

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06240

研究課題名(和文)九州山系ヤマメの秋銀化発動機構の解明と光波長による人為銀化誘導技術の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the autumn silvering mechanism of masu salmon in the Kyushu Island and establishment of artificial silvering induction technology using light.

研究代表者

内田 勝久(Uchida, Katsuhisa)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50360508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：九州山系のヤマメは、短日化の進行する秋に銀化し、宮崎県沿岸では冬季限定のサクラマス海面養殖の種苗となる。九州山系ヤマメの銀化率は低く、海水適応能も不完全であり、これらの課題を克服することが海面養殖の効率化の鍵となる。本研究では、九州山系ヤマメの秋銀化現象を生理学的に理解することを目的とした。その結果、秋銀化に伴い、甲状腺の活性化が認められ、その後、初冬に海水適応能を獲得すること、銀化や海水適応能は、春期に退行することが示された。また、春銀化を示す北海道系統のヤマメを九州で飼育することにより、異なる系統ヤマメの銀化発動には日長などの環境要因ではなく、遺伝的要因が寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サケ科魚類の銀化には、下垂体を中枢とした内分泌因子が関連することが、春に銀化する北方系統ヤマメや大西洋サケで知られているが、短日化の進行する秋に銀化する九州山系ヤマメではそれらの知見は乏しい。また、銀化発動時期の異なる系統ヤマメを同一の環境条件で飼育し、銀化変態や海水適応能を比較解析した事例も無い。本研究の成果は、単に、秋銀化に伴う内分泌系の機能発現の理解だけに留まらず、日長や光波長といった環境因子の入力と受容、脳内の光周性因子や内分泌因子の機能発現という一連の生理・内分泌機構として体系的に捉えるための基盤成果になり、将来的には、環境因子を基盤とした人為的な銀化誘導技術の確立にも直結する。

研究成果の概要(英文)： The landlocked masu salmon in Kyushu Island turns slightly silvery, or smolting in autumn. They become seedlings for cherry salmon seawater (SW) aquaculture in the coastal areas of Miyazaki, which is limited to the winter season. However, the smolting ratio is quite low, and their SW adaptability is incomplete. Overcoming these problems is the key to improving the efficiency of SW aquaculture. In the present study, we have physiologically investigated the fall smolting phenomenon of masu salmon in Kyushu Island.

Our results show that activation of the thyroid gland was observed in autumn, and that SW adaptability was acquired in early winter, and silvering and SW adaptability declined in spring. In addition, breeding masu salmon from Hokkaido, which is considered to be spring smolting strains, in Kyushu suggest that genetic factors, rather than environmental factors such as day length, contributed to the initiation of silvering among different strains of masu salmon.

研究分野：魚類生理学

キーワード：銀化 海水適応 ヤマメ サクラマス 海面養殖 甲状腺ホルモン 光周性因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冷水性のサケ科魚類に分類されるヤマメは、北海道や本州北部地域では、大部分の個体が、長日化により春期に銀化変態して海水適応能を獲得し、海へと降りた個体はサクラマスと称される。一方、九州山系のヤマメは、周辺海域を流れる暖流の影響により、そのほとんどは銀化せず、陸封型個体としてその一生を河川で終える。しかし、九州山系ヤマメの一部は、短日化の進行する秋期(=春銀化の半年前)に僅かに銀化変態し、不完全ながらも海水適応能を有している。また、それらの銀化種苗を希釈海水により馴致することで、冬季に海面養殖が可能となり、それにより、温暖な南九州沿岸において、僅か数か月の海面飼育により大型化した“みやざきサクラマス”の生産が可能となっている。

サケ科魚類の銀化変態期には、体表の銀白色化や甲状腺の活性化、海水適応能の獲得などの形態的・生理学的変化が生じ、外洋での回遊生活に向けた準備が整う。ヤマメの銀化の発動と進行やそのホルモンによる制御基盤については、春銀化系統ヤマメにおいて研究知見が集積されているが、秋に銀化する南方系ヤマメにおいては知見が乏しい。また、銀化発動時期の異なる系統ヤマメを同一の環境条件で飼育し、銀化変態や海水適応能を比較解析した事例は無い。

