

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292126

研究課題名(和文) 魚類の成長を制御する生殖腺機能の解明と養殖への利用

研究課題名(英文) The role of gonads for growth in teleosts "Basic and Applied"

研究代表者

三浦 猛 (Miura, Takeshi)

愛媛大学・南予水産研究センター・教授

研究者番号：00261339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は魚の成熟と成長の関係を内分泌学的に明らかにするとともに、得られた基礎理論を魚類養殖の効率化に活用する技術の開発を目指して行われた。

解析の結果、数種の魚では、成長の制御に生殖腺が、下垂体と同様重要な役割を果たすことが確認となった。数種の魚種では、生殖腺による成長の制御機構は、生殖腺で発現する成長ホルモンおよび雌性ホルモンが重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、成熟に起因する養殖魚の変形の内分泌メカニズムが明らかとなるとともに、魚の飼育環境条件(流速)や栄養条件と成熟および成長の関係が明らかとなり、成熟制御による魚類養殖効率化のための基礎的知見が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish the efficient fish culture, I analyzed the relationship between growth and maturation of several fish in endocrinologically. As a result of the analysis using several fish species, the gonads are necessary for normal growth and thus, from the perspective of regulation of body growth, can be considered a "secondary pituitary", and it is considered that the role of gonad for body growth is the production and secretion of growth hormone and/or estradiol-17 beta (E2). Furthermore, I detected the relationships between maturation and environmental condition (water current), and maturation and nutritional factor. These finding is fundamental knowledge for regulation of maturation for the establishment of the efficient fish culture.

研究分野：水族生殖生理学

キーワード：生殖腺新機能 成長 成熟 栄養 水流 養殖 成熟リスク 成長促進剤

## 1. 研究開始当初の背景

魚の性や成熟は、養殖の効率に大きく影響する。例えば、ブリの成熟期の著しい体重減少、肉質の劣化および体の著しい変形、サケ科魚やタラ類で認められる早期成熟矮小雄個体の出現、ティラピアやヒラメなど雌雄の違いによる著しい成長差などがこれに当たる。これら魚類の生殖による成長への影響に関する諸問題を解決することができれば、魚類養殖の生産性は飛躍的に向上するものと考えられる。

これまで一般的には、魚類の成熟による成長遅滞は、卵母細胞への卵黄の蓄積（卵黄形成）などに多大なエネルギーが費やされるために起こると信じられてきた。しかし、魚種によっては、ブリなどのように、卵黄形成中に最大の成長速度を示すものもあり、卵黄形成に関するエネルギーの収支のみで成長速度の変化を説明することはできない。私たちはこれまで、ウナギおよびティラピアを用い、魚類の成熟制御機構を分子レベルで解析してきた。その結果、成長ホルモン（GH）、インシュリン様成長因子（IGF）-I およびグレリン等、成長の制御に関わる因子が mRNA のみならずタンパクレベルでも生殖腺で発現しており、精子形成に関しては、その進行に促進的に作用することが明らかとなった（Manal et al. *Biol. Reprod.* 1999, Miura et al. *Reproduction*, 2011）。この生殖腺で発現している GH 等の成長制御に関わる因子が、個体の成長に直接作用しても何ら不思議ではない。

このように、成長関連因子が発現している生殖腺が、個体の成長に関与しているか否かを、ティラピアを用いた生殖腺の外科的除去実験により調べたところ、雌雄とも生殖腺を除去したティラピアは著しく成長が阻害され、除去した生殖腺を皮下へ再移植したティラピアは、その成長が回復した（Bhatta et al., *PNAS*, 2012）。この実験結果より、申請者らは、「生殖腺が産生する成長ホルモン等の内分

泌因子が魚体の成長を直接コントロールしている、即ち“生殖腺は成長にとって第2の脳下垂体である”という仮説を提唱した。この仮説に基づく解析により、上に示した魚類の成長に及ぼす性・成熟の作用メカニズムを明らかにすることが出来るとともに、性や成熟が関係する養殖魚の成長に関する諸問題の機構を解明し、魚類養殖の飛躍的な効率化技術開発の方向性を示すことが出来るものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発したウナギやティラピアの生体外器官培養系およびティラピアの生殖腺除去・移植実験系を用い、魚類の成長に関わる生殖腺の影響のメカニズムを明らかにするとともに、魚類養殖で大きな問題となっている産卵期後の急激な体重減少や、それに続く変形および肉質劣化を、このメカニズムを人為的に制御する事による養殖魚の成熟を阻止する為の基礎技術の開発を目指し、魚類養殖の効率化技術の確立に貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、上述のように、申請者が開発したウナギおよびティラピアの生体外器官培養系およびティラピアの生殖腺除去・移植実験系を用いて、基礎的な解析を行うとともに、これらの基礎研究で得た結果をもとに、実際に養殖現場で、養殖業者の協力の下、実証実験を行った。

