

令和元年6月19日現在

機関番号：88003

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02984

研究課題名(和文) 外来魚の根絶を目指した不妊化魚の大量作出のための技術開発

研究課題名(英文) Innovation of mass production of sterilized fish focusing on invaded fish by high temperature

研究代表者

中村 将 (Nakamura, Masaru)

一般財団法人沖縄美ら島財団(総合研究センター)・総合研究センター 動物研究室・参与

研究者番号：10101734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：外来魚の新規駆除方法の開発を目的としてティラピアの成魚と稚仔魚の高水温(37℃)飼育による不妊化魚の効率良い誘導の検討を行なった。成熟雄を不妊化することは可能であったが、死亡率が高かった。稚仔魚では、54-60日間の処理で70%以上の割合で不妊化することが確認された。更に、処理環境の改善により死亡率が改善した。稚仔魚を用いた不妊化雄の大量生産が最適であることが明らかになった。不妊化雄は性的に成熟し、活発な性行動を行なった。正常雌と番って産卵した。しかし、産卵した卵は未受精で死亡することが確認された。現在、大量の不妊化雄を作出して繁殖した池への放流による個体変動についての検証をはじめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来動物が繁殖して、日本の在来生物の生態系が危機的状況となっている。外来生物の駆除を試みられてきたが、劇的に減らす有効方法の開発がなされていない。我々は、ティラピアを高水温で飼育すると遺伝的雄は完全に不妊化するが性的には成熟することを見いだした。不妊化した雄のみを大量に自然界に放流することで正常なメスとの産卵を高めることで自然界の魚を激減させることが出来るものと考え、高水温による効率良い不妊化雄の作出方法を目指した。更に、作出したオス個体を成熟するまで大量に飼育して、完全な不妊化を確認する方法を確立した。得られた大量の不妊化オスを実験池に放流して影響を調べ、新規駆除法の開発を開始した。

研究成果の概要(英文)：The main aim of this study was to develop a new method to diminish the invaded fish population, which were bred in the outdoor pond, by the release of sterilized males. First, we tried to improve the efficiency of sterilization of juvenile and adult tilapias under high temperature (HT) (37 degree centigrade) for 54-60 days. Although it was possible to induce the sterilization of adult males, the mortality during treatment was high. In the juveniles treated with HT for 54-60 days, approximately 70% sterilization was achieved. Sterilized males displayed male nuptial coloration, territorial, and sexual behavior. They mated with normal, mature females that produced eggs, but all eggs were unfertilized and died. Finally, we succeeded to produce a large number of sterilized males and started the experiments to diminish the invaded tilapia by releasing sterilized male tilapia into the ponds, where tilapia are breeding.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：高水温 ティラピア 不妊化 アポトーシス 生殖細胞 性ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本全土で外来の大型動物が繁殖して古来の生物を捕食することにより生態系の破壊が進行していることが頻繁に報告されている。沖縄も例外ではなく、陸域ではマングース、水域ではティラピア類をはじめとしてプレコなど多数の魚類の繁殖が詳細に調べられ報告されている。本州では、釣り人が放流したと考えられるオオクチバスが琵琶湖で繁殖して在来種を駆逐していることが報道されている。根絶を目指して捕獲が続けられているが、莫大な費用、時間、労力を費やす割には根絶にはほど遠いのが現実である。このような外来種による問題は国際社会でも深刻な社会問題として認識されて来た。日本では2004年には特定外来種による生態系等に関わる被害の防止に関する法律(特定外来生物法)が成立し、2005年に施行された。しかし、この法律はあくまで日本の生態系や農林業、人の生活に大きな悪影響を及ぼす恐れのある外来種の輸入等を規制する法律にすぎない。国際条約の「生物多様性条約名古屋議定書(COP10)」でも外来種の侵入防止、駆逐などの必要性が明記された。先頃出されたCOP10のロードマップにおいて、環境省、農林省、文部省、国土交通省が連携して農林水産業や生態系への影響防止を図るとともに、多様な分野と連携して普及啓発を強化し、外来種問題への認識と外来生物の駆除対策への理解を深めることが宣言された。COP10にある外来種の撲滅の実現のためには、捕獲による取り組みに加えて新規の効率的根絶法の開発が求められている。

