°Cで飼育した貝 (b). の鰓における37°C 1時間の熱処理後の *hsp70* mRNA のタイムコース分析 (すべてのサンプルは *ef1* を内部標準とし、コントロール値を基本値として算出. バーは3~4サンプルの標準誤差を表示. バーの上のアスタリスクはコントロールと比較した有意差を表示 (*P<0.05))

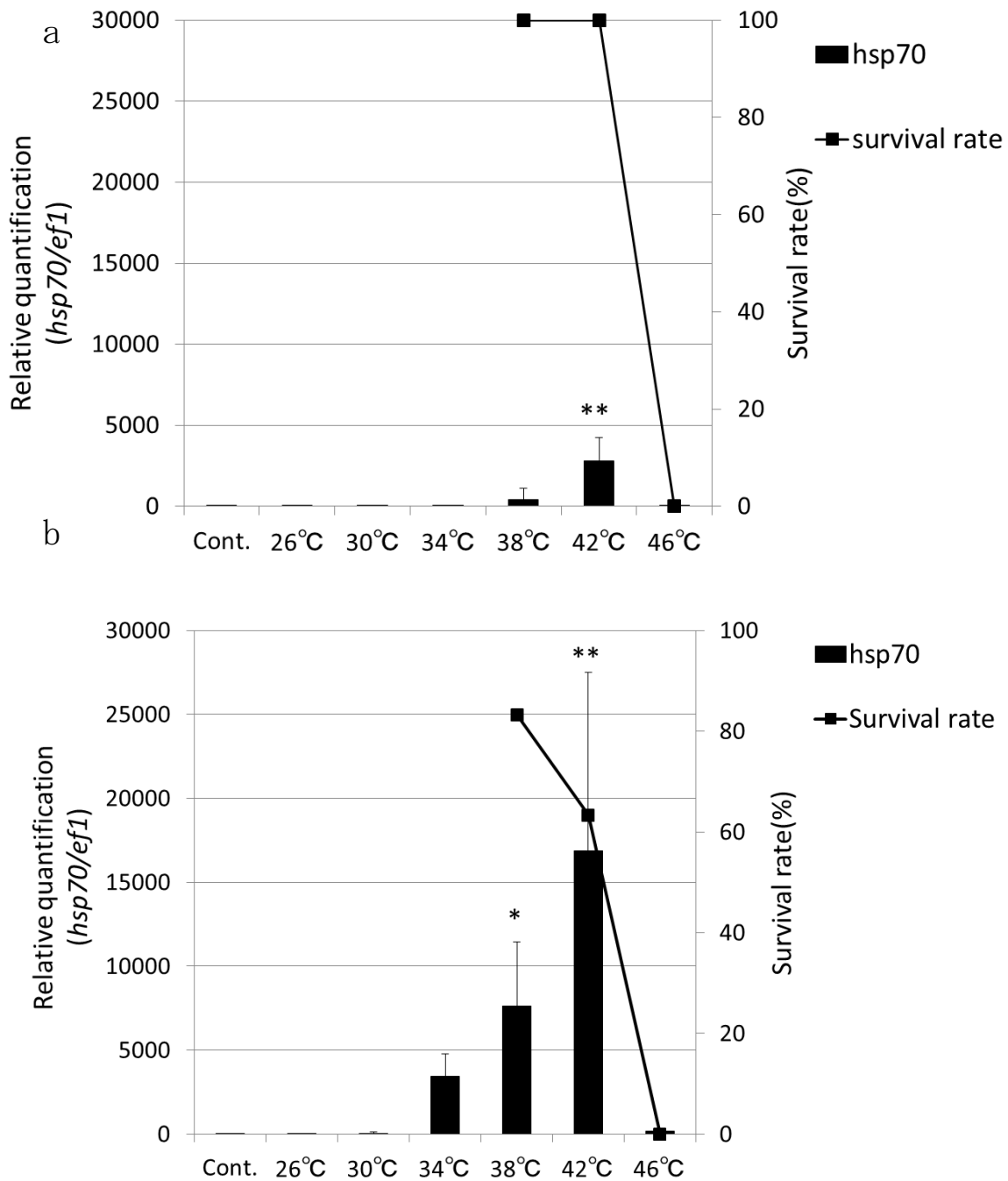


図4-2. 10-12°Cで飼育していた貝 (a). 20-22°Cで飼育していた貝 (b). の熱処理後の *hsp70* mRNA の発現および生残率 (すべてのサンプルは *ef1* を内部標準とし、コントロール値を基本値として算出. バーは7サンプルの標準誤差を表示. バーの上のアスタリスクはコントロールと比較した有意差を表示 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$))

