



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ふ化放流事業における初期生育環境がサケ稚魚の分子応答と生理特性に与える影響
Author(s)	小亀, 友也
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第16711号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16711
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99556
Type	doctoral thesis
File Information	Yuya_Kogame_summary.pdf, 全文の要約



主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：小亀 友也

学位論文題目

ふ化放流事業における初期生育環境がサケ稚魚の分子応答と 生理特性に与える影響

サケ *Oncorhynchus keta* は北太平洋沿岸域に広く分布し、日本では北海道を中心に重要な水産資源として利用されてきた。北海道では 19 世紀末から人工ふ化放流事業が本格化し、現在では年間約 10 億尾の稚魚が放流されている。しかし、放流規模の拡大にもかかわらず、2000 年代以降は北海道集団を中心に来遊数の減少が続いている。この問題には、温暖化による海洋環境変化と長期的なふ化放流の影響が複合的に関与していると考えられている。

サケの稚魚は降海直後から高い遊泳能力、代謝能、浸透圧調節、捕食回避行動などの能力を同時に要求される。また、サケの回帰率は、沿岸滞在期の成長速度や肥満度、それらを支える餌環境と密接に関連している。近年の温暖化に伴う水温上昇や餌環境の変化により、成長速度や肥満度が十分でない個体の割合が増加し、その結果、初期海洋期における減耗が強まっていると考えられる。

一方、ふ化場環境は高密度飼育や給餌条件、水温などが自然河川とは大きく異なる。ふ化場での飼育は、稚魚の成長促進には有利である反面、行動や生理特性の発達が十分に促されない可能性がある。ふ化場から放流した個体は野生個体に比べて降海後の生残率が低いことが報告されており、ふ化場における飼育条件が回帰率に影響すると考えられる。放流個体の生残率を高めるためには、生育環境の違いが稚魚に与える影響を明らかにし、それを踏まえた飼育環境の改善が求められる。また、放流後の個体には、ふ化場飼育時に起因する選択圧が作用し、野生個体とは異なる形質を有する個体が回帰する可能性がある。回帰した個体は再生産に用いられるため、遺伝的・表現型的な変化が世代を通じて集団に蓄積すると考えられる。そのため、ふ化放流の影響を短期的な飼育環境の問題にとどめず、長期的に反映される形質の変化についても考慮する必要がある。

近年、稚魚の形質の変化を説明する分子基盤としてエピジェネティクス、特に DNA メチル化が注目されている。DNA メチル化は塩基配列を変化させることなく遺伝子発現を調節する仕組みであり、栄養状態やストレス、化学物質曝露など多様な環境要因に応答して変化し得る。自然環境とふ化場環境といった生育環境の違いは、異なる DNA メチル化状態を誘導し、稚魚の形質に影響している可能性がある。したがって、DNA メチル化状態を調べることは、初期環境が稚魚の形質に及ぼす影響を分子レベルで捉えるための有効な手段となり得る。

そこで、本研究では、サケにおける初期発生段階の水温条件と浮上後の飼育環境、さらに親魚由来の違いが、分子応答と生理特性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

第一章では、ふ化放流事業で行われる飼育水温の人為的な操作が稚魚に与える影響を明らかにするため、異なる水温条件で飼育した稚魚の成長および白筋と肝臓における総メチル化率を比較した。受精卵を 5℃で浮上まで飼育し、浮上後は一方を 5℃ (L_L 群)、他方を 10℃ (L_H 群) で放流サイズ(尾叉長約 50 mm)まで飼育した。また、受精卵を 10℃で放流サイズまで飼育し(H_H 群)、浮上までと浮上後の経験水温が異なる 3 群を作出した。L_L 群は浮上後 0、20、30、42、76 日、L_H 群は 0、20、30 日、H_H 群は 0、10、21、31 日に尾叉長(FL)と体重(BW)の測定および白筋と肝臓を採取し、DNA のおよび総メチル化率を測定した。放流サイズの L_H 群と H_H 群の比較により浮上前の水温、L_H 群と L_L 群の比較により浮上後の水温が、成長と総メチル化率に与える影響を検証した。浮上時の尾叉長(FL)は、L_L 群および L_H 群に対し、H_H 群が有意に大きかった。放流サイズに到達した時点での FL は、群間で有意差は認められなかった。FL の瞬間成長率(SGR)は、L_L 群は L_H 群に比べて有意に低値を示した。浮上時の体重(BW)は、L_L 群および L_H 群が H_H 群よりも有意に小さかった。放流サイズ到達時の BW は、群間で有意差は認められなかった。BW の SGR において、L_L 群は L_H 群より有意に低値を示した。また、L_H 群は H_H 群より有意に高い値を示した。浮上後の BW および FL の SGR は L_L 群が L_H 群と比較して小さく、浮上後の水温に大きく規定されていた。また、L_H 群の BW の SGR は H_H 群に対して大きい値を示したことから、浮上前の水温もその後の成長率に影響を与えることが明らかになり、初期の成長抑制に対する回復過程として、補償成長が生じた可能性が示唆された。白筋の総メチル化率は、L_L 群および L_H 群において、FL の増加に伴い上昇する傾向が認められた。これに対し、H_H 群では、FL の増加に伴いメチル化率が低下する傾向がみられた。肝臓では、L_L 群および L_H 群で FL の増加に伴いメチル化率が低下する一方、H_H 群では増加傾向を示した。さらに、群間で浮上時および放流サイズ到達時の筋肉メチル化率を比較したところ、浮上時には H_H 群が L_L 群および L_H 群より有意に高い値を示し、放流サイズ到達時には L_H 群が H_H 群より有意に高い値を示した。一方、肝臓のメチル化率については、浮上時および放流サイズ到達時のいずれにおいても有意差は認められなかった。以上の結果から、浮上前の水温が、浮上時および放流サイズ時の白筋の DNA メチル化パターンの形成に影響する可能性が示唆された。一方、肝臓では、浮上時および放流サイズ時のいずれにおいても、水温による有意な総メチル化率の差は認められなかった。しかし、浮上後の経時的変化は浮上前の水温によって異なり、肝臓においても浮上後のメチル化パターンの形成が水温の影響を受けた可能性が示唆された。これらのことから、ふ化場での人為的な水温管理は、特に白筋における放流サイズ時の DNA メチル化パターンの形成に影響を及ぼし得ることが明らかとなった。

