

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580266

研究課題名(和文)カレイ類に起こる形態異常の本質的理解と、二次黒化の根本的防除法の開発

研究課題名(英文) Understanding of malformation and mal-pigmentation of Heterosomata, and development of prevention method for staining-type hyper-melanosis

研究代表者

田川 正朋 (TAGAWA, Masatomo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20226947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カレイ類の種苗生産では、体色や形態の異常個体が多発し問題となっている。本研究では形態異常および二次黒化の本質解明と根本的な防除をめざした。

アカガレイの形態異常発現を詳細に分析した結果、成長とストレスという2要因が、左右性形成と黒化現象にそれぞれ独立して関与することが示唆された。また、マツカワにおいて、仔魚型黒色素胞のメラニン凝集ホルモンに対する感受性から、無眼側形質は仔魚型であることが示唆された。ヒラメの二次黒化に関して、ストレスが促進的、凹凸底面が抑制的に作用する可能性が見いだされた。鱗の移植実験より、有眼側鱗には無眼側鱗を有眼側化させる因子の存在が推測された。

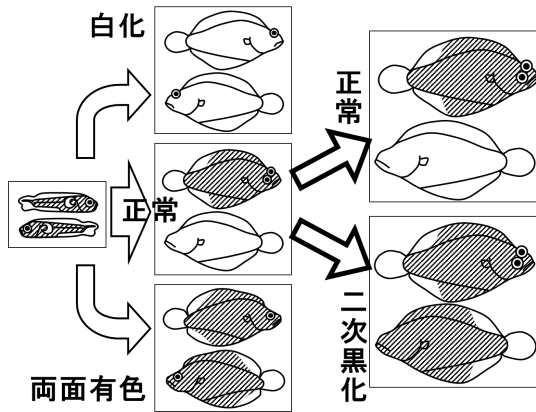
研究成果の概要(英文)：In heterosomata, the frequent occurrence of malformation and mal-pigmentation of juveniles is one of the most serious obstacles for efficient seed-production. This study was aimed to clarify the fundamental nature of the malformation and staining-type hyper-melanosis of the blind side. By detailed analysis of malformation occurrence in red halibut, it is suggested that growth speed and stress independently affect the asymmetrical formation of the body and hyper-melanosis, respectively. The responsiveness of larval-type melanophores of barfin flounder against melanin-concentrating hormone suggested the larval nature of the blind side. In Japanese flounder, we preliminary found that stress stimulates, and uneven bottom prevents, the enlargement of staining type hyper-melanosis, respectively. In addition, presence of inducing substance(s) for ocular-side characteristics was suggested by transplantation experiment of scales.

研究分野：魚類生理学

キーワード：形態異常 カレイ類 二次黒化 ホルモン ストレス 成長速度 有眼側化因子

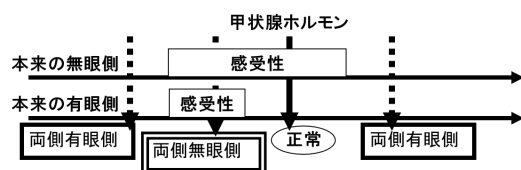
1. 研究開始当初の背景

カレイ類は魚価が高く定住性も強いいため、稚魚を海に放流して漁業で回収する栽培漁業には極めて好適である。しかし形態的に正常な放流種苗を生産する過程が困難なため、ヒラメを含むわずかの種のみが、栽培漁業の対象となっているに過ぎない。



上図に示したように、変態を完了してカレイ類の形になった時に、体の両面が白い白化個体や、逆に両面ともに着色し眼の位置も左右対称な両面有色個体等、他の魚種では考えられないほど極端な形態異常が頻発し、80%を越えることもある。また一旦は正常な形・体色に変態した稚魚であっても、数ヶ月飼育すると白かった無眼側に黒色部位が出現する現象(二次黒化)も存在する。そのため、十分な数の放流種苗を生産するためには飼育を受精卵から何度も繰り返さなくてはならないこともあり、栽培漁業を効率的に推進する上で最大の障害となっている。

