

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870508

研究課題名(和文)カタクチイワシにおける性成熟・産卵形質の環境応答に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the environmental response of reproductive traits in Japanese anchovy

研究代表者

北野 載 (Kitano, Hajime)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30635008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カタクチイワシにおける性成熟・産卵など繁殖特性の環境応答を評価するために、水槽内における飼育実験を行うとともに、生理学的根拠を伴う定量的な評価を行うための生殖関連遺伝子解析を行った。飼育実験の結果、自然水温と比較して低水温で飼育した個体は、成長が遅く、成長に伴う肥満度の増加は低い水準で推移する傾向がみられ、性成熟体長は大型化した。さらに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により本種の成長・生殖関連因子を複数同定し、今後の解析に向けた情報基盤を整備した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the environmental response of reproductive traits in Japanese anchovy *Engraulis japonicus* under captive conditions. Expression analyses of reproduction-related genes were also undertaken to enable to quantitative evaluation of the environmental response of reproductive traits. In individuals reared in the low-temperature condition, the body size (total length) of puberty onset was larger compared with individuals under natural water temperature. In addition, lower growth rate, slower increase of condition factor were observed in individuals under the low-temperature condition. The database of reproduction-related gene was constructed by transcriptome analyses using next-generation sequencer.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：カタクチイワシ 性成熟 産卵 環境応答

1. 研究開始当初の背景

多獲性小型浮魚類の加入量および資源量の多寡は、親魚の産卵時期、産卵量、卵質などに反映されることが知られており、これら繁殖特性値は水温・餌条件など生息環境の影響を強く受けることが報告されている。したがって、資源量変動機構の解明には産卵親魚における繁殖特性の環境応答の解明が不可欠である。

日本周辺のカタクチイワシ *Engraulis japonicus* は、資源量の増大に伴い沿岸（高水温域）から沖合（低水温域）へと分布域を拡大することが知られている。野外採集個体の調査結果により、これら2群間には性成熟が開始される体長や産卵開始水温に加え、産卵量、産卵頻度などの繁殖特性値に明瞭な差異が存在することが報告されている。しかし、これらのような性成熟・産卵形質の多型が発生するメカニズムの検証は未だなされていない。

これまで申請者は、九州西岸域のカタクチイワシを用いて飼育水槽内における産卵誘導技術を開発し、生殖生理学・細胞生物学的解析手法を用いて水温・餌量が性成熟・産卵に及ぼす影響の実証するための実験基盤を整備した。この飼育実験系をツールとすることで、従来の資源研究では野外採集標本と海域環境との関連性を探るに止まり、未だ明らかではない「カタクチイワシにおける繁殖特性の環境応答メカニズム」を解明できるのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

一般的な生物の形質発現は、個体のもつ遺伝子構成のほか、生息する環境に依存して生理条件を変化させることで可塑的に誘導されることがある。日本周辺のカタクチイワシには生息海域の異なる系群間の遺伝的差異はないことを示唆する報告がなされており[引用文献と]、環境要因が及ぼす繁殖形質への影響の評価が喫緊の課題となっている。これらの報告を踏まえ、申請者は、カタクチイワシの沿岸-沖合群間における繁殖形質の多型が「胚発生から性成熟に至るまでに個体が経験する水温に依存して決定されるのではないか？」という仮説を立てた。本申請研究では、(1) 経験水温が性成熟・産卵特性値に及ぼす影響の解明、(2) 経験水温に対する繁殖特性応答の定量的評価に向けた生殖関連ホルモン遺伝子発現量の解明による上記仮説の検証を目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 飼育実験による繁殖特性値の評価

水槽内で飼育された長崎県産カタクチイワシ親魚が産出した受精卵を回収し、自然水温区(水温: 13.3~32)と低水温区(水温: 15~17)の水槽に分けて収容した。孵化後は成長段階に応じた生物餌料および配合飼料を給餌して飼育した。各水槽区から種々の

日齢にある個体を一部取り上げて体長と体重を測定するとともに、肥満度を算出して成長を評価した。さらに、これら個体の卵巣と精巣は、常法による組織切片作製と顕微鏡観察により性成熟の有無を確認した。雌は卵黄形成の開始、雄は精細胞の出現をそれぞれ性成熟の指標とした。さらに、産卵開始水温および種々の水温における産卵頻度を評価した。

(2) 生殖関連ホルモン遺伝子解析

性成熟期のカタクチイワシ雌個体から脳、脳下垂体、卵巣および肝臓を採取し、抽出した mRNA を対象として illumina HiSeq2000 による 2000 万リードペア/組織のシーケンズ解析を行った。さらに、得られた塩基配列について、Trinity によるアセンブルを行った後に、Blast 相同検索によるアノテーションおよび blast2go を用いた Gene Ontology の付与を行った。

