

島根大学研究機構 戦略的研究推進センター 『萌芽研究部門』	平成26年度	<h1 style="text-align: center;">年度報告 書</h1>	提出日 平成27年1月17日
① プロジェクト名	「隠岐の秋ブドウ」の漁況予測のための資源生態調査		
② プロジェクトリーダー ー	広橋 教貴	所属	生物資源科学部隠岐臨海実験所
		電子メール	hiro@life.shimane-u.ac.jp
③ プロジェクトの概要 (プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。)			
<p>山陰地方、とくに島根県隠岐島漁業において主要漁獲対象種であるケンサキイカ(通称“シロイカ”)を、安定的かつ持続的に漁獲資源として確保していくためには、この海域における生殖、生態、漁況について、基本的知見の収集とその分析が必要である。“シロイカ”は、初夏に来遊するケンサキイカと秋以降に来遊するブドウイカが知られているが、両者のゲノムに違いはなく、よって現在では分類学上、ケンサキイカ: <i>Photololigo edulis</i> という学名で同一種として扱われている。夏群のケンサキイカは九州地方を回遊するため、山陰における漁獲量は年変動が大きい。一方、秋群のブドウイカは、別ルートを回遊すると予想されており、漁獲圧が少なく、その結果、山陰のシロイカにおいて漁獲量の比重が高く、重要水産資源となっている。従ってこの秋群の資源生態を正確に掴むことが、長中期的な漁況予測を可能とし、山陰シロイカの市場への安定供給、ひいてはブランド化を進める基盤となる。そこで本研究では、シロイカ漁獲量予測の確立に重要なケンサキイカとブドウイカを明確に区別するための遺伝学的、形態学的特徴を見つけ、その中から信頼性と利便性の高い2群識別法を確立することを目指す。</p>			
④ プロジェクトのメンバー及び役割			
氏名	所属(職)	本年度の役割分担	
(プロジェクトリーダー) ー 広橋教貴 尾崎浩一 初見真知子	生物資源科学部(准教授) 生物資源科学部(教授) 生物資源科学部(准教授)	研究統括および現地調査の実施 情報の収集と分析 データ解析	

⑤ (1) 本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価

(本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って、計画と達成目標を箇条書きにしてください。また、その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し、以下の基準に従って自己評価して下さい。)

- A : 目標以上に成果をあげた。
- B : ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。
- C : 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。
- D : 年度末までに目標達成は不可能である。

自己評価が B 以外の場合には、その原因についても記載して下さい。 2～3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。)

計画と達成目標	達成状況と自己評価
① ケンサキイカ、およびブドウイカの採集とDNAシーケンスの為に試料作製	(自己評価)C 日本海南西部における平成 26 年度の 9 月までのシロイカ(ケンサキイカ)水揚量は各地で前年比 50%前後と大きく下回り、9 月～12 月期は平年の約 15%に留まり、とくに隠岐地方においては活魚の入手がほとんど困難な状態が続いた。そのため DNA 解析の為に試料調整が極めて困難であった。そこで過去 3 年間で集めた凍結サンプルより実験を進め、それ以外は鳥取県など島外からの食用イカを購入して行わざるを得なかった。
②上記2群の季節推移のモニタリング	(自己評価)C 上記の理由により、当初の計画した通りには進まなかったが、隠岐近海で捕獲され、鮮魚として販売されるケンサキイカをよく調べたところ、これまで見過ごされていた初冬のケンサキ型を見つけることができた。
③2群の形態的差異の測定と組織化学分析による2群表現型の違いを明らかにする。	(自己評価)B 過去 3 年に渡って収集された個体試料を解析して、アロメトリー以外にケンサキイカとブドウイカを区別する形態的特徴を見つけることができた。すなわち、夏期来遊群のケンサキイカタイプは、精子平均鞭毛長が 65.7um であるのに対し、秋期来遊群のブドウイカのそれは、108um であった。夏群に関しては十分な個体数からデータを得ることが出来た。 2 群におけるタンパク質発現の差異を、レチノイド代謝の観点から検討するため、ケンサキイカの各組織におけるレチノイド組成の分析を行ない、基礎データを収集した。その結果、眼以外に肝臓において 11-シス形レチノールが多量に貯蔵されていることを見出した。このデータを基に、今後ブドウイカとの比較等を行う。
④ミトコンドリア DNA の塩基配列比較による同種・別種・隠蔽種の判別	(自己評価) 上記の個体試料から DNA 解析を行い、ミトコンドリア DNA の非コード領域内に個体差を示す繰り返し配列を見出した。現在、この領域を用いて 2 群の集団解析を行っている。そのため評価は空欄とする。

