

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580199

研究課題名（和文）魚類養殖の効率化を目指した成熟抑制技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of the maturity control technique aiming at advance of the fish aquaculture techniques

研究代表者：

三浦 智恵美（MIURA CHIEMI）

愛媛大学・南予水産研究センター・講師

研究者番号：90518002

研究成果の概要（和文）：本研究は、魚類の成熟や成長のメカニズムを分子・細胞レベルで探求し、その基礎的知見から応用研究を展開する事により、魚類養殖の効率化を目指した成熟抑制技術を確立する事を目的として行われた。その結果、基礎研究では、ウナギ、モザンビークテイルピアを用い魚類の生殖腺と成長ホルモンの関係を分子レベルで解析した。応用研究では、養殖ブリの配偶子形成過程を詳細に解析する事で性成熟開始時期を特定し、ブリの給餌を制御する事により、成熟を抑制する事が可能であることを示した。更に、この制限給餌による魚の成長を内分泌的・生理学的に解析した。

研究成果の概要（英文）：Growth initiates sexual maturation in fish. However, the onset of maturity leads to a marked loss of body weight. To avoid the risks associated with of spawning, yellowtail farmers have tried to restrict the diet from winter to spring, a period just before the breeding season. By restricting the diet they can avoid the reduction in body weight. In this study, we show how growth of fish is dependent on the control of diet by using endocrinological and physiological analysis of these cultured yellowtails.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：成長，成熟

1. 研究開始当初の背景

魚類養殖の技術が高度化するに従い、これまであまり注目されて来なかった様々な生命現象による養殖効率の低下の問題が顕在化してきた。中でも魚の性成熟に伴う養殖効率の低下は、近年非常に

大きな問題となっている。現在、水産養殖が盛んに行なわれており、出世魚として知られているブリは、魚体の大きさに比例して商品価値が高くなり、迅速且つ効率良く成長させる事が求められる。しかしながら、ある程度成長すると性成熟

が開始し、それとともに成長が遅滞する。また、産卵時期のブリで得意的に発症する上湾症（尾部が上部に湾曲する魚体の変形）によりブリの商品価値が著しく下がるなども、性成熟に伴うブリ養殖の問題点として挙げられた。

2. 研究の目的

本研究では、これらブリ養殖での性成熟に伴う様々な問題を分子生理学的側面からの解析によって解決することを目的として行われた。

3. 研究の方法

本研究は、成長と成熟の因果関係を実験室レベルで解析し、その基礎的な知見をもとに、実際の養殖魚であるブリを用いて、給餌と成長、成長ホルモンと成熟の関係を解明し、養殖ブリの給餌制御による成熟抑制法の開発を行なった。

4. 研究成果

本研究では、まず成長と性成熟の因果関係の解明の基礎研究を行なった。モザンビークティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の稚魚期からの魚の体重、体長、性成熟の過程を調べ、成長と性成熟の因果関係を明らかにした。まず体重、体長の増加に伴う魚類の成長速度の増減と雌雄の成長に伴う性成熟を組織観察により調べ、次に性成熟を制御している性ステロイドホルモンの血中濃度を経時的に調べた。その結果、雌雄ともに性成熟が活性化すると成長速度が減少することが明らかとなり、ティラピアの雌雄の成長差は、性成熟の開始する時期が異なっている事から起こる事が明らかとなった。更に、成長と成熟の相関を調べるため、成長ホルモン (Gh) の刺激により肝臓で分泌されるインスリン様成長因子 (Igf-1) の発現量の変化を RT-PCR により調べたところ、雌雄共に成長速度の増減に呼応して発現量の変動する事が明らかとなった。この事から、Igf-1 は成長に深く関与する事が示唆された。

次に、Gh が魚類の配偶子形成へ関与する可能性を、配偶子形成の制御機構解析が容易であるニホンウナギ (*Anguilla japonica*) を用い詳細に調べた。まず精子形成過程での精巣での *gtmRNA* は、成熟段階を問わず発現していることが確認された。ウナギ Gh に対する特異抗体を作製し、それを用いて精巣での Gh タンパクの発現を調べたところ、mRNA のみならず、タンパク質も精子形成開始前から減数分裂開始直前までの成熟段階の精巣で発現していることが確認された。更に、ウナギの生体外精巣器官培養法を用いて Gh の解析を行った結果、Gh は精原幹細胞の増殖分裂を促進させ、E2 様作用をもつが、その作用の仕方は、ステロイドホルモンの産生分