4. 研究成果

(1) 経験水温が繁殖特性値に及ぼす影響

低水温区の個体は、自然水温区と比較して成長が遅いことに加え、成長に伴う肥満度の増加は自然水温区よりも低い水準で推移する傾向がみられた(図1と図2)。雌の性成熟開始体長は、自然水温区で 43.0 mm (60 日齢)、低水温区で 54.6 mm (194 日齢)であった(図3と図4)。雄の性成熟開始体長は、自然水温区で 48.2 mm (60 日齢)、低水温区で 54.2 mm (157 日齢)であった(図5と図6)。以上より、自然水温区と比較して、低水温区の個体は性成熟開始までに多くの日数を要することに加え、性成熟開始体長は大型化することが示された。さらに、低水温区における性成熟開始体長の大型化は、性成熟に十分な肥満度に到達しないまま成長することが原因であることを示唆する結果が得られた。

産卵開始水温は、両群ともに約 15 であった。産卵頻度は両群ともに水温の上昇に伴い高くなったが、両群における差異は認められなかった。これら結果より、カタクチイワシ個体が胚発生から性成熟までに経験する水温は、上記繁殖特性には影響を及ぼさないことが示唆された。

本研究を実施する中で、飼育実験で得られた初回成熟体長に達して間もない親魚において、一部の卵黄形成卵の退行により産卵量の下方修正が起こることを確認した。一方で、その後は自身の体成長を伴いながらも退行卵が消失したことから、摂餌によるエネルギーを短期間のうちに再生産ヘシフトさせる特性をもつと考えられた。この結果は本課題の目的とは異なるものであが、カタクチイワシの産卵量の環境応答を評価するための有用な知見であると考えている。

(2) 生殖関連ホルモンの遺伝子発現解析

illumina HiSeq2000 により得られた塩基配列をアセンブルした結果、33,7197 のコンテグ配列が得られた。ここで構築したデータベースにより、本種でこれまでに未知であった脳内ペプチド Kiss1 や、卵黄前駆物質であるピテロジェニンをはじめとする生殖関連因子ならびにインスリン様成長因子など、成長関連因子の遺伝子配列が得られた。本研究期間内にこれら遺伝子発現量の環境応答に関する評価を実施することはできなかったが、これまでに実施した飼育実験により得られたサンプルを今後解析するにあたっての有用な情報基盤が整備された。