a

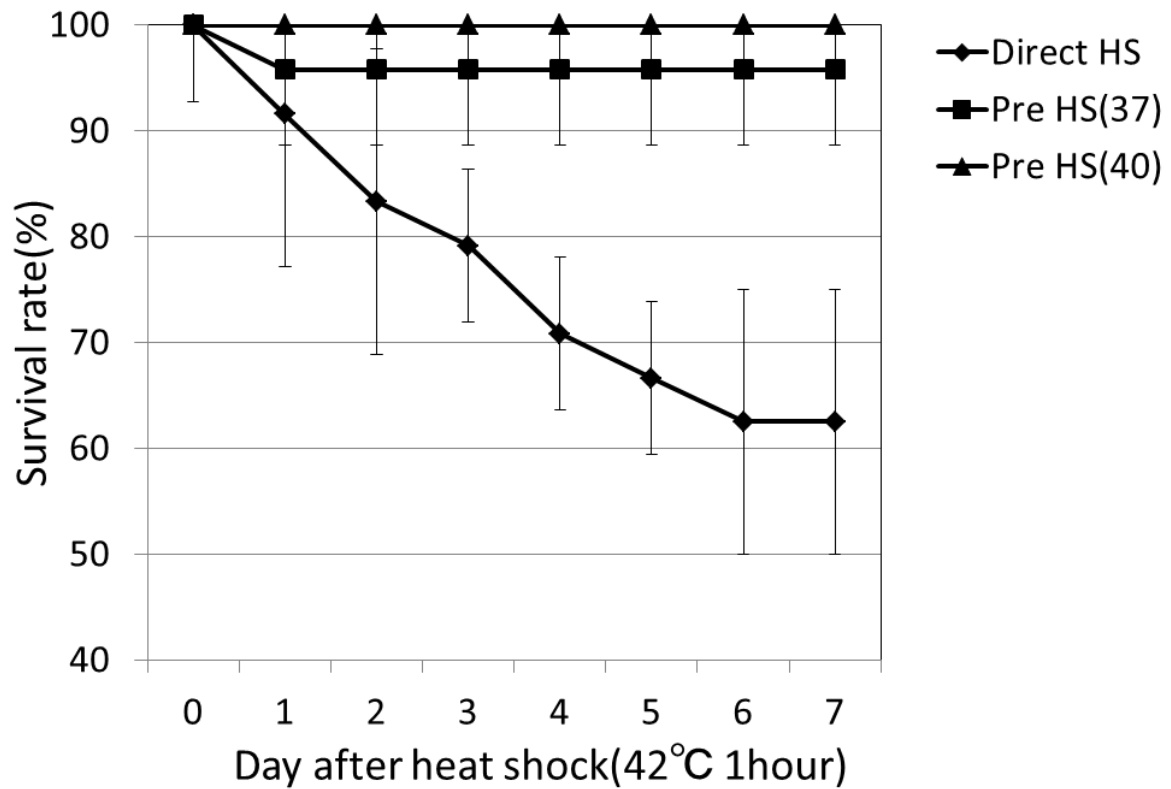


図4-3-(a). 無処理の貝と事前の熱処理を行った貝の熱処理後の生残率. (Direct HSは無処理、Pre HS(37℃)は37℃の事前の熱処理を示し、Pre HS(40℃)は40℃の事前の熱処理を表示. バーは8サンプルの標準偏差を表示)

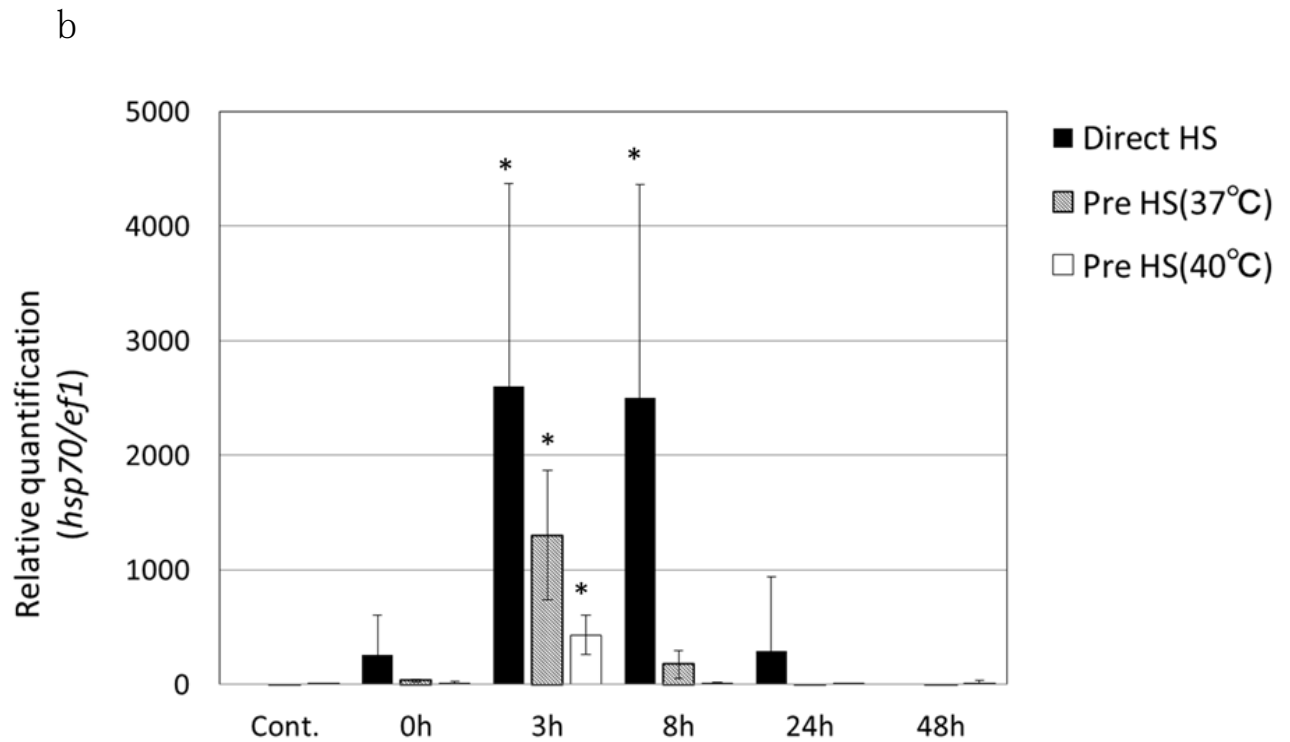


図4-3-(b). 無処理の個体と事前の熱処理を行った個体との熱ショック後の *hsp70* mRNA のタイムコース分析.(すべてのサンプルは *ef1* を内部標準とし、Direc HS のコントロール値を基本値として算出. バーは4~5サンプルの標準偏差を表示. バーの上のアスタリスクはコントロールと比較した有意差を表示 (* $P < 0.05$))

