

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14967

研究課題名(和文)ニホンウナギ仔魚における嗅覚特性の解明に基づく嗅覚餌付け技術の開発

研究課題名(英文)Trials of improved feeding techniques for Japanese eel larvae based on its olfaction characteristics

研究代表者

渡邊 壮一 (Watanabe, Soichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20507884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではニホンウナギ仔魚期の嗅覚受容特性を明らかにするとともに、嗅覚刺激により索餌行動を惹起できる可能性について検討を行なった。本研究でニホンウナギ仔魚の嗅覚細胞の応答についてリン酸化ERK免疫組織化学により検出可能となり、仔魚の嗅覚受容特性を検討できるようになった。また微小照明条件下での動画取得系を構築することで天然照度条件と同様の環境での仔魚の行動観察が可能となった。嗅覚刺激による仔魚の積極的な索餌行動の惹起手法については今後も更なる検討を要するが、ニホンウナギ仔魚の飼料開発ならびに生態の解明に資する基礎的解析手法を構築できた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the olfaction characteristics of artificial Japanese eel larvae to assess the possibility of improvement of feeding techniques for eel larvae by stimulating olfactory system. To know the olfaction characteristics of eel larvae, several methods to detect the response of olfactory cells were examined in this study, and whole-mount immunohistochemistry of phosphorylated-ERK can be applicable to detect the chemo-reception of the sensory cells in the olfactory epithelia of eel larvae. Newly-developed video acquisition system with infra-red illumination enables us to assess the feeding activities of eel larva under very low visible light conditions as its natural habitat. Further investigation is needed to assess the contribution of olfaction in the feeding activity of Japanese eel larvae; however, useful techniques for the research on eel larvae were established in this study.

研究分野：水圏生物学

キーワード：種苗生産 飼料 嗅覚

### 1. 研究開始当初の背景

本研究開始時点においてニホンウナギの完全養殖技術は実験室レベルでは成功していた。仔魚養成用飼料には商業レベルまでの規模拡大に向けて多くの問題点を抱えていたが、その状況は現時点においても変わらない。天然環境ではニホンウナギ仔魚は海水中の有機懸濁物(マリンスノー)を利用していることが示唆されているが、その栄養価は人工飼料と比較して低い。しかしニホンウナギ仔魚は天然環境の方が高成長であることが強く示唆されている。つまり天然環境においてニホンウナギ仔魚は積極的に摂餌し、多くの餌料を体内に取り込んでいると考えられた。しかし養殖ニホンウナギ仔魚は少なくとも通常照明条件下では積極的な索餌行動を見せない。索餌行動には嗅覚等の外部化学感覚が重要であることが考えられ、このような感覚は栄養取込における一次スクリーニング、つまり有用物質を取込み、有害成分を排除する上でも重要である。しかしウナギ仔魚において嗅覚がどのような特性を持つか、そもそも養殖仔魚においてこれらの化学感覚が機能的であるかといった基本的な情報ですら、未だ全く不明であった。このような状況下では新規餌料開発は総当たりの戦略に依らざるを得ず、先行きは不透明である。喫緊の課題であるニホンウナギ仔魚用飼料および飼育法の確立には、これまでの戦略に加えて、生物自体が持つ生理学的特性といった基礎的知見を基に技術開発を行うことが有効であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究ではニホンウナギ仔魚を用いて魚類における簡便な嗅覚反応検出系を構築し、ニホンウナギ仔魚の嗅覚特性について検討することを大きな目的とした。また外環境の化合物組成が嗅覚特性に与える後天的影響についても検討を行い、ニホンウナギ仔魚の嗅覚特性改変技術の開発を目指した。さらに行動解析系も構築し、各種物質に対する指向性遊泳も検証し、ニホンウナギ仔魚での積極的索餌行動の誘起技術「嗅覚餌付け」の有効性についても検証することとした。

