

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450270

研究課題名(和文)ウナギの変態に関する機能形態学的ダイナミクスとその応用

研究課題名(英文) Morphofunctional dynamics of metamorphosis in eel leptocephali and its application for aquaculture

研究代表者

黒木 真理 (KUROKI, Mari)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00568800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウナギの完全養殖技術確立を目指して、仔魚の変態に伴う形態学的・生理学的変化と奇形発症について研究した。その結果、1)人工シラスウナギでは50%以上に天然魚ではほとんどみられない8種類の脊椎骨形態異常が観察された。2)仔魚の体表全体にある塩類細胞でNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、Cl<sup>-</sup>チャネル、1型Na-K-2Cl共輸送体などのイオン輸送タンパクの免疫反応が観察され、これらが仔魚のイオンバランスを保つ役割を担っていると考えられた。3)飼育水槽中の水流が成長と形態異常に及ぼす影響を調べたところ、大きい流速の水槽で飼育された仔魚ほど体サイズが小さく、脊索後湾の形態異常をもつ個体が多いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Morphofunctional dynamics of metamorphosis and occurrence of deformities in reared eel leptocephali were studied to contribute to establishing artificial production techniques of glass eels for eel aquaculture. It was revealed that 1) eight types of vertebral deformity (compression, luxation, fusion, brachyospina, modification, lordosis, kyphosis and scoliosis) that were seldom found in wild glass eels occurred. 2) Ionocytes distributing all over the body surface of leptocephali showed immunoreaction of ion transporters such as NKA, NKCC1 and CFTR, and these transporters appeared to play an important role for keeping the ion balance of the leptocephalus body. 3) Leptocephali reared at the higher water velocities in the circulating rearing tank showed smaller body sizes and higher occurrence of notochord curvature suggesting importance of current condition in the tank.

研究分野：水圏生態学

キーワード：回遊魚 ウナギ レプトセファルス 変態

## 1. 研究開始当初の背景

海洋に生息するレプトセファルス(仔魚)から河口域に接岸するシラスウナギ(稚魚)への移行期にみられるウナギの変態は、形態・生理・生態において大転換を伴う個体発生上極めて重要なイベントである。ウナギ仔魚の外部形態や分布・生態に関する知見は、これまで外洋における産卵場調査の過程で蓄積されてきたが、ウナギの変態過程や変態の引金機構に関する基礎生物学的な知見は大幅に不足している。

一方、養殖用シラス種苗の安定供給を目指して、日本では約50年前から人工種苗生産技術の開発研究が始まった。2003年には実験室内で世界初の人工シラスウナギができ、2010年には第2世代が誕生して人工環境下でウナギの生活環を一回りさせる、いわゆる「完全養殖」に成功した。しかし、飼育下のレプトセファルスの生残率や成長率は依然低く、人工仔魚の成長率は天然魚の1/2程度に留まっている。また、天然では孵化後5ヶ月前後で変態を開始するのに対し、人工魚では最大伸長期全長の55mmを越え、ふ化後2年を経過しても変態しない個体もある。また、この間の斃死や重篤な奇形の発生が大きな問題となっている。この変態過程に生じる様々な技術的問題を解決しなくては、産業ベースの量産技術の確立は望めない。

ウナギは重要な水産資源であるが、資源量は世界規模で激減している。ニホンウナギは資源量が1970年代盛時の10%にまで減少し、2014年には国際自然保護連合により絶滅危惧IB類に指定された。

こうした状況の中で、ウナギの変態現象に関する基礎生物学的な知見を集積し、人工シラスウナギ種苗の量産に向けてその応用を図ることは緊急の研究課題であると同時に、ひいては天然のシラスウナギ資源の保護にもつながる研究として重要である。

## 2. 研究の目的

現行のウナギ人工種苗生産における変態時の奇形多発と変態遅延ならびに変態不斉の問題を解決し、早期・一斉に変態を誘発して健全なシラスウナギの大量生産を実現するためには、レプトセファルス期の栄養・環境条件を改善して成長率を高め、適切な変態の引き金を与えることが必要である。そのためにはまず、変態過程の諸器官・組織の形態と機能の変化について、詳細な観察が必要である。

そこで本研究では、形態学・組織学的手法を用いて、変態過程で起こる体形、骨格の諸変化と奇形発症の状況を詳細に記述する。次に、免疫組織化学と分子生物学的手法により、変態に関与するホルモンの動態と浸透圧調節機構に関する機能的変化を明らかにする。こうして得られた研究成果を現在の人工シラスウナギの生産現場へ応用する方法について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 形態異常の記載：人工飼育魚の変態後、硬骨化が完了したシラスウナギの段階で、Alizarin Redによる硬骨染色およびX線撮影を行い、脊椎骨の形態異常の種類について定義・記載し、各形態異常の発症率、発症部位について調べた。また、天然魚の生物学的情報も比較検討して参考とした。