第5章 総合考察

現在カキ類養殖は、FAOの統計によると、2013年では全世界の総生産量が殻付き重量換算で約500万トンであり、貝類の中で最も生産量が多く中国が85%以上を占めており、韓国、日本、アメリカ、フランスなどでも多く生産されている。日本においても農林水産省の「平成27年漁業・養殖業生産統計」によると、カキ類は約16万トンとホタテガイに次いで第2位となっている。中でも、宮城県、広島県の2大産地を中心に生産量が多く、それ以外のカキ生産地では、飼育方法や品種にこだわった特徴のあるカキの産業化に取り組んでおり、厚岸の「カキえもん」、三重県の「的矢カキ」、隠岐に代表される「イワガキ」、大分県の「イタボガキ」などがブランドカキとして確立されつつある。

一方、アメリカの殻付きカキ市場においては、戦後熊本県から輸出されたカキ稚貝の中に含まれていたシカメガキが「Kumamoto oyster」としてブランド化されている。「Kumamoto oyster」は食味がクリーミーで濃厚である特徴を持つため、販売単価がマガキの約2倍程度で取引されている。著者らは、県内沿岸漁業の活性化のため、新たな県産ブランド水産物として熊本県産の「Kumamoto oyster」の産業化に取り組んでいる。

本研究では、まずシカメガキの稚貝量産技術の確立に取り組んだ（第2章第1節）。シカメガキの稚貝生産における最大の課題は、浮遊幼生から二枚貝に変態させる採苗と呼ばれる作業である。採苗は、飼育環境が一変するため、採苗飼育期間は浮遊幼生飼育期間よりも周囲の環境に影響を受けやすい。さらに、基質に付着する前の成熟幼生は、変態時に粘液を出しながら底面をほふくするため、糞や餌料藻類など汚れにまみれることが多く、病原性の細菌感染症など飼育環境の悪化による大量死が発生しやすい（鳥羽, 2004）。そのため、採苗に用いる成熟幼生は、採苗後すぐに基質に付着する個体を用いることが望ま

しい。著者は、最良な採苗開始時期を検討するため、採苗時に用いる成熟幼生の大きさと眼点の出現率を指標にして行う手法を提案した。その結果、眼点の出現率が75%以上になった時点で採苗を行うことで、より安定的な採苗が可能となることを示した。また、継代した1年貝を親貝として用いた結果、採苗時の付着率が88.3%と非常に高い値を示し、継代した親貝を用いることで、幼生飼育や採苗飼育がより安定することを明らかにした。

次に著者は、親貝養成技術について検討を行った(第2章 第2節)。マガキなどの親貝管理手法で用いられている積算水温による管理をシカメガキに応用し、積算水温が $1100\sim 1300^{\circ}\text{C}\times\text{日}$ (約100日程度)の長期加温飼育を行うことで、平均147~240万粒/個の卵量と良好なD型移行率を示す幼生が得られた。この技術により、より安定的な親貝養成が可能となることを示した。さらに、種苗生産した成長スピードの異なる貝や飼育環境が異なる貝の性比について検討した(第2章 第3節)。その結果、1年目の貝は日間成長率の低い群は雄、日間成長率の高い群は雌の割合が高い傾向を示した。さらに、2年目の貝は、異なる飼育環境においても性比への影響は認められなかった。今後、安定的に親貝を確保するためには、成長の異なる群を管理する必要があることを示した。これらの結果から、稚貝生産における新たな知見の蓄積により、シカメガキの安定生産に大きく寄与できると考えられる。

現在、シカメガキ養殖において高水温期の大量死が大きな課題となっている(中根ら, 2014)。シカメガキ養殖の産業化のためには高水温期の大量死の対策が不可欠である。そのため、高水温耐性を持った系統を作出することは重要である。カキ類における選抜育種は、養殖の損失を低減するために非常に重要な方法であることが報告されており(Huvet et al., 2010)、生残性などの形質は次世代に高く遺伝することが報告されている(Delaporte et al., 2007;

Degremont et al., 2007; Degremont et al., 2010)。そこで、遺伝的に高水温に強い形質を持った個体の選抜育種法について検討を行うため、選抜のためのマーカー遺伝子として HSP70 に着目した。マーカー選抜育種は、カキ類養殖における夏の大量死に抵抗性がある系統を選抜できる可能性があるため、大変役に立つ方法であることと考えられる (Lang et al., 2009)。さらに転写レベルでの測定は、カキ類の細胞内のより初期の反応を測定できるため、感受性の高いマーカーとなるのではないかと考えられた。

HSP70 はストレス状態の細胞内反応や、生物の生残や回復のために重要な役割を果たしている (Lindquest et al., 1986)。HSP70 は、一般的に高温処理により発現が急上昇することが知られているが、他にも重金属、寄生虫、低酸素、塩分などのストレス要因によってもその発現が誘導されることから、様々な生物における、ストレス状態を把握するためのバイオマーカーとして広く使用されている (Sorensen et al., 2003)。特に、カキ類における HSP70 は、コントロールレベルでの発現がなく、ストレスに対して特異的に発現することから、カキ類がストレスを経験しているかどうか把握するための重要な指標として考えられている (Clegg et al., 1998; Piano et al., 2002)。これまで、タンパク質レベルでの HSP70 の発現解析は行われているが、転写レベルでの発現解析に関する情報は少ない (Franzellitti et al., 2005)。さらに、熱耐性と *hsp70* mRNA の転写パターンについても明らかになっていないことから、シカメガキを用いて、熱処理による *hsp70* mRNA の発現パターンについて解析を行った。