近年、光波長が魚類の生理機能の発現に影響するという、大変興味深い知見が集積されている。例えば、冷水性カレイ・マツカワでは、緑色 LED が視床下部における食欲制御ホルモンの機能発現を介して体成長を促進する。また、短日繁殖性を示すヤマメでは、脳深部にある血嚢体がロドプシンファミリー遺伝子を発現する光受容器官であり、季節性の光センサーである光周性因子 [甲状腺刺激ホルモン β 鎖 (TSH β) や 2 型脱ヨウ素酵素(DIO2)] の機能発現を介して生殖内分泌系が作動し、成熟が進行する。さらに、最近、大西洋サケの脳から光周性因子として新規パラログ分子 (TSH β b や DIO2b) が同定され、それらの因子の発動と春銀化に寄与する内分泌因子の発動には正の相関があることが示されている。従って、サケ科魚類の銀化現象は、単に、銀化に伴う内分泌系の機能発現の理解だけに留まらず、光波長の入力と受容、脳内の光周性因子や内分泌因子の機能発現という一連の生理・内分泌機構として体系的に捉えることが可能な段階に達している。言い換えれば、光波長入力を含めた銀化発動機構の包括的な理解こそが、秋銀化の仕組みや銀化発動時期の地理的差異を生理学的に理解する礎となり、それらの基礎知見は、光波長を基盤とした人為的な銀化誘導技術の確立にも繋がる。

2. 研究の目的

本研究においては、(1)九州山系ヤマメの秋銀化に伴う脳内の光周性因子の動態解析、(2)秋銀化発動の出力指標と想定される内分泌因子群の動態や海水適応能を解析し、春銀化系統(北海道産)ヤマメと比較し、環境因子と銀化の発動・進行の関連性を生理学的に理解することを目的とした。

項目(1)の実験1では、春銀化の発動機構に関する知見を基盤に、九州産ヤマメにおける光周性因子 (TSH β および DIO2) 遺伝子の同定と発現動態を解析し、秋期の銀化変態がどのような生理・内分泌学的基盤により発動するのかを理解することを目的とした。また、実験2では、体色の銀白化が進行する前の個体と、銀白化が進行した個体を比較し、九州産ヤマメの銀化変態に伴う生理学的因子の変動を捉えることを目的とした。項目(2)では、北海道産ならびに九州・五ヶ瀬産ヤマメの飼育試験を、2021年7月から2022年5月まで宮崎県五ヶ瀬町で継続し、実験1として、体表の形態変化ならびに甲状腺組織の動態解析を行うこと、実験2として、秋期と春期における2系統ヤマメの海水適応能の生理学的評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)九州山系ヤマメの秋銀化に伴う脳内の光周性因子の動態解析

実験1. 2019年11月、(株)やまめの里より銀化ヤマメを購入した。購入魚は、自然日長 (NDL=10.5L:13.5D) 下で飼育されている当才魚 (0+, 体長 15.1-20.6 cm, 体重 43.2-89.7 g) であった。光周性因子関連遺伝子の同定に用いるプライマーは、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) から塩基配列情報を検索し、サケ科魚類で同定されている既知の遺伝子情報を元に、Genetyx (Osaka, Japan) を用いて相同性の高い配列を探索し、Primer 3 により標的遺伝子に特異的なプライマーを設計した。次いで、PCR 法による特異的増幅産物のクローニングとシーケンス解析を進め、得られたシーケンスを基に、ヤマメの TSH β および DIO2 の部分塩基配列構造を明らかにした。

