

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580202

研究課題名（和文） カレイ類の形態異常出現機構の解明と防除  
－最適な変態「前」成長速度の検討－研究課題名（英文） Mechanisms and prevention of malformation in Pleuronectiformes  
－determination of optimal growth rate before metamorphosis－

研究代表者

田川 正朋（TAGAWA MASATOMO）

京都大学・フィールド科学教育研究センター・准教授

研究者番号：20226947

研究成果の概要（和文）：カレイ類の漁獲を増やすために日本全国で稚魚を海に放流しているが、その放流稚魚を育てる時に様々な奇形ができてしまう。これを防ぐため、卵から孵化して間もない頃に、どのような速さで成長した魚が正常に育ったかを調べた。その結果、ホシガレイでは特に孵化後18日まで、まだ体がカレイの形になるよりも前に、8mm以上に育てると良いことが明らかになった。また、この原因は、甲状腺ホルモンの効き目が体の大きさによって異なっているためだと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Although flatfish juveniles are released into the sea all over Japan to enhance the flatfish resources, malformed juveniles of various types occurs at a high percentage when rearing. Individual growth history was examined to clarify the optimal growth rate to become normal juvenile. From the result on spotted halibut, it is recommended to enhance the growth to attain 8 mm in total length by 18 days after hatching (before becoming flatfish shape). This is because the effect of thyroid hormone was different among individuals having different body size.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：カレイ類、形態異常、甲状腺ホルモン、タイミング説、耳石標識、成長履歴、両面有色、白化

## 1. 研究開始当初の背景

カレイ類では白化や両面有色と呼ばれる形態・色彩異常の個体が、種苗生産現場では多い時には80%以上も出現し、カレイ類の種苗生産を進める上での最大の障害となっている。

我々の研究グループは、ヒラメにおいて右体側の眼が変態期に左体側に移動する機構

を、光学および電子顕微鏡レベルで検討し、pseudomesial bar (Pb) と呼ばれる、カレイ・ヒラメ類にのみ存在する硬骨が眼を押し上げて移動させることを初めて指摘した。さらに、形態異常個体の解析やホルモン投与実験から、Pb骨の形成には「発達上の特定の時期に」甲状腺ホルモンが必須であることを明ら

かにした。この Pb 骨は他の骨よりも甲状腺ホルモン依存性が高く、また反応可能期間が短かく、眼の移動に関して甲状腺ホルモンは特定の時期に作用し眼のない側（無眼側）を作ることを明らかにした。

カレイ類にみられるもう一つの左右非対称性は体色であるが、変態期に出現する黒色素胞の有無が、成魚の表裏の体色を決定していることが知られている。我々は以前の実験から、ヒラメでは「発達上の特定の時期に」甲状腺ホルモンを作用させると白化個体となることを示している。即ち、体色についても甲状腺ホルモンは特定の時期に作用し眼のない側を作ると推測できた。

ホシガレイ等では、体の両側とも白く無眼側化した白化個体や、両側とも着色した（眼のある側の形質を示した、有眼側化した）両面有色個体が存在する。即ち、もともと、体の左右はどちらも独立して無眼側や有眼側の形質を表現する潜在的な能力を有するはずである。また、甲状腺ホルモンは左右の区別無く体中に同時に行き渡るはずである。即ち、左右が非対称になるためには、「体の左右で甲状腺ホルモンの感受性の存在する期間が異なり、正常な形に変態するためには片側のみに感受性が存在する時に甲状腺ホルモンのシャワーを浴びる必要がある」（タイミング説）のではないかと考えた。この作業仮説を検証するため、ホシガレイを甲状腺ホルモン合成阻害剤の存在下で飼育し、様々なタイミングで甲状腺ホルモンを添加し変態をおこさせた。すると、ホルモン添加のタイミングごとに、正常、白化、両面有色等の個体が予想通りに異なった比率で出現した。即ちタイミング説は、少なくともホシガレイについては形態異常の出現を適切に説明できることが示された。これはカレイ類の左右非対称性の発現機構に関する、最初のかつ現時点で唯一の作業仮説である。飼育可能なカレイ類のうち、変態までの期間が3ヶ月以上と最長であるババガレイ、および2週間程度と最短であるヌマガレイを用いて、飼育実験を行った。その結果、この2種の形態異常の出現についてもタイミング説が当てはまることが明らかとなり、タイミング説がカレイ類全般に広く普遍性を有する可能性が示された。