第 3 章では、シカメガキの *hsp70* cDNA を単離し、熱処理後の各組織における発現パターンを調査した。その結果、得られたシカメガキ *hsp70* mRNA は、他のカキ類の HSP70 と非常に高い相同性を示し、熱処理後、コントロールレベルと比較して有意な発現上昇が確認され、得られた cDNA がシカメガキのストレス誘導

性の *hsp70* cDNA であることが明らかとなった。

第4章では、得られたシカメガキ *hsp70* cDNA の塩基配列を利用して、熱処理における、貝の *hsp70* mRNA の発現パターンと生残率の調査を行った。さらに、熱耐性を誘導した個体における *hsp70* mRNA の発現特性についても調査した。その結果、20-22 °C で飼育した貝は、10-12 °C で飼育した貝と比較して熱処理後、顕著に *hsp70* mRNA の転写が素早く、高く発現した。さらに、事前に熱処理を行い、熱耐性を誘導した個体の *hsp70* mRNA は、無処理貝と比較して顕著に *hsp70* mRNA の転写量が低く、一方で無処理貝は長時間にわたり *hsp70* mRNA の発現が認められた。これらの結果から、*hsp70* mRNA の発現パターンが高温耐性個体の選抜を行ううえで有効である可能性が示唆された。マガキにおいて、夏の大量死に感受性がある貝と耐性がある貝について、事前にストレスを与え、その後低酸素ストレスを与えた結果、耐性がある貝は HSP70 の発現が有意に感受性のある貝と比較して低い結果が示されている (Samin et al., 2007)。これらの結果から、ストレス耐性を持った貝は、ストレスに対して HSP70 が発現しにくい特性を持っている可能性があり、*hsp70* mRNA の発現を指標とした高温耐性を持つ系統選抜の可能性が示された。

参考文献

Clegg J. S., Uhlinger K. R., Jackson S. A., Cherr G. N., Rifkin E., Friedman C. S.

Induced thermotolerance and heat shock protein-70 family in Pacific oyster

Crassostrea gigas. *Mol. Mar. Biol. Biotec.* 1998;7:21-30.

Delaport M., Soudant P., Lambert C., Jegade M., Moal J., Pouvreau S., Degremont

L., Boudry P., Samin J. Characterization of physiological and immunological

differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Expe. Mar. Bio. Ecol.* 2007;353:45-57.

Degremont L., Ernande B., Bedier E., Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 2007;14:41-53.

Degremont L., Bedier E., Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 2010;299:21-29.

Franzellitti S., Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Physiol.* 2005;336:1157-1163.

Huvet A., Normand J., Fleury E., Quillen V., Fabioux C., Boudry P. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 2010;304:95-99.

Lang R.P., Bayne C.J., Camara M.D., Cunningham C., Jenny M.J., Langdon J. Transcriptome Profiling of Selectively Bred Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Families that Differ in Tolerance of Heat Shock. *Mar. Biotechnol.* 2009;11:650-668.

Lindquest S.L. The heat-shock responses. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:1151-1191.

Martinetz J.C., Vasquez-Yeomans R., Guerrero-Renteria Y. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster(*Crassostrea sikamea*) *Hidrobiologica* 2012;2:181-184.

中根基行, 鮫島守, 永田大生, 三浦精悟 熊本産クマモト・オイスターづくり事業Ⅱ(クマモト・オイスター養殖試験). 平成25年度熊本水研セ事報. 2014;88-89.

Piano A., Asirelli C., Caselli F., Fabbri E. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chap.* 2002;7:250-257.

Samin J.F., Degremont J., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Havet A., Bacca H., Wormhoudt V., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Soudant P., Nicolas J.L., Roux F.L., Renault T., Gagnaire B., Geret F., Boutet I., Burgeot T., Bourdry P. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster(*Crassostrea gigas*) and its relationship with immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 2007;268:227-243.

Sorensen J G., Kristensen T N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 2003;6:1025-1037.

鳥羽光晴 アサリ種苗生産の現場基礎技術. 千葉水研セ業績Ⅳ. 2004;pp98.

謝辞

多大なるご助言とご指導いただきました北野健先生、高宗和史先生、滝尾進先生、逸見泰久先生に心より感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、実験に協力していただきました当研究室の皆様に感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、多大なる御支援、御理解をいただいた、熊本県水産研究センターの中野平二次長、鮫島守部長、熊本県庁水産振興課の木村武志課長、熊本県水産研究センター職員の皆様、天草広域本部水産課職員の皆様、熊本県庁人事課職員の皆様に心より感謝いたします。

※本論文は2017年3月熊本大学大学院自然科学研究科学学位論文である。

クルマエビ養殖池の飼育水を利用したハマグリ中間育成

中根基行、三浦精悟、鮫島守、中野平二

Rearing juvenile Hard clam *Meretric lusoria* in water from Kuruma prawn
Marsupenaeus japonicus aquaculture ponds

Motoyuki Nakane, Seigo Miura, Mamoru Sameshima, Heiji Nakano

キーワード：ハマグリ、中間育成 クルマエビ養殖池

緒言

熊本県水産研究センターでは、放流用のハマグリ稚貝を大量生産するため、中間育成方法を検討してきた。平成 21 年度から平成 23 年度まではダウンウェリング式カラムを使って市販の二枚貝餌料用の珪藻給餌による飼育試験や、コンクリート池に生海水を注水するだけの粗放的な飼育試験に取り組んできた。

