

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：82708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22596

研究課題名(和文)ニホンウナギ仔魚の成長停滞メカニズムの解明に基づく健苗性指標の確立

研究課題名(英文)Development of the physiological indices based on the mechanism of growth retardation in Japanese eel larvae

研究代表者

金子 信人(Kaneko, Nobuto)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・任期付研究員

研究者番号：50886265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請は、ニホンウナギ仔魚の成長停滞の機序の理解と、それに基づいた成長指標の確立を行った。RNA-Seqにより、初期成長に重要な遺伝子を網羅的に探索した。4日間の絶食により4,133個の遺伝子が増加し5,985個が減少した。そのうち、インスリン様成長因子結合蛋白遺伝子(igfbp-1a)は、体サイズと負の相関を示したことから、成長停滞の指標として有用と考えられた。実際、通常より高水温で飼育した40日齢仔魚は対照に比べ体サイズが小さく、かつ高いigfbp-1a量を示した。このことから本種仔魚においてigfbp-1a量は成長停滞に関連する成長指標として有用と示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、飼育下で起こるニホンウナギ仔魚の成長停滞の原因を生理学的観点から解明することに学術的意義がある。また、メカニズムへの理解に基づいて、飼育魚の成長状態を最大化する適切な飼育条件の探索や、飼育魚の動物福祉の評価を行うための指標を提供することから、商業的、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：This proposal aims to develop growth indices based on the mechanism of growth retardation in Japanese eel larvae. Initially, growth-regulating genes were comprehensively explored using RNA-Seq technique, which revealed 4,133 genes upregulated and 5,985 genes downregulated in larvae after four days of fasting. Among them, insulin-like growth factor binding protein (igfbp)-1a was considered a useful index of growth retardation because relative expressions of igfbp-1a negatively correlated with body size. Furthermore, the usefulness of igfbp-1a as a growth index was examined. Larvae at 40 days post-hatch reared at a higher temperature than normal conditions demonstrated smaller body size and higher relative expressions of igfbp-1a than the control group. These findings suggest that gene expression of igfbp-1a would be a useful index of growth retardation in Japanese eel larvae.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ニホンウナギ 仔魚 成長 インスリン様成長因子 インスリン様成長因子結合蛋白 成長ホルモン
レプトセファルス RNA-Seq

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の安定した種苗量産技術の確立は喫緊の課題である。本種の種苗量産の問題の1つは、仔魚(レプトセファルス)期の成長停滞や生残率の低さである。魚類の成長は、飼育環境や餌などの外的要因に由来する複雑な生理反応の結果として起こる。したがって、ウナギ仔魚の成長の制御機構を理解することは、適切な種苗生産技術を確立する上で重要であると考えられる。そのためには、成長に関連する因子を網羅的かつ統合的に捉える方法と、他魚種で明らかになっている知見を応用する方法を組み合わせることが有効と考えられる。一般に、魚類の成長は成長ホルモン(GH)やインスリン様成長因子(IGF)、IGF結合蛋白(IGFBP)などが重要な役割を果たす。さらに、ウナギ仔魚の体組成の多くはヒアルロン酸で構成されているが、哺乳類においてヒアルロン酸合成に関与するとされるトランスフォーミング増殖因子(TGF)も本種仔魚においては重要な可能性がある。飼育下で起こるニホンウナギ仔魚の成長停滞に関与する因子の特定と制御機構の理解を深化することにより、機序への理解に基づいたウナギ仔魚の健苗性(成長状態やストレス)の指標を確立、ひいては指標を用いた飼育環境条件の評価や改善に展開できると考えられる。しかしながら、本種仔魚の成長制御機構については極めて断片的な知見しかない。

2. 研究の目的

本研究は飼育下のニホンウナギ仔魚に起こる成長停滞の原因解明を目的とし、本種仔魚の成長制御機構への理解深化と、機序に基づいた成長状態やストレスの評価指標の確立ならびに応用を行った。

3. 研究の方法

(1) ニホンウナギの初期成長に重要な遺伝子のスクリーニング

まず、異なる成長、栄養状態をもつウナギ仔魚を作出するため、絶食試験を行った。10Lアクリルポウル水槽に仔魚を400尾ずつ収容し、スラリー状飼料を1日5回各15分、5日間給餌する群(給餌群)および同期間絶食させる群(絶食群)に分けて飼育した。毎日12:30に32匹を無作為に抽出し、実体顕微鏡(OLYMPUS SZH10 attached to DP71; Olympus, Tokyo, Japan)で外部形態を撮影し、ImageJ 1.53a (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて全長(TL)および体高(BD)を測定した。また、仔魚は4尾ずつプールしてRNAlater(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に保存し、Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega, Madison, WI, USA)のプロトコルに従い、total RNAを抽出した。tRNAの一部はTaKaRa PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)のプロトコルに従い、cDNAに逆転写した。

