

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：	14101
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23658178
研究課題名（和文）	ウナギの筋肉の性能が浸透圧ストレスによって変化する分子機構の解明
研究課題名（英文）	Studies on the molecular mechanism of change in muscle properties associated with osmotic stress
研究代表者	
	船原 大輔 (FUNABARA DAISUKE)
	三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号：	00335150

研究成果の概要（和文）：

ウナギを淡水，50%人工海水および100%人工海水で飼育し，普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現比を解析した。その結果，50%人工海水で飼育した場合には，普通筋における速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が抑制された。100%人工海水で飼育した場合には，より速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が抑制され，相対的に遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量が増加することで，普通筋が浸透圧ストレスによって遅筋化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Eels were kept in fresh water, 50% artificial sea water and 100% artificial sea water and then expression levels of fast-type and slow-type myosin heavy chain genes in white and red muscles of the eels were analyzed. The expression of the fast-type myosin heavy chain gene in the white muscle of the eels kept in 50% artificial sea water was suppressed. The expression level of the fast-type myosin heavy chain gene in the white muscle of the eels kept in 100% artificial sea water was decreased, indicating that the white muscle changed to a slow-type muscle by osmotic stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生体高分子化学

科研費の分科・細目：水産学・水産科学

キーワード：生化学，ウナギ，普通筋，血合筋，ミオシン，速筋型ミオシン重鎖，遅筋型ミオシン重鎖，浸透圧ストレス

1. 研究開始当初の背景

ウナギが環境水の塩濃度の変化による浸透圧ストレスによって，普通筋と血合筋ともにスプリント型からマラソン型に変化させることが明らかとなってきた。これはウナギが河川と海洋で遊泳能力を変化させていることを意味している。筋肉の性能はミオシンの性質によって決定されることから，本研究では，ミオシン・アイソフォームの発現パターンを解析することで，浸透圧ストレスによ

る筋肉の性能変化の分子メカニズムを明らかにするとともに，それらの知見をもとにしてウナギの肉質を操作できる新しい養殖技術の開発への可能性を探る。

2. 研究の目的

浸透圧ストレスに応じたウナギ筋肉の性質変化の分子メカニズムは不明である。

筋肉の性能を決定づけているのは，主に収縮タンパク質であるミオシンであるが，ウナ

ギは、浸透圧ストレスを受けるとミオシン・アイソフォームの発現パターンを変化させて筋肉の機能を変化させている可能性が、これまでの研究によって明らかになっている。すなわち、浸透圧ストレスによって筋肉における速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの発現比率が変化し、その結果として、筋肉の性質が変化している可能性が考えられた。

そこで本研究では、ウナギが浸透圧ストレスによって筋肉の機能を変化させる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ウナギの浸透圧ストレス下における長期飼育

川魚問屋で購入したウナギを淡水、50%人工海水、および100%人工海水中で次のように飼育した。すなわち水槽に砂利を2cmほど敷き詰め、水位が水槽の深さの3分の2程度になるように飼育水を入れた。淡水には塩素除去した水道水を使用し、人工海水はその水を用いて調製した。淡水における飼育は、購入後3日間淡水で飼育し研究室の環境に慣れさせた後、新しい淡水を入れた水槽にウナギを移し、それを飼育1日目とした。50%人工海水における飼育は、購入後3日間淡水で飼育し研究室の環境に慣れさせた後、ウナギを50%人工海水に移し、それを飼育1日目とした。100%人工海水における飼育は購入後、3日間淡水で飼育し研究室の環境に慣れさせた後、飼育水を50%人工海水に交換し3日間慣れさせてから、ウナギを100%人工海水に移し飼育1日目とした。なお飼育期間中は水温を25℃で一定にし、1日1回餌を与えた。

(2) ウナギ普通筋および血合筋の採取

一定期間飼育したウナギから筋肉を採取し、普通筋と血合筋に分離した。採取した普通筋と血合筋は重量を測定した。測定後、直ちに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

(3) ミオシン重鎖遺伝子の発現解析

淡水、50%人工海水及び100%人工海水で飼育したウナギから採取した普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現パターンを、TaqManプローブを用いた定量的リアルタイムPCR法により行った。

-80℃で保存しておいた各筋肉から常法により抽出した全RNAを鋳型としてcDNAを合成し、リアルタイムPCRの鋳型とした。

4. 研究成果

(1) ウナギの浸透圧ストレス下における長期飼育

淡水、50%人工海水および100%人工海水で飼育したウナギは次の期間飼育した後、そ

れぞれ筋肉を採取した。

淡水飼育：1日、111日、118日、129日、172日、181日、189日、196日、257日

50%海水飼育：1日、110日、112日、130日、132日、180日、194日、257日

100%海水飼育：1日、106日、108日、136日、171日、182日、185日、190日、245日、247日、254日

(2) 普通筋および血合筋の重量変化

飼育後のウナギから採取した筋肉の普通筋および血合筋の外観は、淡水、50%人工海水および100%人工海水のどの試験区のウナギの普通筋と血合筋にも違いは認められず、浸透圧ストレスによって筋肉の外観は大きく変化しないことが分かった。