※¹ この粗放的な中間育成方法では、9 ヶ月（7 月から 3 月）の飼育期間で平均殻長 1mm～1.5mm に成長し、生残個数は 400 個/m²～1500 個/m²であった。¹⁾

一方、近年は二枚貝の餌となる植物プランクトンが豊富に増殖しているクルマエビ養殖池の飼育水（以下「ブラウンウォーター」という。）を使った中間育成技術に注目が集まっており、他県ではアサリの種苗生産から中間育成において、このブラウンウォーターを飼育水に利用して良好な飼育成績を収めている。本県はクルマエビ養殖池が多数存在していることから、ブラウンウォーターを利用してより効率的なハマグリの中間育成技術開発が可能と考えられる。当水産研究センターでも、平成 25 年度ハマグリ中間育成試験においてブ

ラウンウォーターを使用して一定の成果を得ることが出来たため、その概要を報告する。

※²

材料及び方法

1 供試稚貝

試験に用いた稚貝は、株式会社ヤマーマリンファームで生産された平均殻長 0.2mm、90 万個と 0.3mm、180 万個用いた。

2 飼育期間（試験期間）

飼育期間は、平成 25 年（2012 年）7 月 20 日から同年 11 月 8 日（111 日間）とした。

3 飼育場所及び飼育方法

熊本県上天草市維和島の全築堤クルマエビ養殖場の敷地内で実施した。飼育方法は多段式のダウンウェリングカラム(φ50cm)を 12 個使用し、養殖池の飼育水を 24 時間かけ流して飼育した。

収容する稚貝の大きさにより 0.3mm 試験区（7/20 試験開始）と 0.2mm 試験区（7/27）の 2 試験区を設定した。0.3mm 試験区は A から H、0.2mm 試験区は I から L とした。収容個数とカラムの配置を表 1 に示した。飼育管理とし

※¹ 平成 21 年度～平成 23 年度 有明海漁業振興技術開発事業 水産庁委託事業

※² 平成 24 年度 有明海漁業振興技術開発事業 水産庁委託事業

て、1週間に1回程度、カラムの清掃や交換を実施した。稚貝の成長段階に応じて、底面のネットを180 μm から300 μm に変更した。

表1 試験区設置位置と稚貝収容個数

| カラム | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----------|-------|----|----|----|----|----|----|----|
| 稚貝の大きさ | 0.3mm | | | | | | | |
| 収容個数(万個) | 15 | 30 | 15 | 30 | 15 | 30 | 15 | 30 |
| 棚の位置 | 下段 | | 中段 | | 上段 | | | |

| カラム | I | J | K | L |
|----------|-------|---|----|---|
| 稚貝の大きさ | 0.2mm | | | |
| 収容個数(万個) | 15 | | 30 | |
| 棚の位置 | 下段 | | 中段 | |

4 飼育環境の評価

飼育水温と塩分は自動観測器（JFEアレック社製 INFINITY-CY）により測定した。

8月から毎週1回程度飼育海水を実験室に持ち帰り、海水をフィルターろ過し、N,N-ジメチルホルムアミドにより抽出し、蛍光値を測定してクロロフィルa濃度を求めた。9月27日には、持ち帰った飼育水を顕微鏡観察しプランクトン組成を明らかにした。

稚貝の成長及び生残個数の推定

1週間に1回程度、試験区毎に30個の殻長を実体顕微鏡下で測定し、平均殻長を求めた。

試験終了時は、試験区毎に重量を計測し、重量法により回収個数を算出した。殻長については100個以上を計測し、カラム毎の殻長組成について測定割合から算出した。

結果

1 飼育環境

期間中の水温は7月30日に32.5 $^{\circ}\text{C}$ となり、最低水温は11月8日8.9 $^{\circ}\text{C}$ であった。塩分は試験開始当初14.3であったが、その後上昇し、試験終了時には34.1となった（図1）。

クロロフィルa濃度はカラム上段では23.9 $\mu\text{g/L}$ から120.6 $\mu\text{g/L}$ の間を推移し、中段では

6.6 $\mu\text{g/L}$ から91.9 $\mu\text{g/L}$ の間を推移し、下段では10.7 $\mu\text{g/L}$ から78.3 $\mu\text{g/L}$ の間を推移した（図2）。