RNA-Seqを用いて、初期成長に関与する遺伝子を網羅的に調べた。上述の絶食試験のサンプルのうち、13日齢給餌群・絶食群および23日齢給餌群・絶食群(4日間の絶食を経験)の仔魚それぞれ3検体ずつを、Illumina HiSeqを用いた150bpのペアエンドシーケンス(BGI Inc., China)に供した。得られたクリーンリードを用いて、Trinityを使用してDe novoアセンブリを行い、またTgiclを使用して転写産物をクラスタリングした。クラスタリングした配列はNT, NR, GO, KOG, KEGG, SwissProt, InterProなどのデータベースを用いてUnigeneにアノテーションした。また、クリーンリードはBowtie2を使用してマッピングし、RSEMを用いて遺伝子発現量を算出した。処理群間の発現変動遺伝子(DEG)はDESeq2 (fold change 2.00, adjusted p-value 0.05)で検出した。

(2) 成長・増殖因子の発現動態モニタリング

他魚種における知見から、成長に重要と考えられるIGFBP-1aとTGF- β 3に着目してクローニングを行った。鋳型となるcDNAは、上述の絶食試験のサンプルのうち、23日齢の給餌群の仔魚から調製した。ニホンウナギIGFBP-1aおよびTGF- β 3の非翻訳領域に特異的に結合するプライマーを設計し、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Bio Inc)のプロトコルに従いPCRを行った。増幅産物を1.5%アガロースゲルによる電気泳動に供し、NucleoSpin GelおよびPCR Clean-up Kit (TaKaRa Bio Inc)をそれぞれ用いて各ターゲット遺伝子のシングルバンドを精製した。PCR産物は、DynaExpress TA PCR cloning kit (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan)を用いてpTAC-2 vectorに挿入し、DynaCompetent Cells JetGiga DH5 (BioDynamics Laboratory Inc.)に形質転換した後、寒天培地(Fast-Media Amp Agar: Invitrogen, Waltham, MA, USA)で37 $^{\circ}$ C 16時間培養した。その後、標的配列が挿入されたコロニーを液体培地で35 $^{\circ}$ C 16時間培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてプラスミドを抽出した。塩基配列は、3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)を用いて解析した(Fasmac Co., Ltd, Kanagawa, Japan)。

給餌開始時から80日齢までのニホンウナギ仔魚を定期的にサンプリングし、成長の季節変化を調べる試験を行った。海水かけ流しかつ1日5回の給餌を行い飼育した仔魚を、7、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80において、32尾ずつランダムに抽出し体サイズ

を測定したのち、4尾ずつプールし RNAlater に保存した。他魚種の知見から、成長に関する可能性の高い、成長ホルモン *gh* およびインスリン様成長因子 *igf-1* および *igf-2* の遺伝子発現量を測定した。遺伝子発現量の測定に際しては、各標的遺伝子のリアルタイム定量 PCR 用プライマーを作成のうえ、TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio Inc.) のプロトコルに従い、LightCycler 96 System (Roche, Basel, Switzerland) を用いて行った。相対発現値の解析のため、内部標準遺伝子として *ribosomal phosphoprotein P0* との相対値を計算するとともに、増幅効率による補正を行った (Pfaffl, 2001)。さらに、前述の絶食試験のサンプルについても、同様に GH と IGF の相対発現量を測定した。

(3) 健苗性指標の検討と展開：飼料や飼育条件の評価

絶食試験のサンプルを用いて、体サイズと GH や IGF、IGFBP-1a や TGF- β 3 などの成長関連遺伝子の発現量との関係を調べ、成長状態 (成長停滞) を反映する指標としての有用性を調べた。

実際に指標を用いて、飼育環境条件の良否を判断できるか調べる試験を実施した。5.7L クライゼル水槽に収容し、6日齢仔魚を350尾ずつ収容し、スラリー状飼料を1日5回各15分給餌した。昼間08:30-18:30は全海水かけ流し、夜間18:30-08:30のみを閉鎖循環にし、夜間水温を通常通りの区 (対照区) と通常より高温の区 (高温区) を設け、各試験区3反復として40日齢まで飼育した。20および40日齢において、体サイズおよび生残率を比較した。また、同日齢に発現解析用の全体サンプルを採取し、*gh*、*igf-1*、*igf-2*、*igfbp-1a* の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR で測定した。