次に、採取した普通筋および血合筋を分けて重量を測定し、それらの比率を調べた(表1)。その結果、淡水、50%人工海水および100%人工海水で飼育したウナギにおいて、普通筋および血合筋の占める比率に大きな違いは認められなかった。したがって、浸透圧ストレスによって普通筋の量が増加したり、血合筋の量が増加したりすることはないことが示された。

表 1. 浸透圧ストレス下で飼育したウナギ筋肉における普通筋および血合筋の割合(%)

	淡水	50%海水	100%海水
普通筋平均含量(%)	88.43	87.82	87.57
血合筋平均含量(%)	11.57	12.18	12.43

(3) 浸透圧ストレス下で飼育したウナギ筋肉における速筋型ミオシン重鎖遺伝子及び遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現解析

飼育水の塩分濃度によって、ウナギ普通筋および血合筋におけるミオシン・アイソフォームの発現量がどのように変化するのを解析するために、各試験区ウナギの普通筋および血合筋における速筋型ミオシン重鎖及び遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量を、定量的リアルタイムPCR法で調べた。筋肉性質を評価する指標として、速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量と遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量の比(速筋型/遅筋型)を算出し、その値を採用した。すなわち、値が大きい場合には筋肉は速筋型に、値が小さい場合には遅筋型であると判断した。

<淡水飼育ウナギ>

淡水試験区で飼育したウナギの普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量の比を求めた。第1日目の発現比を基準として各飼育期間の試料と比較したところ、181日飼育の普通筋を除いて、飼育期間が長くなるにしたがい普通

筋と血合筋とともに速筋型/遅筋型の値が大きくなった (Fig. 1). このことから本研究の飼育条件下では、ウナギの筋肉は速筋型になることが明らかとなった.

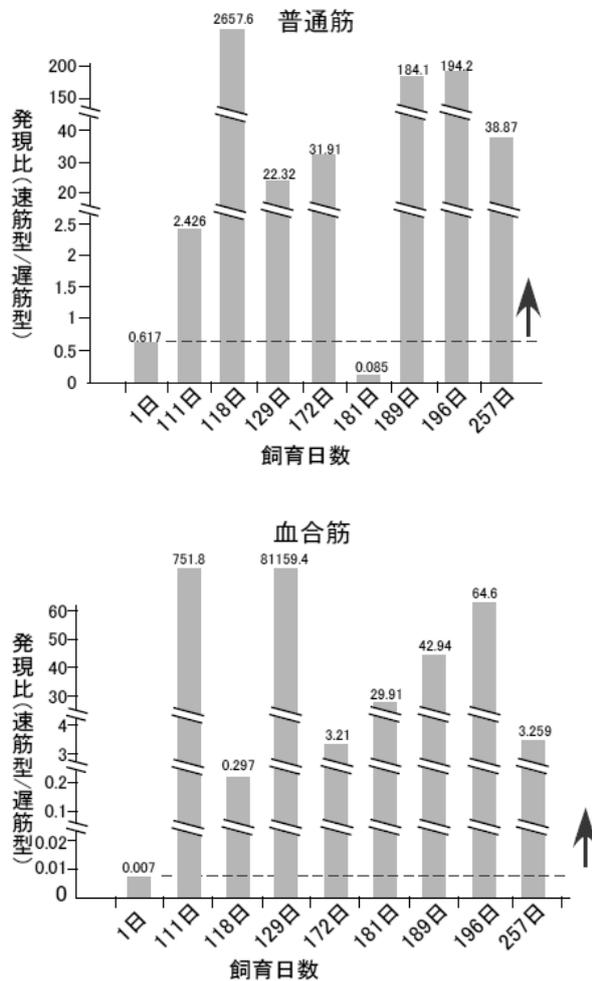
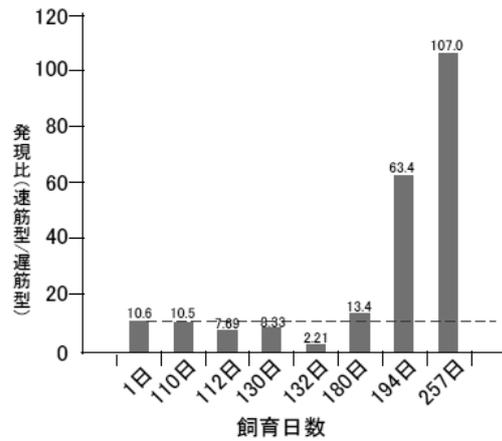


Fig. 1. 淡水飼育したウナギ普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖の発現比. 上, 普通筋; 下, 血合筋.

<50%人工海水飼育ウナギ>

50%人工海水試験区で飼育したウナギの普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量の比を求めた. 第1日目の発現比を基準として各飼育期間の試料と比較したところ, 普通筋において飼育180日目まで速筋型/遅筋型の値がほとんど変化しなかった (Fig. 2). 一方血合筋では, 値が上昇しており, 速筋型の比率が大きくなっていった. 以上の結果から, 50%人工海水飼育によって普通筋における速筋化が抑制されたと考えられた.