### 3. 研究の方法

ニホンウナギ仔魚期の嗅覚特性を明らかにするため、まず嗅覚細胞の反応検出系の構築を行なった。神経細胞の活動マーカーである *c-fos* 発現の検出、嗅覚細胞の興奮検出に用いられている実績のあるリン酸化 ERK (pERK) の検出を、それぞれ *in situ* hybridization 法と免疫組織化学によって行なった。これらに加えてカルシウムイメージングによるリアルタイム反応検出系についても検討を行なった。また索餌行動の検討には行動解析が必須となることから、その実験系についても構築した。ウナギ仔魚は透明な魚体を持ち、通常光量下では強い負の走光性を示すことから、微小照明条件下での動画取得系を構築した。上記実験系の検討完了後、嗅覚細胞反応検出系を用いてニホンウナギ初期仔魚における嗅覚特性について検討を行なった。さらにニホンウナギ仔魚の嗅覚特性の後天的変化について、嗅上皮を刺激することが示唆された各種成分を含む環境水中で初期仔魚を飼育した後に当該成分に対する行動を観察することを試行した。

を示すことから、微小照明条件下での動画取得系を構築した。上記実験系の検討完了後、嗅覚細胞反応検出系を用いてニホンウナギ初期仔魚における嗅覚特性について検討を行なった。さらにニホンウナギ仔魚の嗅覚特性の後天的変化について、嗅上皮を刺激することが示唆された各種成分を含む環境水中で初期仔魚を飼育した後に当該成分に対する行動を観察することを試行した。

### 4. 研究成果

#### (1)ニホンウナギ仔魚の嗅覚反応検出系

他生物種での知見を基に、ニホンウナギ仔魚における嗅覚受容細胞の興奮を検出するマーカーとして利用可能な遺伝子およびタンパクとして *c-fos* および pERK を選定し、その検出手法を確立した。まず *c-fos* について蛍光 *in situ* hybridization 法にて最適な検出条件を決定した。他魚種における先行研究より *c-fos* は刺激受容後しばらくして発現レベルが最大化することが知られており、ニホンウナギ仔魚では刺激後 30 分程度が検出に最適であることも併せて示された。単一の検出手法のみでは擬陽性または偽陰性を判断できないことから pERK の免疫組織化学的検出もついて市販抗体を用いて検討を行なった。その結果 pERK についても *c-fos* と同様の染色パターンが得られ、嗅覚細胞の興奮マーカーとして使用可能であることが示唆された。しかし ERK のリン酸化は *c-fos* の発現上昇よりも応答が早く、さらにリン酸化状態を保持するためにザンボニ液を固定液として用いる必要があったことから *c-fos* と pERK の同時的検出は困難であった。検出作業は pERK の方が簡便であることから、本研究では主に pERK を指標として嗅覚細胞の感覚受容について検討した。カルシウムイメージングによるリアルタイム反応検出系についても検討を行なったが、カルシウム蛍光試薬の均一な嗅上皮細胞内への導入が困難であることが示された。

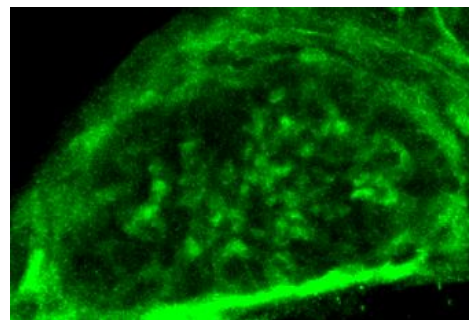


図 1. 30 日齢ニホンウナギ仔魚嗅上皮(仔魚抽出物曝露個体)での pERK 免疫組織化学

#### (2)ニホンウナギ仔魚の行動観察系の確立

前述の通りニホンウナギ仔魚は透明で、通常照明条件下では負の走光性を示すことから、適切な行動観察を行なうためにはまず仔魚の行動観察に適した照度条件と、それに合わせた動画取得システムの構築が求められる。

