

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850133

研究課題名(和文) 絶食により誘導されるニホンウナギの変態のトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of Japanese eel during metamorphosis induced by starvation

研究代表者

須藤 竜介 (Sudo, Ryusuke)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・研究員

研究者番号：60722676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：変態機構を理解するため、ウナギ仔魚に絶食処理を施し、変態を誘導させた。変態過程の個体からRNAを抽出し、RNA-seq法によるトランスクリプトーム解析に供した。解析の結果、約3億7千万リードの塩基配列データを得た。各群の発現量を比較したところ、変態過程の中盤で遺伝子が大きく変動しており、特に転写伸長因子、筋原繊維サイズの調節や解糖に関わる遺伝子が変動していることが明らかとなった。また、変態の進行に伴って甲状腺ホルモンレセプターの発現も上昇していた。そこで変態前の個体にチロキシンを曝露したところ変態が誘導された。したがって、ウナギにおいても甲状腺は変態に重要な役割をしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For understanding of metamorphosis of eels, RNA-seq of head and whole body of eel larvae during metamorphosis was performed. Approximately 373 million reads were generated and assembled 320,321 transcripts. The results of comprehensive analysis of RNA-seq data showed that many genes were drastically changed during the early to late metamorphosis stages. From gene ontology analysis, it is revealed that the expression of genes for transcriptional elongation, regulation of myofibril size and glycolytic process was greatly changed. During metamorphosis, expression of thyroid hormone receptors increased, and thus eel larvae were exposed to thyroxine. All larvae exposed to thyroxine were induced metamorphosis. Therefore, thyroid hormone may also play important role for metamorphosis of eels.

研究分野：水圏生物学

キーワード：ニホンウナギ 変態 トランスクリプトーム解析 レプトセファルス 甲状腺ホルモン 絶食

1. 研究開始当初の背景

ウナギ属魚類は柳の葉の形をした仔魚（レプトセファルス）からいわゆるウナギの形をした稚魚（シラス、シラスウナギ）へと劇的な変態をする。レプトセファルスからシラスウナギへの変態は著しい形態変化を伴うだけでなく、プランクトン生活から定着生活へと行動様式も変わる重要な時期である。また、レプトセファルスの変態はアナゴやウツボなどが属するウナギ目魚類に共通する特徴であり、動物学的にも興味深い現象である。しかしながら、現在その知見は著しく不足している。これは、レプトセファルスの変態が海域で起こるため、研究材料の入手や観察が困難なためである。したがって、レプトセファルスの変態の研究をするためには実験室内で人工的に変態をさせる必要がある。ニホンウナギは、実験室レベルでのシラスウナギの生産に成功しており、目下のところウナギ目魚類の中で変態機構を詳細に解析できる唯一の材料となっている。

一方、2010年以降、我が国におけるシラスウナギの不漁が続いており、養鰻業界をはじめとする鰻関連業界にとって大きな問題となっている。こうした中で、養殖用シラスウナギ種苗の安定供給に耐えうる実用的な人工種苗生産技術の開発は喫緊の課題となっている。実用的な人工種苗生産の実現において、飼育コストが掛かるレプトセファルスの期間をいかに短くし、いかに早くシラスウナギへと変態させるかは非常に重要である。レプトセファルスからシラスウナギへの変態に関する生物学的情報は養殖種苗技術の改善の一助となる可能性も秘めている。すなわち、ニホンウナギの変態メカニズムに関する研究は生物学・水産学の両面において新たな研究展開が待たれている。

2. 研究の目的

ウナギ属魚類に見られるレプトセファルス（仔魚）からシラスウナギ（稚魚）への変態は劇的な形態変化を伴う動物学的に興味深い現象である。本研究では人工的に稚魚を作出できる唯一の種であるニホンウナギを用いて、レプトセファル

スの変態の生理学的カスケードの解明を試みる。具体的には、絶食により変態を誘導させ、トランスクリプトーム解析によりその過程の遺伝子発現を網羅的に調べることでニホンウナギの変態機構の総合的な理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 解析サンプルの準備

人為催熟により得られたウナギ受精卵を孵化仔魚から最大伸長期に達するまで飼育した。ウナギ属魚類の変態は絶食が引き金となることが知られている。そこで、最大伸長期のレプトセファルスに絶食処理を行い、変態を誘導させて変態前後のウナギのサンプリングを実施した。なお、ウナギ仔魚の飼育には換水が容易で奇形率が低減できるクライゼル型水槽を用いた。

(2) 変態期のトランスクリプトーム解析

変態期を形態から変態前・変態前期・変態後期・変態後の4期間に分けて（図1）、それぞれを8個体ずつサンプリングした。各個体の頭部と体部から Total RNA を抽出した。各群・各組織 8 個体分をプーリングし、RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を実施した。なお解析には次世代シーケンサー（Illumina HiSeq2000）を用いた。