普通筋



血合筋

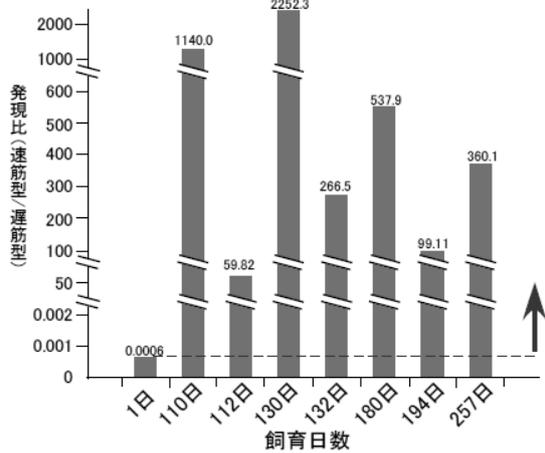


Fig. 2. 50%人工海水飼育したウナギ普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖の発現比. 上, 普通筋; 下, 血合筋.

<100%人工海水飼育ウナギ>

100%人工海水試験区で飼育したウナギの普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量の比を求めた. 第1日目の発現比を基準として各飼育期間の試料と比較したところ, 普通筋において飼育171日目を除いた全ての飼育期間で, 速筋型/遅筋型の値が第1日目の値よりも小さかった (Fig. 3). このことから, 普通筋が遅筋化していることが示唆された. 一方, 血合筋では値が上昇しており, 速筋型の比率が大きくなっていった.

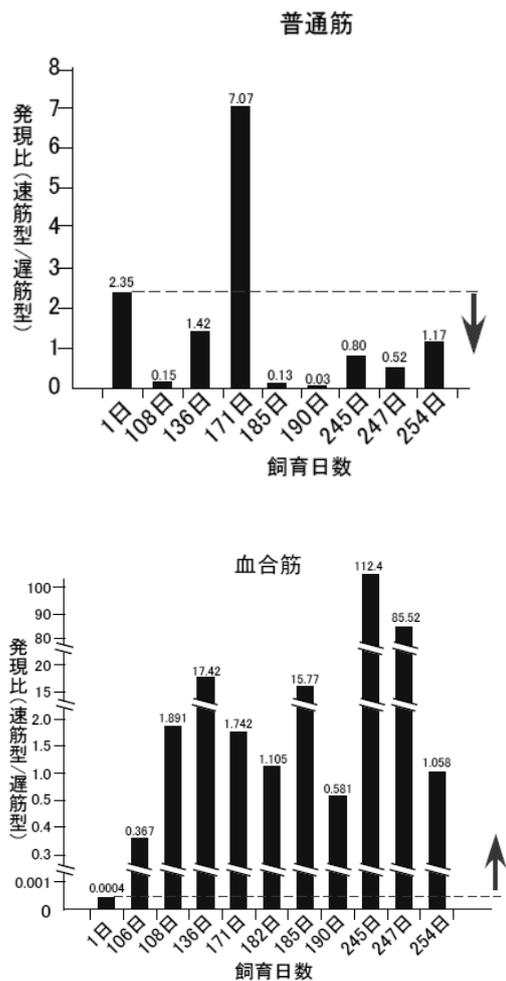


Fig. 3. 100%人工海水飼育したウナギ普通筋および血合筋における速筋型および遅筋型ミオシン重鎖の発現比. 上, 普通筋; 下, 血合筋.

【考察】

本研究によって、ウナギは環境水の塩濃度の変化によって受ける浸透圧ストレスによって、筋肉を質的に変化させていることが示唆された。本研究での飼育条件下では、普通筋および血合筋においては、ともに速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現量が増加することが、淡水飼育試験区によって示された。すなわち普通筋と血合筋がともに速筋化していた。ところが50%人工海水試験区では、普通筋において飼育180日目までは速筋型/遅筋型の値が第1日目と変化なかったことから、速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が抑制された可能性が考えられた。100%人工海水試験区では、普通筋において速筋型/遅筋型の値が第1日目よりも減少したことから、50%人工海水試験区よりも速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が抑制されたと考えられた。この結果は、塩濃度が上昇すると普通筋

において速筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が抑制されることで、相対的に遅筋型ミオシン重鎖遺伝子の発現が増加し、普通筋が遅筋化している可能性を示唆している。

本研究で得られた成果によって、ウナギが産卵回遊のために川から海へ下る際の環境水の塩濃度の変化によって、ウナギは筋肉の性質を遅筋型に変化させていると予想された。遅筋は持続的運動に適していると考えられていることから、長距離の遊泳が必要な産卵回遊のために適した筋肉に変化している可能性が示唆された。

ウナギは水産業上重要な魚種であり、日本では多く消費されている。ほとんどのウナギは淡水で養殖されているが、本研究の成果は、飼育水の塩濃度によってウナギの肉質が変わる可能性があることを示している。

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)

[学会発表] (計1件)

小野田雄基・船原大輔・加納 哲. ウナギの海水馴化とミオシン・アイソフォーム発現量の変化. 平成24年度日本水産学会秋季大会. 平成24年9月15日. 下関.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船原 大輔 (FUNABARA DAISUKE)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号： 00335150