

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660165

研究課題名(和文)ニホンウナギの産卵環境を決める化学的要因の探索

研究課題名(英文)Chemical factors for spawning of Japanese eels

研究代表者

沖野 龍文(Okino, Tatsufumi)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号：30280910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンウナギの産卵海域である西マリアナ海嶺において成分を記憶しているウナギが戻ってくるための頼りにしているとの仮説のもと、におい成分の候補としてアミノ酸を分析した。採水した地点・深度・時間による差が大きい一方で、分担者がこれまで分析してきた日本沿岸海水や河川水に比べて明らかに異なるパターンを示した。その濃度はウナギが感知するのに十分であった。アミノ酸以外の低分子を網羅的に分析したところある程度の特徴が見出された。さらに、実験室における産卵時における海水の化学成分も調べた。

研究成果の概要(英文)：Sea water of West Mariana Ridge which is a spawning area of Japanese eel was analyzed for amino acids and other small molecules. Amino acid compositions and concentrations were different in depth, sampling point and time. However its PCA results showed the amino acid composition of the spawning area was different from Japanese coastal water and river water. In addition, other small molecule compositions showed some characteristics in the spawning area. In the laboratory, sea water was analyzed during spawning experiments.

研究分野：水産化学

キーワード：ウナギ ケミカルシグナル 回遊 産卵

1. 研究開始当初の背景

ニホンウナギ稚魚の漁獲量は年々減少し、資源の枯渇が危惧されている。ウナギの安定供給のためには、小規模では成功している完全養殖を、現在の稚魚からの養殖と同レベルまで大規模に実用化することが必要である。そのためには、産卵から稚魚に至る生態の理解が重要である。長い間謎とされてきたニホンウナギの産卵地域は、塚本らの精力的な研究で明らかにされた(Nat. Commun., 2, 179(2011))。それによると塩分フロントと海山列の交点で新月の時期に産卵することとされているが、塩分フロントを形成するのは水深100メートル程度であり、産卵するために親魚がいる200メートル以深では塩分フロントは形成されていない。さらに、塩分フロントの微妙な変化を親魚が感知できるという生理学的根拠はない。一方、ウナギの嗅覚は非常に鋭く、特にアミノ酸に対して強く反応する。(Chem. Senses, 31, J14(2006))そこで、塩分フロントを形成する海水に含まれる化学物質あるいは親魚から放出される集合フェロモンあるいは性フェロモンなどの物質が産卵環境の形成に寄与していることを仮説として立てた。

2. 研究の目的

ニホンウナギの産卵地域に関する研究は、社会的・学術的に注目を集め、地域の特定という点ではほぼ目的を達成した。新たなステージに種々の課題があるが、産卵環境を決める要因を化学者の立場で検討するというのが、本研究である。産卵環境に特有の化学物質あるいは特有の組成があつて、それをたよりに親魚が集まっている、あるいは親魚から放出される集合フェロモンあるいは性フェロモンなどの物質によって誘引されているという仮説をたて、高感度のアミノ酸分析装置、LC/MS/MSを駆使して、候補物質を絞り込み、産卵環境に特徴的に出現する物質の解明を試みることを目的とした。

具体的には、試料として、実験室水槽から得られる産卵前後の海水と産卵環境の天然海水を分析する。サケの母川回帰において、母川のにおい成分である溶存遊離アミノ酸組成が重要であることが知られている。そこで、すべての試料の遊離アミノ酸組成を調べ、産卵環境に特有の組成あるいは産卵前後の水槽に特有の組成・特有の変化がないか調べて、サケにみられるような遊離アミノ酸の寄与があるのか、ないのかを明らかにする。

アミノ酸以外の成分にも着目してフェロモン物質を探索するために、産卵環境で他の海水より高い濃度で存在していないかどうか明らかにする。あるいは産卵直前の水槽水の成分を精査し、何らかの産卵誘起物質が出現する可能性を検討する。フェロモン物質を同定するために、いわゆるメタボロミクス解析の手法で、精密質量を測定可能なLC/MS/MSを用いて、多成分の差異解析を実