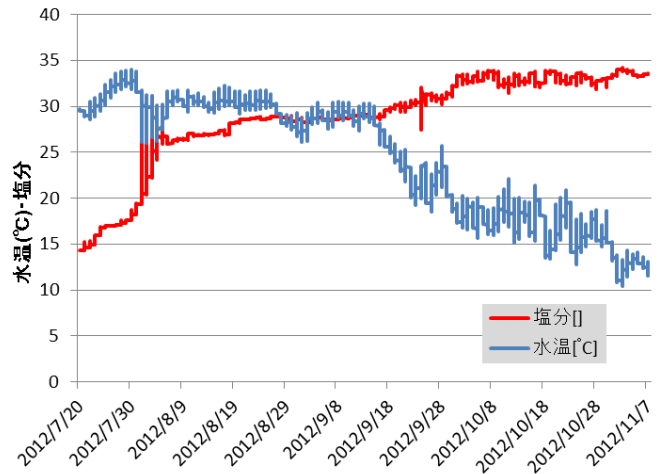


図1 水温と塩分の推移

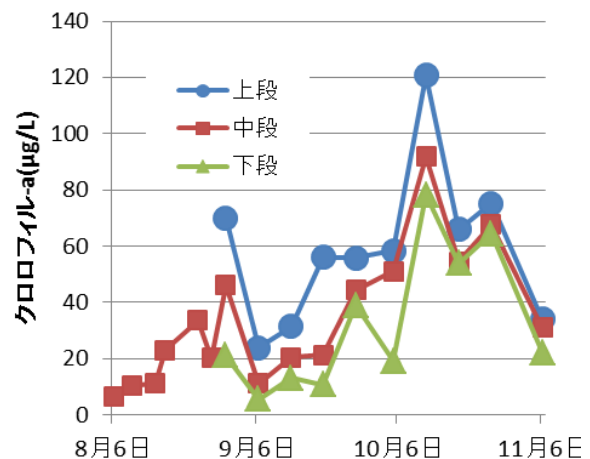


図2 クロロフィルa濃度の推移

養殖池内の植物プランクトン組成は、優先種は *Leptocylindrus* spp. でその他に *Asterionellopsis aracialis*、*Pseudo-nitzschia* sp.、*Coscinodiscus* spp. 及び種類不明の微細藻類が認められた（図3）。

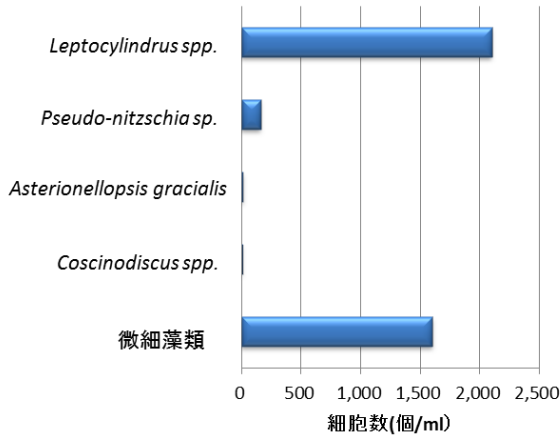


図3 クルマエビ養殖池内のプランクトン組成

2 成長及び生残

0.3mm 試験区では試験終了時の平均殻長は 2.0mm から 3.0mm となった (図4)。0.2mm 試験区では、試験終了時の平均殻長は 2.2mm から 2.4mm となった (図5)。回収した全てのハマグリを合わせた平均殻長は 2.5mm であった。

カラム毎および棚位置別の平均殻長を表 2 に示した。0.3mm 試験区ではカラム毎の成長では 15 万個/カラムと 30 万個/カラムでは E 区を除いて、15 万個収容区の方が大きくなった。棚位置別では上段(2.7mm)>中段(2.6mm)>下段(2.2mm)となった。0.2mm 試験区では下段(2.4mm)>上段(2.3mm)となった

生残率が最も高かった試験区は G 区で 63.9%、続いて A 区 59.1%、B 区 55.3%であった。サイズ別の平均生残率は 0.3mm 試験区では 42.1%、0.2mm 試験区では 17.6%であった。開始サイズと棚位置別の生残率では、0.3mm 試験区では下段が 57.2%、中段 49.4%、上段 30.9%、0.2mm 試験区では中段 18.4%、下段 16.7%となった (表 2)。カラムあたりの収容個数と生残率の関係では、0.3mm 試験区は E 区を除いて、15 万個収容区の方が 30 万個収容区よりも良好な結果が得られた。0.2mm 試験区では、収容個数と生残率の間に違いは見られなかった。

試験区毎の大きさ別の回収個数は、最も多

く回収できたのは B 区の 16.5 万個で、続いて D 区の 13.6 万個、G 区の 9.5 万個となった。

少なかったのは E 区と L 区でそれぞれ 1.7 万個であった。回収したハマグリ大きさは 3mm 以下の個数が全ての試験区で半数以上を占めていた (図6)。試験終了時の取り上げ選別後のハマグリを図7に示す。本試験における総回収個数は 88 万個であった。

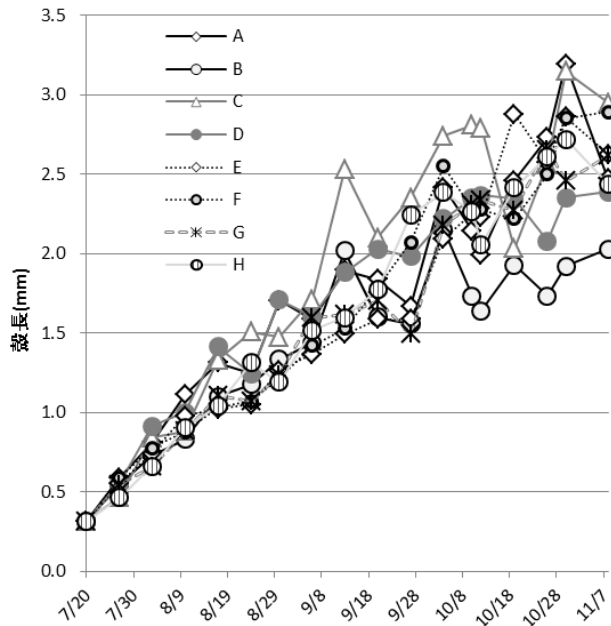


図4 成長の推移(0.3mm 試験開始)