我々は主にヒラメとホシガレイを用いて、カレイ類の変態の仕組みを個体レベルで明らかにしてきた。



その結果、白化や両面有色のような変態期に起こる形態異常については、上図に示したように甲状腺ホルモンの感受性とホルモン分泌のタイミングによって、おおよそ説明できることをホシガレイなどについて明らかにした(タイミング説 文献)。これに基づいて、特定の成長速度になるように水温や日長、餌などを調節することで白化や両面有色の発現比率を低減できる見通しが立ちつつある。

次に解決すべきは変態後におこる二次黒化である。これについては水槽に底砂を敷くなどの面倒な飼育条件を整えない限り抑制は困難とされている。我々は二次黒化とは、単なる黒色化でなく、他の色素胞や鱗の形状

も含めた有眼側化であることを既に明らかにしている。また、飼育環境が二次黒化の出現のしやすさに影響を与えるという情報を得ており、二次黒化現象の本質的な理解にもとづく防除方法の確立が可能と考えている。

<引用文献>

Tagawa M, Aritaki M (2005). Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 141: 184-189.

2. 研究の目的

(1) アカガレイを、新たなモデル魚種として確立する。

アカガレイは栽培漁業の候補として種苗生産が試みられているが、変態完了時には殆どの個体が様々なタイプの形態異常となっており、現時点では正常魚の生産に成功していない。また、このアカガレイは極めて多様な形態異常が出現し、タイミング説でも説明がつかない、いわば「最後の難問」である。そこで、今後の研究の基礎となる色素細胞や鱗の発達過程、形態異常における成長履歴などの影響などを明らかにしたい。そして次の段階では、あと一步にまでせまっていたカレイ類の左右非対称性形成機構の概要解明、および種苗生産への具体的かつ普遍的な技術提案へとつなげたい。

(2) 二次黒化のおこる機構を明らかにし、根本的な防除方法を具体的に提案する。

ヒラメやマツカワでは変態時の形態異常は大幅に防除可能となったが、変態後におこる二次黒化は未だに多発し、次に解決すべき重要な問題となっている。二次黒化を「発現させない」ための飼育方法(例えば、水槽に砂を敷く等)は考案されているが、もともと二次黒化を「発現しにくい」稚魚の存在することも知られている。本研究ではこの2つを初めて区別し、もともと二次黒化を発現しやすい部位の決定時期や機構を明らかにするとともに、水質管理が困難になる底砂を用いなくても二次黒化を発現しにくい飼育方法の提案を目指す。

3. 研究の方法

(1) アカガレイの形態異常各タイプの分類: アカガレイでは、体色は左右で異なるにも関わらず眼は左右対称に位置するような形態異常個体をはじめとして、これまでヒラメやホシガレイには見られなかった異常タイプが知られている。まず、天然魚でみられる左右非対称な形質のうち、関連性のつよい形質のグルーピングを行った。その後、独立している可能性のある形質について、理論的に考えられる全ての左右性の組み合わせ

を考えた。このタイプ分けによって、飼育現場で得られる全ての異常タイプが網羅できるかを確認した。

(2) アカガレイ飼育魚における飼育条件および成長履歴と形態異常出現の関係：本種では眼位と体色が一致しない形態異常が存在していることから、眼位と体色の左右性がそもそも別の機構によって決定されている可能性がある。そこで、飼育水温や飼育密度を3段階に変えた水槽をそれぞれ設置し、形態異常の出現状況を前述のタイプ分類を用いて比較を行った。さらに、左右別に、眼位自身および眼位と体色の関係性が、水温や密度によりどのような影響を受けるかを検討した。

ある時点での耳石直径はその時の体長にほぼ比例することが知られている。また、ALCを用いると耳石の最外層を生体染色することができる。即ち、特定の時期にALC標識を施せば、変態後に形態異常個体が確定した後にALC標識時の体長を個体毎に推定することが可能である。そこで、孵化後20日、40日、60日にALC標識を行い、変態後に左右の眼位、あるいは左右の体色と眼位の関係性、それぞれについて正常であった個体と異常であった個体の過去の推定体長を比較した。