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から、今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また、各グループ間での連携状況についても記入して下さい。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について(自己評価)

上述したように今年度はケンサキイカが全般的に不漁で、計画した試料採集が出来なかったことが、研究遂行に大きな障害を与えた。そのなかで、かつて 3 年間で集めた試料を丹念に解析したり、活魚の利用に拘われず、島外から食用に入荷される鮮イカを用いることで、新知見を得たことは良かった。今年度の研究期間中にこれまで集めた試料の解析をほぼ終えたことから、来年度は活イカのデータを取ることが望まれる。これらを合わせて、本研究課題の成果をまとめる予定であり、若干遅れを取っているが、今年度の発見に基づいて方法論を確立できたので、次年度はまとまった成果が期待できる。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

イカ不漁という状況の中でも、メンバー 2 名の隠岐訪問を実現できたことは良かった。メールによる情報交換も必要に応じて行われ、解析方法において議論を深め、また H27 年 2 月には来島して、共同実験を行う予定を組むなど、常に有機的な連携ができています。今後さらにメンバーの専門性を生かして、残りの研究期間に本課題の問題解決を図る。

⑥ 公表論文，学会発表など（当該研究に関連した本年度の公表論文，学会発表，特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては，差し支えない範囲で記載して下さい。）

論文掲載（総件数）	3
学会発表（総件数）	4
特許出願（総件数）	0

【内訳】

●論文（年度末までに発行される学術雑誌等（紀要も含む）に掲載が確定しているものも含め，代表的なものを10件程度選んで記入してください。）

- Masa-aki Yoshida, Lixy Yamada, Hiroe Ochi, Yoko Iwata, Miwa Tamura-Nakano, Hitoshi Sawada, Warwick H. Sauer, Atsushi Ogura, Noritaka Hirohashi* Integrative omics analysis reveals differentially loaded proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2014; Apr 24 PMID: 24768636
- Noritaka Hirohashi*, Yoko Iwata, Warwick H. H. Sauer, Yasutaka Kakiuchi, Respiratory CO₂ mediates sperm chemotaxis in squids. In Sexual Reproduction in Animals and Plants. Proceedings. Eds, H Sawada, N Inoue, M Iwano, 2014; Springer Japan
- 広橋教貴 頭足類生殖システムにおける代替的適応形質の制御基盤 –統合的オーム解析– 島根大学生物資源科学部研究報告(紀要)19号 2014年 9-12.

●学会発表（代表的なものを数件記入して下さい。）

- 広橋教貴 山田科学成果発表会：平成26年5月31日 東京コンファレンスセンター有明
- 広橋教貴 8大学合同公開臨海実習：平成26年9月24日 広島大学向島臨海実験所
- 広橋教貴 理化学研究所ケミカルバイオロジー勉強会：平成26年10月1日 埼玉県和光市
- 広橋教貴 日本解剖生理合同大会シンポジウム「受精成立過程における精子の特性変化とその制御機構」：平成27年3月21日 神戸国際会議場（予定）