2. 研究の目的

不妊化の方法としては様々な方法が考えられる。ブサルファンなどの薬品や性ホルモンの大量投与で生殖細胞を特異的に殺し不妊化させる方法である。薬品、性ホルモンを大量に投与し続けなければならないことや完全な不妊化が難しいなどの問題がある。ガンマー線照射による生殖細胞を殺す方法があるが、魚体への悪影響が心配される。加えて、薬品や放射線処理した魚を自然界に放流することは問題がある。不妊化する遺伝子の導入によるトランスジェニック個体の作成も考えられるが、カルタヘナ法により遺伝子導入した個体を自然界へ放流することは禁じられているので許可を得るには困難が予想される。従って未だ安全、安価な不妊化魚の大量生産の成功に至っていない。今回開発した方法は、薬品、放射線を使わずまた遺伝子導入を行わない不妊化法であることから自然界に放流しても安全である。寿命まで子孫を残すことが出来ないと考えられるので放流しても自然繁殖することはないと考えられる。高水温を維持するための安価な装置があればどこでも実施可能な方法で、魚の飼育経験のある人は誰でも不妊化魚を大量に作成することが可能である。欠点として高水温処理期間には死亡率が10-40%と高いので処理方法を改良する必要がある。ティラピア以外の種では温度による不妊化は不明であるが、今後、他の種で不妊化に成功した時の先攻研究として多くの情報を得ることが出来る。本申請では、以下の主に4つの問題を解決して将来不妊化魚を大量に放流して外来魚を根絶させるための喫緊の応用技術開発を行なうものである。

3. 研究の方法

将来不妊化魚を大量に放流して外来魚を根絶させるための喫緊の応用技術開発を行なう。主に4つの問題点を解決する。1)雄のみを効率良く大量に不妊化させる方法の確立:様々なサイズのティラピアの全雄稚魚の不妊化を高水温飼育で誘導し、死亡率が少なく効率良く大量に不妊化魚を生産する条件を明らかにする。2)長期飼育による半永久不妊化の確認研究:不妊化した魚を長時間飼育して寿命までの確実な不妊化を確認する。3)不妊化雄と正常成熟雄との成熟雌をめぐる雄間競争に関する研究:正常成熟雄との共存下で不妊化魚が正常雄に打ち勝って雌を獲得して交配し、未受精卵・死卵となるかを調べる。4、高温による生殖細胞死滅機構の解明:温度による生殖細胞が死滅する分子機構を解明する。

4. 研究成果

モザンビークティラピア稚仔魚を用いて高水温(37℃)で54-60日(7群)間連続的に飼育して効率良い不妊化誘導について検討した。処理成魚の腹部を圧迫して精液を集め顕微鏡下で精子の有無を判定する方法で不妊化率調べた。その結果、どの群も約70%の不妊化率であった。また、エアと餌の供給量を増やすこと、飼育水を頻繁に換水することで処理期間の死亡率が顕著に低下した。不妊化雄は婚姻色を呈し縄張り行動も認められた。正常雌と交配して産卵した。しかし、卵は未受精卵で全て死亡した。不妊確認1年後においても精子を持たない不妊であることを再確認した。現在、この実験で得られた大量の不妊化雄をティラピアが繁殖した実験池に放流して野外個体の変動を調べている。

親魚の不妊化も試みた。ナイルティラピア成熟雄を用いて60日間高水温飼育して精巣への影響をしらべた。その結果、処理開始間もなく生殖細胞がアポトーシスを起こして死滅することが確認された。処理終了時の精巣中には生殖細胞は組織学的に全く確認出来なかった。ステロイド代謝酵素の抗体に強い陽性反応を示すライデッヒ細胞は精巣中に集塊となり認められた。また、血中の性ホルモン量は正常成熟雄と同じ様に高値であったことから、高温は性ホルモン合成に影響がないものと判断された。

高水温飼育により不妊化したモザンビークティラピアのメスの長期飼育による生殖特性について調べた。ふ化後10日の幼魚を高水温飼育(37℃、56日間)した後約21カ月齢まで成長させた。その結果、メスは婚姻色を示さず、泌尿生殖突起も未発達で外見的に明らかに正常成熟メスと異なっていた。卵巣は著しく小さく糸状で卵は確認出来なかった。組織観察でも生殖細胞は全くみとめられなかったが、卵巣の特徴である卵巣腔が認められた。アロマターゼを含むステロイド代謝酵素の抗体による免疫染色では強い陽性反応を示す細胞が確認されたが、その数は著しく少なかった。血中のエストラジオール、テストステロン、11-ケトテストステロンも正常成熟メスと比べても著しく低かった。このことから、不妊卵巣中に性ホルモンを産生する細胞が分化しているにも関わらず長期に渡り雌として性的成熟が起こらないことが明らかとなった。

