令和元年度水産学技術賞

高温耐性ニジマスの作出と高温耐性の生物学的評価

稲野 俊直,^{1*} 田牧 幸一,² 山田 和也³¹近畿大学水産研究所, ²公益社団法人宮崎県漁村活性化推進機構, ³宮崎県農政水産部水産政策課

Production of thermally tolerant rainbow trout and biological evaluation of thermal tolerance

TOSHINAO INENO,^{1*} KOICHI TAMAKI² AND KAZUYA YAMADA³

¹Aquaculture Research Institute, Shingu Station, Kindai University, Shingu, Wakayama 647-1101, ²Miyazaki Fishing Communities Revitalization organization, Miyazaki, Miyazaki 880-0858, ³Miyazaki Prefecture, Agriculture and Fisheries Department, Fisheries Administration Division, Miyazaki, Miyazaki 880-8501, Japan

はじめに

宮崎県には1911年（明治44年）に初めてニジマス *Oncorhynchus mykiss* が移植され御池に放流された。その後、1960年代に長野県や岐阜県等から養殖用として宮崎県水産試験場にもたらされたニジマスによって、種苗生産技術開発が行われた。同じ頃、宮崎県水産試験場は、水温が高い平野部でも飼育できるニジマス品種の改良に取り組むようになった。

1966年に始めたニジマスの選抜淘汰は、夏季に産卵期前の1歳魚を高水温（最高27℃程度）にした水槽で飼育して、生残個体を親魚にして次世代の生産を繰り返す方法であった。また、1971～1977、1985～1992年および1998年の夏季に1歳魚を30～35℃に1～5分間浸漬して同様の選抜淘汰を行った。そして飼育試験や民間養魚場では、この高温選抜系が24℃でも活発な摂餌行動を示し、生残率も高いと評価されることもあったが、その生理機構は科学的に検証されていなかった。また、外部の研究機関からは必ずしも一定の評価が得られていなかった。そこで高温選抜系の高温耐性について、生物学的評価を行い更なる選抜手法の改良に取り組んだ。

1. 受精卵と稚魚の高温耐性

授精・ふ化水温、系統、発生段階の違いによる受精卵の半数致死温度（LT₅₀）を比較した。由来が明確な標準系ニジマス（ドナルドソン系）と高温選抜系のそれぞれの卵を10および14℃で授精した胚を用いて、授精時の水温で卵割初期、胞胚期、神経胚期に達した胚について、10℃授精胚は13～19℃の7通り、14℃授精胚は17～21℃の5通りの水温において7.5、15、30、60、

180、360、720、1,440分間暴露して授精時と同じ水温でふ化率を求めた。

その結果を基に暴露時間毎にLT₅₀を算出したところ、10および14℃授精胚はいずれも暴露時間の延長に伴い低下した。10℃授精胚のLT₅₀は、胞胚期の1,440分間暴露において高温選抜系（15.1℃）は、標準系（13.5℃）より有意に高かったが、卵割初期では17.4℃と17.3℃、神経胚期では15.7℃と14.0℃と、LT₅₀に系統間の差はなかった。一方、14℃授精胚のLT₅₀は、いずれの発生段階においても高温選抜系は標準系より高く、両系統のLT₅₀の差は、卵割初期、胞胚期および神経胚期でそれぞれ、1.7、1.3および1.4℃であった。すなわち、高温選抜系の受精卵は、10℃では胞胚期、14℃では卵割初期、胞胚期および神経胚期において標準系よりLT₅₀が高く、受精卵において高温耐性の形質を獲得していることが示唆された。

稚魚についても高温選抜系と標準系を対象に、24～29℃において1℃間隔で試験区を設定し、稚魚を0.5～96時間暴露して各試験区の死亡数を記録しLT₅₀を求めた。3～12時間暴露では、系統間で差は認められなかったが、72時間のLT₅₀は高温選抜系（25.8℃）が標準系（24.3℃）より高かった。

次に、予め15℃または20℃に馴致した高温選抜系と標準系（ドナルドソン系および長野産）の稚魚（3.0～24.2g）を対象に、5℃/時間で水温を上昇させて臨界最高温度（CTM）と死亡温度（DT）を比較した。

その結果、15℃馴致の高温選抜系および長野産ともにCTMは29.6、29.7℃、DTは30.0、30.1℃と差がなく、20℃馴致でも高温選抜系と長野産のCTMは双