泌を介さず、Gh 単独で作用していることが明らかとなった。

次に、成長と性成熟の因果関係の解明の応用研究を行なった。まず形態学および内分泌学的に養殖ブリの精子形成および卵形成の初期過程を詳細に解析することで成熟開始時期を特定した。その結果、オスの生殖腺体指数 (GSI) は 3 月までほとんど変化が見られないが、4~5 月には増加し産卵期を迎えた。メスの GSI は 5 月の中旬に急激に増加し産卵期を示した。精巣では 2 月までは精原細胞のみであったが 4 月には多数の精子が存在した。卵巣では、2 月までは周辺仁期の卵母細胞が確認されたが、3 月より卵黄の蓄積が開始され、4 月から 5 月の中旬には最終成熟に達した多数の成熟卵が観察された。これらの事から養殖ブリの成熟開始時期は、水温の上昇する 3 月末から 4 月上旬であることが明らかとなった。またそれに伴い性ステロイドの上昇も確認された。

ブリ養殖では、性成熟に伴い、産卵後の著しい体重減少、身質の劣化や褐色化、さらにヒコウキと言われる尾部の骨が湾曲する変形などの多くの問題が発生する。これらの原因の一つとして、魚類の性成熟過程、および産卵に関わるプロテアーゼ及びリパーゼの作用が考えられる。本年度は、プロテアーゼ・リパーゼが繁殖期の魚類に及ぼす作用を詳しく解析した。その結果、産卵期の 17・, 20・-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) の上昇に伴い、筋肉中のプロテアーゼ・リパーゼ活性が増加する事が明らかとなった。この事から、生殖腺の成熟を伴っていない幼魚に DHP を投与し、プロテアーゼ・リパーゼ活性を測定した所、DHP 投与群では、それらの活性が対照群と比較して有為に増加する事が明らかとなった。産卵期のサケ科魚類にて引き起こされるブナ化は、性ホルモンによって引き起こされることが報告されているが、この生涯に一回産卵を行なうサケ科魚類で顕著に見られるブナ化現象と、多回産卵を行なう養殖ブリの産卵後の体重減少など様々な問題が同様の現象である可能性が示唆された。

本研究では、ブリの成熟に伴うリスクを回避するために成熟抑制技術の確立を行なった。本課題で行なった実証試験は、愛媛県愛南町久良湾にて養殖生け簀で飼育されているブリの給餌を制限する事で成長がどのようにコントロールされるのかを調べた。まず、冬期から春期にかけて制限給餌を行なっているブリと普通給餌を行なっているブリを定期的にサンプリングし解析した。ブリの生殖腺の重量、形態変化および血中の性ホルモン量から、精子形成および卵形成の最も盛な時期が 4-5 月である事が明らかとなり、制限給餌を行なった群の生殖腺は、普通給餌を

行なった群に比べ、この時期の生殖腺の体に対する重量が低い値を示した。また、生殖腺のステージも制限給餌群は、普通給餌群に比較して発達に差がある事が明らかとなった。更に性ステロイド 17 \cdot , 20 \cdot -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) の濃度が産卵期(5月)に、制限給餌群で減少する事から、制限給餌を行なう事により血中の DHP 濃度が大きく抑えられる事が明らかとなり、産卵後のブリの成長遅滞と体重減少には、DHP が大きく関与している可能性が示唆された。

本研究では、制限給餌がブリの筋肉中の一般成分に与える影響を調べた所、制限給餌群では筋肉中の脂肪含有量の減少を抑える事が明らかとなった。消化酵素に着目し性成熟に伴うプロテアーゼ、リパーゼ活性を測定した所、産卵期にリパーゼ活性が増加した。この事から、成熟後の肉質劣化はリパーゼ活性の増加による急激な脂質分解が主な原因であることが示唆され、ブリの成熟に伴うリスクが、給餌による成熟抑制により回避されることが明らかとなった。

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 14 件)

