

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07846

研究課題名(和文)光受容器官としての血嚢体の生理機能解明によるニホンウナギの新規成熟誘起技術の開発

研究課題名(英文)Studies on physiological functions of saccus vasculosus in Japanese eel

研究代表者

香川 浩彦 (Kagawa, Hirohiko)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60169381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニホンウナギにおいて、脳深部にある血嚢体が光受容器官であり、初期成熟に重要な役割を果たすことを明らかにした。血嚢体は青色光に対する光受容体(sws2)や光受容後の情報伝達を担う甲状腺ホルモン転換酵素などの因子(光周性因子)を有し、成熟に伴いこれらの遺伝子の発現量が増加すること、また、外科的手術により血嚢体を除去すると成熟に関連するホルモンの発現量が減少し、卵母細胞の発達が抑制されることが明らかとなった。今後、これらの基礎的知見をもとに、ホルモン注射によってしか成熟しない、ニホンウナギを光などの環境因子より成熟誘導する技術が開発されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シラスウナギの大量種苗生産技術を開発するためには安定的に簡便な方法で受精卵を確保する必要がある。これまで、受精卵を得るためにはホルモン注射により成熟を促進し、人工授精等により受精卵を確保していた。この手法は煩雑で受精卵の質もあまり良くない。本研究では、光や水温などの環境因子により成熟を促進する技術を開発することを目指して、これまで不明であった血嚢体の生理機能を明らかにすることを目的として実験を行い、脳深部にある血嚢体が青色光を受容する光受容器官であり、初期成熟に重要な役割を果たすことを明らかにした。この情報をもとに、環境因子による効率的な種苗生産技術が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The physiological function of Japanese eel saccus vasculosus (SV) has long been unknown. In this study, to clarify the photoperiodic and the physiological roles of SV in the Japanese eel, we examined the presence of rhodopsin family genes and key genes regulating seasonal reproduction in the SV. By means of real time quantitative PCR, we found that photoreceptors, such as short wavelength-sensitive opsin 2 (sws2, blue sensitive) was highly expressed in the SV and increased from summer to winter in male eels reared in the outside pond. Moreover, we found that iodothyronine 5'-deiodinase (dio2), tsh, and gp expressed in the SV and these factors also increased during the process of puberty. We also demonstrated that removal of SV by surgical surgery decreased gene expression of these factors and depressed the development of oocytes. These results indicate that saccus vasculosus has important physiological function of photoreceptor and the sexual maturation in Japanese eel.

研究分野：魚類繁殖生理学分野

キーワード：ニホンウナギ 血嚢体 光受容 成熟制御機構 成熟誘導技術 シラスウナギ 種苗生産

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

1. 研究開始当初の背景

ウナギの養殖生産に必要なシラスウナギの資源量は減少の一途をたどっている。特に、この20年間は極度の不漁により生産量は激減し、資源の回復は見られない。このようなシラスウナギ資源の減少と価格の暴騰は養殖業を圧迫し、ひいては養殖産業と日本の食文化衰退につながる重大な問題である。こうした状況を受けて、環境省や国際自然保護連合などは相次いで絶滅危惧IB類にニホンウナギを掲載し、近い将来に絶滅の危険性があると提言している。今後、種の保存の観点からワシントン条約においてシラスウナギの取引を制限する可能性が高く、ますますシラスウナギの確保が困難になると推察される。

一方、2010年にウナギ完全養殖技術が開発され、シラスウナギが生産できる技術的基盤が形成された。申請者はニホンウナギの受精卵確保のために、ホルモン投与による人為的な成熟制御技術を開発し、この完全養殖技術の開発に貢献した。しかし、未だにシラスウナギの大量種苗生産技術の開発はなされていない。その理由の一つは、人為的なホルモン投与で得られる卵質(受精率やふ化率など)は個体毎に変動する上に、非常に低く、安定供給ができないことにある。申請者らは、これまで、ホルモン投与による人為催熟法について種々の研究を行ったが、ホルモンによる成熟誘起方法では、これ以上の卵質の卵を得ることは難しいと判断した。