(2) 甲状腺の機能形態：変態期における甲状腺ホルモンの関与を明らかにするため、ELISA法により2種類の甲状腺ホルモン(チロキシン[T4]、トリヨードチロニン[T3])を個体別に測定した。また甲状腺刺激ホルモンβサブユニット(TSHβ)mRNAの動態を定量PCR法で調べた。さらに抗T4抗体を用いて甲状腺の免疫組織学的観察を行った。

(3) 浸透圧調節機構：魚類の浸透圧調節に関与する塩類細胞について、成魚の鰓塩類細胞とレプトセファルスの体表に分布する塩類細胞を免疫組織化学的手法により比較し、高浸透圧環境(全海水)における塩類排出の役割の違いを検討した。さらに低浸透圧環境(半海水)におけるレプトセファルスの塩類細胞の適応を調べた。

(4) 最適飼育環境の探索：レプトセファルスからシラスウナギまでの一連の発育段階における生残・成長にとって最適な水温、塩分などの環境条件について飼育実験によって調べた。

(5) 水流と形態異常の関係：飼育水槽内の流速と形態異常発症との関連性を明らかにするため、4段階の異なる流速(5.7, 6.7, 7.4, 8.3 cm/sec)をもつ飼育水槽を用いてそれぞれの生残・成長・奇形発症率を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 人工シラスウナギでは、半数以上に天然魚ではほとんどみられない計8種類(圧縮・脱臼・融合・短椎・変形・前湾・後湾・側湾)の脊椎骨の形態異常が観察された。これらの異常は、とくに尾椎に多く発症することが明らかとなった。このような形態異常をもつ個体の一部は遊泳・摂餌能力が低下し、重篤な場合は死亡につながる。今後、形態異常を引き起こす原因と発症のタイミング、症状の時間経過を把握することが重要である。

(2) 変態期とシラスウナギ期には甲状腺濾胞上皮細胞が肥厚し、甲状腺ホルモンの活発な産生・蓄積が示唆された。しかし、体内のT4、T3量はともに変態期には上昇せず、変態後のクロコ期で上昇した。TSHβは変態後のシラスウナギ期に最大値を示し、その後クロコ期に激減した。これより、ウナギの変態において甲状腺ホルモンの関与は小さく、むしろその後のシラスウナギやクロコの接岸・遡上行動に強く関係している可能性が考えられた。

(3) 高浸透圧環境下で人工的にふ化・飼育したレプトセファルスについて、形態学的・免疫組織化学的手法を用いて観察したとこ

ろ、体表全体に分布する塩類細胞において  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase、 $\text{Cl}^-$ チャネル、1型  $\text{Na-K-2Cl}$  共輸送体などのイオン輸送タンパクの免疫反応が観察された。レプトセファルス期には体表に分布する塩類細胞が体内のイオンバランスを保つ役割を担っているが、シラスウナギに変態して鰓が形成されると、その機能は鰓の塩類細胞に集中し、レプトセファルス期に見られた体表塩類細胞は消失することが明らかになった。

(4) レプトセファルスの生残・成長に最適な塩分環境を調べた実験において、半海水馴致魚の体液浸透圧は全海水馴致魚に比べてやや低い値を示したが、いずれも海水の 1/3 程度の値を保っていた。透過型・走査型電子顕微鏡で塩類細胞を観察したところ、全海水馴致魚の塩類細胞は半海水の仔魚に比べて電子密度の高い細胞質と肥大した管状構造、発達したミトコンドリアをもっており、全海水馴致魚ではイオン輸送活動がより活発であることがわかった。したがって、レプトセファルスは体液浸透圧に近い半海水環境下において浸透圧調節に要するエネルギー消費を抑えることができ、その結果人工飼育魚の生残・成長を高めることができるものと考えられた。

