

奄美リュウキュウアユ仔魚の餌環境 および栄養状態の定量的評価に関する研究

小針 統¹・杉本 智²・四宮明彦¹・河合 溪³・西村 知⁴

鹿児島大学：1 水産学部 2 水産学研究科 3 国際島嶼教育研究センター 4 法文学部

Study on Quantitative Evaluation of Food Availability and Nutritional Conditions for Fish Larvae, *Plecoglossus altivelis ryukyuensis*

KOBARI Toru¹・SUGIMOTO Satoru²・SHINOMIYA Akihiko¹・KAWAI Kei³
NISHIMURA Satoru⁴

1: Faculty of Fisheries, 2: Graduate School of Fisheries, 3: Research Center for the Pacific Islands, 4: Faculty of Law, Economics and Humanities, Kagoshima University

Abstract

We carried out plankton sample collections on Yakugachi river in Amami Island and incubation experiments of fish larvae *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* to evaluate food availability and nutritional conditions. High turbidity was evident for the stations on the tidal flat where salinity showed a high variability, while chlorophyll was high on the tidal flat and at the offshore stations. We suggest that not only salinity but also food availability might be responsible for frequent occurrence of the larvae on the tidal flat. We will evaluate food availability and nutritional conditions for the larvae from more analyses of field sample and incubation experiments.

1. はじめに

リュウキュウアユ (*Plecoglossus altivelis ryukyuensis*) は琉球列島中部に分布する日本固有亜種であるが¹, 絶滅が危惧されており保全のために多くの努力が払われてきた。近年では, 種苗生産やこれらの放流によるリュウキュウアユの保全が検討されつつあり, 天然あるいは人工孵化させた稚仔魚の栄養状態を評価する手法が望まれている。魚類の栄養状態を評価する手法の1つとして, これまで核酸を使った手法が利用されてきた²。この手法の大きな利点は, 少ない検体から簡便かつ高精度に分析できるだけでなく, 生態学的情報を得ることができることにある。もしこの手法がリュウキュウアユに利用できれば, 稀少な天然個体群に最小限度の人為的影響で多くの生態学的知見を得られる利点がある。また, この手法は多くの稀少生物に利用可能であるものの未だこのような試みが世界的にもなされておらず, 島嶼域の自然科学研究に大きく貢献できることが期待される。そこで本研究では, 奄美リュウキュウアユ仔魚の分布域における餌環境および核酸およびタンパク質を使った栄養状態評価法を確立するため, その予備的知見を得ることを目的とする。具体的な課題は以下の通りである。

課題A：餌環境調査

天然仔魚が分布する役勝川河口域の環境と餌バイオマス・組成を明らかにする

課題B：飼育実験

給餌・無給餌状態下における仔魚個体あたりの核酸およびタンパク質量の違いを明らかにする

本報告では、解析が終わったデータについて述べる。

2. 方法

2-1. 餌環境調査

鹿児島県奄美市住用地区にある役勝川河口域にて、2009年12月22日満潮前後（9時～14時）に役勝川河口域の上流部（満潮時でも淡水となる場所）～下流部（住用漁港）の6地点において（Fig. 1），リュウキュウアユ仔魚の餌環境調査を行った。

各地点において河床直上20cmの河川水を採取し、水温、塩分、pH・溶存酸素はYSI 556 MPS使って、濁度およびクロロフィル*a*濃度はターナーデザイン社製AquaFluorを使って測定した。クロロフィル*a*濃度を測定するため、河川水100mLをハンディポンプを使って20kPa以下でワットマンGF/Fフィルターに濾過した。フィルター上の捕捉された細胞の光合成色素はN, N-ジメチルホルムアミド中で常温・暗状態で24時間以上抽出し³、ターナーデザイン社製蛍光光度計を使ってクロロフィル*a*濃度を測定した⁴。

リュウキュウアユ孵化仔魚の餌プランクトンバイオマスとその組成を明らかにするため、河川水450mLを採取し酸性ルゴールで固定した（最終濃度3%）。この微小プランクトン標本を実験室に持ち帰り、サイフォンを使って濃縮した。これから副次標本をウッターモルチャンバーに採取し、倒立顕微鏡下で中心目珪藻・羽状目珪藻・渦鞭毛藻・