1. Celino, F. T., Shimizu-Yamaguchi, S., Miura, C. and Miura, T.: Proliferating spermatogonia are susceptible to reactive oxygen species attack in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biol. Reprod.* 87(3):70, 1-9, 2012.
2. Higuchi, M., Celino, F. T., Shimizu-Yamaguchi, S., Miura, C. and Miura, T.: Taurine plays an important role in the protection of spermatogonia from oxidative stress. *Amino Acids* 43:2359-2369, 2012.
3. Bhatta, S., Iwai, T., Miura, C., Higuchi, M., Shimizu-Yamaguchi, S., Fukada, H., Miura, T.: Gonads directly regulate growth in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 11408-11412, 2012.
4. Higuchi, M., Celino, F. T., Tamai, A., Miura, C. and Miura, T.: The synthesis and role of taurine in the Japanese eel testis. *Amino Acids* 43: 773-781, 2012.
5. Higuchi, M., Celino, F. T., Miura, C. and Miura, T.: The Synthesis and Role of Taurine in the Eel Spermatogenesis. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Environmental Pollution and Ecotoxicology*, Eds., M. Kawaguchi, K. Misaki, H. Sato, T. Yokokawa, T. Itai, T. M. Nguyen, J. Ono and S. Tanabe, pp. 35-40. 2012.
6. Kazeto, Y., Koyama, M., Tosaka, R., Gen, K., Yokoyama, M., Miura, C., Miura, T., Adachi, S. and Yamauchi, K.: Molecular characterization and gene expression of Japanese eel (*Anguilla japonica*) gonadotropin receptors. *Zoological Science* 29(3): 204-211, 2012.
7. Celino F.T., Yamaguchi, S., Miura, C., Ohta, T., Tozawa, Y., Iwai, T. and Miura, T.: Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *Plos One*, 6(2) e16938, 2011.
8. Ito, K., Nozaki, M., Ohta, T., Miura, C., Tozawa, Y. and Miura, T.: Differences of two polychaete species reflected in enzyme activities. *Marine Biology* 150:1211-1221, 2011.
9. Ohta, T., Ueda, Y. Ito, K., Miura, C., Yamashita, H., Miura, T. and Tozawa, Y.: Anti-viral effects of interferon administration on seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 30:1064-1071, 2011.
10. Miura, C., Miura, T.: Analysis of spermatogenesis using an eel model. *Aqua-Bio Science Monographs*. 4:105-129, 2011.
11. Miura, C., Shimizu, Y., Uehara, M., Ozaki, Y., Young, G. and Miura, T.: Growth hormone is produced by the testis of Japanese eel and stimulates proliferation of spermatogonia. *Reproduction* 142:869-877, 2011.
12. 三浦智恵美・三浦 猛: マダイの成長と免疫系に及ぼすオニヒトデの効果. 養殖 48 (2): 44-47, 2011.
13. 三浦 猛・三浦智恵美・三浦仁嗣: 技術-養殖ブリの産卵リスクとその制御のための給餌管理-制限給餌による成熟抑制と成長遅滞の解消-. アクアネット 14 (1): 52-59, 2011.
14. Ito, K., Nozaki, N., Kunihiro, T., Miura, C. and Miura, T.: Study of sediment cleanup using polychaete. *International Symposium on Modeling and Analysis of Marine Environmental Problems* (MAMEP Sympo. 2010) 133-139, 2010.

[学会発表] (計 25 件)