(5) 仔魚飼育水槽中の流速の違いが成長と形態異常に及ぼす影響についてふ化後 186 日間にわたって調べたところ、流速の大きい水槽で飼育されたレプトセファルスほど体サイズが小さく、脊索後湾の形態異常を呈する個体が多くなった。また、弱い水流であっても長期にわたる定常的な循環水流は 55% 以上のレプトセファルスに形態異常を引き起こすことがわかった。一方、シラスウナギにおいては水流による形態異常の発症率に有意差は認められなかった。今後、こうした流速の問題だけでなく、飼育水槽の形状、サイズ、注排水法、給餌方法、洗浄方法なども含め、飼育システム全体の設計・改良を総合的に行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kuroki, M., Seo M.Y., Okamura, A., Watanabe, S., Tsukamoto, K., Kaneko, T. (2016) Morphofunctional features of ionocytes in Japanese eel *Anguilla japonica* leptocephali acclimated to half-diluted and full-strength seawater. *Ichthyological Research* 63, 印刷中  
doi:10.1007/s10228-016-0520-0 査読有
- ② Liénart, C., Feunteun, E., Miller, M.J., Aoyama, J., Mortillaro, J.-M., Hubas, C., Kuroki, M., Watanabe, S., Dupuy, C., Carpentier, A., Otake, T., Tsukamoto, K., Meziane, T. (2016) Geographic variation in stable isotopic and fatty acid composition of anguilliform leptocephali and particulate

organic matter in the South Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 544, 225–241.

doi:10.3354/meps1157 査読有

- ③ Seo M.Y., Kuroki, M., Okamura, A., Tsukamoto, K., Watanabe, S., Kaneko, T. (2015) Occurrence of larval and adult types of ion-secreting ionocytes in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Ichthyological Research* 62, 487–494.  
doi:10.1007/s10228-015-0463-x 査読有
- ④ Miller, M.J., Feunteun, E., Aoyama, J., Watanabe, S., Kuroki, M., Lecomte-Finiger, R., Minegishi, Y., Robinet, T., Reveillac, E., Gagnaire, P.-A., Berrebi, P., Tsukamoto, K., Otake, T. (2015) Biodiversity and distribution of leptocephali west of the Mascarene Plateau in the southwestern Indian Ocean. *Progress in Oceanography* 137, 84–102.  
doi:10.1016/j.pocean.2015.05.026 査読有
- ⑤ Feunteun, E., Miller, M.J., Carpentier, A., Aoyama, J., Dupuy, C., Kuroki, M., Pagano, M., Réveillac, E., Robinet, T., Sellos, D., Watanabe, S., Tsukamoto, K., Otake, T. (2015) Stable isotopic composition of anguilliform leptocephali and other food web components from west of the Mascarene Plateau. *Progress in Oceanography* 137, 69–83.  
doi:10.1016/j.pocean.2015.05.024 査読有
- ⑥ Kuroki, M., Miller, M.J., Tsukamoto, K. (2014) Diversity of early life history traits in freshwater eels and the evolution of their oceanic migrations. *Canadian Journal of Zoology* 92, 749–770.  
doi:10.1139/cjz-2013-0303 査読有
- ⑦ Sudo, R., Okamura, A., Kuroki, M., Tsukamoto, K. (2014) Changes in the role of the thyroid axis during metamorphosis of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 321, 356–364.  
doi:10.1002/jez.1861 査読有
- ⑧ Kuroki, M., Righton, D., Walker, A. (2014) The importance of Anguillids: a cultural and historical perspective introducing papers from the World Fisheries Congress. *Ecology of Freshwater Fish* 23, 2–6.  
doi:10.1111/eff.12089 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① Kuroki, M., Marohn, L., Miller M.J., Wysujack, K., Tsukamoto, K., Hanel, R. Early larval growth and hatching time of Atlantic eels in the Sargasso Sea. *39th Annual Larval Fish Conference*. Vienna, Austria. July 16, 2015
- ② Kuroki, M. Public education for eel conservation. *Eel Planet International Symposium*. Tokyo, Japan. June 28, 2015