●特許出願 なし

⑦ 外部資金獲得状況（当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数，金額を記入して下さい。）

■外部資金獲得状況一覧		件数	金額(千円)
(1) 科研費 (配分額は間接経費を含む)		1	配分額 1,430
(2) 科研費以外の外部資金	受託研究	0	0
	共同研究	1	1,255
	寄附金・助成金	1	200
	合計	3	2,885

【一覧内訳】

(1) 科研費（科目ごとに，テーマ，研究者，金額をそれぞれ列挙してください。）

基盤(C)「精子CO₂センシングの分子基盤」(代表研究者: 広橋教貴) 1430千円

(2) その他外部資金（一覧の項目別に，テーマ，研究者，金額を列挙してください。）

富士通共同研究「海洋センシングプロジェクト」(代表研究者: 広橋教貴) 1255千円

進化学振興木村資生基金「性的対立 シンポジウム開催助成」(分担研究者 広橋教貴) 200千円

⑧ その他特筆すべき成果 (受賞、シンポジウムの開催、産学連携・地域連携に関する各種見本市、展示会への出展等も含む。)

シンポジウム開催

第 85 回日本動物学会仙台大会(東北大学 2014 年 9 月 11 日)においてシンポジウム「性的対立～対立の構図：行動から分子へ」を企画し、オーガナイザーを勤める。公益信託進化学振興木村資生基金より講演会開催の助成を受け、非会員の招待講演者を3名招へいし、約 50 名の聴衆を集めた。

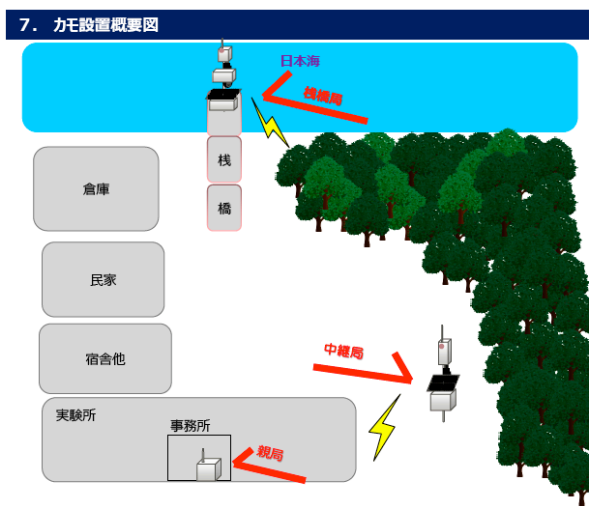
産学連携

島根大学と富士通は共同研究「海洋センシングプロジェクト」を開始し、通信システムによる隠岐の島の海洋環境モニタリング(設備費1,255,300円(税別)*)を平成 26 年 11 月よりスタートさせた。富士通が開発したマルチセンシング装置(カモ:下図)を実験所棧橋に設置し、各種気象データおよび海洋データを毎時 1 回のペースで自動計測し、通信により中継局から親局へデータを送信し、集中管理する。これによって、今後、海洋変化や気象変化の兆候を素早く捉えることで、実験所付近のアマモ場で産卵するアオリイカの繁殖生態研究に活用し、さらに自然災害・漁業被害の防災にも役立てる。

* 設備費は富士通の全額負担

地域連携

隠岐の島の中等教育機関と連携し、隠岐高校において「ジオパーク学」の特別授業(6月25日朝日新聞朝刊に掲載)、西郷中学校と JST サイエンスパートナーシップ(SPP)事業において海洋生物調査実習(7月30日～8月1日、8月17日の山陰中央新報朝刊に掲載)を開催した。隠岐の島農林水産課と協力して9月9日に隠岐の島北部沿岸に打ち寄せた大量の赤潮による海産動物の被害の調査と有害プランクトンの種同定を試みた。形態的特徴と遺伝子解析から原因種を特定し、さらに国立環境研究所から同じプランクトンを取り寄せて、ゲノム DNA の塩基配列の比較を行った。これらの調査結果を広く公開し、隠岐島の水産業や地域活性化に役立てるべく、隠岐の島町と生物資源科学部および学外有識者を招いて(ミッション報告会との合同開催という形式で)研究会を3月29日に隠岐の島で開催することに決定した。その他、本プロジェクトと密接に繋がる地域連携・大学間連携の活動として、全国臨海若手の会(7月19日～21日)を主催し、イカの研究者を数名招へいし、閉会后から数日間に渡り共同でシロイカの資源調査を行った(島前西ノ島町、下の写真)。そこでシロイカ2群に関する有益な情報交換をして、現在も東北大学と共同研究を行っている。