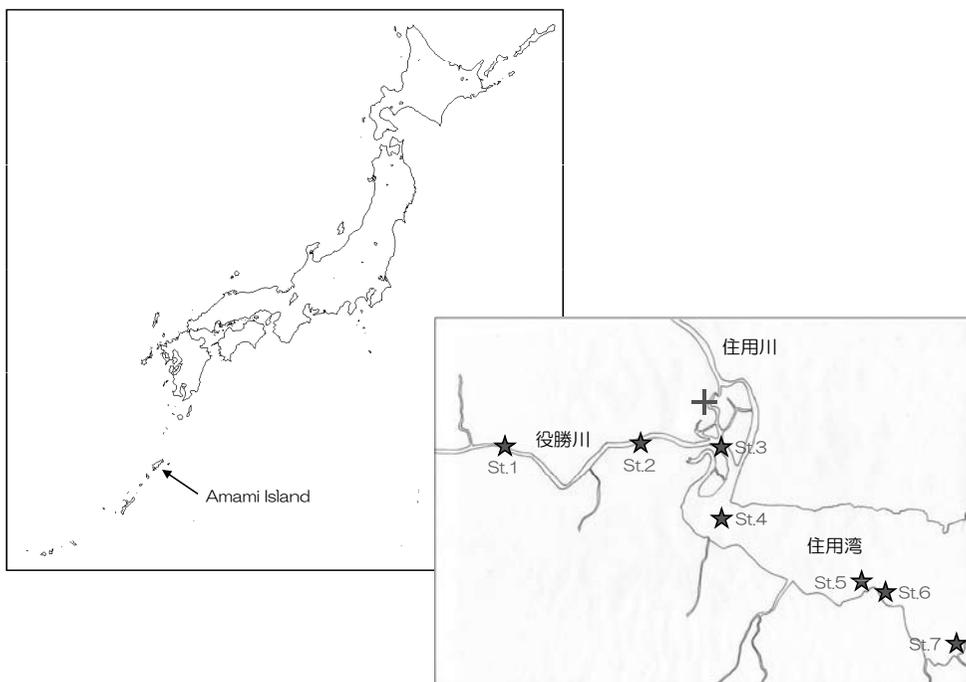


Fig. 1) 奄美役勝川の淡水域 (Station 1),汽水域 (Station 2～4),海水域 (Station 5～7) で実施された野外調査地点 (星印) と飼育実験地点 (十字)

ワムシ類・無殻繊毛虫・有殻繊毛虫について識別計数中である。また、各分類群の30細胞についてサイズを測定し、近似する立体に換算して体積を求め、細胞体積あたりの炭素換算係数を使ってバイオマスを算出する予定である。

2-2. 飼育実験

飼育実験は、鹿児島県奄美市住用にある奄美マングローブパーク内のリュウキュウアユ飼育施設で行った。

この施設で孵化したリュウキュウアユ仔魚を、飢餓区は役勝川・住用川の河川水を入れた30L水槽で、給餌区は1tタンクでエアレーションしながら飼育した。飼育期間中の水温は $14.9 \pm 2.6^\circ\text{C}$ 、塩分は $7.5 \pm 2.5\text{PSU}$ である。給餌区では、1日あたり配合飼料を0.01g、シオミズツボワムシを仔魚1個体につき2000匹になるように添加しながら飼育した。12時間おきに給餌区・無給餌区から仔魚5個体を採取し、体サイズを測定するためにデジタルカメラで個体を速やかに撮影した。その後、バクテリアや他の微生物による核酸やタンパク質のコンタミネーションを避けるため、各個体を超純水で洗浄し、2 mLマイクロチューブに封入して -30°C 以下で分析まで冷凍保存した。