* Tel : 81-735-29-0001. Fax : 81-735-29-0147. Email : ineno@kindai.ac.jp

方 30.4℃ で差がなかったが、ドナルドソン系 (29.9℃) より高かった。DT は、20℃ 馴致の高温選抜系、長野産およびドナルドソン系において、それぞれ 30.9℃、30.6℃ および 30.2℃ と、高温選抜系が標準系の 2 系統より高かった。このように CTM と DT は、15℃ 馴致では差が認められなかったが、20℃ 馴致では高温選抜系が高くなる傾向を示し、馴致温度が高い程、高温耐性が強くなることが示唆された。

以上のように、高温選抜系は受精卵や稚魚において、ある程度の高温耐性を獲得していると考えられた。

2. 高温飼育下における摂餌

前述の生物学的指標では、その差は僅かしかなく高温選抜系の有用性を説明することは難しかった。養殖規模で高温選抜系を飼育すると、高水温期にも摂餌活性が衰えないという印象を受けることから、高温選抜系と標準系 (ドナルドソン系) の摂餌率を高温飼育下において自発摂餌装置を用いて比較した。

平均体重 7.5 および 8.7 g の両系統を 50 尾ずつ供して、17.5 から 25.7℃ まで、平均 0.3℃/日の昇温速度で 21 日間かけて緩やかに水温を上昇させたところ、日間摂餌率は標準系 (4.1%) に対して高温選抜系 (7.1%) が高かった。

次に平均体重 22.4 および 22.6 g の両系統を 37 尾ずつ供し、水温を 0.5℃/日で 13 日間かけて 24.1℃ に上昇させたところ、18 日目までは両系統間の日間摂餌率に差は認められなかったが、それ以降の日間摂餌率は、高温選抜系 (0.8%) が標準系 (0.2%) より高い状態を維持した。

さらに平均体重 34.8 および 34.1 g の両系統を 27 尾ずつ供し、水温を 16.7℃ から 21.7℃ へと 1 日で急上昇させ、以降 28 日間かけて 0.1℃/日で 24.4℃ に緩やかに水温を上昇させたところ、昇温直後から標準系の日間摂餌率は低下し 0.1% を示したのに対して、高温選抜系 (1.0%) は高い状態を維持した。

この結果は、高温選抜系が 24℃ でも活発に摂餌する特性を裏付けるものであった。

3. 育種を目的とした系統間の交配と高温耐性

稚魚 (3.0~24.2 g) の CTM を比較した実験において、ドナルドソン系 (宮崎県水産試験場で継代飼育) は高温選抜系より有意に低い CTM の値を示した。¹⁾ そこで、高温耐性の低い系統を高温選抜系と交配して F1 を作出するため、2 系統のドナルドソン (青森系と日光系) の親世代 F0 の CTM を測定して、同時に測定した高温選抜系と比較した。

15℃ 馴致した 3 系統の F0 の CTM は、29.1~29.2℃ であり、差が認められなかったが、20℃ 馴致では、日

光系 (29.7℃) は、青森系 (29.9℃) および高温選抜系 (30.0℃) より CTM が低く、以前の研究を支持する結果であった。各系統の CTM は、20℃ 馴致が 15℃ 馴致より高い値を示し、その差は高温選抜系 (0.9℃)、青森系 (0.7℃)、日光系 (0.4℃) の順に大きかった。馴致温度 (10, 15, 20℃) と CTM には高い正の相関があり、その傾きは、0.18℃であったとの報告がある。²⁾ 高温選抜系でも同様の CTM の上昇が認められ、20℃ 馴致の高温選抜系の CTM は、同報告の 15℃ 馴致 (29.1 温選抜系の℃)、20℃ 馴致 (29.8 温選抜系の℃) より高い値を示していた。高温耐性は、遺伝的差異³⁾ や馴致温度^{3,4)} によって影響を受けるが、ベニザケ *Oncorhynchus nerka* は、産卵回遊の間に地域特異的な温度適応を示すことが示唆されており、^{5,6)} ニジマスでもよく似た適応が 29℃ に達する砂漠の環境で確認されている。⁷⁾ 高温選抜系は、本研究において比較した 2 系統以外の系統と比較しても高温耐性に優れていることが予想され、馴致温度が高いほど他の系統より高い CTM を示すことが推察される。