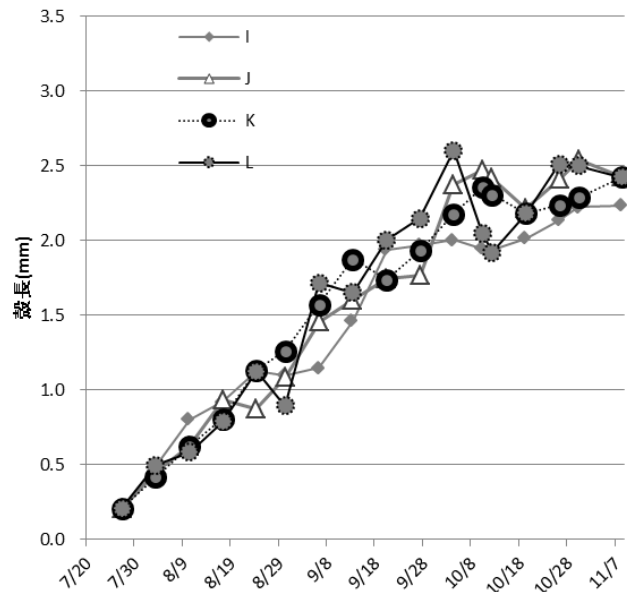


図5 成長の推移(0.2mm 試験開始)

との報告⁸⁾を併せて考えると、試験開始当初の塩分低下は、それがかえってハマグリ稚貝の成長や生残にとって、好適条件になったと考えられた。

ハマグリの沈着初期稚貝の適水温範囲は23.0~32.5℃⁹⁾、2.3mmの稚貝を用いた飼育試験では22.0~34.5℃との報告⁸⁾から、水温は9月上旬までは25℃以上を維持し、ハマグリの成長にとっては適切な水温が保たれた。

餌料環境は、クロロフィルa濃度が最低値で6.6 µg/L、最高値は120.6 µg/Lを示した。同時期の有明海（荒尾沖、表層）におけるクロロフィルa濃度は平均14.6 µg/L(3.4~20.8 µg/L)であり、クルマエビ養殖池の飼育水は期間を通して、高い値を示し、餌の量としては良好であったと考えられた。室内試験において、珪藻単一種の給餌では成長や生残への影響が示唆されていることから¹¹⁾、クルマエビ養殖の飼育水中のプランクトン組成は、*Leptocylindrus* spp. と種不明の微細藻類で大半を占めており、このことから、餌として複数の藻類を摂餌していたと考えられ、ハマグリ稚貝の餌料環境としては良好であったと考えられた。複数種の植物プランクトンが観察されたが、実際にハマグリがどの植物プランクトンを摂餌しているのかは不明である。

今後は、分子生物学的手法などを用いて、ハマグリ稚貝が摂餌しているプランクトン種類を明らかにすることで、成長や生残に必要なとする植物プランクトンを積極的に培養することで、より効率的な飼育が可能になると考えられる。

成長は試験開始から9月下旬までは順調に成長したものの、それ以降は測定値が上下し、成長の鈍化が認められた。9月下旬以降もクロロフィルa濃度は高濃度で推移していたことから、9月下旬以降は餌が十分に存在したものの、水温が低下したために成長が鈍化し

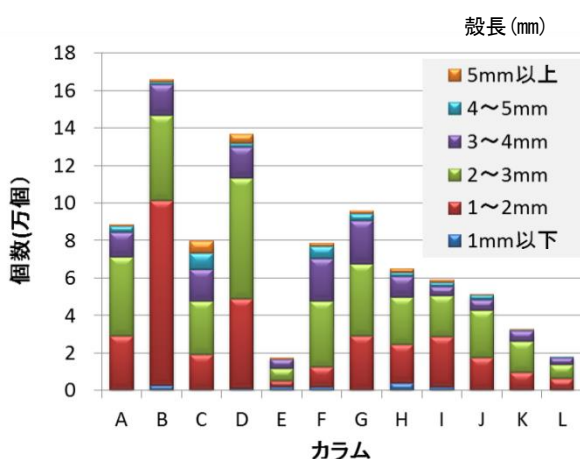


図6 カラム毎の收容個数とサイズ組成



図7 試験終了時

考察

日本で行われているハマグリの中間育成は、自家培養した植物プランクトンを餌として給餌し、ろ過海水や調温した海水を使って実験室レベルで生産されている^{2)~5)}。本試験において、クルマエビ養殖場の飼育水を使用することで、新たなハマグリ中間育成の技術を提案することができた。

本試験は車エビ養殖場という野外環境で実施したことにより、天候の影響を大きく受けた。試験開始時の塩分が14.3であったのは、降雨により車エビ養殖池の塩分が低下したためである。

変態期幼生が河口付近に多く沈着することや⁶⁾、D型幼生の至適な塩分が19.3~36.3との報告⁷⁾、1.5mmの稚貝の最適塩分範囲が19.3~32.2であり、低塩分限界が6.4~12.9

たと考えられた。

稚貝の導入サイズ別の飼育成績については、0.3mm 試験開始区では、180 万個を收容し、平均殻長 2.5mm (2.0mm から 3.0mm)、合計 72.2 万個を回収した。生残率は 42.2% (11.7%~63.9%) であった。カラムを設置した棚の位置の違いによる成長、生残の違いは、成長では上段(2.7mm)>中段(2.6mm)>下段(2.2mm)となり、生残率では、下段(57.2%)>中段(49.4%)>上段(30.9%)となった。成長については、カラムが上方に設置してあるほど餌料条件が良かったのか、カラム内の生残数が少なかったために密度効果が他のカラムに比べて小さかった可能性が考えられる。一方、生残率については、カラムが上にあるほど沢山のゴミや生物が紛れ込んだ。特にホトトギスガイが多数みられた上段のカラムではハマグリ稚貝がホトトギスガイの足糸により絡み取られ死んでいた。上段ほどゴミや他生物が多かったことが、ハマグリ稚貝の生残に影響を及ぼしたと考えられた。上段から順にカラム内を飼育水が通過することでろ過され、下段に行くほどゴミや侵入生物が除去されることにより、ハマグリにとって良質な飼育水が供給されてい