第二章では、飼育水温が白筋の遺伝子発現および筋形成に与える影響を解明することを目的に、第一章で作出した 3 群の放流サイズ時の白筋を対象とした RNA-seq 解析を行った。加えて、RNA-seq 解析で発現量に差が見られた遺伝子および筋形成に関わる遺伝子について、浮上時と放流サイズ時の qPCR による発現量およびメチル化状態を比較した。さらに、筋肉の組織切片を作製し白筋の筋線維径を測定し、各群の筋線維の太さを比較した。RNA-seq 解析の結果、発現変動遺伝子の数は L_L 群と L_H 群間に比べ L_H 群と H_H 群間で 2 倍以上多かった。従って、浮上までの水温は浮上後の水温よりも放流サイズ時の遺伝子発現に影響する可能性が示唆された。さらに、L_H 群と H_H 群を対象とした KEGG 経路解析の結果、L_H 群の白筋で発現が上昇していた遺伝子群は、計 10 個の経路に有意な enrichment が認められ、主に代謝系および細胞内恒常性維持に関連する経路が含まれていた。最も顕著に enrichment していた経路は解糖系／糖新生であり典型的な解糖系関連遺伝子が含まれていた。他にも炭素代謝、フルクトースおよびマンノース代謝、ペントースリン酸経路に関わる経路も活性化していたことから、浮上まで低温で管理されることに

より、白筋でのエネルギー産生能が高まると推察された。一方、H_H 群では細胞周期やモータータンパク質に関連する経路が enrichment しており、筋細胞分裂や細胞骨格形成に関わる遺伝子群の活性化が示唆された。これらの遺伝子は筋芽細胞の増殖・分化過程で高発現することから、本研究の条件下では、胚期高温群において白筋の線維形成・リモデリングが相対的に活発であると考えられた。L_H 群では、L_L 群と比較してオートファジー経路が有意に enrichment していた。これらの経路はオートファゴソーム形成やリソソーム依存的分解に関与しており、浮上後の昇温に伴う代謝負荷の増大に応答して、細胞内の品質管理やミトコンドリアの再構築が促進された可能性が考えられた。魚類においても高温条件下でのオートファジー活性化が報告されており、本研究結果は同様の温度応答を反映していると考えられた。qPCR による遺伝子発現解析では、筋発達の指標となる *creatine kinase M-type-like (ckm-like)*、*myogenin (myog)*、*paired box protein pax-7a (pax7a)* および KEGG 経路解析で変動が認められた糖代謝関連経路に含まれる *pyruvate kinase PKM-like (pkm-like)*、*ATP-dependent 6-phosphofructokinase muscle type-like (pfkm)* について群間比較を行った。浮上時では、L_L および L_H 群に比べて H_H 群で *pax7a* および *myog* の発現量が高く、さらに *ckm-like* も高い値を示していた。このことから、低温条件下では筋形成の進行そのものが遅延し、筋芽細胞の分化スイッチが十分に入っていない段階にあることが示唆された。一方で、高温条件では筋形成が早期に進行し、筋芽細胞が活発に分化・融合して筋線維を形成している段階にあると考えられた。実際、低温飼育では筋芽細胞の増殖や分化速度が低下し、筋形成遺伝子群の発現が遅延するため、本研究で得られた L 群の *ckm-like* 低値は、成熟筋線維がまだ形成途上にある段階を反映していると考えられた。放流サイズ時には、低温で長期間飼育した L_L 群は、*pax7a* および *myog* の発現量が L_H 群や H_H 群と比べて低い傾向を示したが、*ckm-like* は L_H 群と同等の水準であった。これは、L_L 群が長期の飼育により筋芽細胞を分化させ、成熟した筋線維が増えた結果であると推察された。一方、高温維持の H_H 群では *ckm-like* が L_L 群や L_H 群よりもやや低下しており、KEGG 解析の結果からも、筋線維形成やリモデリングが活発である可能性が考えられた。また、*pax7a* については高い個体も見られたが、一部の個体で低値を示したのは、すでに多くの筋芽細胞が筋線維化へと分化し、プールサイズが減少していることを反映していると考えられた。また、放流サイズ時には糖代謝に関わる *pkm-like* の発現量が浮上前の水温によって異なる傾向が見られたが、メチル化状態に大きな違いは見られなかった。筋肉の組織切片を作製し白筋の筋線維径を測定し、各群の筋線維の太さを比較した結果、浮上時では H_H 群が L_L 群および L_H 群よりも太い線維の割合が高く、放流サイズ時には L_L 群、L_H 群、H_H 群の順に太い筋線維の割合が高かった。筋線維径が大きくなると、単位体積あたりの筋維持コストが相対的に小さく、基礎代謝における省エネルギー化が生じ得ることから、飼育水温は代謝特性の形成に関与することが示唆された。また、L_H 群と H_H 群は、浮上後に同じ水温を経験したにもかかわらず、筋線維径は L_H 群でより速く肥大する傾向にあり、解糖系経路の活性化と併せて L_H 群の補償成長への関与が示唆された。