## 4. 研究成果

本格的な実験に先立ち、本研究の研究対象であるメダカ、ティラピア、ウナギ、ブリ、マダイ、クロマグロから成長に関わると因子として成長ホルモン（GH）、インシュリン様成長因子（IGF）-I,II,III、IGF-結合タンパク 1～6、摂食制御にも作用すると考えられるグレリン、レプチン、コレシストキニン（CCK）、

ペプチド Y (PY) およびオレキシンの cDNA の部分配列を明らかにし、この情報をもとにリアルタイム PCR による遺伝子発現解析系を構築した。

オスに比較してメスが大きいウナギを用い、雌雄による成長の違いのメカニズムを解析した。雌性ホルモン処理によりメス化を誘導したウナギの成長とメス化していないウナギの成長を比較観察したところ、メス化により成長の増大が観察された。また、雌雄ともに個体群の中で成長が早い個体は、生殖腺中の成長ホルモン遺伝子およびタンパクの発現が強いことが、リアルタイム PCR および免疫組織学的解析により明らかとなった。この生殖腺での成長ホルモンの発現と個体の成長に関しては、ウナギ同様メスが大きいヒラメについても同じ傾向が得られた。メスに比較してオスが大きいティラピアでは、生殖腺を除去すると雌雄の成長差が無くなることから、生殖腺が雌雄の成長差に関係することは明らかとなったが、ウナギのように性ステロイドホルモンと成長差との関係は見出されなかった。

メダカを用いて、飼料の栄養条件と成熟との関係を観察した。その結果雌に関しては、一般的な飼料に比較して、低タンパク・高脂質、或いは高タンパク・低脂質の条件の飼料を給餌したメダカの産卵数が増加する傾向が認められた。なお、本実験を行うために、様々な栄養素を含む飼料原料を実験魚に与えて魚の生理状態を遺伝子レベルで観察したところ、ユニークな作用を有する飼料原料を発見することができた。

給餌コントロールにより、魚類の成熟を制御できるか否かを、養殖ブリを用いて調べた。給餌抑制により成熟を抑制できることは既に明らかになっているので、摂食量の増大が成熟に影響をあたえるか否かを調べた。イカの内臓は、古くより魚類の摂食性を向上させることが知られているが、このイカの内臓の

溶解液をブリの飼料に 1% 添加したところ、消化管でのコレシストキニン遺伝子発現量が上昇するとともに、胃腸管のプロテアーゼ活性が向上し、12.7% 摂食量が増加した。実際に 1% のイカ内臓溶解液を添加した飼料を養殖漁場のブリに 6 ヶ月間給餌したところ、摂食量が増加するとともに、魚体重が有意に増加した。しかしながら、雌雄ともに有意な生殖腺重量の増加は認められなかった。この結果から、給餌制限によって、生殖腺の発達は抑制されるが、過給餌によっては生殖腺の発達は促進しないものと推察された。

成熟期前後のブリを用いて、ヒコウキ型変形の発症と成熟との関係を解析した。その結果、成熟期の脊椎骨の弱体化がヒコウキ型変形を誘起することが明らかとなった。また、成熟期に雌雄とも血液中の濃度が高くなる性ステロイドホルモン  $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) のブリ幼魚への投与により、脊椎骨の弱体化が再現された。この結果から、秋季以降での制限給餌によりブリの成熟は抑制され、結果として血中 DHP 量が低下するが、この制限給餌により、ヒコウキ型変形の出現も抑制できるものと考えられた。

ティラピアを用いた予備実験により、水流と成長に何らかの関係があることが推察されたので、水流の強度とティラピアの成長を、水流を人為的に調節した実験水槽で調べた。なお、実験に使用した流速は、5.5cm/sec, 10.3cm/sec, 16.3cm/sec および 37.7cm/sec の 4 種類である。その結果、流速が速ければ速いほど成長の速度が早いことが明らかとなった。これらの供試魚の生殖腺を観察したところ、雌雄ともに流速 16.3cm/sec の時に最も成熟が進んでいることが明らかとなった。流速による成長の促進は、魚の運動量の違いに関係する可能性が高く、流速の成熟への影響は、水流による魚へのストレスが関係しているものと推察された。この流速による魚の成長