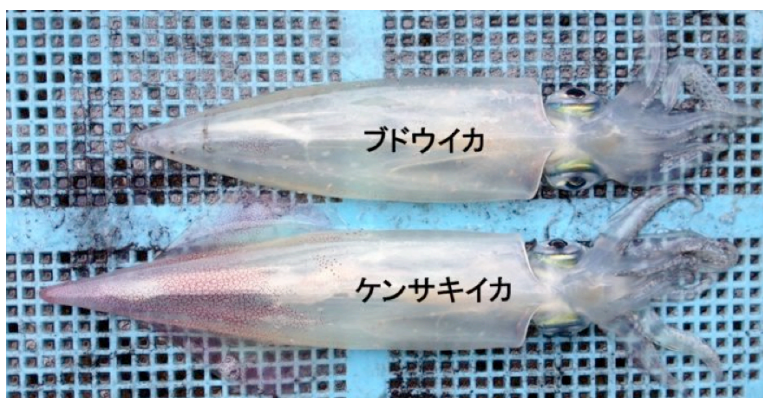
その他

文部科学省教育関係共同利用拠点に認定された(認定期間:平成 26 年 7 月 31 日～平成 30 年 3 月 31 日)ことを受け、本研究課題のシロイカを含む隠岐島フィールドを利用した生物資源の教育・研究における利活用を推進する。

⑨ 本年度の主要な研究成果 (図, 表, ポンチ絵などを多用して, 2ページ以内にわかりやすくまとめてください。)

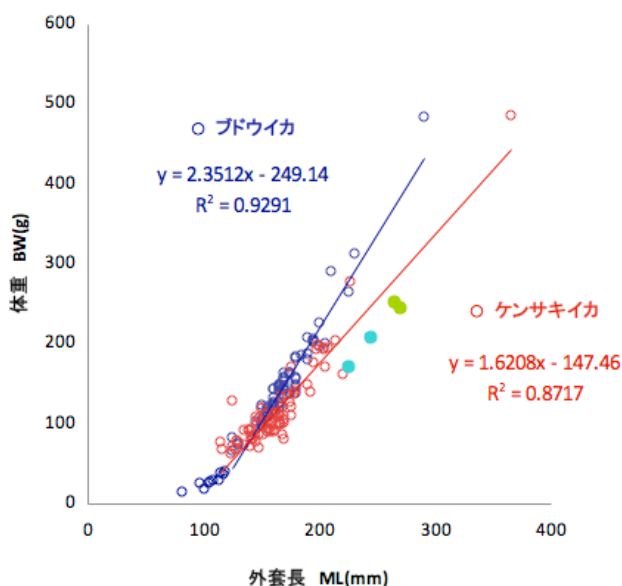
1 シロイカ 2 群の形態的差異

隠岐島(島前西ノ島)で 2012 年~2014 年の 3 年間で採集されたシロイカ(ケンサキイカとブドウイカ:右写真)の外殻長と個体重量を計測した。ケンサキイカとブドウイカの区別は、便宜的に経験に基づく時節に応じた体サイズと体型をもって行い、後に詳細な形態観察と遺伝子解析で明らかにするという手順をとった。まず体測定データを見ると、外殻長