一方で、甲状腺ホルモン感受性は、孵化後日数そのものには直接に依存していないことを示す現象も見つかった。例えば、同じ日に孵化した仔魚を用いて甲状腺ホルモン投与実験を行った場合でも、一つの水槽中には正常や白化、両面有色の個体が出現して

くる。もし、甲状腺ホルモン感受性が孵化後日齢に直接依存しているならば、この場合は水槽中の全ての個体が同じ形になるはずである。我々は、甲状腺ホルモン感受性は、孵化後日数ではなく個体ごとの体長に直接依存して発現しているのではないかと考えた。

飼育が順調に経過し、途中の死亡も少なく速く成長すると、予想に反して、殆どが白化個体となってしまったことがある。高い水温や低い水温で飼育を行うと成長速度が異なってくるが、形態異常の比率も大きく変わってくる。また、同じ水槽で飼育を行った場合でも、成長には比較的大きな個体差が存在する。これらは、個体ごとの成長速度こそが、形態異常の発現に大きな影響を及ぼすと仮定した時に、全てサポーティングな情報となる。魚類生態学の分野では耳石の日周輪から過去の体長を逆算することがしばしば行われ、非常に強力なツールと考えられ始めている。耳石直径は体長にほぼ比例するため、ある時点で蛍光色素を用いて耳石の成長点である最外層を標識しておけば、変態後に標識時の体長を推定することが出来る。

## 2. 研究の目的

日本の栽培漁業上の大きな問題を含み、かつ、左右非対称性の発現という発生学上興味深いテーマでありながら、これまで全くといって良いほど生理学的な検討がなされてこなかった、カレイ類の変態期の左右非対称な形態形成に研究の光をあてる。特に、タイミング説のベースとなる時間軸が孵化後日齢ではなく個体ごとの体長であることが確認された場合には、今後、魚類の発生生理学において時間軸として「体長」が重要であることを示せると考えている。

さらに、これまでの仔稚魚の生理学的な研究では、程度の差こそあれ、同一ロットの仔稚魚を均一な群として扱ってきた。我々はこのに来て、初めて個体差を問題にしないと解決できない現象に突き当たったといえる。本来、群としてひとまとめにして考えて良いのは、個体差がその現象に対して「意味がない」ほど小さな影響しか持たない場合のみである。逆に考えると、研究を実際に進めるうえで無視され続けてきた個体差という要因を初めて意味あるものとして研究するチャンスを得たと捉えることもできる。

予想される結果としては、正常な個体に変態させるために最適な成長速度を、具体的な数字として目安を提示出来ることである。これは、一般的に漠然と考えられていた、「速い成長の得られる飼育条件こそが、良い飼育である」とする考え方に対して、最適な成長速度が存在することをデータの裏打ちをとるような信頼性の高いものとして提示することにつながる。この考え方がカレイ類のみに

当てはまるか、他魚種にも広く当てはまるかは今後の検討が必要であるが、少なくとも種苗生産上で何らかの問題のある魚種では検討すべき事項の一つとの認識が広まるはずと考えている。

本研究によって明らかにしたかった点は以下の2点にまとめられる。

(1) カレイ類の形態異常を低く抑えることができるような最適な成長速度を求める。正常な稚魚に変態した個体は、変態前の成長が良かったのか悪かったのかを、耳石標識から逆算する。耳石直径は体長にほぼ比例する。そこで、変態前の数時点において耳石最外層を蛍光色素で標識しておき、変態を完了後に標識された径から体長を逆推定する。ホンガレイをパイロット実験と位置づけ、他のカレイ類へ研究を発展させる基礎を築く。