凍結標本は水につけて解凍した後、1% Sarcosyl溶液を標本サイズに合わせて加えた。マイクロチューブに粉碎ビーズを加え、ボルテックスで5分間ホモジナイズし、その後Tris bufferを加えた後ボルテックスで5分間ホモジナイズした。この標本は10分間15000gで遠心分離し、溶液の上澄みを核酸およびタンパク分析に供した。核酸分析については、各標本の上澄み液を $75\ \mu\text{L}$ ずつ黒色96ウェルマルチプレートに入れ、各ウェルに1000倍に希釈したSYBR Greenを $75\ \mu\text{L}$ ずつ加えた。20分間室温で核酸を染色させ、蛍光マイクロプレートリーダー（パーキンエルマー社製ARVO MX1420）を用いて全核酸（DNA+RNA）の蛍光強度を測定した。その後、RNaseを各ウェルに $7.5\ \mu\text{L}$ ずつ注入し室温で20分間静置するとRNAが分解されるので、蛍光マイクロプレートリーダーでDNAの蛍光強度を測定した。DNA含有量（DNA）およびRNA含有量（RNA）については、分析回ごとにDNA（シグマアルドリッチ社製D4522）およびRNA標準液（シグマアルドリッチ社製R7125）の希釈列を作製し、蛍光強度との回帰直線から求めた。タンパク質分析については、核酸分析と同じ方法で得た上澄み液1 mLを採取し、これにBradford Reagent（シグマアルドリッチ社製B6919）1 mLを加え、室温で20分間静置してタンパク質を染色させた。この試料を、吸光度計（日立社製U1800）を使って595nmの波長で吸光度を測定した。タンパク質含有量（PRO）については、分析ごとにタンパク標準液（シグマアルドリッチ社製B2518）の希釈列を作製し、吸光度との回帰直線から求めた。これらのデータについては、現在解析中である。

3. 結果と考察

3-1. 役勝川河口域の餌環境

Station 1の水温は調査地点の中で最も低く、満潮時でも塩分がゼロを示し、潮汐による影響を受けないことが分かった（Fig. 2）。Station 2~4では水温が $15.2 \sim 16.7^\circ\text{C}$ 、塩分が $18.3 \sim 24.0\text{PSU}$ で、同じ地点でも調査時中に塩分が大きく変化した。潮汐によって河川水や海水が移入するため、かなり塩分が変化しやすい地点であることが分かった。Station 5~7では水温が $19.9 \sim 21.7^\circ\text{C}$ 、塩分が $33.6 \sim 35.3\text{PSU}$ と高く、河川水の影響をあまり受けていないことが分かった。これらのことから、Station 1は淡水域、Station 2~4は汽水域、Station 5~7は海水域と区分できる。

淡水域ではpHが6.4であったが、下流ほど高くなる傾向があり最も海側にあるStation 7ではpHが8.4となった。淡水域の96%を除くと、上流から河口域に向かって酸素飽和

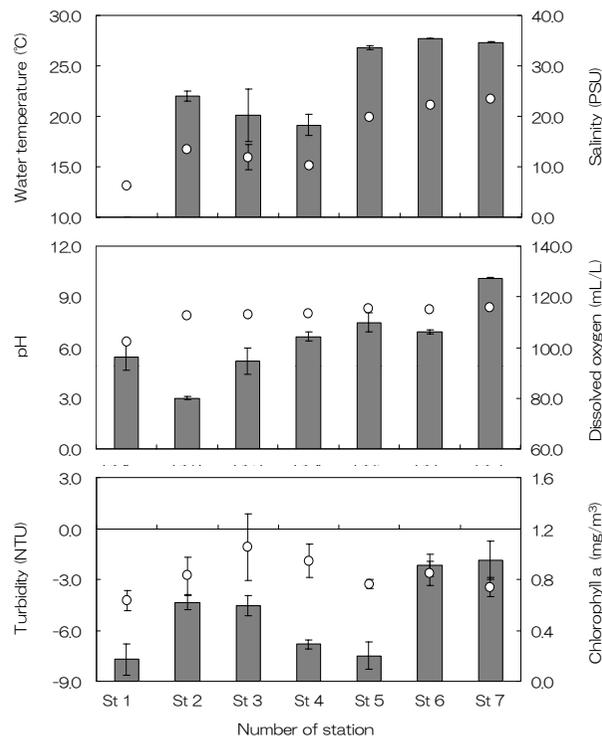


Fig. 2) 奄美役勝川の淡水域 (Station 1), 汽水域 (Station 2~4), 海水域 (Station 5~7) の川床20cm上における水温 (°C: 上段白丸), 塩分 (PSU: 上段棒グラフ), pH (中段白丸), 酸素飽和度 (%: 中段棒グラフ), 濁度 (NTU: 下段白丸), クロロフィルa濃度 (mg/m³: 下段棒グラフ).