メダカでの高温処理により、熱ショックタンパク質(HSP)ファミリーであるHSP70等の発現が急上昇した後、生殖細胞の増殖が抑制されて雄化することを報告している。そこで本研究では、メダカの生殖細胞増殖におけるHSPの役割を明らかにするため、HSPファミリーの発現制御因子である熱ショック転写因子1(HSF1)のノックアウト系統の作製および表現型解析を実施した。まず、ゲノム編集を利用してHSF1ノック

クアウトメダカ系統の作製に成功した。次に、高温処理によるこの系統の表現型を解析したところ、野生型と比較して明らかに生残率が低かった。また、高温による生殖細胞数への影響を調べたところ、孵化時期において、この系統の生殖細胞数は野生型と比較して有意に少ないことが分かった。さらに、次世代シーケンス解析を実施したところ、高温処理による HSF1 ノックアウト XX メダカにおける生殖細胞の増殖抑制は、高温処理による抗ミューラー管ホルモン受容体 2 (AMHR2) の発現上昇とアポトーシスによる生殖腺体細胞数の減少が原因であることが示唆され、HSF1 が生殖腺体細胞を介して生殖細胞の増殖を保護している可能性が示された。

野生下のナイルティラピアとカワスズメ (モザンビークティラピア) の本来的な行動を観察・記録し、水槽飼育下の個体の行動と比較する目的で野外生態調査を行った。生息情報のあった山梨県笛吹市では確認されず、愛知県名古屋市の荒子川では水の濁りのため詳細な観察ができなかった。一方で東京都小笠原村父島の八ツ瀬川では、カワスズメの繁殖行動を含む生態を観察・記録することができた。父島では他に大村川において生息を確認した。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 加賀谷玲夢, 野津了, 岡慎一郎, 中村將, ティラピアの成熟精巣の高水温による不妊化、日本水産学会春季大会, 2017
2. Nozu R, Pandit NP, Grau EG, Nakamura M, Sexual characteristics sterilized tilapia, The 8th International Symposium on Fish Endocrinology, Gethenburg Sweden, 2016
3. Nakamura M, What we know from sex changes in fish? The 22nd International Congress of Zoology, Okinawa Japan 2016
4. Nakamura M, Kagaya R, Nozu R, Oka S, Sterilization of matured testis of tilapia by high temperature. 18th International Congress of Comparative Endocrinology. 2017
5. 野津了, 加賀谷玲夢, 岡慎一郎, 中村將, 高水温処理によるティラピアの不妊化-長期飼育による不妊性への影響、日本動物学会, 2017
6. 飯島啓, 小川智史, 柴田安司, 外 5 名, ニシキゴイの遺伝的雌の生殖腺性分化に及ぼす高温ストレスの影響、日本比較内分泌学会, 2017
7. 飯島啓, 小川智史, 佐藤将, 外 2 名, ニシキゴイの卵巣形成過程に及ぼす高温ストレスの影響、日本水産学会春季大会, 2018
8. 中村將, 魚類の性転換現象から何をすることが出来たか、日本水産学会秋季大会, 2018
9. 加賀谷玲夢, 野津了, 岡慎一郎, 中村將, 高水温飼育した雄のカワスズメの不妊化と性行動について、日本水産学会秋季大会, 2018
10. 北野健, 魚類の性分化におけるエストロゲンの役割、日本水産学会秋季大会, 2018
11. 原誠二, 白石絵史, 北野健, メダカの雄か機構におけるコルチゾル下流因子の検索、日本水産学会春季大会, 2019
12. 北野健, 魚類における環境依存的な性決定に関する研究、日本水産学会春季大会, 2019

〔図書〕(計 3 件)

1. Nakamura M and Kobayashi Y, 2018 Sex determination and control in grouper. In: SEX CONTROL IN AQUACULTURE, p737-750, WILEY Blackwell
2. Kobayashi Y, Nozu R Horiguchi R and Nakamura M, 2018, Variety of sex change in tropical fish (Chapter 16), In: Diversity in Sex Differentiation, Reproductive and Developmental Strategies. p321-347, Springer
3. Kitano T, Endocrine and environmental control of sex differentiation in gonochoristic fish (Chapter 17), In: Diversity in Sex differentiation, reproductive and developmental strategies. p307-320, Springer

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：北野 健

ローマ字氏名：Takeshi Kitano

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院先端科学研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：4033621

研究分担者氏名：野津 了

ローマ字氏名：Ryo Nozu

所属研究機関名：沖縄美ら島財団

部局名：総合研究センター・動物研究室

職名：研究員

研究者番号(8桁)：7077430

研究分担者氏名：加賀谷玲夢

ローマ字氏名：Remu Kagaya

所属研究機関名：帝京科学大学

部局名：生命環境学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：90722132