

Point

これまで形態形質の特徴に乏しく判別が難しかった魚卵の種同定を精度良く行うため、遺伝子解析手法による魚卵同定技術を開発しました。今後、海洋生態系・漁場の保全、生物多様性を適切に評価していくうえでの新たなツールとして紹介します。

# 遺伝子解析手法による魚卵同定技術の開発

環境創造研究所 生物多様性研究センター 環境生態部 杉島 英樹、河村 佳正、稲葉 滋広、櫻井 秀明  
 環境リスク研究センター リスク評価部 中村 匡聡、沖縄支社 沖縄支店 亜熱帯環境調査部 田端 重夫

## はじめに

魚類は漁獲対象として重要な生物群であり、海洋生態系の上位に位置しています。魚類の初期生活段階の生息時期・場所や現存量を把握するため、海域環境調査において卵稚仔調査が実施されます。

調査結果は魚卵と稚仔魚に分けてまとめられますが、特に魚卵調査においては、多くが「単脂球形卵」や「○○科の一種」等、種が判別できずに報告されています。その主な理由として、大抵の魚卵がほぼ球形で形態形質の特徴が乏しいこと、ホルマリン等による固定で色調が消失すること等が挙げられます(図1)。このように種同定率が低い魚卵調査結果は、環境評価において有効活用しにくいいため、同定の精度向上が求められていました。

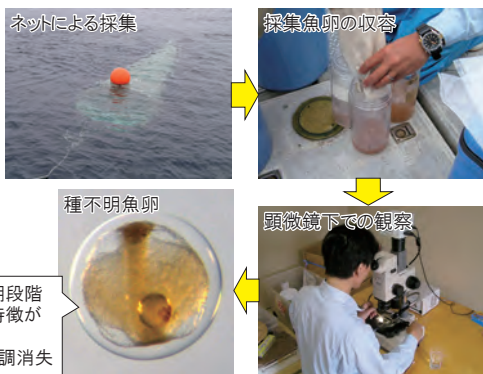


図1 魚卵調査の流れ

## 魚卵同定技術について

魚卵同定にあたっては、これまではふ化実験により同定精度を補完してきました。ふ化実験では、対象とする魚類の発育の初期段階を把握でき、同定精度の向上が図れるとともに、発生・分類学的に重要な基礎情報を得ることができます。その一方で、現地で実施するため時間と費用がかかるという課題がありました。

近年では、遺伝子(DNA)の塩基配列情報を利用した種の同定技術開発が進み、これは形態形質によらない魚卵同定手法として非常に優れています。しかし、魚卵からのDNA抽出は難しく、適用できる魚種が限定される等の問題があるため、これまでは卵稚仔調査のように多くの魚種の卵が混在する試料には適用されてきませんでした。

そこで、当社では卵稚仔調査における種不明魚卵に適用できるように、遺伝子解析手法による種同定技術の改良を図りました(表1)。

表1 魚卵同定技術の特徴と課題

分析技術	類別	概要	課題
ホルマリン固定試料分析(現行技術)	定量・定性	試料をホルマリン固定し顕微鏡で観察することで種類ごとの個数を把握する方法	・形態形質の特徴が乏しいことから同定精度が低い
ふ化実験(現行技術)	定性	魚卵を培養器でふ化させ仔魚や稚魚の形態を観察し分類する方法	・現地で実施するため、時間と費用がかかる
遺伝子解析	定性	遺伝子の塩基配列情報を利用し同定する方法	・魚卵からのDNA抽出成功率が低い ・適用できる魚種が限定

→改良

## 遺伝子解析手法について

### (1) 遺伝子解析の手順

魚卵同定の手順を図2に示します。遺伝子解析による同定では、魚卵採取直後に顕微鏡下でタイプ分けを行い、70~90%濃度のエタノールで固定し、抽出したDNAの塩基配列を解読してデータベースと照合することで種類を判別します。

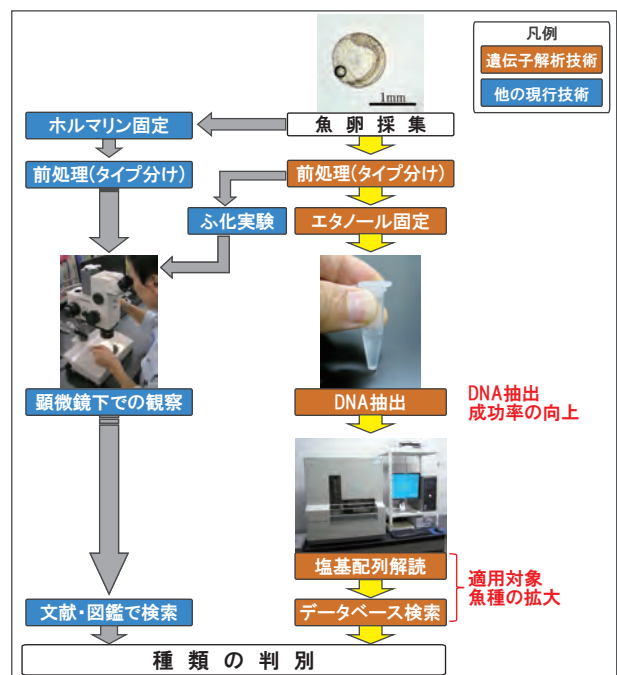


図2 魚卵同定の手順

従来の遺伝子解析における課題を踏まえて、本開発では下記の改良を図りました。

[DNA抽出成功率の向上]