本来、魚類は環境因子により成熟が制御されているので、ウナギにおいても成熟に必要な環境を整えれば成熟が進行すると考えられる。しかし、ニホンウナギの複雑な生息域(西マリアナ海嶺南部海域の産卵場への大回遊を含む)から推測される環境因子(水温、水圧、遊泳など)が成熟に与える影響について、これまで国内外で多くの検討がされたが、成熟・産卵を誘起できた例はない。一方、環境因子のうち光は魚類の成熟に重要な影響を及ぼすが、ウナギの成熟に及ぼす日長の影響について、系統立てた基盤研究はなされていない。最近、サクラマスの脳の深部にある血嚢体(saccus vasculosus)が光受容器官であり、光を介した性成熟に重要な働きをしているという注目すべき研究が発表された。さらに最近、光波長が魚類の生理現象に影響するという非常に興味ある結果が報告されている。例えば、冷水性カレイ・マツカワで緑色光が成長を促進することや、サクラマスで白い背景の水槽で飼育すると海水適応能が上昇すること、黒色の背景色でマツカワを飼育すると雌に分化する割合が高くなるなど、魚類の様々な生理現象と光波長は密接な関係にあると言える。しかし、ニホンウナギの血嚢体が光受容器官として、また、成熟制御器官としてどのような生理機能を有しているかについては、研究がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ニホンウナギの血嚢体の生理機能を明らかにするために以下の実験を行った。(1)ニホンウナギの血嚢体に存在する光受容体の種類や光の情報を成熟制御内分泌機構に伝える情報伝達因子(光周性因子)を明らかにする。(2)これらの光受容体および光周性因子と性成熟の関連を明らかにするために、初期成熟やホルモンによる成熟誘導などに伴う光受容体や光周性因子の動態を明らかにする。さらに(3)血嚢体が成熟に関与している直接的な証拠を得るために、血嚢体除去が初期成熟に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ニホンウナギの血嚢体に存在する光受容体と光周性因子の解析

ニホンウナギ脳に存在する光受容タンパク質を次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子探索を行った。得られた遺伝子情報を用いて、血嚢体に特異的に存在する光受容体や光周性因子を明らかにした。

(2)光受容体と光周性因子と性成熟の関連

血嚢体と性成熟の関係を明らかにするために、人為的なホルモン処理により成熟誘導した雌ウナギおよび屋外飼育下した雄ニホンウナギを用いて、血嚢体における青型オプシン(*sws2*)、緑型オプシン(*rh2*)や桿体オプシン(*fwo*)および光周性因子のmRNA量をリアルタイムPCR法を用いて測定した。

(3)血嚢体除去が初期成熟に及ぼす影響の解明

血嚢体が実際に性成熟を制御しているか否かを知るために、未熟雌ニホンウナギを用いて、外科的な手術により血嚢体を除去した。その後、屋外池において初期成熟が起こる8月中旬から11月上旬にかけて自然条件下で飼育し、成熟関連ホルモンの遺伝子や血中ステロイドホルモン量などの測定を行うとともに卵巣の組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1)ニホンウナギの血嚢体に存在する光受容体と光周性因子の解析

次世代シーケンサーを用いたニホンウナギの脳における網羅的解析結果から、ニホンウナギ脳内には17種類の光受容体が存在していることが明らかとなった。17種類の光受容体を分類すると、色の識別に関わる錐体視物質2種類(*sws2*, *rh2*)および明暗の識別に関わる桿体視物質2種類(桿体オプシン *fwo* および *dso*)、眼の錐体細胞や桿体細胞等の視細胞ではなく、脳や松

果体といった非視細胞で発現する非視覚系光受容色素 13 種類で構成されていた。このうち、光受容体 5 種 (*sws2*, *rh2*, *fwo*, *dso* および *opn5*) についてリアルタイム PCR 法を用いて血嚢体における組織発現分布を調べたところ、光受容体のうち、錐体視物質である *sws2* および *rh2* は血嚢体において特異的に非常に高い発現が認められた。桿体視物質 *fwo* および *dso* においては、両方とも眼で特異的に発現していたが、血嚢体を含む他の脳の部位および末梢器官における発現量は、眼の発現量と比較すると極少量であった。*opn5* の血嚢体における発現量は低く、脳下垂体でやや高い発現が認められた。また、光受容体に加え、ニホンウナギの血嚢体において 3 種類の光周性因子 (甲状腺刺激ホルモン: *tsh*、甲状腺刺激ホルモン受容体: *tshr* および 甲状腺ホルモン転換酵素: *dio2*) が存在していることがはじめて明らかになった。これらの実験結果から、ニホンウナギの血嚢体が光受容器官として重要な生理機能を有している可能性が示唆された。