次に、高温耐性が低い系統と判断した日光系 (N) と高温選抜系 (T) を交配した F1T 系及び F1N 系 (母系を T 又は N で示している) の CTM を測定した。メス親を高温選抜系とした F1T および及びオス親を高温選抜系とした F1N の CTM は共に 30.1℃ であり、高温選抜系と日光系の雌雄を入れ替えた交雑群間で差は認められなかった。また、F2 の CTM はメス親を高温選抜系とした F1T の同胞交配 F2T (30.1℃) とオス親を高温選抜系とした F1N の同胞交配 F2N (30.2℃) に差は認められなかった。すなわち、高温選抜系より明らかに CTM が低い標準系と高温選抜系を交配した F1 は、雌雄の何れが高温選抜系であっても CTM が標準系より高く、高温選抜系 F0 とは差がなく、その完全同胞の F2 でも CTM が標準系より高かったことから、高温選抜系と他系統との交配により高温耐性に優れた個体群を作出できることが示唆された。

さらに、F1 の変動係数は 0.50 と 0.53 であったが、F2 では 0.88 と 1.36 と変異が大きかったことから、表現型の変異の広がり確認され、F2 以降の選抜が効率的な育種に繋がると考えられた。

4. 改良した選抜指標の検証

CTM 実験の場合、馴致温度から CTM までの水温上昇が体温上昇と大幅な時間差がなく、⁸⁾ 体温が環境温度に追従できる一定割合で数時間かけて上昇する。⁹⁾ 一方、魚が CTM で平衡を失う時間として定義されている有効時間 (ET) を高温耐性の評価指標としている研究もある。^{9,10)} CTM と ET は高温耐性の表現型を正しく評価するものの、時間がかかり、1 つの実験で少数の個体

しか検査できない。さらに、CTM に達した個体は、実験後に死亡する可能性が高い。そこで、馴致温度から直接 CTM 付近の水温に暴露して ET を測定する方法によって試行錯誤したところ、17°C 馴致では 28°C 暴露が効率的であったため、この手法による ET の選抜育種の指標としての有効性を検証した。

小型魚は、大型魚よりも表面積対体積比が高いため水温の影響を受けやすく、大型魚よりも体温が急激に上昇し、早く平衡喪失する。¹¹⁾ しかし、高温選抜系でふ化日が若干異なり体重に有意な差がある大きな早期稚魚（平均 1.83 g）と小さな晩期稚魚（平均 0.67 g）の ET は、それぞれ平均 41.2 分と 67.1 分を示し、大きな早期稚魚が有意に早く平衡喪失した。さらに、F2N 稚魚の ET と体重、体長の両方の間に高い負の相関関係が観察されたため、ET によって高温耐性を比較するためには類似の体サイズのグループ間で比較する必要があると考えられた。過去の研究ではニジマスを含む複数魚種の稚魚から若魚・成魚における CTM と体長との間には相関がなかった。¹¹⁾ 一方、ニジマスの ET は、体サイズと負の相関、¹²⁾ アパッチトラウト *Oncorhynchus gilae apache* とリオグランデカットスロート *Oncorhynchus clarkii virginialis* では、CTM と体サイズに負の相関、¹¹⁾ ブルーギル *Lepomis macrochirus* は大型魚の平衡喪失温度が小型魚より低いことが報告されている。⁸⁾ 本研究の結果を含めても魚体の熱交換率だけでは、ET と魚体サイズの関係を説明することは難しい。本研究で見られた小型魚が示した長い ET は、小型魚の代謝が大型魚より小さいことに関係していると推察される。平均体重に有意差のない日光系と F2T 及び F2N の稚魚を比較した時、ET は F2T 稚魚（52.8 分）および F2N 稚魚（60.9 分）が日光系（40.5 分）より有意に長かった。これらの結果は、熱交換率が同一であっても系統間で ET に差があることを意味し、高温選抜系から生産された F2 稚魚が、高温耐性の表現型を獲得したことを示唆しており、CTM を測定した前述の研究の結果と一致していた。¹³⁾

成長の良い系統を育種する際に選抜の指標として体重や肥満度等が用いられるが、養殖ニジマスの体重と肥満度の変動係数は、それぞれ 21 と 17% であるが、¹⁴⁾ 対照的に我々の以前の研究で F2 稚魚の CTM の変動係数は 0.88 と 1.36% であって、¹³⁾ 本研究において計測された ET の 16~39% の変動係数は、ET が高温耐性の選抜指標として CTM より有用であることを示唆している。

致死的な高温ストレスの反応には 3 つの段階があり、第 1 段階は異常な行動を特徴とし、第 2 段階は平衡喪失を伴い、第 3 段階では鰓蓋運動が停止し死亡する。¹⁵⁾ ブラウントラウト *Salmo trutta* を高温ストレス応答の第 1 および第 2 段階から低温の水に移した場合、通常、回復できることがわかっている。¹⁵⁾ 本研究におい