第三章では、親魚の由来と飼育環境が稚魚の代謝特性と分子応答へ与える影響を明らかにすることを目的とし、次の試験を行った。放流由来の親魚と自然産卵由来の親魚を用いて親の由来の異なる交配群を作出し、浮上後にふ化場環境（配合餌料を給餌）と自然環境（自然の餌を摂餌）で放流サイズになるまで飼育した。その後、同一の海水環境（冷凍コペポダを給餌）で 20 日間飼育を行った。放流サイズの稚魚の白筋と肝臓を用いて、親の由来と飼育環境の違いが遺伝子発現経路に及ぼす影響を RNA-seq 解析により検証した。次に放流サイズ時と海水飼育後のエネルギー指標の変化、qPCR による白筋・肝臓の代謝に関わる遺伝子発現量と DNA メチル化状態を解析し、親の由来および飼育環境の違いが与

える影響とその持続性を調査した。その結果、ふ化場環境で放流サイズまで飼育された稚魚は、自然環境で飼育された同サイズの稚魚に比べて、白筋や肝臓では脂質代謝およびエネルギー代謝関連経路といった同化的成長を支える代謝経路等が活性化することが判明した。また、浮上から放流サイズまでの FL および BW の SGR は、ふ化場環境で飼育された群が自然環境で飼育された群に比べて 1.8 倍程度高かった。一方、海水移行後にはふ化場群の FL および BW の SGR は大幅に減少し、FL の SGR は自然環境群と差が見られなくなった。しかし、BW の SGR は引き続き若干高い値を示していた。エネルギー指標である筋肉中のトリグリセライド含量(%)、グリコーゲン含量(%)はふ化場環境で飼育された群で高く、海水移行後にはグリコーゲン含量が若干減少したが、どちらのエネルギー指標も依然として高い傾向にあった。さらに、ふ化場環境で飼育された群は、自然環境で飼育された群に比べて、放流サイズ時の肝臓で脂肪酸 β 酸化を担う *Acyl-CoA oxidase 1* の発現量が高く、海水移行後にもこの傾向は維持された。一方、白筋では、グルコース取り込みに関与する *glucose transporter type 4*、脂質合成系を制御する転写因子である *sterol regulatory element-binding transcription factor 1*、血中トリグリセリド由来脂肪酸の取り込みに関与する *lipoprotein lipase-like* および 酸化代謝の調節に関与する *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* の発現量が高い傾向にあったが、海水移行後には低下し、群間の差は見られなくなった。これらの遺伝子の発現量と DNA メチル化状態に相関は見られなかった。これらの知見を総合すると、ふ化場環境で育成された個体は、海水移行前に配合餌料によって獲得した高栄養依存型の代謝基盤を部分的に保持しつつ、海水移行後の急激なエネルギー環境の変化に対応するために、糖質・脂質代謝を再調整していることが明らかとなった。特に、海水移行後の初期成長ではエネルギー供給が制限される一方で、浸透圧適応による負荷が増大するため、筋肉中のグリコーゲンの動員や肝臓での脂質酸化能の維持といった代謝戦略が、BW の SGR に重要な役割を果たしたと考えられる。また、親の由来による影響も検証したところ、放流由来の親を持つ稚魚は自然産卵由来の親を持つ稚魚に比べて、自然環境において酸化的リン酸化やクエン酸回路といったエネルギー産生系の代謝経路が高く維持されており、ふ化放流事業でもこのような遺伝的・分子機能的変化が蓄積される可能性が示唆された。

高い標準代謝率や高い代謝余地をもつ個体は、餌が豊富な条件では急速な成長が可能である一方で、餌が乏しい条件下では維持コストが相対的に大きくなり、生残上不利になり得ると指摘されている。これらのことから、飼育水温や飼育環境の違いは、稚魚の代謝特性の形成に関与し、放流後の生残に影響する可能性が示唆された。