実験2. 秋季に銀化する五ヶ瀬産ヤマメを実験魚とし、銀化出現前後の7月 (14L: 10D) と11月 (10.5L: 13.5D) にサンプリングを行った。血清中のインスリン様成長因子 I (IGF-I) および甲状腺ホルモン (T4) 量の測定は、ヤマメの血清測定用に最適化された時間分解蛍光免疫測定法 (Time-Resolved Fluoroimmunoassay; TR-FIA) により測定した。採取した各脳領域の *tsh β a*, *tsh β b*, *dio2a*, *dio2b*、下垂体 *gh* 遺伝子発現量を qPCR 法により測定した。

(2) 地理的分布の異なる2系統ヤマメにおける銀化発動および海水適応能に関する比較研究

実験1. 北海道産ならびに九州・五ヶ瀬産ヤマメを2021年10月より2022年5月まで、五ヶ瀬町の養殖生け簀で飼育した。飼育環境条件は自然日長・水温、給餌条件は飽和給餌とした。毎月のサンプリング時に、両系統ヤマメの写真を撮影し、その外部形態から銀化の進行段階を「パー」「前期スモルト」「中期スモルト」「フルスモルト」の4段階に区分し、評価した(図1)。また、甲状腺を組織学的に解析し、甲状腺濾胞細胞高を指標に、甲状腺機能の活性化を評価した。



図1. 五ヶ瀬産ヤマメの銀化ステージ区分

実験2. 冬期(12月)と春期(5月)に、北海道産ならびに五ヶ瀬産ヤマメを海水に直接移行し、その後の生存率、血漿浸透圧データを得るとともに、魚類の海水適応に必須とされる鰾の酵素遺伝子、*nkaa1b* の発現変動をqPCR法により測定した。

4. 研究成果

(1) 九州山系ヤマメの秋銀化に伴う脳内の光周性因子の動態解析

特異的プライマーを用いたPCR法により、脳組織を用いてヤマメの *tshβ* および *dio2* のパラログと推定される遺伝子配列を単離できた。単離された遺伝子配列を、既知のサケ科魚類のパラログ配列と比較し、各パラログの遺伝子配列の相同性が示された。また、分子系統樹解析の結果から、得られた遺伝子配列が、他のサケ科魚類のパラログと同一のタクサに位置づけられることが示された。以下の実験においては、単離された配列をヤマメの *tshβa*, *tshβb* および *dio2a*, *dio2b* 遺