て、同様に第 2 段階の平衡喪失状態からほぼ全個体が回復したことは、生きた個体を必要とする選抜育種を行う際に、高温耐性形質の指標として、ET が有用できることを示唆している。

今後は、ET の再現性や実際の育種への応用について研究する必要がある。

謝 辞

本賞に推薦頂いた東京大学 渡部終五名誉教授、浅川修一教授にお礼申し上げます。

本研究は、東京大学 渡部終五名誉教授の御指導、御鞭撻の下に行われたもので、深く感謝申し上げます。また、ニジマスの CTM、LT₅₀ の測定に関する実験方法について詳細な御助言および御協力をいただいた財団法人海洋生物環境研究所 土田修二博士、自発摂餌に関する実験の計画の立案において数多くの御助言と御協力をいただいた東京海洋大学 延東真名誉教授、本研究にとって重要なニジマスの高温選抜系の育種に関する過去の資料の提供や貴重な御助言をいただいた元宮崎県水産試験場長 神田美喜夫氏、高温選抜系ニジマスの各種実験に際し多大な御協力をいただいた元宮崎県水産試験場小林分場長 小金丸隆氏、栗田壽男氏、兼田正之氏、毛良明夫氏並びに職員の皆様に感謝申し上げます。

本研究の一部は、平成 21~25 年度地球温暖化対策推進費委託事業（水産庁増殖推進部研究指導課）によって実施され、共同研究において御尽力いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所 尾島信彦博士、馬久地みゆき博士、北村章二博士、矢田崇博士、武藤光司氏、東京大学 浅川修一教授、木下滋晴准教授、アクトメッド㈱ 陳盈光博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ineno T, Tsuchida S, Kanda M, Watabe S. Thermal tolerance of a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* strain selected by high-temperature breeding. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 767-775.
- 2) Currie RJ, Bennett WA, Beitinger TL. Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species. *Environ. Biol. Fish.* 1998; **51**: 187-200.
- 3) Elliott JM. Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Freshw. Biol.* 1991; **25**: 61-70.
- 4) Berger EM, Woodward MP. Small heat-shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Exp. Cell Res.* 1983; **147**: 437-442.
- 5) Lee CG, Farrell AP, Lotto A, MacNutt MJ, Hinch SG, Healey MC. The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks. *J. Exp. Biol.* 2003; **206**: 3239-3251.
- 6) Eliason EJ, Clark TD, Hague MJ, Hanson LM, Gallagher ZS, Jeffries KM, Gale MK, Patterson DA, Hinch SG, Farrell AP. Differences in thermal tolerance among sock-

- eye salmon populations. *Science* 2011; **332**: 109–12. doi: 10.1126/science.1199158.
- 7) Pickering AD. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 1992; **100**: 125–139.
 - 8) Cox DK. Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In: Gibbons JW, Sharitz RR (eds). *Thermal Ecology*. CONF-730505, Nat. Tech. Inf. Serv., Springfield. 1974; 158–163.
 - 9) Perry GML, Danzmann RG, Ferguson MM, Gibson JP. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in out-bred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 2001; **86**: 333–341.
 - 10) Danzmann RG, Jackson TR, Ferguson MM. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. *Aquaculture* 1999; **173**: 45–58.
 - 11) Recsetar MS, Zeigler MP, Ward DL, Bonar SA, Caldwell CA. Relationship between fish size and upper thermal tolerance. *Trans. Am. Fish. Soc.* 2012; **141**: 1433–1438.
 - 12) Perry GML, Matyniuk CM, Ferguson MM, Danzmann RG. Genetic parameters for upper thermal tolerance and growth-related traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2005; **250**: 120–128.
 - 13) Ineno T, Tamaki K, Yamada K, Kodama R, Tsuchida S, Tan E, Kinoshita S, Muto K, Yada T, Kitamura S, Asakawa S, Watabe S. Thermal tolerance of a thermally selected strain of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and the pedigrees of its F1 and F2 generations indicated by their critical thermal maxima. *Fish. Sci.* 2018; **84**: 671–679.
 - 14) Gjedrem T. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac. Res.* 2000; **31**: 25–33.
 - 15) Elliott JM. Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. In: Pickering AD (eds). *Stress and fish*. Academic Press, London. 1981; 209–245.