(2) カレイ類の左右非対称性発現機構をさらに詳細に明らかにする。

まず、タイミング説の中心となっている甲状腺ホルモン感受性が、孵化後日齢ではなく体長に依存しているかを、明らかにする。その上で成長速度の異なる飼育群において、甲状腺ホルモン分泌の時期と最終的な形態異常の発生頻度を検討し、タイミング説の実験的な検証を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 変態後の形態異常に決定力を持つのは、孵化後何日目の体長かを検討する

耳石の輪紋径から過去の体長を推測する、あるいは、耳石を蛍光色素を用いて標識する、等のテクニックは、魚類仔稚魚の生態学では常套手段であり、高い信頼性を有している。対象魚種にはこれまでに最も知見を蓄積してきたホンガレイを用いる。ALC (アリザリンコンプレクソン)により変態前に耳石標識を数回おこなう。通常の飼育を継続し、全個体が変態を完了して正常・白化・両面有色などの形態が決定した後に、全個体をサンプリングし、耳石の標識経から標識を行った日の体長を逆算する。正常・白化・両面有色それぞれに変態を完了した個体が、各々、体長が何ミリから何ミリであったかを標識した孵化後日数ごとに明らかにする。

これにより、変態後の形態にクリティカルな影響を有する孵化後日数を求める。また、その時の正常個体になった個体が示していた体長範囲こそが、飼育現場での目標とすべき成長速度の目安となるはずである。

(2) 甲状腺ホルモンの感受性が体の左右それぞれに存在する体長範囲を検討する

(1)の実験で対象とした形態異常は、ホンガレイ仔魚が甲状腺ホルモンを分泌するタイミングを「自分で決定した」結果として起こったものであり、これは飼育者が形態異

常を防除するための最適成長速度を求めるものであった。次に甲状腺ホルモンの投与を実験者が行うことで、甲状腺ホルモン感受性が体の左右それぞれに存在する体長範囲を明らかにする。即ち、チオウレアによって仔魚が自分では甲状腺ホルモンを作れないような状態におき、甲状腺ホルモンの投与と同時に耳石標識を行い、変態完了まで飼育を行う。甲状腺ホルモンを浴びた時に、感受性の存在した側は、無眼側の形質を発現し白くなる。つまり、白化個体は、甲状腺ホルモンを浴びた時点で体の両側に甲状腺ホルモン感受性があった個体、正常個体は体の片側のみ感受性があった個体、そして、両面有色個体は体の両側とも感受性がなかった個体である。これらより、体の左右それぞれに甲状腺ホルモン感受性が存在した体長範囲を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) ALCにより変態前のホンガレイに耳石標識をおこない、通常の飼育を継続し、全個体に変態を完了して正常・白化・両面有色などの形態が決定した後に、全個体をサンプリングした。耳石の標識経から標識を行った日の体長を逆算すると、変態前のDステージおよびEステージにおいては、後に白化魚となった個体の体長は、正常魚や両面有色魚となった個体よりも有意に小さかった。DステージおよびEステージにおいて成長の悪い個体が、変態時に白化している可能性が強く示唆される結果となった。特に孵化後18日のDステージにおいて全長が約8mm以上であった個体からは白化個体は殆ど出現していなかった。

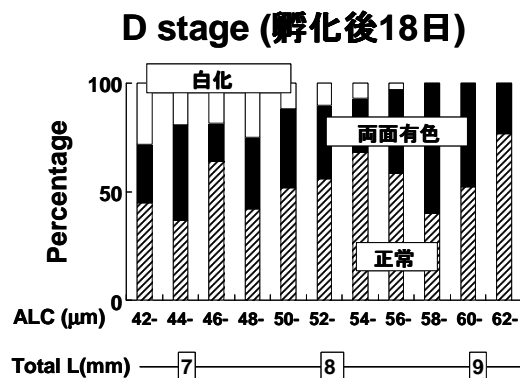


図1. Dステージ(孵化後18日)における耳石標識径(ALC mm)と形態異常出現頻度(Percentage)との関係。耳石径から逆算された体長(Total L mm)を付した。