速度の違いは、陸上養殖等で効率的な養殖技術として応用できる可能性が高いものと考えられた。

本研究により、成熟と成長の関係が解明され、そのメカニズムの一端が明らかになるとともに、成熟と成長、および成熟に伴う養殖上の問題点に対する人為的なコントロール方法を示すことができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

原著

1. Kondo, F., Ohta, T., Iwai, T., Ido, A., Miura, C., Miura, T.: Effect of the squid viscera hydrolysate on growth performance and digestion in the red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* (in press).
2. 近藤史崇, 岩井俊治, 三浦智恵美, 坂田潤弥, 太田史, 井戸篤史, 入江奨, 岡松一樹, 角正浩一, 三浦猛: エクストルーデッドペレット飼料が養殖クロマグロの消化と成長に与える影響. 日本水産学会誌82 : 923-933 (2016).
3. Ito, K., Ito, M., Oniduka, T., Ohta, K., Torii, T., Hano, T., Mochida, K., Ohkubo, N., Miura, T., Fujii, K. : Differences in the ability of two marine annelid species, *Thalassodrilides* sp. and *Perinereis nuntia*, to detoxify 1-nitronaphthalene. *Chemosphere* 151: 339-344 (2016).
4. Ohta, T., Kusano, K., Ido, A., Miura, C. and Miura, T.: Silkrose: A novel acidic polysaccharide from the silkworm that can stimulate the innate immune response. *Carbohydr. Polym.* 136: 995-1001 (2016).
5. Ido, A., Iwai, T., Ito, K., Ohta, T., Mizushige, T., Kishida, T., Miura, C. and Miura, T.: Dietary effects of housefly (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae) pupae on the growth performance and the resistance against bacterial pathogen in red sea bream (*Pagrus major*) (Perciformes: Sparidae). *Appl. Entomol. Zool.* 50: 213-221 (2015).
6. Iwai, T., Takahashi, M., Ido, A., Miura, C. and Miura, T.: Effect of gender on Akoya pearl quality. *Aquaculture* 437: 333-338 (2015).
7. Ohta, T., Ido, A., Kusano, K., Miura, C. and Miura, T.: A novel polysaccharide in insects activates the innate immune system in mouse macrophage RAW 264 cells. *PLoS ONE* 9 (12) : e114823 (2014).

8. Miura, C., Yoshihara, Y., Shimizu-Yamaguchi, S., Hayashi, D., Hamada, K., Takeda, Y., Miura, M., Miura, T.: Controlled feeding alleviates the reduced growth associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 424-425: 10-17 (2014).
9. Fukushima, E., Iwai, T., Miura, C., Fritzie, C., Urasaki, S. and Miura, T.: A xenograft mantle transplantation technique for producing a novel pearl in an Akoya oyster host. *Mar. Biotechnol.* 16: 10-16 (2014).
10. 水野かおり, 三浦智恵美, 三浦猛: カワハギおよびウマズラハギの成長と水温の関係. 水産増殖 62: 31-35 (2014).
11. Higuchi, M., Miura, C., Iwai, T. and Miura, T.: Trypsin regulates meiotic initiation in Japanese eel (*Anguilla japonica*) by promoting the uptake of taurine into germ cells during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 89: Article 58, 1-9 (2013).
12. Nozaki, M., Ito, K., Miura, C. and Miura, T.: Examination of the digestive enzyme distribution in the gut tract and the functions of intestinal caecum, in megascolecoid earthworms (*Oligochaeta: Megascolecidae*) in Japan. *Zool. Sci.* 30: 710-715 (2013).

総説

13. 三浦猛, 井戸篤史, 橋爪篤史, 三浦智恵美: 昆虫由来免疫賦活化物質「シルクローズ®」の魚類養殖への利用. *アクアネット*20 (5):48-54 (2017).
14. 三浦猛, 滝本敦史, 三浦智恵美: 活魚輸送がマダイの生理状態および肉質に与える影響. *アクアネット*20 (3):26-31 (2017).
15. 三浦猛, 三浦智恵美: 養殖クロマグロにおけるEP飼料の消化性. *アクアネット*20 (3):44-49 (2017).
16. 三浦猛, 太田史, 三浦智恵美, 高橋隆行, 井戸篤史: 魚粉に代わる養魚飼料原料 昆虫ミールの可能性と機能性. *養殖ビジネス*52(3): 35-39 (2015).
17. 三浦猛, 太田史, 近藤史崇, 三浦智恵美, 高橋隆行, 井戸篤史: 脱カドミウム(Cd)イカ内臓溶解液の養殖魚に対する飼料効率改善効果. *養殖ビジネス*52(2): 61-64 (2015).
18. 三浦猛, 岩井俊治, 三浦智恵美: 生物学的基礎研究と真珠養殖. *真珠の雑誌*104. ①-⑩ (2015)