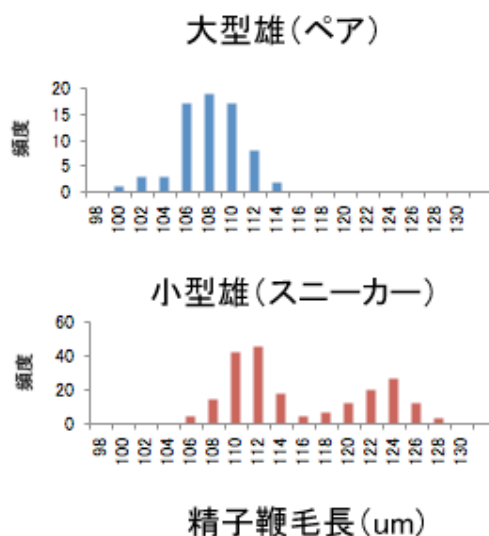
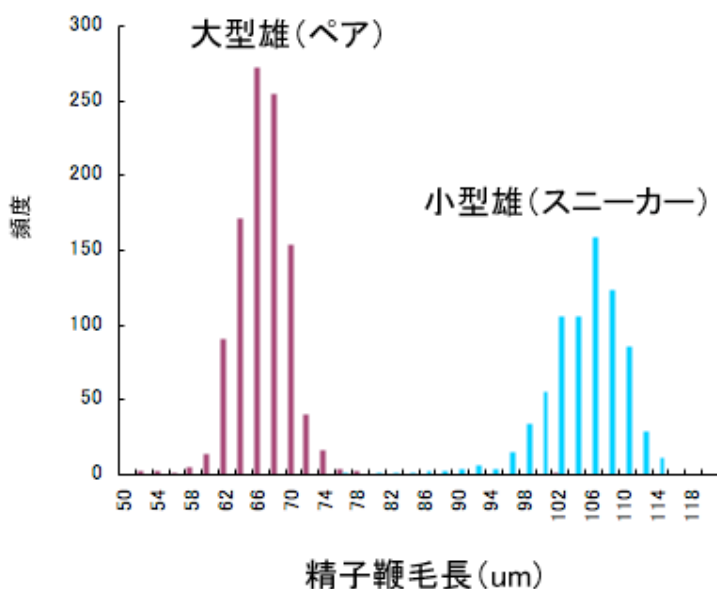
が 20 センチ以下の個体においては、体重/外殻長の比(B/L)が 2 群間で区別できないこと、それ以上の個体では区別可能であること、同一集団内において B/L 値は体サイズや季節に拘わらずほぼ 1 次関数式に近似され、その傾きはケンサキイカでは 2.35、ブドウイカでは 1.62 であることが分かった(右下図)。

つぎに成熟雄が生産する精子の形態に何か違いがないか調べた。その理由として、これまで近縁な沿岸性イカであるヤリイカにおいて形態的差異に基づく雄 2 型が存在し、またこの雄 2 群の精子はその鞭毛長が顕著に異なることを発見していたからである。体サイズが 20 センチ以上の個体を集め、B/L プロットから暫定的にブドウイカかケンサキイカかを判別し、それらの雄がもつ精子鞭毛サイズを測定したところ、ケンサキイカでは 65.7um で、ブドウイカでは 108um と顕著な違いがあることを発見した。次に 20 センチ以下の個体群で成熟した雄を探し、同様に精



ケンサキイカ(夏来遊群)

ブドウイカ(秋来遊群)