たと推察された。收容個数との関係では、30 万個よりも 15 万個で生残率も成長も良好な成績が得られた。

0.2mm 試験区では、90 万個を收容し、15.8 万個を回収した。平均殻長は 2.4mm (2.3mm~2.4mm) で平均生残率が 17.6%であった。試験区を設置した棚の位置や收容個数に関係はなかった。

本試験結果について、カラム毎の回収個数を単位面積 (m²) あたりに換算すると、8.9 万個から 84.5 万個(平均 37.7 万個)となり、成長についても平均殻長が 2.5mm で、大型化することができた。

本試験では、ハマグリ稚貝が実際に摂餌しているプランクトン種類や量などの給餌条件や適切な注水量、飼育密度などの飼育条件は明らかにできなかった。クルマエビ飼育池の飼育水を使ったハマグリ飼育事例は他になく、不明な点が多い。今後は、クルマエビ飼育池中のプランクトンの動態及び水温や塩分などの水質の変化などを把握することで、ハマグリ稚貝の飼育条件を明らかにする必要がある。

表 2 試験区別の生残率と平均殻長及び棚位置別の生残率と成長

| 試験区(0.3mm) | A | B | C | D | E | F | G | H | |
|------------|--------|------|--------|------|-------|------|--------|------|------|
| 收容個数(万個) | 15 | 30 | 15 | 30 | 15 | 30 | 15 | 30 | — |
| 回収個数(万個) | 8.8 | 16.5 | 7.9 | 13.6 | 1.7 | 7.8 | 9.5 | 6.4 | 72.2 |
| 生残率(%) | 59.1 > | 55.3 | 53.1 > | 45.6 | 1.7 < | 26.2 | 63.9 > | 21.7 | 42.1 |
| 殻長(mm) | 2.5 > | 2.0 | 3.0 > | 2.4 | 2.6 < | 2.9 | 2.6 > | 2.4 | 2.5 |
| 棚位置 | 下段 | | 中段 | | 上段 | | | | |
| 生残率(%) | 57.2 > | | 49.4 > | | 30.9 | | | | — |
| 殻長(mm) | 2.2 < | | 2.6 < | | 2.7 | | | | |
| 試験区(0.2mm) | K | L | I | J | | | | | |
| 收容個数(万個) | 15 | 15 | 30 | 30 | — | | | | |
| 回収個数(万個) | 5.8 | 5.1 | 3.2 | 1.7 | 15.8 | | | | |
| 生残率(%) | 21.5 | 11.9 | 19.7 | 17.1 | 17.6 | | | | |
| 殻長(mm) | 2.4 | 2.4 | 2.2 | 2.4 | 2.4 | | | | |
| 棚位置 | 下段 | | 中段 | | | | | | |
| 生残率(%) | 16.7 | | 18.4 | | — | | | | |
| 殻長(mm) | 2.4 | | 2.3 | | | | | | |

要 約

ハマグリの中間育成において、クルマエビ養殖池の飼育水（ブラウンウォーター）を飼育水として利用し、ダウンウェリングにより飼育した。0.3mm 試験開始区では、180 万個を収容し、平均殻長 2.5mm (2.0mm から 3.0mm)、合計 72.2 万個を回収した。生残率は 42.2% (11.7%~63.9%) であった。0.2mm 試験区では、90 万個を収容し、15.8 万個を回収した。平均殻長は 2.4mm (2.3mm~2.4mm) で平均生残率が 17.6%であった。試験区を設置した棚の位置や収容個数に関係はなかった。

文 献

- 1) 水産庁増殖推進部栽培養殖課：平成 21~23 年度有明海漁業振興技術開発事業結果報告書 2012 ; : 159-195.
- 2) 深山義文、森山豊、高草木将人、目黒清美、牧野直：千葉県 種苗生産研究所・富津生産開発室業務報告書 2010 ; : 23-27
- 3) 宮里幸司、宇都康行、高草木将人、目黒清美、牧野直：千葉県 種苗生産研究所・富津生産開発室業務報告書 2011 ; : 23-27
- 4) 後川龍男：有明海漁場再生対策事業 福岡県水産海洋技術センター事業報告書 2012 ; : 130-131.
- 5) 後川龍男：有明海漁場再生対策事業 福岡県水産海洋技術センター事業報告書 2013 ; : 149-150.
- 6) 田中彌太郎、沼口勝之：大規模砂泥域開発調査事業（豊前海域）昭和 60 年度調査報告書（生物篇） 1986 ; : 53-57
- 7) 相良純一郎：東海水研報 1958 ; No22 : 27-32
- 8) 沼口勝之、田中彌太郎：養殖研報 1987 ; No11 : 35-40
- 9) 田中彌太郎 養殖研報 1986 ; No9:45-49
- 10) 中根基行、中野平二、鳥羽瀬憲久、本

REPORT OF KUMAMOTO PREFECTURAL FISHERIES RESEARCH CENTER

No. 1 0 AUGUST 2017

| | |
|--|-----|
| Taisei Nagata..... | 1 |
| Studies on the seedling production and the selective breeding in the Kumamoto oyster <i>Crassostrea sikamea</i> (Doctoral thesis) | |
| Motoyuki Nakane, Seigo Miura, Mamoru Sameshima and Heiji Nakano..... | 113 |
| Rearing juvenile Hard clam <i>Meretric lusoria</i> in water from Kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i> aquaculture ponds | |