図1 変態期のニホンウナギ仔魚。
上から変態前、変態前期、変態後期
変態後。

(3) 遺伝子発現データの解析

トランスクリプトーム解析により得られたデータを用いて Trinity による de novo assembly により cDNA カタログ配列を作成した。CLC カタログ配列に対して BlastX およ

び Blast2Go によりアノテーション付与を行った。cDNA カタログ配列に CLC genomic workbench を用いて各リードをマッピングし各群の発現量を比較した後、各種ソフトウェアを用いて Gene Ontology 解析を実施した。

(4) 変態期の甲状腺ホルモンに関する実験
ウナギの変態期の甲状腺ホルモンの動態を調べた。変態期の T4 と T3 の濃度を ELISA 法により測定すると共に、甲状腺刺激ホルモン (TSH) の遺伝子発現を調べた。また、最大伸長期のウナギ仔魚を 1mM-T4 海水に 24 時間曝露させ、その効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 変態期の遺伝子発現

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により約 3 億 7 千万のリードを得ることが出来た。Trinity による de novo assembly によりコンティグ数 438364 の cDNA カタログ配列を作成した。冗長性除去のため CD-Hit-EST により 80%配列同一性でクラスターリングし、コンティグ数を 320321 まで減らした後、BlastX および Blast2Go によりアノテーションを付与した。上記の配列を用いて CLC Genomic Workbench により各リードを Mapping し、各群の発現を比較した。その結果、体部の各遺伝子発現の発現量の相関は変態前 vs 変態前期で $r=0.96$ 、変態前期 vs 変態後期で $r=0.79$ 、変態後期 vs 変態後で $r=0.95$ であり、変態前期と変態後期で大きく発現が変化することが明らかとなった (図 2)。また甲状腺ホルモン関連の遺伝子に関してその発現動態を見たところ、甲状腺ホルモンレセプターは変態の進行に伴い発現量が上昇することが明らかとなった。

また変態前と変態前期の遺伝子発現に着目して解析したところ、頭部では 65 コンティグ、体部では 131 コンティグの発現変動遺伝子 (FDR corrected) が見つかった。さらに Gene Ontology 解析により、体部における発現変動遺伝子は Biological Process の側面からは翻訳伸長・筋繊維の調節・解糖に関わる遺伝子が大きく変化していることが明らかとなった (図 3)。

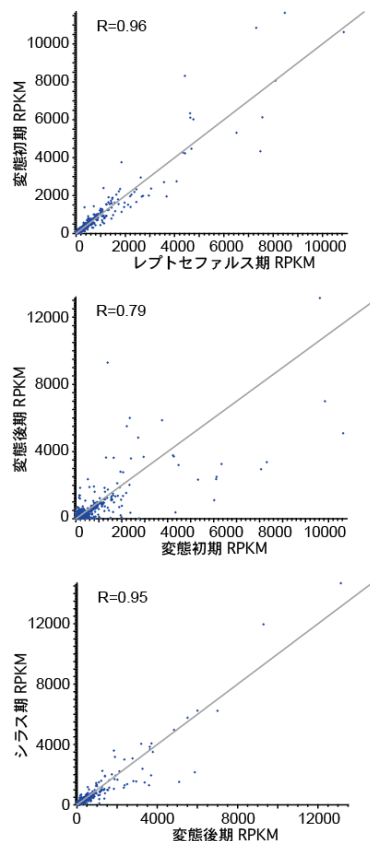


図 2 変態期の各段階間の発現遺伝子の比較

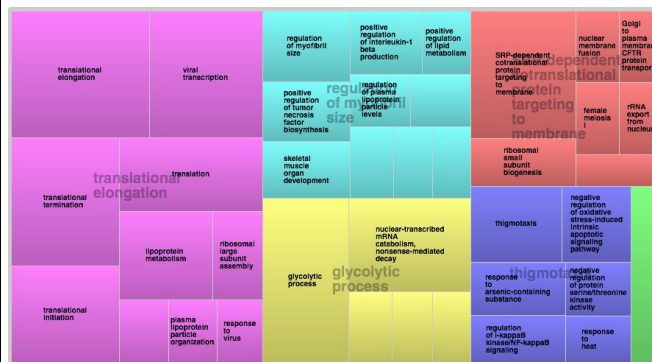


図 3 変態期初期に上昇した遺伝子の Gene Ontology 解析の結果。REVIGO により可視化した。

(3) 甲状腺関連因子の解析

魚類の変態に関与する甲状腺ホルモン (T4 および T3) を調べたところ、変態前また変態中に大きな変動は T4 と T3 のどちらにも認められなかったが、クロコになると上昇する傾向が明らかとなった (図 4)。甲状腺刺激ホルモン (TSH β) についても mRNA の発現動態を調べたところ、TSH β の発現量は変態後に高まることが明らかとなった。さらに、最大伸長期の仔魚を T4-100nM 海水に 24 時間曝露さ