1. Bhatta, Sandip・岩井俊治・三浦智恵美・三浦猛: 魚類の生殖腺の機能 I (生殖腺による成長制御). 平成 24 年度日本動物学

- 会,大阪,9月13日(2012).
2. 岩井俊治・Bhatta, Sandip・三浦智恵美・三浦猛:魚類の生殖腺の機能2(異所性移植による配偶子形成).平成24年度日本動物学会,大阪,9月13日(2012).
 3. 樋口理人・三浦智恵美・三浦猛:トリプシンおよびタウリンによる精子形成での減数分裂制御機構.平成24年度日本動物学会,大阪,9月13日(2012).
 4. Miura, C., Shimizu, Y., Young, G. and Miura, T.: Testicular growth hormone stimulates spermatogonial proliferation. *The 7th AOSCE Congress*, Kuala Lumpur, Malaysia, 4 March. Abstract book, 40 (2012).
 5. Miura, T., Iwai, T., Bhatta, S. and Miura, C.: Gonad is regulatory organ for growth in teleost. *The 7th AOSCE Congress*, Kuala Lumpur, Malaysia, 4 March. Abstract book, 41 (2012).
 6. Higuchi, M., Celino. F. T., Miura, C. and Miura, T.: Effect of taurine on eel spermatogenesis. *International symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology*, Matsuyama, Japan, 5 August. Abstract book, 33 (2011).
 7. Watanabe, N., Celino. F. T., Miura, C., Ohashi, H., Fukushima, E., Iwai, T., Hosokawa, H., Uchimura, Y. and Miura, T.: The induction of sterility using RNA interference technique in *Pinctada fucata martensi*. The international Symposium on Pearl Research, Tokyo, Japan, 5 October, Abstract book, 31 (2011).
 8. Sone, K., Iwai, T., Uehara, M., Watanabe, N., Celino. F. T., Hosokawa, H., Odawara, K., Miura, C. and Miura, T.: Selective bleeding of disease-resistant Japanese pearl oysters using molecular markers. The international Symposium on Pearl Research, Tokyo, Japan, 5 October, Abstract book, 32 (2011).
 9. Fukushima, E., Iwai, T., Miura, C., Watanabe, N., Urasaki, S., Kuwayama, K., Odawara, K. and Miura, T.: Newly developed technique of producing pearl using mantle fragment of *Pinctada margaritifera* and *Pteria penguin* in hyposensitized Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata*. The international Symposium on Pearl Research, Tokyo, Japan, 5 October, Abstract book, 33 (2011).
 10. Higuchi, M., Miura, C. and Miura, T.: Synthesis of taurine and its role in Japanese eel spermatogenesis. World Congress on Reproductive Biology, Cairns, Australia, 10 October. Abstract book, 123 (2011).
 11. Miura, C., Shimizu, Y., Uehara, M., Ozaki, Y., Young, G. and Miura, T.: Growth hormone in synthesis in the testis and stimulates spermatogonial proliferation in Japanese eel, *Anguilla japonica* World Congress on Reproductive Biology, Cairns, Australia, 11 October. Abstract book, 189 (2011).
 12. Bhatta, S., Iwai, T., Miura, C., Higuchi, M., Yamaguchi, S. and Miura, T.: Gonad in one of the control organs for growth in fish. World Congress on Reproductive Biology, Cairns, Australia, 11 October. Abstract book, 191 (2011).
 13. Sandip Bhatta・岩井俊治・樋口理人・山口園子・三浦智恵美・三浦猛:魚類の成長を直接コントロールする器官としての生殖腺,平成23年度日本水産学会春季大会,東京都,3月28日,講演要旨集,29(2011).
 14. 樋口理人・Celino. F. T.・玉井綾子・山口園子・三浦智恵美・三浦猛:ニホンウナギ精巣でのタウリン合成機構,平成23年度日本水産学会春季大会,東京都,3月30日,講演要旨集,140(2011).
 15. Sandip Bhatta・岩井俊治・三浦智恵美・*樋口理人・清水園子・三浦猛:生殖腺は魚類の成長をコントロールする,平成23年度日本水産学会秋季大会,長崎市,9月30日,講演要旨集,53(2011).
 16. Sandip Bhatta・樋口理人・岩井俊治・清水園子・三浦智恵美・三浦猛:テラピアの成長の雌雄差と生殖腺の発達の関係について,平成23年度日本水産学会秋季大会,長崎市,9月29日,講演要旨集,53(2011).
 17. 樋口理人・三浦智恵美・三浦猛:タウリンがウナギ精子形成の及ぼす作用1,平成23年度日本水産学会秋季大会,長崎市,9月29日,講演要旨集,53(2011).
 18. 樋口理人・三浦智恵美・三浦猛:タウリンがウナギ精子形成の及ぼす作用2,平成23年度日本水産学会秋季大会,長崎市,9月29日,講演要旨集,53(2011).
 19. 樋口理人・三浦智恵美・三浦猛:タウリンがウナギ精子形成の及ぼす作用3,平成23年度日本水産学会秋季大会,長崎市,9月29日,講演要旨集,54(2011).
 20. 三浦智恵美・伊藤克敏・上田祐輔・太田加代子・岩井俊治・太田耕平・浦崎慎太郎・山本正文・三浦猛:オニヒトデのマダイ成長と免疫系に及ぼす効果.平成22年度日本水産学会秋季大会.京都.9月24日.講演要旨集47(2010).

21. 吉原勇作・三浦智恵美・山口園子・樋口理人・竹田 豊・浜田克人・三浦仁嗣・三浦 猛：制限給餌による養殖ブリの成熟・成長コントロール. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 京都. 9 月 24 日. 講演要旨集 49 (2010).
22. 岩井俊治・伊藤克敏・上田祐輔・三浦智恵美・浦崎慎太郎・太田加代子・山口園子・串間充崇・三浦 猛：イェバエ由来物の魚類成長および免疫系への作用. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 京都. 9 月 24 日. 講演要旨集 49 (2010).
23. 山口園子・Fritze T. Celino・三浦智恵美・三浦 猛：酸化ストレスに対する魚類精原細胞の防御機構. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 京都. 9 月 24 日. 講演要旨集 20 (2010).
24. 伊藤克敏・野崎真奈・太田 史・戸澤 謙・三浦智恵美・三浦 猛：ゴカイ類が有する有機物分解能の分子生物学的解析. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 京都. 9 月 24 日. 講演要旨集 25 (2010).
25. 上田祐輔・太田 史・伊藤克敏・岩井俊治・浦崎慎太郎・山下浩史・戸澤 謙・三浦智恵美・三浦 猛：マハタ組み換えインターフェロンの効果. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 京都. 9 月 24 日. 講演要旨集 52 (2010).

研究組織

(1) 研究代表者

三浦 智恵美 (MIURA CHIEMI)

愛媛大学・南予水産研究センター・講師

研究者番号： 90518002