まず多くの魚類が感知できないと考えられる赤外線(940 nm)に対する仔魚の応答を検討したところ、顕著な走性を示さないことが明らかとなり、撮影用照明として適していることが示された。行動観察用水槽についても試作を行ない、底面に黒色アクリル板を用いた奥行き 3 cm の薄型アクリル水槽が仔魚の行動観察に有効であった。赤外線照明の照射方向を最適化することによって透明な魚体を有するウナギ仔魚でもコントラストの高い映像を取得可能となった。なお動画の取得については解像度も勘案して民生品ビデオカメラの赤外線撮影モードを使用した。また無線による遠隔カメラ操作を行い、観察水槽を設置した暗室内に入室せず長時間の動画取得を行なった。本研究ではここまで構築された赤外線照明によるニホンウナギ仔魚の行動観察系を用いた。

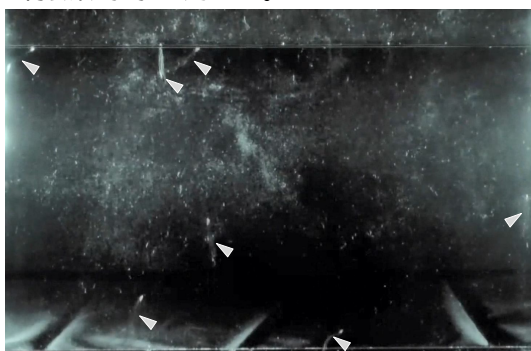


図 2. 可視光暗黒下で見られるニホンウナギ仔魚の鉛直上方遊泳 矢じりが仔魚

まず可視光暗黒下でのニホンウナギ仔魚の行動を観察したところ、上方への遊泳が顕著に誘発された。このことは完全暗黒がニホンウナギ仔魚に対する光条件としては不適であることを示唆しており、わずかながら可視光が存在する条件を構築する必要が生じた。そこで LED 調光装置と減光フィルターを用いた微小照明システムを構築した。これにより天然照度条件と同様の環境での仔魚の行動観察が可能となった。これを用いて行動観察を実施したところ、特定の照明範囲を境に仔魚の鉛直方向の遊泳パターンが変化することが示され、その範囲を仔魚の至おいて仔魚の飼料に対する遊泳行動を観察したところ、現状で用いている飼料に対して指向性を示す遊泳行動は見られなかった。このことから、現に活発に摂餌する飼料であっても、人工種苗はそれを探索する行動をとらないことが明確に示された。

### (3)ウナギ仔魚の嗅覚応答特性と嗅覚餌付け手法の試行

前述の *c-fos* および pERK の検出を用いて嗅上皮の応答細胞の観察を行なった結果、ニホンウナギ仔魚嗅覚はアラニン、プロリン、グリシン等の低分子アミノ酸類に対して比較的低い感受性を示すことが示唆された。また、ニホンウナギ仔魚抽出物を含む環境水に

曝露したところ、嗅上皮に応答したとみられる細胞が確認され、嗅覚により同種を認識するシステムの存在が考えられた。加えてこれまでニホンウナギ仔魚用飼料原料として重要な成分として用いられているアブラツノザメ卵抽出物について検討を行なった結果、嗅上皮に反応を示した細胞が見られ、何らかの応答をサメ卵抽出物が誘起する可能性が示唆された。しかし、現状の飼料に対しては嗅覚と関連するような指向性遊泳を示さないことから、嗅覚情報として受容こそされているものの、索餌行動の誘発には結びついていないことが考えられる。また曝露物質の違いによる嗅上皮での反応細胞の偏在は現在までのところ確認されず、嗅上皮反応とその受容情報の意味付けとの関連については今後更なる検討を要する。

