

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19295

研究課題名(和文)30年ぶりの再会 - マイワシの実験資源学への挑戦

研究課題名(英文) Reunion for the first time in 30 years - Challenge for experimental resource biology in sardine

研究代表者

松山 倫也 (MATSUYAMA, Michiya)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00183955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイワシは我が国における水産上の最重要資源の一つであるが、飼育下では産卵しないことから、繁殖特性の詳細や母性効果が不明であった。本研究では、マイワシを対象として、飼育下で産卵しない原因を解明するとともに、再現性の高い産卵誘導技術を開発することを目的とした。本研究により、陸上の小型水槽で飼育したマイワシを用いて、再現性の高い産卵誘導技術を開発することに成功した。飼育環境下のマイワシ雌では最終成熟を促進する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH1)が分泌されないことが生殖障害を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産資源の資源管理において重要な生物情報となる対象種の繁殖特性および母性効果の解明には、全生活史を再現する飼育実験系の開発が必要とされ、特に飼育下で産卵することが成否の鍵となる。本研究ではマイワシを対象として、飼育下で産卵しない原因を生殖生理学的に明らかにするとともに、飼育下で確実に産卵を誘導する技術を開発することに成功した。今後、本研究成果に基づき、マイワシの詳細な繁殖特性や母性効果に関する研究が急速に進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although Japanese sardines are one of the most important fishery resources in Japan, they do not spawn under rearing conditions, so details of reproductive characteristics and maternal effects were unknown. In this study, we aimed to develop a highly reproducible spawning induction technology as well as elucidating the cause of not spawning under rearing conditions in sardines. The present study succeeded in developing a highly reproducible spawning induction technology using sardines reared in a tank on land. In sardine females under rearing conditions, it was revealed that the absence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH1) that promotes final oocyte maturation causes reproductive disorder.

研究分野：水産学

キーワード：マイワシ 生殖生理学 実験資源学 母性効果 環境応答

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

1. 研究開始当初の背景

栄養状態や年齢構成に起因する産卵親魚群の繁殖特性の変化が加入量の増減に重要な役割を果たしていることが、近年、北大西洋の底魚類で報告されており、高年齢魚を保護する母性効果を考慮した資源管理が大きな効果を上げている。対象種の繁殖特性および母性効果の解明には、全生活史を再現する飼育実験系の開発が必要とされ、特に飼育下で産卵することが成否の鍵となる。

多獲性小型浮魚類と呼称されるイワシ、サバ、アジ等は我が国ではTAC(漁獲許容量)制度による資源管理が行われている水産上の最重要資源であるが、飼育下では産卵しないことから、繁殖特性の詳細や母性効果が不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、近年卓越年級群の出現により資源状態が回復し、ほぼ30年ぶりに親魚を入手できるようになったマイワシを対象として、生殖生理・内分泌学的観点から飼育下で産卵しない原因を解明するとともに、飼育下での再現性の高い産卵誘導技術を開発する。

3. 研究の方法

1) 飼育下におけるマイワシの生殖腺のモニター

(独)水産研究教育機構瀬戸内海区水産研究所伯方島支所において、自然日長、自然水温下の10トン陸上水槽で当歳魚(0+)および3歳魚(3+)マイワシを飼育した。毎月、適宜10数尾を取り上げ、生殖腺を摘出し、雌雄を確認した後、生殖腺の発達状態をモニターした。平成29年10月17日に0+および3+魚を対象にして、それぞれ雌雄が10尾になるまで取り上げた。引き続き同一飼育群を対象にして、平成30年4月13日に、同様の採集を行った。この時点での標本の年齢は1+歳および4+歳であった。採集した標本は採血した後、血清を保存した。また脳、脳下垂体、生殖腺をそれぞれmRNAの定量用ならびに組織学的解析用に保存した。

2) マイワシの産卵誘導

平成30年4月14日に、1+および4+歳魚それぞれ20尾(この時点で雌雄不明)を対象にして、麻酔(フェノキシエタノール100ppm)を施した後、背筋部にGnRH α (Des-Gly¹⁰-D(Ala⁶)-LHRH-ethylamide)をカカオバターとともに背筋部に注射投与し(400 μ g/kg/BW)、年齢群別に3トン水槽に収容した。収容後、産出卵のモニターを行うとともに、産卵量、受精率を調べた。