通常、魚類のDNA抽出の材料として筋肉部や内臓、鰭等の組織片が使用されます。しかし、魚卵やふ化仔魚は組織片と比べて試料中のDNA量が極めて少ないため、一般的な前処理方法でDNAを抽出することは困難でした。

そこで当社では、1個の魚卵からでも高い確率でDNAを抽出できる最適な前処理方法を採用しました。これにより、魚卵試料におけるDNA抽出成功率が99%となることが確認されました。

[適用対象魚種の拡大]

DNA情報で同定できる生物種数は、既存のDNAデータベースに登録されている種数に依存するため、DNAのどの領域を種判別の対象にするかが重要となります。当社では、魚卵同定に最も適していると考えられる領域について塩基配列の解読を行い、種判別を行います。

国際DNAデータベースに登録されている魚類の塩基配列データ数は増加しつつあり、種判別に使えるデータ数は現在4万件以上あります。当社では、データベースへの登録がない種でも特定領域の塩基配列が解れば、種判別が可能です。

(2)遺伝子解析の有効性について

遺伝子解析に用いた172検体について、現行同定技術(固定試料分析、ふ化実験)で種同定をした結果と比較しました(図3)。

種・属レベルまで同定できた検体は、固定試料分析で9検体(5%)、ふ化実験で30検体(17%)でしたが、遺伝子解析では92検体(54%)と大幅に増えました。

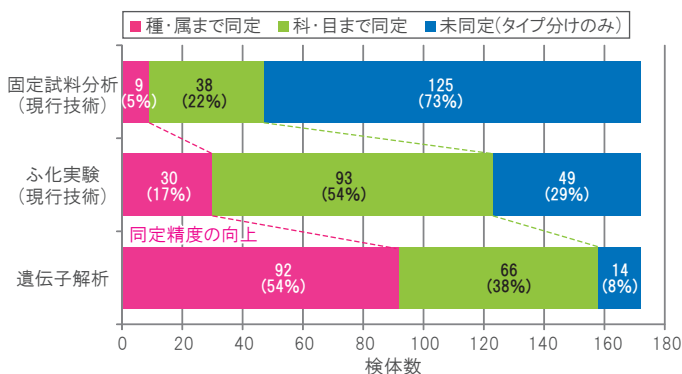


図3 各同定技術による種同定集計結果

さらに、科・目レベルまで同定できたものも含めると、遺伝子解析では合計158検体(92%)となり、現行同定技術に比べて多くの試料の同定が可能となることが確認されました。

各同定技術により種判別できた結果の一例を示します(表2)。固定試料分析やふ化実験では、単脂球形卵等のタイプ分けのみか、科・目等のある分類群に含まれる一種との結果が得られた試料について、遺伝子解析では種名を確定することができました。

表2 各同定技術による種判別結果例

海域	種判別結果		
	固定試料分析	ふ化実験	遺伝子解析
A海域	単脂球形卵 (未同定)	ベラ亜目	シロクラベラ
B海域	アオブダイ亜科	アオブダイ亜科	オビブダイ
C海域	単脂球形卵 (未同定)	種不明(未同定)	シログチ
D海域	単脂球形卵 (未同定)	ベラ科	キュウセン
E海域	ネズッコ科	ネズッコ科	トビヌメリ

おわりに

当社では、1997年のウナギ蒲焼の遺伝子鑑定に始まり、トカゲハゼやヒヌマイトトンボ等の希少生物の遺伝的多様性調査等、他社に先駆けて遺伝子解析技術を積極的に取り入れてきました。

近年では、対象生物の捕獲を伴わずに収集可能な、糞や食痕等の試料を用いた種同定や個体識別手法を開発しています<sup>1)</sup>。

今回紹介した遺伝子解析手法による魚卵同定技術は、海域環境調査で実施される卵稚仔調査における魚卵の種同定精度を向上させるものです。今後、海洋生態系・漁場の保全、生物多様性の評価において有効なデータ取得のための新たなツールとして期待されています。

当社では、今後もいち早く社会のニーズに応えられるように最新の知見・情報を収集し、新技術の開発に積極的に取り組んでいきます。

[参考文献]

1) 当社Webサイト掲載技術資料:「DNA分析-生物の種判別、遺伝的多様性の調査、蒲焼等の食品など-」  
[http://ideacon.jp/contents/technology/analysis/e2-06\\_dna.htm](http://ideacon.jp/contents/technology/analysis/e2-06_dna.htm)