度が高くなる傾向を示した。クロロフィルa濃度は、汽水域のStation 2・3だけでなく海水域のStation 5・6でも0.5mg/m³以上となった。汽水域では濁度が-2.9NTU以上であり、淡水域や海水域よりも高かった。

これまで、リュウキュウアユ孵化仔魚は汽水域に多く⁵、これは塩分が汽水に近いほど死亡率が緩やかになるためとされている⁶。しかし、本研究において汽水域でも同じ地点の塩分は短時間で激しく変化しており、これだけが仔魚の分布を決定しているとは考えにくい。汽水域では、濁度やクロロフィルa濃度が他の地点よりも高いのが特徴的であった。標本の検鏡解析も併せて、餌環境の観点から仔魚が汽水域に多いメリットについて考察を進めていくつもりである。

4. おわりに

リュウキュウアユは、冬季に下流域で産卵し、孵化した仔魚は海に下って翌春まで仔魚期を海で送る⁷。一般的に、自然個体群では孵化後から餌を取り始める時期の仔魚は死亡率が高く、これはこの時期の餌要求に対して餌が足りていないため死亡率が高くなるためと説明されてきた(クリティカル・ピリオド説⁸)。本研究では、河口域において孵化後餌を取り始める時期の仔魚が多いのは、餌が豊富なため仔魚期の死亡をできるだけ抑えるためと仮定して今後の解析を進める。

他方、これまで栄養状態の評価は定期的に仔魚個体を採取して魚体測定や消化管内容物を解析することでなされてきたが⁹⁾、リュウキュウアユなどの絶滅が危惧されている稀少種ではこのサンプル採取すること自体が自然個体群にかなりの影響を与えることになるため、代替する手法が必要である。本研究では、無給餌区の個体では給餌区の個体に比べてRNA/DNA比、RNA/PRO比が低いことが確認されたため、これらの核酸・タンパク質を測定することは、仔魚の栄養状態を評価するのによい手法であると思われる。

5. 謝辞

研究を進めるにあたり、野外調査および標本採取にご協力頂いた奄美マングローブパーク支配人および職員の皆様に感謝申し上げる。本研究における成果の一部は、鹿児島大学学長裁量経費（拠点形成経費：島嶼プロジェクト-豊かな島嶼の発展のために）および日本学術振興会科学研究費補助金（若手研究B：21710012）によって成された。

6. 参考文献

1. Nishida, M. 1988. A new subspecies of the Ayu, *Plecoglossus altivelis*, (Plecoglossidae) from the Ryukyu Island, Japan. *Journal of Ichthyology*, 35, 236-242
2. Raae, A.J., I. Opstad, P. Kvenseth and T.H. Bernt 1988. RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 73, 247-259.
3. Suzuki, R., T. Ishimaru 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *Journal of Oceanographic Society of Japan*, 46, 190-194.
4. Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and phaeopigments. *Limnology and Oceanography*, 39, 1985-1992.
5. 岸野底・四宮明彦 2005. 奄美大島住用湾および焼内湾周辺におけるリュウキュウアユ仔魚の回帰遡上. *魚類学雑誌*, 52, 115-124
6. 岸野底・四宮明彦・寿浩義 2008. リュウキュウアユ仔魚の水温・塩分耐性に関する生残実験. *魚類学雑誌*, 55, 1-8
7. 四宮明彦 1997. リュウキュウアユ. 「日本の希少淡水魚の現状と系統保存 - よみがえれ日本産淡水魚」(長田芳和・細谷和海編), 緑書房, 東京, 36-47
8. Hjort, J. 1926. Fluctuations in the year classes of important food fishes. *Journal of Conseil international pour l'exploration de la mer*, 1, 5-38
9. T. Kawakami and Tachihara K. 2005. Diet shift of larval and juvenile landlocked Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* in the Fukuji Reservoir, Okinawa Island, Japan. *Fisheries Science*, 71, 1003-1009.