3) 各種生殖関連制御因子の遺伝子クローニングと発現解析

2種 Kisspeptin (Kisspeptin-1, Kisspeptin-2), 3種 GnRH (GnRH1, GnRH2, GnRH3), 2種 GtH (FSH, LH), 2種 Leptin (Leptin-a, Leptin-b) の遺伝子およびそれらの受容体遺伝子を対象にして、遺伝子クローニングを行う。体各部における発現パターンを調べた後、発現量変化を生殖腺の発達段階別に解析する。また、Kisspeptin および Leptin に関しては、その受容体遺伝子を含めたISH法による局在解析を行うとともに、レポーター遺伝子アッセイによる転写活性化能を測定する。

4. 研究成果

1) 飼育下におけるマイワシの生殖腺のモニター

平成29年11月の採取時において、雄は精原細胞~精母細胞期、雌は周辺仁期~卵黄形成初期であった。当初、平成29年度中に2回の採集を予定したが、冬季における海水温の低下等の理由により、生殖腺の発達が遅延したため、2回目の採集は平成30年4月に行った。平成30年4月の標本において、雄では精子形成期~排精期、雌では卵黄形成中期~後期の個体が得られ、前年度の標本もあわせ、雌の卵成熟個体を除き、雌雄ともに、生殖周期を形成するすべての発達段階の個体が得られた。

申請者は、日本のマイワシ漁獲量が最大の450万トンとなった1988年にマイワシの飼育実験を行っており(Matsuyama et al., 1991, Matsuura et al., 1991) 今回の研究は約30年ぶりのもとなる。2+および3+歳魚を対象とした、九州大学附属水産実験所の陸上3トン水槽で行った自然日長、自然水温下の前回の飼育では、飼育下の雄は排精している成熟精巢を有していたが、雌では卵黄形成後期にまで至るものの、卵成熟は起こらなかった。今回の研究で、自然日長、自然水温下の陸上小型(10トン)水槽で周年飼育されたマイワシは1+歳で既に雌雄ともに生殖腺は発達し、雌では卵黄形成が進行するとともに、雄では排精にまで至ることが明らかとなった。しかしながら、前回同様、水槽内では自然産卵が行われず、受精卵が得られなかった。

2) マイワシの産卵誘導

2+歳魚および4+歳魚ともに、GnRH α を投与した2日目の夜に最初の産卵を行い、受精卵が得られた。2+歳魚ではGnRH投与後2日目の20:00~02:00に産出卵約7,000粒(受精率75%)が認められ、その後産卵は起こらなかった。4+歳魚ではGnRH投与後2日目の23:00~05:00に産出卵約12,000粒(受精率92%)が認められ、さらにその翌日の23:00~05:00に約5,000粒(受精率95%)の産出卵が得られたが、その後産卵は認められなかった。本研究における産

卵時刻帯は天然群での報告における産卵時刻帯と一致していた。

GnRHa 投与後 10 日目に親魚を取り上げ、雌雄の判定ならびに雌の産卵への関与を調べた。その結果、2+魚群は雌 7 尾、雄 13 尾から構成されており、卵黄形成後期卵もつ雌は 2 尾で他の 5 尾は未熟な卵巣を有していた。一方、雄は 13 尾中 6 尾が排精した成熟精巣を有していた。4+魚群は雌 5 尾、雄 15 尾から構成されており、すべての雌が卵黄形成後期卵の卵巣を有していた。一方、雄は 15 尾中 10 尾が排精した成熟精巣を有していた。雌親魚の卵巣成熟度ならびに産出卵数から、2+魚では 1 尾の雌が、また 5+魚では 1~3 尾の雌が産卵に関与したものと推定され、産卵回数は 2+魚で 1 回、4+魚で 1~2 回であった。

以上、周年にわたる陸上小型水槽での飼育により、1+歳魚からでも受精卵を採取することが可能であることが明らかとなった。卵巣の発達状況は高年齢群（4+魚）の方がよく、多くの受精卵を得るためには高年齢群を用いたほうが良いことも明らかとなった。また、雄は、排精まで至っており、飼育条件下でも雌と比較して配偶子形成における生殖障害が少ないことが示唆された。