孵化後直ちに嗅覚刺激物質に曝露する嗅覚餌付け手法についての検討をサメ卵抽出物を用いて行なったところ、生物濾過を介さない閉鎖飼育システム条件では仔魚に付着している微生物に起因すると考えられる水質悪化が発生し、これは試料添加によりさらに顕著となり、飼育試験中の生残率が著しく低下した。換水頻度を上げても状況の改善は見られなかった。抗生物質の添加により生残率は改善したが、抗生物質自体が忌避反応を誘発することが示唆された。本手法を詳細に検討するためには嗅覚反応検出系を指標として試料中の活性物質についてあらかじめ単離・精製し、添加量を極力抑える必要があると考えられる。同時に微生物の増殖を限りなく抑えることができる飼育実験システムの構築も必要と考えられる。

### 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 5 件)

Orozco, Z.G.A., Soma, S., Kaneko, T., Watanabe, S. (2018). Spatial mRNA expression and response to fasting and refeeding of neutral amino acid transporters *slc6a18* and *slc6a19a* in the intestinal epithelium of Mozambique tilapia. *Frontiers in Physiology*, 9, 212, doi: 10.3389/fphys.2018.00212. (査読有)

Orozco, Z.G.A., Soma, S., Kaneko, T., Watanabe, S. (2017). Effects of fasting and refeeding on gene expression of *slc15a1a*, a gene encoding an oligopeptide transporter (PepT1), in the intestine of Mozambique tilapia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 203, 76-83. DOI: 10.1016/j.cbpb.2016.09.006 (査読有)

Watanabe, S., Itoh, K., Kaneko, T. (2016) Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: Exploring with an improved gill incubation system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 151-159.

DOI:10.1016/j.ygcen.2016.04.024 (査読有)

Breves, J.P., Inokuchi, M., Yamaguchi, Y., Seale, A.P., Watanabe, S., Hunt, B.L., Lerner, D.T., Kaneko, T., Grau, E.G. (2016) Hormonal regulation of aquaporin 3: opposing actions of prolactin and cortisol in tilapia gill. *J. Endocrinol.* 230, 325-337. DOI: 10.1530/JOE-16-0162 (査読有)

Kuroki, M., Seo, M.Y., Okamura, A., Watanabe, S., Tsukamoto, K., Kaneko, T. (2016) Morphological features of ionocytes in Japanese eel *Anguilla japonica leptocephali* acclimated to half-diluted and full-strength seawater. *Ichthyol. Res.* 63, 487-495. DOI: 10.1007/s10228-016-0520-0 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

畔柳美月・山田祥朗・渡邊壯一．人工ニホンウナギ仔魚の微小照明条件下での遊泳特性 東アジア鰻学会研究発表会，東京，平成 30 年 3 月 31 日．

Ishii, M., Watanabe, S., Furukawa, F., and Kaneko, T. Rise of plasma potassium level directly stimulates branchial K<sup>+</sup> excreting system in freshwater-acclimated Mozambique tilapia. International Symposium "Fisheries Science for Future Generations", Tokyo, Sep. 22-24, 2017.

Orozco, Z.G.A., Soma, S., Kaneko, T., and Watanabe, S. Gene expressions of slc15a1a and b, genes that encode oligopeptide transporters, in the intestine of Mozambique tilapia in relation to nutrient condition. International Symposium "Fisheries Science for Future Generations", Tokyo, Sep. 22-24, 2017.

畔柳美月・倉石 祐・金子豊二・渡邊壯一．レプト期のニホンウナギはどこで味を感じているのか？ 東アジア鰻学会公開シンポジウム，東京，平成 29 年 7 月

22 日．

〔図書〕(計 2 件)

排出と浸透圧調節 (10 章) 渡邊壯一  
【書籍】魚類学，恒星社厚生閣，pp. 99-110, 2017.

魚の呼吸および浸透圧・アンモニア調節のメカニズム (第 1 章-4) 渡邊壯一  
【書籍】循環式陸上養殖-飼育ステージ別国内外の事例にみる最新技術と産業化，緑書房，pp. 41-46, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 壯一 (WATANABE, Soichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20507884