(2) 光受容体と光周性因子と性成熟の関連

ニホンウナギ血嚢体と性成熟の関連を明らかにするために、ホルモン投与により人為的に成熟・産卵させた雌ウナギの血嚢体、脳各部位および眼における、光受容体と光周性因子の発現量を性的に未熟な雌ウナギと比較した。その結果、成熟・産卵した雌ウナギの血嚢体を含む脳内全体で *sws2* が急激に上昇することが示された。一方、眼における発現量には変化は認められなかった。また、*rh2* は血嚢体および眼の両方とも発現量に変化が認められなかった。また、光周性因子 (*tsh*, *tshr* および *dio2*) は、成熟・産卵した個体の血嚢体において、未成熟個体と比較して発現量が上昇した。さらに、雄ウナギの血嚢体における光受容体と光周性因子の発現量の季節変化を調べた。その結果、光受容体では *sws2* が、夏から秋にかけて上昇し、ニホンウナギの初期成熟開始時期であるとされている 10 月に発現量のピークが認められた。一方、*rh2* および *opn5* は年間を通して大きな変化が認められなかった。光周性因子の *tsh*, *tshr* および *dio2* の全てが夏から秋にかけて上昇し、ニホンウナギの初期成熟開始時期であるとされている 10 月に発現量のピークが認められた。これらの結果から光受容体 *sws2* と光周性因子が、雄ニホンウナギの初期成熟時期に同調して上昇することが明らかとなり、血嚢体が性成熟に何らかの生理機能を果たしていることが考えられた。鳥類やほ乳類では、光情報認識後、下垂体隆起葉から甲状腺刺激ホルモン (*tsh*) が分泌され、第三脳室の上皮細胞の甲状腺刺激ホルモン受容体に結合し、甲状腺ホルモン転換酵素 (*dio2*) の発現を誘起する。この *dio2* は甲状腺ホルモン (T4) を局所的に活性型の甲状腺ホルモン (T3) に変換する。T3 は、正中隆起の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンの神経末端とグリア細胞の形態変化をもたらし、GnRH が放出される。GnRH 放出後、下垂体から生殖腺刺激ホルモンが分泌され、生殖腺の発達につながるという仕組みとなっている。従って、本研究の結果を考え合わせると、ニホンウナギでもほ乳類や鳥類と同様このような情報伝達経路が血嚢体に存在している可能性が高い。

(3) 血嚢体除去が初期成熟に及ぼす影響の解明

血嚢体を外科的手術により除去し、血嚢体除去が性成熟関連ホルモンの遺伝子や卵巣の発達に及ぼす影響について調べた。その結果、血嚢体除去個体では、sham (偽手術) 対照群や対照群と比較して、中脳における生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (*mGnRH*, *cGnRH*) および下垂体における生殖腺刺激ホルモン (*fsh*, *lh*, *gp*) 遺伝子が減少していた。また、油球の蓄積に必要なと思われる 11-ケトテストステロンが血嚢体除去群で減少する傾向が見られた。さらに、組織学的観察の結果、血嚢体除去群の卵径は対照群および sham 群と比較して小さく、油球の蓄積が少なかった。これらの結果から、血嚢体除去がニホンウナギの初期成熟を抑制したことが明らかとなり、血嚢体がニホンウナギの初期成熟に重要な器官である可能性が示された。今後は、血嚢体における光受容体や光周性因子がどのような仕組みで視床下部-脳下垂体-生殖腺系内分泌機構を制御しているのかについて、さらには、青色光が性成熟に及ぼす影響について詳細な研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

宗石 瞬、Lim Bongsoo、Sungpyo Hur、内田勝久、香川浩彦 ニホンウナギ血嚢体の光受容器官としての生理機能の解明. 日本水産学会春季大会 2017 年

Shun Muneishi, Lim Bongsoo, Sungpyo Hur, Katsuhisa Uchida and Hirohiko Kagawa
Elucidation of physiological functions of saccus vasculosus as a photoperiodic organ in
Japanese eel (*Anguilla japonica*) The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International
Symposium “ Fisheries Science for Future Generations ” 2017.

Shun Muneishi, Lim Bongsoo, Sungpyo Hur, Katsuhisa Uchida, Hirohiko Kagawa.
Elucidation of physiological functions as a photoreceptor organ of saccus vasculosus in
Japanese eel (*Anguilla japonica*). 1st Joint Symposium on Aquaculture Science between
University of Miyazaki, Japan and National Institute of Fisheries Science, Korea. 2017.

Hirohiko Kagawa Studies on physiology of eel in University of Miyazaki. Workshop on
Establishment of East Asia Conservation network for sustainable fish resources. 2017.

Misa Hamada, Katsuhisa Uchida, Fumiya Furukawa, Yuta Seko, Hirohiko Kagawa Saccus
vasculosus is a photoperiodic sensory and endocrine organ in Japanese eel reproduction
The 8th International Symposium on Fish Endocrinology 2016 , Gothenburg, Sweden.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内田 勝久

ローマ字氏名：UCHIDA, katuhisa

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50360508

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮西 弘

ローマ字氏名：MIYANISHI, hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。