- ③ 竹内 綾, 黒木真理, 岡村明浩, 塚本勝巳  
「ニホンウナギ仔魚の飼育水槽の水流  
が脊椎骨異常の発症に及ぼす影響」 日  
本水産学会春季大会. 東京海洋大学品川  
キャンパス, 東京. 2015年3月30日
- ④ 須藤竜介, 山田祥朗, 黒木真理, 塚本勝  
巳, 坂本 崇「ニホンウナギと *Anguilla  
mossambica* の雑種は仔魚期間が短い」  
平成 27 年度日本水産学会春季大会. 東  
京海洋大学品川キャンパス, 東京. 2015  
年 3 月 30 日
- ⑤ Kuroki, M. Status and trend of the Japanese  
eel resources—ecological research for eel  
conservation. *International symposium on  
conservation, management and trade of  
Anguilla bicolor eel in Indonesia*. Jakarta,  
Indonesia. November 25, 2014
- ⑥ 恩田拓堯, 竹茂愛吾, 三宅陽一, Michael J.  
Miller, 黒木真理, 青山 潤, 木村伸吾「亜  
熱帯循環系におけるウナギ目を中心と  
した魚類稚仔魚の分布特性」 2014 年度  
水産海洋学会. 水産総合研究センター中  
央水産研究所, 神奈川. 2014 年 11 月 16  
日
- ⑦ Kuroki, M., Watanabe, S., Tsukamoto, K.  
Contribution of otolith microchemistry to  
reveal the evolutionary origin of  
catadromous migration in anguilliformes  
fishes: an example of tropical moray eel. *5th  
International Otolith Symposium*. Mallorca,  
Spain. October 24, 2014
- ⑧ 恩田拓堯, 竹茂愛吾, 三宅陽一, Michael J.  
Miller, 黒木真理, 青山 潤, 木村伸吾「北  
赤道海流域における物理・生物学的調査  
研究 (2) -ウナギ目仔魚の分布-」 平成  
26 年度日本水産学会秋季大会. 九州大学  
箱崎キャンパス, 福岡. 2014 年 9 月 20  
日
- ⑨ 竹茂愛吾, 恩田拓堯, 三宅陽一, Michael J.  
Miller, 黒木真理, 青山 潤, 木村伸吾「北  
赤道海流域における物理・生物学的調査  
研究 (3) -ニホンウナギ仔魚の分布-」 平  
成 26 年度日本水産学会秋季大会. 九州  
大学箱崎キャンパス, 福岡. 2014 年 9 月  
20 日
- ⑩ Watanabe, S., Kuroki, M., Miller, M.J.,  
Aoyama, J., Pickering, T., Sasal, P.,  
Tsukamoto, K. Primary biological  
parameters for conservation of tropical eels  
in the South Pacific Ocean. *American  
Fisheries Society 144th annual meeting*.  
Quebec, Canada. August 19, 2014
- ⑪ Feunteun, E., Miller, M.J., Dupuy, C.,  
Aoyama, J., Watanabe, S., Kuroki, M., Acou,  
A., Carpentier, A., Linart, C., Miziane, T.,  
Réveillac, E., Robinet, T., Tsukamoto, K.,  
Otake, T. Feeding ecology of anguilliform  
leptocephali in the Pacific and Indian  
Oceans examined by isotopic and fatty acid  
analyses. *American Fisheries Society 144th  
annual meeting*. Quebec, Canada. August 19,  
2014
- ⑫ 徐 美暎, 黒木真理, 岡村明浩, 塚本勝巳,  
渡邊壯一, 金子豊二「ニホンウナギ仔魚  
の塩類細胞」公開シンポジウム「うなぎ  
の未来Ⅱ—人とうなぎの共存をめざし  
て」 東京大学弥生キャンパス, 東京.  
2014 年 7 月 27 日
- ⑬ Kuroki, M. Cultural aspects of eels in  
Japan—An inseparable, long-standing  
relationship between eels and the Japanese.  
FAO Eel Talks 2014—Eels and Humans: For  
better understanding towards an eternal  
coexistence on earth, *31st Session of the  
FAO Committee on Fisheries*. Rome, Italy.  
June 9, 2014
- ⑭ 徐 美暎, 黒木真理, 岡村明浩, 塚本勝巳,  
渡邊壯一, 金子豊二「ニホンウナギ仔魚  
の塩類細胞に関する機能形態学的特性」  
平成 26 年度日本水産学会春季大会. 北  
海道大学函館キャンパス, 北海道. 2014  
年 3 月 29 日
- ⑮ Kuroki, M., Tsukamoto, K. Larval migration  
of the newly discovered anguillid species  
*Anguilla luzonensis* in the western North  
Pacific. *Symposium on Systematics and  
Diversity of Fishes*. Tokyo, Japan. July 6,  
2013
- ⑯ Kuroki, M., Miller, M.J., Aoyama, J.,  
Watanabe, S., Yoshinaga, T., Tsukamoto, K.  
How was a new anguillid species *Anguilla  
luzonensis* discovered in the western North  
Pacific? *9th Indo-Pacific Fish Conference*.  
Okinawa, Japan. June 25, 2013

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kuroki, M., Oijen, M.J.P., Tsukamoto, K.  
(2013) Eels and the Japanese—an inseparable,  
long-standing relationship. In: Eels and  
Humans (Tsukamoto, K., Kuroki, M. eds.),  
Springer, Japan, pp. 91-108.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
黒木 真理 (KUROKI, Mari)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
助教  
研究者番号 : 0 0 5 6 8 8 0 0