すなわち、ホンガレイにおいてはDステージ、あるいは孵化後18日までの成長を全長8mm以上になるように促進してやることにより、形態異常のうち白化を効率的に防除でき

る可能性が極めて高い。今後は、実際に成長促進を行い白化防除が達成できるかこと確認すれば、ホシガレイ種苗生産現場で応用できる「成長目標値」がすぐにでも確定できるはずである。同様の実験を多種の異体類についても行うことで、異体類全般の白化防除に大きな貢献につながると考えている。

(2) ホシガレイを用いて甲状腺ホルモン投与時の体長が変態後の形態におよぼす影響を検討した。ALCにより孵化後26日(変態前、Eステージ)に耳石標識をおこなうと同時に甲状腺ホルモン(チロキシン、T4)の浸漬を開始した。飼育完了時には正常と両面有色の個体が出現した。耳石の標識経からT4投与開始日の体長を逆算すると、正常に変態した個体では8.9mmを中心とする一峰性の分布を示したが、両面有色となった個体では8.5mmと9.3mmの2つのピークを持つ二峰性となった。このことは、ホルモン投与開始時に、体長の大きな個体と小さな個体とが両面有色へと変態したことを示す。

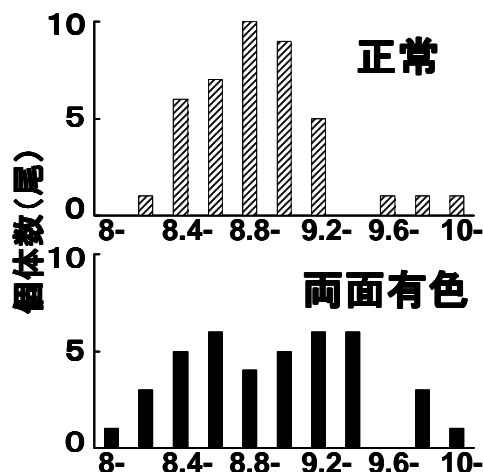


図2. 甲状腺ホルモン投与時の特定逆算体長における正常と両面有色の出個体数

原因は不明であるが白化個体が出現しなかったため再検討の余地は残されてしまったが、本結果からは我々が提唱している「タイミング説」において、時間軸は孵化後日数ではなく個体毎の体長である可能性が強く示唆された。このことは、個体変異が大きいため「とらえどころのない」現象であった形態異常の出現が、体長という一つの要因から説明できる可能性を支持する。即ち、(1)において明らかにした成長速度に依存した形態異常出現について、成長に依存した生理的機構も背景にあるらしいことを示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Taizo Nishikawa, Masato Aritaki, Daisuke Shimizu, Toshihiro Wada, Masaru Tanaka, Masatomo Tagawa (2010). Faster growth before metamorphosis leads to a higher risk of pseudoalbinism in juveniles of the starry flounder *Platichthys stellatus*, as suggested by otolith back-calculation. *Fisheries Science*, 76, 827-831. (査読有)
- ② Byung-Sum Chin, Masahiro Nakagawa, Masatomo Tagawa, Reiji Masuda, Yoh Yamashita (2010). Ontogenetic changes of habitat selection and thyroid hormone levels in black rockfish (*Sebastes schlegelii*) reared in captivity. *Ichthyl. Res.*, 57, 278-285. (査読有)
- ③ Mitsuo Nakamura, Tadahisa Seikai, Masato Aritaki, Reiji Masuda, Masaru Tanaka, Masatomo Tagawa (2010). Dual appearance of xanthophores, and ontogenetic changes in other pigment cells during early development of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 76, 243-250. (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① 辻 寛人・田川正朋(2011). ヒラメ稚魚の無眼側に発現する二次黒化一発現過程の解析と黒化部位の特徴一. 平成23年度日本水産学会春期大会(東京海洋大、東日本大震災のため発表中止) 要旨集 311番 P.30.
- ② 吉川尚樹・Thamootharan Mammaran・Elvin M Bavoh・田中克・田川正朋(2011). 祖先的なカレイ目魚類ボウズガレイの親魚適性の検討. 平成23年度日本水産学会春期大会(東京海洋大、東日本大震災のため発表中止) 要旨集 310番 P.30.
- ③ 田中健太郎・鈴木徹・清水大輔・有瀧真人・田川正朋(2010). ヒラメの変態におけるアポトーシス関与の可能性. 平成22年度日本水産学会春期大会(日本大学生物資源科学部 3/26-3/30) 要旨集 324番 P.44.
- ④ 西川泰造・清水大輔・有瀧真人・田川正朋(2010). ホシガレイにおける両面有色個体の出現機構一甲状腺ホルモン投与時期の体長との関連一. 平成22年度日本水産学会春期大会(日本大学生物資源科学部 3/26-3/30) 要旨集 323番 P.44.