(3) マツカワにおける二次黒化部位の有眼側化および発現過程の検討：マツカワでは正常稚魚の生産技術はおおむね確立されているが、色素胞や鱗など体表における左右非対称な形質の発現過程など、基礎的な情報が得られていない。そこで、マツカワにおいても二次黒化が有眼側化であるかを、採卵親魚用に長期飼育されていた当歳魚から4歳魚までについて、各種色素胞組成および鱗の形状を検討した。

(4) マツカワの正常発育における黒色素細胞の出現過程とホルモン調節：マツカワではヒラメと異なり、浮遊期の仔魚は黒色である。そのため、まず正常発育における黒色素細胞の発現様式を検討した。変態前後の各ステージ仔稚魚について色素胞密度を測定し、左右体側で比較をおこなった。その結果、黒い体色は主に仔魚型黒色素胞の拡散によるものと明らかになったため、変態期におこる体色の淡色化への関与が考えられるホルモン(メラニン凝集ホルモン：MCH)の作用を、切り出した尾部にホルモンを投与することで検討した。

(5) ヒラメの個体識別による二次黒化の発現過程：これまでの二次黒化の研究では、飼育水槽を単位として解析することが殆どであった。このため、二次黒化の進行過程や程度、例えば黒化部位が拡大するのか、黒化個体数が増加するのかについては問題にも

されず、現象の本質把握には至っていない。そのため、イラストマー樹脂を標識として用い、個体ごとに二次黒化の発現経過を検討した。さらに個体ごとの二次黒化発現の時期や程度と、体サイズなどその個体の有する属性との関連を検討した。

(6) ヒラメにおける二次黒化の発現開始時期の特定：前年度の結果より、体長5cm時点でわずかに二次黒化が発現している稚魚は、全く発現していない稚魚よりも最終的な二次黒化面積が大きい。このような個体を、二次黒化を発現させにくいとされる底砂を敷く水槽から、発現させやすい底砂を敷かない水槽に、様々な時期に移行させた。最終的な二次黒化の激しさと、二次黒化の発現開始時期との関係を検討し、種苗生産を行う上で二次黒化の発現に関して注意すべき時期の特定を試みた。

(7) ヒラメの着色型黒化におけるストレス応答ホルモンおよび水槽底形状の影響：他魚種の知見から考えると、ストレスが二次黒化の発現に関与する可能性が高い。そこで、ストレスにより分泌されるホルモンであるコルチゾルを稚魚に投与し、二次黒化の拡大過程を黒化面積率により検討した。また、底砂を用いずに二次黒化を予防することを目的に、砂のもつ様々な属性(ザラザラした感、凹凸面、隠れ家、砂の見た目)を有する底面を作成し、二次黒化の拡大を検討した。

(8) ヒラメにおける鱗の自家移植実験：二次黒化は無眼側に有眼側の形質が拡大する現象であることから、有眼側鱗には無眼側を有眼側化させる何かがあると予想した。同一個体の有眼側と無眼側とで鱗を自家移植し、移植鱗自身、および移植鱗の再度取り除いた部分の再生鱗に、黒色素胞が出現するかを検討することで予想の検証を試みた。

4. 研究成果

(1) アカガレイの形態異常各タイプの分類：飼育下のアカガレイでは他の異体類には見られない異常タイプが頻発する。各非対称形質の関連性を検討したところ左右の眼位は独立していた。一方、正常な左右の体色は、本来その側の眼が正中線を越えなければ黒色に、超えた場合は白色であることが強く示唆された。そのためアカガレイについては、左右の眼位と眼位から予想される体色の正常・異常について、全ての組み合わせである12タイプに分類した。

(2) アカガレイ飼育魚における飼育条件および成長履歴と形態異常出現の関係：アカガレイでは飼育条件と形態異常の関連が検討されていない。そこで水温と飼育密度が形態異常に及ぼす影響を前述のタイプ分けを

用いて検討した。左右眼位や眼位と体色の関連性は、飼育水温に対し異なった反応性を示したが、天然よりも高水温である12度から15度で最適な結果を示した。成長履歴を検討した結果でも、左右眼位、および体色と眼位の関係性、ともに、高成長の個体の方がより高い正常率を示す傾向が見られた。一方、高飼育密度は左右の眼位や白化の出現には明確な影響を与えず、軽微な黒化のみを増加させた。即ち、左右眼位と黒化の出現には、異なった発現機構が強く示唆された。