GnRHa 投与により卵成熟とそれに続く産卵が誘導されたことから、飼育下のマイワシ雌では、卵黄形成終了時における GnRH1 の分泌障害に起因した LH の未放出により最終成熟が起こらないことが推察された。魚体への負担を避けるため、今回カニューレによる卵黄形成終了後の雌と排精雄の選別は行わず、そのため産卵に関与したと考えられる雌の尾数が少なかった。今後は、卵黄形成終了後の雌のみを選別することにより、産卵量の増大を図ることが期待される。

マイワシの卵巣の発達様式は非同期発達型で、この様式をもつ魚種は 1 産卵期に複数回産卵すると考えられている。マサバやマアジも非同期発達型の卵巣をもち、実際、飼育下で長期（1~2 ヶ月）にわたり、連日産卵が行われる。しかしながら、今回の実験では、マイワシの産卵はほぼ 1 回であった。したがって、GnRHa 投与により卵成熟と産卵は誘導されるものの、飼育下での産卵が天然群の産卵生態を反映しているものとは考え難い。水槽の規模、水深、親魚群の尾数や性比等、条件を改善することで天然群に近い産卵生態が再現され、本種の繁殖特性が解明されることが望まれる。

何れにしても、マイワシの受精卵を確実に入手する実験手法は整備された。今後は親魚の年齢や栄養条件を変えることにより、それらの仔稚魚がどのような環境応答をし、生残、加入していくかという実験資源学が本格的に展開され、マイワシの資源管理に活用されることが期待される。

3) 各種生殖関連制御因子の遺伝子クローニングと発現解析

本研究における対象遺伝子は、2 種 Kisspeptin (Kisspeptin-1, Kisspeptin-2), 3 種 GnRH (GnRH1, GnRH2, GnRH3), 2 種 GtH (FSH, LH), 2 種 Leptin (Leptin-a, Leptin-b) およびそれらの受容体遺伝子である。これらの中、2 種 Kisspeptin (Kisspeptin-1, Kisspeptin-2), 3 種 GnRH (GnRH1, GnRH2, GnRH3), 2 種 GtH (FSH, LH) および GnRH1 受容体の遺伝子クローニングが終了した。

2 種 Kisspeptin の受容体 (KissR1 および KissR2)、2 種 GtH の受容体 (FSHR および LHR)、Leptin 受容体 (LepR) の遺伝子に関しては部分配列を取得済みであるが、本研究期間内に全配列を決定するに至らなかった。これらの受容体遺伝子の全配列が決定し次第、体各部における発現パターンならびに発現量変化を生殖腺の発達段階別に解析する。また、Kisspeptin および Leptin のレポーター遺伝子アッセイによる転写活性化能を測定する予定である。

飼育下のマイワシ雌では、卵黄形成終了時における GnRH1 の分泌障害に起因した LH の未放出により最終成熟が起こらないことが推察された。しかしながら、マイワシを含むニシン科魚類では各種生殖制御因子の機能に関する情報が極めて乏しく、それらの整備は急務である。本研究期間中に、各種生殖関連制御因子の遺伝子クローニングと発現解析は未完了となったが、引き続き、機能解析に関する研究は行う予定である。なお、申請者は同じニシン目に属すカタクチイワシでも同様の研究を並行して進めている。カタクチイワシは飼育条件下でも自然産卵し、親魚になるまで約 4 ヶ月と短期間で成熟するので、ニシン目魚類の性成熟機構解明のためのモデル種となる。先行するカタクチイワシの各種情報を活用することで、マイワシにおける性成熟機構の研究が加速することが期待される。

< 引用文献 >

Matsuyama M, Adachi S, Nagahama Y, Kitajima C, Matsuura S. Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. Marine Biology 108, 21-29 (1991)

Matsuyama M, Adachi S, Nagahama Y, Kitajima C, Matsuura S. Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. Ichthyological Research 37, 381-390 (1991)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakaguchi K, Yoneda M, Sakai N, Nakashima K, Kitano H, Matsuyama M. Comprehensive Experimental System for a Promising Model Organism Candidate for Marine Teleosts. Scientific Reports 9, (査読有), Article number: 4948 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41468-8>

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 太田 耕平

ローマ字氏名： (OHTA, kohei)

研究協力者氏名： 米田 道夫

ローマ字氏名： (YONEDA, michio)

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。