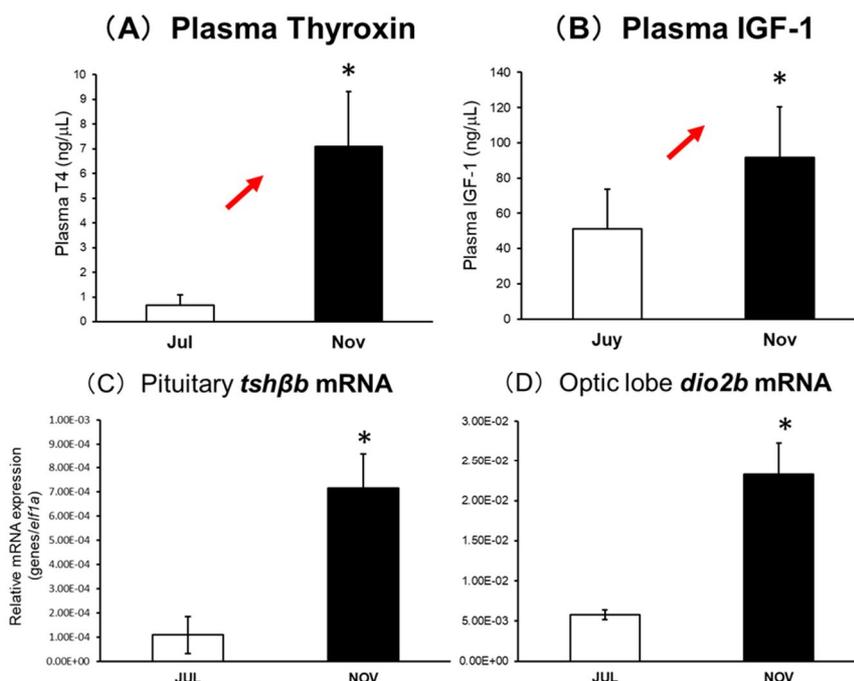


図2. 銀化前(7月)と銀化後(11月)の五ヶ瀬産ヤマメにおける内分泌因子ならびに光周性因子の発現動態

(A), (B) はそれぞれ、血中の甲状腺ホルモン(T4)ならびにインスリン様成長因子I(IGF-I)を、(C), (D)は、下垂体甲状腺刺激ホルモンβ鎖(*tshβb*)、2型脱ヨウ素酵素(DIO2b)の発現量を示している。

伝子として行なった。

銀化出現後（11月）の個体においては、下垂体 *tsh β b* ならびに第三脳室周辺を含む視蓋領域での *dio2b* 発現量が、銀化前（7月）の個体に比べて有意に増加していた（図2）。血中 T4 ならびに IGF-I 量は銀化ヤマメで有意に上昇し（図2）、視蓋での *dio2b* の発現量と正の相関を示した。このことから、九州山系ヤマメにおける銀化変態が11月初旬に起こることが生理・内分泌学的な視点で明らかとなった。また、*tsh β b* と *dio2b* および血中 T4 量の変動にも、それぞれ正の相関が認められたことから、秋銀化を発動するヤマメにおいても、春銀化発動型のタイセイヨウサケと同様の機構により、光周性因子が作動し、銀化に寄与する内分泌系を作動していると推察された。

本実験においては、春と秋という日長変動の全く異なる環境において、秋銀化ヤマメの銀化発動に光周性因子という視点を導入し、内分泌因子と結び付けて解析した初めての事例である。本研究の成果により、銀化変態は、季節性成熟と同様、脳内での甲状腺ホルモンの代謝が重要である可能性も示唆され、サケ科魚類の銀化発動機構の生理・内分泌学研究に、新たな糸口を示すことができた。今後、光周性因子の情報がどのような仕組みで内分泌系に伝達されるのかを示すことが、銀化進行の仕組みを捉えるための突破口になると考える。

（2）地理的分布の異なる2系統ヤマメにおける銀化発動および海水適応能に関する比較研究

北海道産ならびに五ヶ瀬産ヤマメを同一環境で飼育したところ、五ヶ瀬産ヤマメは、秋に銀化を発動する個体の割合が高まり、甲状腺の濾胞上皮細胞高も増加した。また、銀化最盛個体の割合は12月に約60%を示したが、その割合は5月に0%となり、甲状腺の濾胞上皮細胞高も低下した（図3）。