水温、飼育密度および成長履歴などの検討の結果を総合的に考察することで、アカガレイにおける多様な形態異常の出現機構の概要がほぼ明らかになった。即ち、左右の眼位や白化は、左右ごとにそれぞれが独立して、主に成長速度に依存して決定され、一般的には高成長ほど正常化する。一方、無眼側黒化は主にストレスに依存して増加するが、本種では高水温がストレスとして作用している可能性も示唆された。これらより、本種では低水温で高成長を促すような新しい飼育技術の開発が形態異常の防除に必要であると考えられた。

(3) マツカワにおける二次黒化部位の有眼側化および発現過程の検討： マツカワにおいても無眼側の二次黒化部位には有眼側同様に成魚型黒色素胞と黄色素胞、および櫛鱗の存在することを確認した。このことは、二次黒化が有眼側化現象である可能性が、カレイ類に共通する普遍的な現象であることを強く示唆する。また、二次黒化の発現完了時期はヒラメよりもやや遅く、孵化後6-7ヶ月であった。

(4) マツカワの正常発育における黒色素細胞の出現過程とホルモン調節： マツカワ仔魚は特徴的な黒い体色を示すが、仔魚型黒色素胞の密度は白いヒラメ仔魚と同様であり、黒色素胞の拡散が黒い体色の主な原因であることが明らかとなった。この色素胞のメラニン凝集ホルモンに対する感受性を調べたところ、無眼側では変態後にも感受性を示したのに対し、有眼側では変態後に感受性を失っており、機能的にも左右非対称性が認められた。

(5) ヒラメの個体識別による二次黒化の発現過程： 正常に変態を完了したヒラメ稚魚をイラストマー樹脂により個体識別し、二次黒化の発現経過を検討した。その結果、二次黒化は黒化部位が尾部から頭部にかけて約2ヶ月間にわたり拡大したのちに停止することが確認された。また、体長5cm程度の早期に二次黒化をわずかでも発現していた個体は、最終的な黒化面積が大きく、黒化発現時期が黒化程度の予測に用いられる可能性が示された。

(6) ヒラメにおける二次黒化の発現時期の特定： 二次黒化抑制効果が確実である底砂を用いて、成長に伴う二次黒化の開始・中絶・再開の状況を検討した。残念ながら二次黒化には決まった発現可能期間は見いだされず、孵化後約5ヶ月(体長約20cm)でも底砂を取り除くと発現した。また黒化開始後に底砂を導入すると黒化拡大は停止したものの、底砂を除去すると速やかに黒化が再開した。即ち、二次黒化は潜在的に常に発現しうることで、および底砂による抑制効果は一時的でしかないことが明らかとなった。

(7) ヒラメの着色型黒化におけるストレス応答ホルモンおよび水槽底形状の影響： ストレス応答ホルモンであるコルチゾルをヒラメに投与すると、有意に無眼側の着色型黒化面積が増加することが予備的に明らかになった。また、水槽底面に凹凸をつけることで、ヒラメの着色型黒化が抑制できる可能性が示された。

(8) ヒラメにおける鱗の自家移植実験： ヒラメの無眼側鱗を有眼側に移植すると、移植鱗上に黒色素胞が出現した。一方、有眼側鱗を無眼側に移植しても黒色素胞は減少しない。しかし、移植した有眼側鱗を再び取り除くと、そのあとに再生してくる鱗は有眼側鱗と同様に多数の黒色素胞を有していた。このことから、有眼側や有眼側鱗には、無眼側鱗あるいは再生鱗に黒色素胞を出現させる何らかの要因(有眼側化因子)が含まれていると推測された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

Toshinori Isojima, Masatomo Tagawa (2014). Transplantation of pigmented and non-pigmented scales into the ocular and blind sides of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, suggesting the presence of ocular-side characteristic inducer in pigmented scales. Fish. Sci. 80: 1027-1035.