施し、候補物質を検討する。これらによりニホンウナギの産卵に關与する化学物質を明らかにすることを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) ニホンウナギ産卵海域の海水成分分析

2015年と2016年にJAMSTECの海洋調査船「なつしま」で行われた研究航海に乗船した。塩分を調査して産卵海域を推定し、推定された海域でグリッドを設定し、水深1000mまで50~100m間隔でCTDにより採水した。得られた海水はる過後、冷凍して持ち帰った。その後蛍光標識して、超高速液体クロマトグラフィーでアミノ酸組成を分析した。また、低分子成分を網羅的に分析するために、SPEにより脱塩、濃縮した後、LC/MS(LTQ Orbitrap Discovery)により分析した。両分析について、得られた結果をSIEVEを用いて主成分分析を実施した。なお、2017年にはこの研究航海が実施されなかった。2016年は台風の影響で調査時間が十分にとれなかったため、産卵海域の推定精度が低いと考えられる。

(2) フェロモン作用物質の探索

鹿児島県志布志市の国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所志布志庁舎で行われた誘発産卵によるニホンウナギ産卵試験で使用した産卵水槽内の海水を採水した。ホルモン最終投与後から、産卵したと推定される時まで、各実験で採水間隔を決めた。親魚は、実験によって養成魚あるいは天然魚を用いた。産卵のタイミングは、当初流出する海水に卵が含まれることで判断できたが、産卵試験を改善するために卵が水槽から流出しないようにシステムを変更したためその判断が不可能になった。そこで、試行的にビデオカメラにより行動観察しながら、産卵のタイミングに合わせて採水することも試みた。得られた海水については、(1)と同様の分析・解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ニホンウナギ産卵海域の海水成分分析

ニホンウナギの産卵海域である西マリアナ海嶺でのべ20点以上、各地点で10点以上の深度から採水することができた。多くのサンプルで、ニホンウナギの味神経応答試験によるアミノ酸刺激閾値濃度を超える濃度のアミノ酸が検出された。一方で、2014年と2015年を比較するとかなりアミノ酸組成は異なるし、地点による差、深度による差も大きいことがわかった。同じ地点で時間を変えて採水することは1地点でしかできなかったが、かなり組成が異なっていた。ニホンウナギが生まれた場所をにおい成分で記憶しているとして、アミノ酸は候補の一つである。ニホンウナギが感知しえる濃度が、外洋域であっても意外に存在することが確かめられた。現時点の結果で、この組成を記憶してい

るだろうということは、はっきりいうことができない。どのような形で記憶しているかということをとらえるためには実験を重ねる必要がある。つまり、何種類程度のアミノ酸の濃度を記憶しているのか、絶対的な濃度が重要なのか、濃度の比率が重要なのか、比率は関係なく何種類かのアミノ酸の濃度の合計が重要なのか、など多くの可能性が考えられる。このように複数の成分の組み合わせで考える必要があるのであれば、アミノ酸以外の成分にしても同様のことがいえる。しかしながら、本研究以前の予備的データも含めて総合的に検討してみると若干の傾向がみられる。まず、アルギニン、セリン、グリシンの濃度が概ね高いことである。海水中の遊離アミノ酸濃度のデータはあまり蓄積されていないが、分担者の一人である上田が過去に分析した日本沿岸のデータや北海道内の河川のデータなどに比べると明らかに異なることがわかる。また、(2)の鹿児島島の沿岸海水とも全く異なる。さらに、主成分分析してみると、いくつかのクラスターに分かれ、かつ鹿児島島の沿岸海水とも分かれる。広範囲に分析することができれば、傾向が見えてくるのかもしれない。実験的には、産卵海域をピンポイントに確認した上で、その海水を分析することも重要である。また、回遊ルート上の海水組成とそうでないところの比較も重要である。