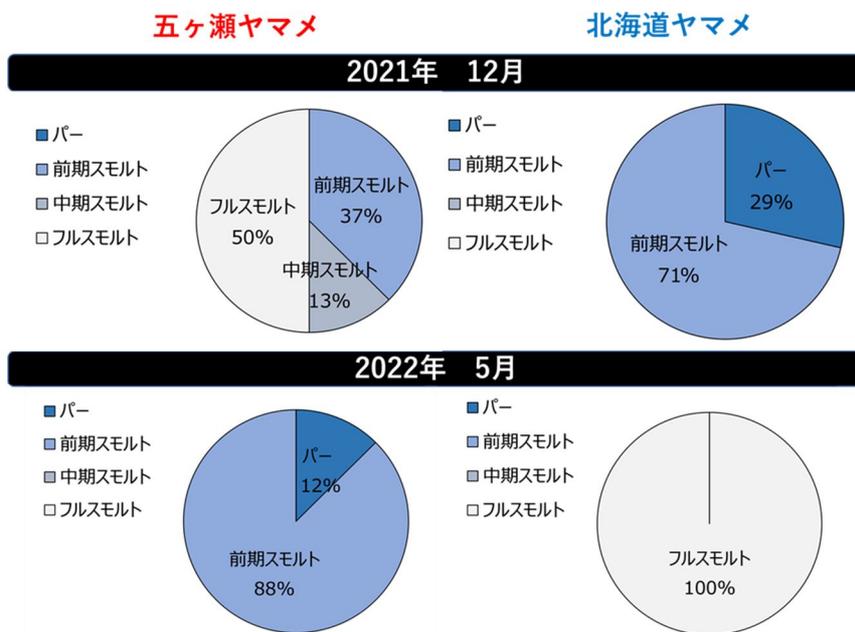


図3 冬期（12月）ならびに春期（5月）における五ヶ瀬産ならびに北海道産ヤマメの銀化ステージ区分の割合

一方、北海道産ヤマメにおいては、秋期に銀化最盛個体は認められず、濾胞上皮細胞高に変化も認められなかった。しかし、春期においては、全ての個体が銀化最盛個体となり（図3）、甲状腺細胞の活性化も認められた。以上の結果は、五ヶ瀬ヤマメは秋に銀化を発動し、銀化最盛個体の割合が高まるが、その後、春にかけて銀化が退行することを示唆している。また、北海道産ヤマメは秋に銀化が進行する個体は認められず、その後、冬期に銀化が徐々に進行し、春に最盛期を迎えることが示された。

冬期（12月）と春期（5月）において、北海道産ならびに五ヶ瀬産ヤマメの海水適応能をそれぞれ評価したところ、12月試験区の五ヶ瀬ヤマメにおいては、海水移行後7日目に約60%の生存率を示した（図4）。

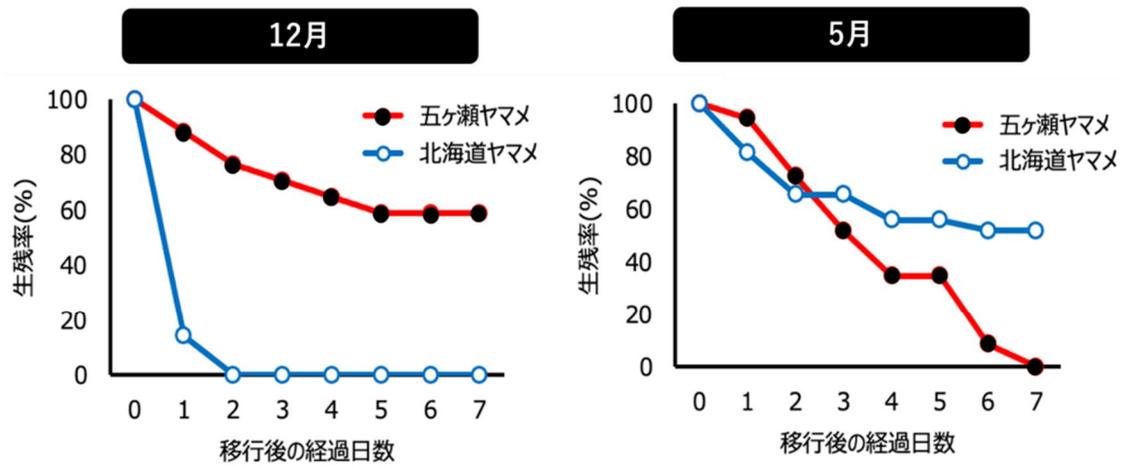


図4 冬期（12月）ならびに春期（5月）における五ヶ瀬産
ならびに北海道産ヤマメの海水適応能の評価
海水移行後7日間の生残率を示している。

また、血漿浸透圧は、移行後1日目に一過的に上昇したが、NK Aα1bの発現上昇に伴い、移行後7日目には海水の約1/3程度に低下し、高い海水適応能を有していることが示された。しかし、五ヶ瀬産ヤマメは5月には海水適応能を示さなかった。一方、北海道産ヤマメは12月に海水適応能を全く示さず、5月の移行試験では、海水中で約半数の個体が生存し、鰓の *nkaα1b* の発現上昇により、海水適応能を獲得していた。