子サイズを測った。前述のヤリイカにおいて、我々は以前に小さな雄がつくる精子はより大きいことを見出していた。この小さい雄集団をスニーカーと呼び、大きな雄群とはその生殖行動の違いで区別される。シロイカにおいてこの小さな雄(すなわちスニーカー雄)の存在が不明であったため、まず 20 センチ以下の成熟雄がスニーカー雄であるかどうか、精子を保管する精莖と呼ばれる貯精器官の形状より判別を行った。その結果、ヤリイカと同様、シロイカのケンサキイカ型とブドウイカ型のどちらにもスニーカー雄の存在が確認された。さらに、精子鞭毛長を測定すると、ケンサキ型のスニーカー精子は、103.8um で、ブドウ型のスニーカー精子は 110um と 124um の2つの集団が認められた。これらをまとめたものを上図に示した。ブドウイカのデータ数が不足しているため、結論づけが出来ないことを承知の上で、議論を進める。夏のケンサキイカの小型群と秋のブドウイカ大型群の精子サイズはかなり近い値を示した。ケンサキイカのスニーカー群が成長して、ブドウの大型群になる可能性については強い証拠がないが否定的である。強いて理由を挙げるなら、1) 一年の寿命のうち、生殖期間は限られており、夏(7~8月)に成熟した個体が晩秋(~12月)まで生殖し続けているのは不可能であること、2) さらにケンサキイカ小型群は決して若齢層ではなく、成長曲線が既にプラトーに達していることが、ヤリイカのデータから予想されることなどである。しかし、ブドウイカのスニーカー群が2峰分布を示すこと、これがヤリイカでは見られないことから、予断を許さない状況である。

これまで夏までに来遊する群れはケンサキイカで、夏以降のものをブドウイカとして認識していた。平成 26 年 11 月に隠岐近海で漁獲されたシロイカ(11月28日に鮮魚として店頭に並んだもの)について調べた(最初に示した図内の黄色でマークしたもの)ところ、2 個体はいずれも成熟雄で精莖形状から大型雄(consort 雄と呼ぶ)であることが判明し、さらに B/L からケンサキイカタイプであることが推定された。初夏(6月)に産卵されたものが 5~6 ヶ月の成長期間を経て成熟した可能性が高い。寿命 1 年と言われるアオリイカにおいても、飼育環境下では 100 日で成熟したというケースもある。ケンサキイカとブドウイカは来遊時期と回遊ルートの違いから生殖的に隔離されるものと考えられてきたが、今回の晩秋におけるケンサキイカ成熟雄の発見から、これまでの仮説の見直しが迫られることとなるかも知れない。今後、全シーズンを通して継続的にシロイカの採集と解析することで、真相を究明していく予定である。

2 シロイカ2群におけるレチノイド代謝系の比較

イカは脊椎動物や節足動物と同様、高度に発達した視覚系を有しており、捕食や生殖などの行動に利用している。視覚の入り口となる視物質の合成には、11-シスレチノールというレチノイド(ビタミンA)が必須であり、その生成のためのレチノイド代謝系とそれに関わるタンパク質の発現は、視覚が関与する行動に重大な影響を及ぼすと考えられる。山陰近海で捕獲されるスルメイカでは、初夏に漁獲される群と秋に漁獲される群との間で、レチノイド代謝に関わるタンパク質の発現量に差があることが示唆されているが、正確な学術的報告はまだない。本研究では、ケンサキイカとブドウイカについて、レチノイド代謝系の差異を明らかにすることを目的に、まず、ケンサキイカについて、眼をはじめとする各組織に含まれるレチノイドの組成分析を行った。その結果、肝臓に多量の11-シスレチノールが存在することを見出した。眼以外の組織での11-シス形レチノイドの存在は、これまで他の動物では報告されておらず、新奇の重要な発見である。今後、今年度のデータを基に、ブドウイカおよび他の軟体動物との比較を行うとともに、11-シスレチノイドの生成機構についても検討する予定である。

3 シロイカ2群の遺伝的差異について

本研究を遂行している最中に他の研究グループから論文が発表され、ケンサキイカとブドウイカのミトコンドリア DNA の全長を比較したところ、約 99.9%が identical であるという内容であった。我々は公表されたゲノム配列から非コード領域に AT リピート配列があり、両者間でリピート数に違いがあることを見つけた。そこでこの AT リピート数多型の頻度がケンサキイカ群とブドウイカ群との間で偏りがあるかどうか調べはじめた。今年度から来年度にかけて十分な試料を得てシーケンス結果から統計学的な解析を行う予定である。