4. 研究成果

(1) 10日齢と20日齢の仔魚を用いて5日間の給餌あるいは絶食を行った結果、体サイズは給餌群で最も高く、絶食群で最も低い値を示した (図1)。

gh の遺伝子発現量はいずれの日齢においても絶食群で高値を示した一方で、*igf-1* と *igf-2* の発現量も *gh* と同様に絶食で増加した。GH に関しては、魚類一般で見られる絶食時の負のフィードバックによる発現量増加と推察されるが、IGFs の発現量については、他魚種ではむしろ絶食で減少する逆の変化がよく知られる。このことは、今回の方法は仔魚の全体をサンプリングしているため IGFs の組織特異的な機能が絶食の影響をマスクしている可能性、あるいは、ウナギ仔魚の長い海洋浮遊生活などといった生物学的特異性に由来する種特異的な成長制御機構を有している可能性が考えられる。今後 IGFs の機能については、さらなる研究が必要である。

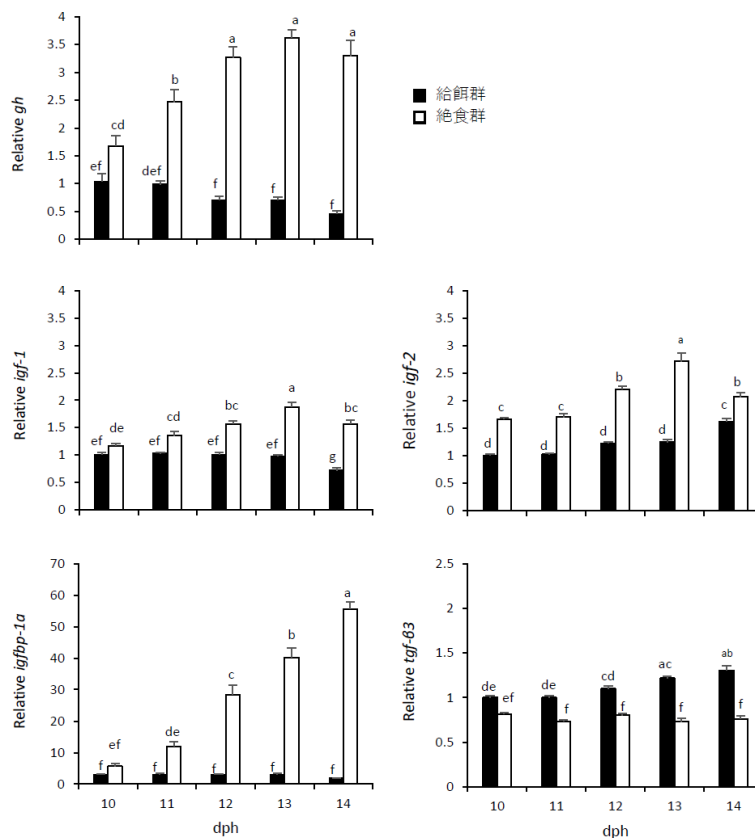


図1. 10-14日齢の仔魚における *gh*、*igf-1*、*igf-2*、*igfbp-1a*、*tgf- β 3* 遺伝子発現量の絶食による変化。数値は平均値 \pm 標準誤差を示す (10日齢給餌群および11日齢絶食群は N=6、10日齢絶食群は N=7、他の群は N=8)。異なる文字は有意差 (Tukey HSD, $P < 0.05$) を示す。

(1) RNA シーケンシングにより、合計約 80.66Gb の塩基が作成でき、全リードをフィルタリングおよびアセンブルした結果、162,267 個の Unigene が得られた。Unigene の全長は 238,437,935bp、平均長は 1,469bp、N50 は 2,824bp、GC 量は 50.07% であった。データベースとのアライメントを行った結果、NR で 96,131 個 (59.24%)、NT で 89,152 個 (54.94%)、Swissprot

で 85,336 個 (52.59%)、KOG で 74,890 個 (46.15%)、KEGG で 86,667 個 (53.41%)、GO で 53,096 個 (32.72%)、InterPro で 67,196 個 (41.41%) がアノテーションされた。13 日齢の給餌群と絶食群における DEG を比較すると、6,076 個の遺伝子がアップレギュレーションされ、8,692 個の遺伝子がダウンレギュレーションされていた。また、23 日齢の給餌群と絶食群の DEG を比較すると、4,133 個の遺伝子がアップレギュレーションされ、5,985 個の遺伝子がダウンレギュレーションされていた。そのうち、IGFBP-1a は両日齢に共通して絶食群で高い発現を示していたことから、ニホンウナギ初期仔魚の成長停滞に重要と考えられた。

(2) - ニホンウナギにおける IGFBP-1a と TGF- β 3 遺伝子に着目してクローニングを行った。IGFBP-1a のクローンからは 264 のアミノ酸からなる 795 塩基のコンセンサス配列を、TGF- β 3 のクローンからは 411 アミノ酸からなる 123 塩基のコンセンサス配列を得た。両者に特異的なプライマーを設計し、絶食試験のサンプルにおけるこれらの遺伝子発現量を測定した結果、*igfbp-1a* 発現量は絶食で最大 55.6 倍の発現量が増加した。*tgf- β 3* 発現量は給餌群で高く、絶食群で低い値を示し、また給餌群では日齢に伴い徐々に増加する変化を示したことから、成長制御に関与すると考えられた。