本実験において、五ヶ瀬産ヤマメは秋に銀化を発動し、海水適応能を獲得するが、北海道産ヤマメは春に銀化の最盛期を迎え、海水適応能を獲得することが示された。同一環境条件での飼育試験から、ヤマメの銀化発動は、環境要因よりも遺伝的要因の影響を強く受けていると推察される。また、秋に銀化し、海水適応能を示す九州山系ヤマメは、冬期の低水温期に海面で養殖できる種苗となり、今後、国内のサケマス海水養殖事業において利活用が期待できる種苗であると考えられる。

以上の研究成果により、九州産系ヤマメの秋銀化発動に寄与する光周性因子、銀化の出力としての内分泌因子の動態が明らかとなり、秋銀化現象のしくみの一端を、生理学的な視点から捉えることができた。また、南北に長い日本に分布するヤマメの銀化発動の季節差は、環境要因よりも遺伝的要因の影響を強く受けていることが示唆された。今後、秋銀化を発動する遺伝的要因を捉えられれば、低水温期である冬期に海水適応能を示す種苗を人為的に誘導する技術の開発へと繋がり、これらの技術は、現在、西日本エリアで海面養殖対象魚とされている陸封型ヤマメ、アマゴ、ニジマス等の銀化率の向上や銀化の早期作出に貢献できると考えられる。本研究の成果は、今後、国産海面養殖サケマスの生産性の向上にも寄与できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yasaka Y., Binh P.T., Hayami Y., Tanaka R., Uchida K., Taoka Y. | 4. 巻 89 |
| 2. 論文標題 Identification and characterization of pathogenic bacteria isolated from dead masu salmon <i>Oncorhynchus masou masou</i> and antibacterial activity of probiotic <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain K-C2 against isolated pathogens | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Fisheries Science | 6. 最初と最後の頁 41-51 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-022-01648-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Irachi S, Hall DJ, Fleming MS, Maugars G, Bjornsson BT, Dufour S, Uchida K, McCormick SD. | 4. 巻 519 |
| 2. 論文標題 Photoperiodic regulation of pituitary thyroid-stimulating hormone and brain deiodinase in Atlantic salmon. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Mol. Cell Endocrinol. | 6. 最初と最後の頁 111056 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2020.111056. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 内田勝久 | 4. 巻 325 |
| 2. 論文標題 宮崎県沿岸域における循環型サクラマス養殖体制の確立と地域水産業の活性化 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 調査月報（一般財団法人みやぎん経済研究所） | 6. 最初と最後の頁 2-8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 南 祐人、上野 賢、宮西 弘、内田勝久（宮崎大農） |
| 2. 発表標題 地理的分布の異なる2系統ヤマメにおける銀化発動 および海水適応能に関する比較研究 |
| 3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山徳知夏、上野 賢、 宮西 弘、内田 勝久（宮崎大農） |
| 2. 発表標題 温暖海域に対応した温度耐性ヤマメ種苗の作出に資する基盤研究 |
| 3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 内田勝久 |
| 2. 発表標題 日本最南限海域での循環型サクラマス養殖体制の構築と その陸上養殖事業への導入 |
| 3. 学会等名 第32回「陸上養殖勉強会」セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 内田勝久 |
| 2. 発表標題 宮崎密着型の循環型サクラマス養殖 |
| 3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上野 賢（宮崎大院農工）・鹿島祥平・濱村由樹（宮崎大農）棟方有宗（宮城教育大）・清水宗敬（北大水産）・宮西 弘・内田勝久（宮崎大農） |
| 2. 発表標題 宮崎県産ヤマメの秋銀化発動に伴う 甲状腺機能ならびに海水適応能の変化 |
| 3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|