低分子の分析結果では、現時点で特定の化合物が産卵海域を特徴づけできると結論できないが、複数の候補となるピークはみられた。さらに、主成分分析の結果によると、明らかにいくつかのクラスターを形成している。したがって、クロマトグラフ上は、ピークが一見少なく、濃度が低すぎるようにも思えるが、主成分分析からはある程度水塊の特徴をとらえることに成功している。

(2) フェロモン作用物質の探索

ニホンウナギの産卵時には、海水中の全アミノ酸濃度が上昇することが認められた。個別のアミノ酸濃度をみても、グルタミンとリシンが産卵時に大きく上昇することが認められた。両アミノ酸は、精子や卵を取り囲む精しょうや卵膜内に多く含まれる物質であり、精子や卵由来であると考えられる。養成魚より天然魚が両アミノ酸の濃度上昇が顕著であった。卵質との関係に興味もたれる。現時点でアミノ酸とフェロモン作用の可能性を示すデータは見出されていない。

低分子分析では、現時点でターゲット化合物を絞れず網羅的な分析に依存していることが問題である。そのため、蛍光標識などの高感度の分析法を用いることができず、アミノ酸が1 mL以下の試料で十分なのに比べ、大量の試料を処理している状態である。したがって、時間間隔を短くすることができず、フェロモンの放出時間がわからない状態と合わせて、採水のタイミングを試行錯誤して

いる状態である。その状況を踏まえて実験結果をみる必要がある。産卵時に濃度が高くなる低分子ピークが複数 LC/MS で確認された。現時点で同定には至っておらず、炭素数20~40の推定分子式が得られているのみである。アミノ酸の分析でもみられた傾向であるが、親が養成魚であるか天然魚であるかによって、差があるようである。したがって、得られたデータを平均して解析するのではなく、産卵行動が正常であると考えられる場合に限定して解析したほうがよさそうである。そのための指標としては、試行したビデオカメラによる観察は可能性の高い方法である。また、卵質を指標とすることもできるであろう。

(3) まとめ

産卵海域のにおい成分としてアミノ酸の分析データを蓄積することができた。この濃度はアミノ酸が感知することができる濃度であり、ニホンウナギにとってにおいとして感じることは間違いない。ある程度の特徴とともに、分析した地点・深度・時間による差が大きいことも見出された。ニホンウナギにとってアミノ酸のような一般的な成分を非常に遠いところから感じて集まるとは考えづらいう方で、全体的な濃度とか組成など大雑把な傾向の変化を感じている可能性はある。確かにニホンウナギが産卵した場所の海水を分析する必要と共に、もっと広範囲の海水を分析する必要もある。

低分子成分を網羅的に分析して主成分分析することで大きな傾向をつかめることは確かめられた。一方で、真に重要な化合物をつかまえるためには、まずは魚類のフェロモン活性が知られている化合物およびその類縁体を高活性に分析できる方法を導入して調べることも重要である。本研究期間の3年間が経過して、研究開始当初の背景が大きく変わっているわけではない。国際自然保護連合により絶滅する危険性が高い絶滅危惧種に指定され、資源管理の重要性、生態理解の重要性はますます高まっている。本研究を基礎に新たな方法を導入して展開する必要がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

福井佑梨、丸山奏子、吉岡裕太郎、上田宏、渡辺俊、塚本勝巳、沖野龍文、ニホンウナギ産卵海域西マリアナ海嶺のアミノ酸組成、化学系学協会北海道支部2017年冬季研究発表会、2017年1月18日、北海道大学工学部(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖野 龍文 (OKINO, Tatsufumi)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・
教授
研究者番号：30280910

(2) 研究分担者

上田 宏 (UEDA, Hiroshi)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学セ
ンター・特任教授
研究者番号：00160177

太田 博巳 (OHTA, Hiromi)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：10351579

今泉 均 (IMAIZUMI, Hitoshi)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・
増養殖研究所・主任研究員
研究者番号：70522762

(3) 研究協力者

丸山 奏子 (MARUYAMA, Kanako)

林 将平 (HAYASHI, Shohei)

福井 佑梨 (FUKUI, Yuri)