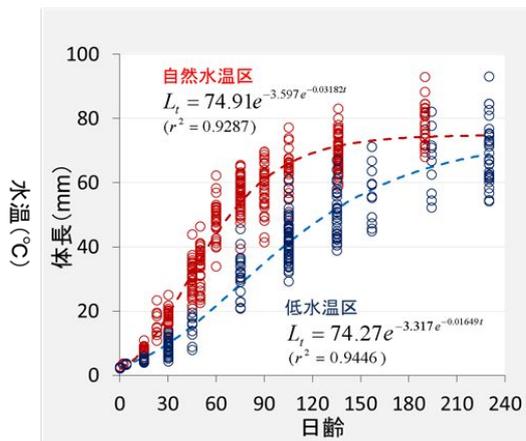


図1．異なる飼育水温下で飼育したカタクチイワシの成長。

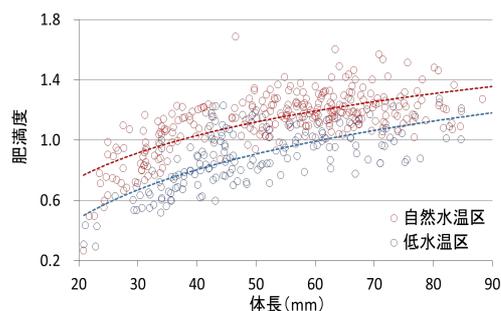


図2．異なる飼育水温下で飼育したカタクチイワシの肥満度。

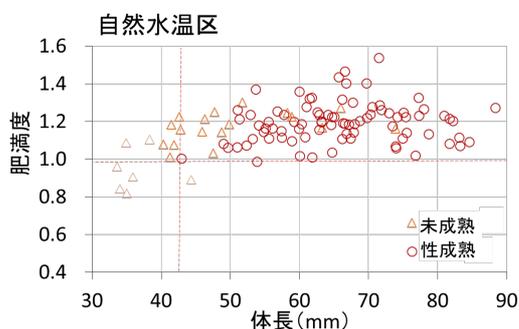


図3．自然水温下で飼育したカタクチイワシ雌の性成熟体長。

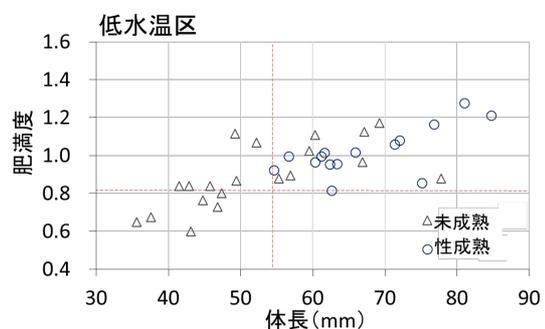


図4．低水温下で飼育したカタクチイワシ雌の性成熟体長。

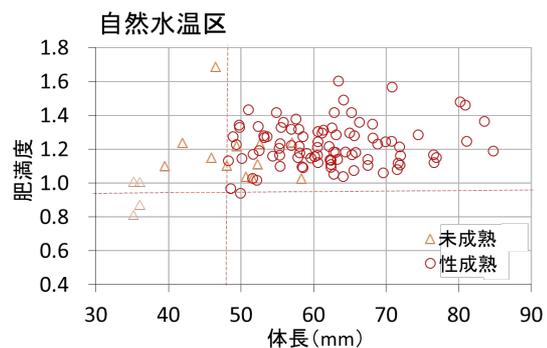


図5．自然水温下で飼育したカタクチイワシ雄の性成熟体長。

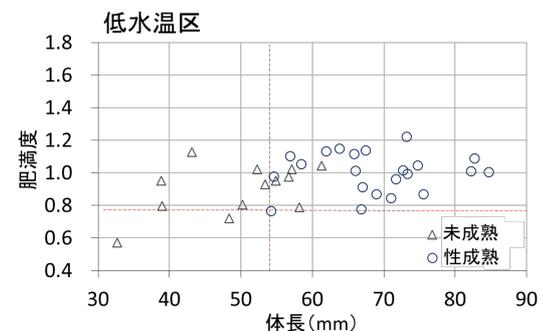


図6．低水温下で飼育したカタクチイワシ雄の性成熟体長。

<引用文献>

Yu, Z.N., Kong, X.Y., Guo, T.H., Jiang, Y.Y., Zhuang, Z.M. and Jin, X.S. Mitochondrial DNA sequence variation of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* from the Yellow Sea and East China Sea. Fisheries Science, 71: 299-307 (2005)

Liu, J. X., Gao, T. X., Zhuang, Z. M., Jin, X. S., Yokogawa, K., & Zhang, Y. P. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis*

australis). Molecular phylogenetics and evolution, 40(3), 712-723 (2006)

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)

M. Yoneda, H. Kitano, H. Tanaka, K. Kawamura, S. Selvaraj, S. Ohshimo, M. Matsuyama, A. Shimizu. Temperature and income resource availability mediated variation in reproductive investment in a multiple-batch-spawning Japanese anchovy. *Marine Ecology Progress Series*, 516, 251-262 (2014) [査読有] doi:10.3354/meps10969

ZP. Sukhan, H. Kitano, S. Selvaraj, M. Yoneda, A. Yamaguchi, M. Matsuyama. Identification and distribution of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) isoforms in the brain of a clupeiform fish, *Engraulis japonicus*, *Zoological Science*, 30, 1081-1091 (2013) [査読有] doi: http://dx.doi.org/10.2108/zsj.30.1081

M. Yoneda, H. Kitano, S. Selvaraj, M. Matsuyama, A. Shimizu. Dynamics of gonadosomatic index of fish with indeterminate fecundity between subsequent egg batches: application to Japanese anchovy *Engraulis japonicus* under captive conditions. *Marine Biology*, 160, 2733-2741 (2013) [査読有] doi: 10.1007/s00227-013-2266-9

[学会発表](計6件)

杉原 直樹, 北野 載, 長野 直樹, 坂口 圭史, 松山 倫也, 飼育下におけるカタクチイワシの成長と性成熟に及ぼす経験水温の影響, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015.03.30. (東京)

田和 篤史, 中園 啓祐, 山口 明彦, 長野 直樹, 北野 載, 山口 忠則, 松山 倫也, 耳石微量元素分析によるカタクチイワシの産卵マーカーの検索, 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014.09.21. (福岡)

田中 寛繁, 米田 道夫, 北野 載, 長野 直樹, 川村 耕平, 田和 篤史, 松山 倫也, 大下 誠二, 卵生産に必要なエネルギーはいつ獲得されるのか? - 炭素・窒素安定同位体比に基づく小型浮魚類での検証 -, 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014.09.20. (福岡)

ZP. Sukhan, 北野 載, S. Selvaraj, 鬼塚 千波里, 山口 明彦, 天野 勝文, 松山 倫也, ニシン目カタクチイワシの3種 GnRH の遺伝子クローニングおよび産生細胞の脳内分布, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014.03.28. (函館)

北野 載, 杉原 直樹, 長野 直樹, 坂口 圭史, 松山 倫也, カタクチイワシの初回成熟における退行卵の出現・消失過程の観察, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014.03.27. (函館)

ZP. Sukhan, K. Kawamura, H. Kitano, S. Selvaraj, A. Yamaguchi, M. Matsuyama, Expression profiles of kiss2, gpr54-2, and gnrh1 in male and female Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) during puberty, 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 2013.11.08. (Tokyo)

[図書](計1件)

米田道夫, 北野 載. カタクチイワシの成熟・産卵量調節機構. 漁業資源の繁殖特性研究 飼育実験とバイオロギングによる新たな展開, 恒星社厚生閣, 水産学シリーズ 175, 79-91 (2013)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 載 (Kitano, Hajime)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 3 0 6 3 5 0 0 8

(2)連携研究者

松山 倫也 (Matsuyama, Michiya)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 0 0 1 8 3 9 5 5

長野 直樹 (Nagano, Naoki)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 5 0 4 3 7 9 4 3

坂口 圭史 (Sakaguchi, Keishi)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 5 0 3 9 6 2 8 0