- ⑤ 西川泰造・清水大輔・有瀧真人・田川正朋(2009). カレイ類の体色異常と変態前の成長履歴との関連－ホシガレイにおいて鍵となる成長段階の存在－. 平成21年度日本水産学会近畿支部後期例会(神戸女学院大学 兵庫県西宮市 11/28). 講演番号A-7(要旨集P8)
- ⑥ 田川正朋・原田靖子・北野忠・秋山信彦(2009). 変態誘起作用をもつ甲状腺ホルモンの幼型成熟魚類における特性. 東京大学海洋研究所共同利用シンポジウム「水生生物の異時性に関する研究. 現状の把握と今後の展望」(東京大学海洋研究所 11/9-10) 講演要旨集P8
- ⑦ 高田奈尚・田川正朋・青海忠久(2008). ササウシノシタの変態に及ぼす甲状腺ホルモンの影響の解析. 第30回稚魚研究会(東北大学 12/6-12/10) 講演番号9
- ⑧ 神田哲・沖増英治・田川正朋・乾靖夫(2008). 魚類の初期発育時における赤血球群の動態と甲状腺ホルモン. 第33回日本比較内分分泌学会大会(広島大学 12/5-12/6) P-82.
- ⑨ TAGAWA Masatomo and ARITAKI Masato(2008). Improper timing of thyroid hormone increase induces higher occurrences of malformed juveniles during the metamorphosis of three flatfishes: Proposal of 'timing hypothesis' for malformation mechanism. 5th World Fisheries Congress (10/20-10/25, Yokohama, Japan). 1c05.
- ⑩ 田川正朋・有瀧真人(2008). カレイ類の左右非対称性(表と裏)は甲状腺ホルモンの作用時期によって決定される. 2008年度 日本動物学会第79回大会(福岡大学 9/5-9/7) 予稿集 3p048 P.122.

[図書] (計4件)

- ① 田川正朋・田中克 (2010) 14章 変態と着底. 161-171. 「魚類生態学の基礎」(塚本勝巳編) 恒星社厚生閣. 東京. 総ページ数 317 ページ.
- ② 田中克・田川正朋・中山耕至 (2009) 「稚魚 生残と変態の生理生態学」京都大学学術出版会. 京都. 387頁. (20090330 出版)
- ③ 青海忠久・田川正朋 (2008) 3-7. 異体類の変態と体色異常. 141-153. 「稚魚学－多様な生理生態を探る」(田中克・田川正朋・中山耕至編) 生物研究社. 東京.

- ④ 岡田のぞみ・田川正朋 (2008) 3-6. ヒラメの変態と眼の移動機構. 131-140. 「稚魚学－多様な生理生態を探る」(田中克・田川正朋・中山耕至編) 生物研究社. 東京.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田川正朋 (TAGAWA MASATOMO)  
京都大学・フィールド科学教育研究センター・准教授  
研究者番号: 20226947

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

有瀧真人 (ARITAKI MASATO)  
水産総合研究センター・宮古栽培漁業センター・場長(2008)  
水産総合研究センター・有明海八代海漁場環境研究センター・センター長(2009-2010)  
研究者番号: 00426298