19. 三浦 猛, 三浦智恵美: 魚の生殖腺は成長コントロールの司令塔? バイオサイエンスとインダストリー 72 (5). 373-379 (2014)
20. 三浦猛, 三浦智恵美, 岩井俊治, 太田史, 井戸篤史: 昆虫の養殖用飼料原料としての可能性. アクアネット16 (5). 30-36 (2013).

[学会発表] (計 31 件)

1. 三浦猛, 太田史, 井戸篤史, 三浦智恵美: カイコ由来免疫賦活化多糖「シルクロース」の単離. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 近畿大学, 奈良, 9 月 (2016) .
2. Miura, T., Iwai, T., Wakaki, R. and Miura, C.: Tidal current is one of the most important factors in the growth of Akoya pearl oyster. The 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center, 宜野湾, 11 月 (2016) .
3. Miura, C., Iwai, T. and Miura, T.: Analysis of the relationship of the hemocytes and epithelial cells of pearl oyster in pearl sac formation. The 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center, 宜野湾, 11 月 (2016) .
4. Iwai, T., Takahashi, M., Mulyana, J. S., Miura, C. and Miura, T.: Bidirectional sex changes in Akoya pearl oyster. The 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center, 宜野湾, 11 月 (2016) .
5. Miura, T.: Characteristics of insect as an alternative raw material for fish feed. Perspective on the utilization of insects for feed and food, Hibiya Convention Hall, 東京都, 11 月(2016).
6. 三浦猛: ウナギを増やすための生物学, 「四万十川流域での産業振興と環境との調和」に関する研修会, 四万十市 (高知県主催), 2 月 (2016) (招待講演).
7. Miura, T.: Approach for Establishment of Sustainable Aquaculture (Key note lecture), *International Seminar, Fisheries and Marine Science in Accordance with Sail Tomini and Festival of Boalemo 2015*, Gorontalo, Indonesia, 9 月 (2015).
8. 三浦 猛: 養殖飼料を魚の生理状態から考える, 第 16 回 ACN フォーラム-日本の水産増養殖を考える会-, 福岡市, 8 月 (2015) (招待講演) .
9. 北村脩, 三浦智恵美, 太田史, 三浦猛: ニホンウナギの雌雄の成長差と生殖腺の相互関係. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (東京都・港区) 3 月 (2015).
10. 三浦 猛, 三浦智恵美, 太田 史, 井戸篤史: 昆虫由来免疫賦活化物質に関する研究. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (東京都・港区) 3 月 (2015).
11. 三浦猛: 真珠養殖における基礎科学の重要性、シンポジウム「これからの真珠養殖と科学 (基礎研究と生産現場との連携)」。宇和島市総合福祉センター (愛媛県・宇和島市), 11 月 (2014) (招待講演) .
12. 三浦智恵美, 太田史, 草野希枝, 井戸篤史, 三浦猛: 天蚕サナギから得られた新規物質シルクロース. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月 (2014).
13. 林大地, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: 養殖ブリにおける性成熟と骨との関係. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月 (2014).
14. 三浦猛, 岩井俊治, 高橋雅治, 井戸篤史, 三浦智恵美: アコヤ真珠母貝の性の違いが真珠の品質に与える影響. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月 (2014).
15. 岩井俊治, 井戸篤史, 三浦智恵美, 三浦猛: 真珠核の正電荷処理が真珠の光学的特性に与える影響. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月, (2014).
16. 三浦智恵美, 岩井俊治, 井戸篤史, 三浦猛: キメラ化アコヤガイを用いたマベ真珠生産技術の開発. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月, (2014).
17. 近藤史崇, 岩井俊治, 三浦智恵美, 角正浩一, 三浦猛: 養殖クロマグロの配合飼料に対する消化特性. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月, (2014).
18. 太田史, 草野希枝, 井戸篤史, 三浦智恵美, 三浦猛: ウリミバエサナギ由来免疫賦活化酸性多糖 Dipteroose の単離・同定. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月, (2014)
19. 井戸篤史, 岩井俊治, 近藤史崇, 太田史, 三浦智恵美, 三浦猛: 脱 Cd イカ内臓の養殖魚に対する飼料効率改善効果の生理学的解析. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学 (福岡県・福岡市), 9 月, (2014).
20. Miura, T., Ido, A., Ohta, T., Iwai, T., Kusano, K., Kobayashi, S., Kishida, T. and Miura, C.: The benefits of using insects as fish and animal feed.