Toshinori Isojima, Naoshi Makino, Yoshifumi Miyama, Masatomo Tagawa (2014). Effects of time and duration of rearing with bottom sand on the occurrence and expansion of staining-type hypermelanosis in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci. 80:785-794.

Naoki Yoshikawa, Taihei Matsuda, Akiyoshi Takahashi, Masatomo Tagawa (2013). Developmental changes in melanophores and their asymmetrical responsiveness to melanin-concentrating

hormone during metamorphosis in barfin flounder (*Verasper moseri*). Gen. Comp. Endocrinol. 194: 118–123.

Toshinori Isojima, Naoshi Makino, Masato Takakusagi, Masatomo Tagawa (2013). Progression of staining-type hypermelanosis on the blind side in normally metamorphosed juveniles and pigmentation progression in pseudoalbino juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using individual identification. Fish. Sci. 79:787-797.

Toshinori Isojima, Hirohito Tsuji, Reiji Masuda, Masatomo Tagawa (2013). Formation process of staining-type hypermelanosis in Japanese flounder juveniles revealed by examination of chromatophores and scales. Fish. Sci. 79: 231–242.

Naoki Yoshikawa, Thamootharan Mammaman, Elvin Michael Bavoh, Masaru Tanaka, Masatomo Tagawa (2012). Gonadal development of the primitive flatfish *Psettodes erumei* in Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. Aquaculture Sci. 60: 475-483.

[学会発表](計 10件)

浅田憲貴・松田泰平・田川正朋．飼育下アカガレイの多様な形態異常防除に向けた試みー出現機構の成長とストレスに基づく理解ー．平成27年度日本水産学会春季大会．東京都港区．2014/3/28．

山本一毅・深山義文・益田玲爾・田川正朋．砂敷によるヒラメ着色型黒化防除の機構コルチゾルによる促進と凹凸面による抑制．平成27年度日本水産学会春季大会．東京都港区．2014/3/28．

浅田憲貴・松田泰平・田川正朋．飼育下アカガレイの多様な形態異常防除に向けた試みー成長履歴の検討ー．平成26年度日本水産学会春季大会．北海道函館市．2014/3/28．

浅田憲貴・松田泰平・田川正朋．飼育下アカガレイの多様な形態異常防除に向けた試みー飼育密度の検討ー．平成26年度日本水産学会春季大会．北海道函館市．2014/3/28．

浅田憲貴・松田泰平・田川正朋．飼育下アカガレイの多様な形態異常防除に向けた試みー飼育水温の検討ー．平成25年度日本水産学会秋季大会．三重県津市．2013/9/20．

浅田憲貴・松田泰平・田川正朋．飼育下のアカガレイに見られる多様な形態異常は眼と体色の組み合わせの異常によって生じる．平成25年度日本水産学会春季大会．東京都港区．2013/3/27．

磯島俊実・深山義文・牧野直・田川正朋．ヒラメ無眼側黒化の程度におよぼす黒化開始時期および黒化中断の影響．平成25年度日本水産学会春季大会．東京都港区．2013/3/29．

吉川尚樹・松田泰平・高橋明義・田川正朋．マツカワにおけるメラニン凝集ホルモン(MCH)反応性は変態後期に左右差を生じる．第37回日本比較内分泌学会大会．福井県福井市．2012/11/30．

越後はるな・藤浪祐一郎・田川正朋．底砂の有無がヒラメの無眼側傷修復部の黒化に与える影響．平成24年度日本水産学会秋期大会．山口県下関市．2012/9/16．

磯島俊実・高草木将人・牧野直・田川正朋．ヒラメ無眼側における着色型黒化進行過程の個体識別による検討．平成24年度日本水産学会秋期大会．山口県下関市．2012/9/16．

[図書](計 1件)

三輪理・田川正朋.(2013). 8章変態.「増補改訂版 魚類生理学の基礎」184-192.恒星社厚生閣.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川正朋 (TAGAWA Masatomo)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号：20226947

(4) 研究協力者

松田泰平 (MATSUDA Taihei)
道立総合研究機構・栽培水産試験場・主査

深山義文 (MIYAMA Yoshifumi)
千葉水総研・種苗生産研・主任上席研究員