(2) - 海水かけ流しで飼育したニホンウナギ仔魚の 80 日齢までにおける *gh*、*igf-1*、*igf-2* の遺伝子発現量は、いずれの遺伝子も 7 日齢で最も高く、その後 30 日齢頃にかけて徐々に減少した (図 2)。また、いずれの遺伝子も 12-18 日齢時点で小さなピークを示し、その後再び減少した。この時期に仔魚は内部栄養から外部栄養に切替えると考えられていることから、初回給餌の影響を受けているものと考えられた。*gh* と *igf-1* はその後も 80 日齢まで低値を維持したが、*igf-2* は微増を続けた。このことから、ニホンウナギ仔魚の成長には *igf-2* が重要な役割を有している可能性が考えられた。

(3) - 絶食試験のうち、2 つの異なる実験期間 (10-14 および 20-24 日齢) のデータを用いて体サイズと各遺伝子の発現量の関係を調べた (表 1)。*gh*、*igf-1*、*igf-2*、*igfbp-1a* の発現量は、TL および BD と負の相関を示し、これらは TL よりも BD と強い関係を示す傾向があった。*tgf- β 3* の発現量は、TL および BD と正の相関があった。このことから、これらの遺伝子はいずれもウナギ仔魚の初期成長に関与し、成長を反映する指標として有用であると考えられた。しかしながら、GH は同化ホルモンでありつつも、絶食時においてのみ有意に増加するホルモンである。本研究において GH の遺伝子発現量は体サイズと負の相関を示したが、通常の給餌下と絶食・貧栄養時では体サイズとの関係性が大きく乱れる可能性がある。加えて、絶食時の IGFs の遺伝子発現量については、上記研究成果 (1) - で述べた通り、分析方法の検討や機能解明が必要であるため、指標としての利用には注意が必要である。これらを勘案すると、ニホンウナギの IGFBP-1a の遺伝子発現量が最も有効な成長停滞の指標であると考えられた。

表 1. 10-14 日齢および 20-24 日齢の仔魚における体サイズと成長関連遺伝子の関係

10-14dph	TL	BD	<i>gh</i>	<i>igf-1</i>	<i>igf-2</i>	<i>igfbp-1a</i>	<i>tgf-β3</i>
TL							
BD	0.64						
<i>gh</i>	-0.56	-0.8					
<i>igf-1</i>	-0.51	-0.73	0.91				
<i>igf-2</i>	-0.22	-0.45	0.68	0.61			
<i>igfbp-1a</i>	-0.36	-0.72	0.75	0.63	0.75		
<i>tgf-β3</i>	0.59	0.53	-0.58	-0.48	-0.57	-0.51	

20-24dph	TL	BD	<i>gh</i>	<i>igf-1</i>	<i>igf-2</i>	<i>igfbp-1a</i>	<i>tgf-β3</i>
TL							
BD	0.83						
<i>gh</i>	-0.47	-0.63					
<i>igf-1</i>	-0.26	-0.43	0.86				
<i>igf-2</i>	-0.24	-0.37	0.73	0.77			
<i>igfbp-1a</i>	-0.42	-0.53	0.94	0.81	0.74		
<i>tgf-β3</i>	0.47	0.62	-0.53	-0.25	-0.45	-0.48	

(3) - 水温変動試験の結果、高温区の仔魚は対照区より小さい傾向を示し、水温が高いほど群内のサイズのばらつきが大きくなった。また、飼育水温が生理状態に及ぼす影響を調べたところ、20 および 40 のいずれの日齢においても、成長促進に係ると考えられる *gh* の遺伝子発現量は高温区で高かった一方で、*igf-2* は低値を示した。成長停滞の指標として有用と考えられた *igfbp-1a* の発現量は高温区で高値を示した。このことから、高温ストレスによる体サイズの低下が高い *igfbp-1a* 発現量として表れており、これを指標として用いることにより、飼育条件の良否を判断する一助になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneko Nobuto, Ishikawa Takashi, Nomura Kazuharu	4. 巻 265
2. 論文標題 Effects of the short-term fasting and refeeding on growth-related genes in Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>) larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 110826 ~ 110826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpb.2023.110826	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子信人、石川卓、野村和晴
2. 発表標題 二ホンウナギ仔魚の絶食・再給餌に伴う成長ホルモンとインスリン様成長因子の遺伝子発現変化
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子信人、石川卓、野村和晴
2. 発表標題 二ホンウナギ仔魚における成長ホルモンおよびインスリン様成長因子遺伝子の日内変動
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023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
---------	---------