- Insect to Feed the World, エーデ(オランダ), 5月, (2014) (招待講演) .
21. Ido, A., Ohta, T., Iwai, T., Kishida, T., Miura, C. and Miura, T.: Positive effects of dietary housefly (*Musca domestica*) pupa for fish and mammal. Insect to Feed the World, エーデ (オランダ), 2014年5月.
22. Miura, C., Yoshihara, Y., Hayashi, D. and Miura, T.: Controlled feeding rescues the growth reduction associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). 10th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, オリオン (ポルトガル), 2014年5月.
23. Miura, T., Miura, C., Iwai, T. and Batta, S.: The role of gonads for growth in teleosts. 10th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, オリオン (ポルトガル), 2014年5月 (2014) (招待講演) .
24. 井戸篤史, 岩井俊治, 伊藤克敏, 太田史, 水重貴文, 岸田太郎, 三浦智恵美, 三浦猛: イエバエ幼虫およびサナギの魚類への作用. 第58回日本応用動物学会, 高知市, 3月 (2014).
25. 太田史, 草野希枝, 井戸篤史, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: ウリミバエサナギから単離した免疫賦活化物質の魚類養殖用飼料への応用. 第58回日本応用動物学会, 高知市, 3月 (2014) .
26. Miura, T., Higuchi, M. and Miura, C.: Control mechanisms of meiotic initiation during spermatogenesis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). The 7<sup>th</sup> AOSCE Congress, 台湾基隆市, 2014年3月 (2014) (招待講演) .
27. Miura, C., Yoshihara, Y., Hayashi, D. and Miura, T.: Controlled feeding rescues the growth reduction associated with spawning in farmed yellowtail. The 7<sup>th</sup> AOSCE Congress, 台湾基隆市, 2014年3月.
28. 三浦猛: 新規機能性飼料原料の開発. 平成25年度日本水産学会中国四国支部例会ミニシンポジウム, 宇和島市, 2013年11月 (2013) (招待講演) .
29. 林大地, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: ブリ上湾症と性成熟の関係. 平成25年度日本水産学会中国四国支部例会, 宇和島市, 11月 (2013).
30. 北村脩, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: ヒラメにおける生殖腺での成長ホルモンの発現と成長との関係. 平成25年度日本水産学会中国四国支部例会, 宇和島市, 11月 (2013).
31. 近藤史崇, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: クロマグロの飼料消化と成長に関する研究. 平成25年度日本水産学会中国四国支部例会, 宇和島市, 11月 (2013).
- 〔図書〕 (計1件)
1. 三浦 猛, 三浦智恵美: 魚類生殖腺の成熟. 「ホルモンから見た生命現象と進化」シリーズ 第4巻 成長・成熟・性決定-継- (伊藤道彦・高橋義明編). pp59-75. 裳華房 (2016).
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計2件)
- 名称: 組成物、及び組成物の製造方法  
発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 太田史, 橋爪篤史  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-113379  
出願年月日: 2016年6月7日  
国内外の別: 国外
- 名称: 成長促進剤及び飼料  
発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 近藤史崇  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-034205  
出願年月日: 2017年2月25日  
国内外の別: 国内
- 取得状況 (計1件)
- 名称: 多糖類、多糖類を含む組成物、及び免疫賦活剤  
発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 太田史, 岩井俊治, 高橋隆行  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 6019505  
取得年月日: 2016年10月14日  
国内外の別: 国外
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
三浦 猛 (MIURA, Takeshi)  
愛媛大学・南予水産研究センター・教授  
研究者番号: 00261339
- (4) 研究協力者  
近藤史崇 (KONDOU, Fumitaka)、北村脩 (KITAMURA, Shu)、林大地 (HAYASHI, Daichi) (大学院生)、三浦仁嗣 (MIURA, Masatsugu) (秀長水産)、竹田豊 (TAKEDA, Yutaka) (興洋水産)、浜田克人 (HAMADA, Katsuto) (浜英水産)