せたところ、曝露した 17 尾全てで変態が誘導されたこと確認した。一方で、対照群では試験期間中に変態が開始された個体は 40% 以下であった。従って、ニホンウナギにおいても甲状腺は変態に重要な役割を示していることが示唆された。

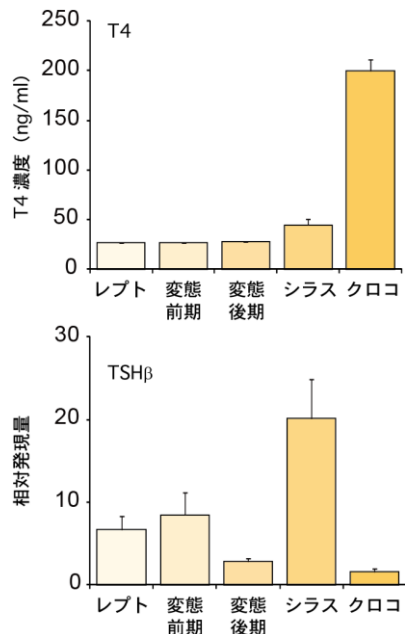


図 4 変態前後の T4 および TSHβ の動態

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 4 件)

Sudo R, Okamura, Fukuda N, Miller MJ, Tsukamoto K. 2017. Environmental factors affecting of spawning migrations of the Japanese eels (*Anguilla japonica*) in Mikawa Bay Japan. *Environmental Biology of Fishes* 査読有り 100:237-249
DOI 10.1007/s10641-017-0575-4

Sudo R, Tsukamoto K. 2015. Migratory restlessness and the role of androgen for increasing behavioral drive in the spawning migration of the Japanese eel. *Scientific Reports*. 査読有り 5:17430 2015
DOI: 10.1038/srep17430

Sudo R, Okamura A, Tsukamoto K. 2015. Profiles of thyroid hormones and mRNA expression for thyroid stimulating hormone in Japanese eel downstream migration. *Coastal Marine Science*. 査読有り 38 (1): 1-7 2015
<http://hdl.handle.net/2261/57163>

Sudo R, Okamura A, Kuroki M, Tsukamoto K. 2014. Changes in the role of the thyroid axis during the metamorphosis of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Zoology Part A*. 査読有り 321:357-364
DOI 10.1002/jez.1862

[学会発表] (計 10 件)

須藤竜介, 風藤行紀, 尾崎雄一, 野村和晴, 田中秀樹. ニホンウナギとバイカラ種との種間交雑. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. ポスター発表. 東京海洋大学, 2017 年 3 月

高崎竜太郎, 須藤竜介, 野村和晴, 田中秀樹, 望岡典隆. ニホンウナギの仔魚から稚魚への変態過程における消化関連器官の組織学的解析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 口頭発表. 東京海洋大学, 2017 年 3 月

高崎竜太郎, 須藤竜介, 野村和晴, 田中秀樹, 望岡典隆. 飼育環境下ニホンウナギ仔魚の変態期におけるステージ分け. ポスター発表. 第 28 回 日本魚類生態研究会 長崎, 2017 年 2 月

Miyao M, Uchino T, Sudo R, Yamada Y, Sakamoto T. QTL analysis for the period of metamorphosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*) using genotyping-by-sequencing (GBS). Poster. Symposium "Eel Planet". Kanagawa, Japan. Nov 2016

Takasaki R, Sudo R, Tanaka H, Nomura K, Mochioka N. Histological observation of digestive organs of Japanese eel during metamorphosis. Poster. Symposium "Eel Planet". Kanagawa, Japan. Nov 2016

宮尾萌莉, 内野翼, 須藤竜介, 山田祥朗, 坂本崇. GBS 法によるニホンウナギの変態期に関する QTL 解析 日本動物遺伝育種学会第 15 回大会. ポスター発表. 名古屋大学, 2016 年 11 月

Sudo R, Nomura K, Tanaka H. Artificial seedlings production of the Japanese eel. Oral. Symposium "Towards reproduction of eel in captivity to support sustainable aquaculture". Wageningen, the Netherlands. 20 Oct 2016

須藤竜介, 風藤行紀, 野村和晴, 田中秀樹. 組換えウナギ成長ホルモンの経口投与がニホンウナギ仔魚の成長に及ぼす影響. 平成 27 年度日本水産学会春季大会. 口頭発表. 東京海洋大学, 2016 年 3 月

Nomura K, Fujiwara A, Kai W, Ozaki A, Iwasaki Y, Nakamura Y, Nishiki I, Ojima N, Yasuike M, Sudo R, Tanaka H. Mapping of quantitative trait loci (QTL) associated with timing of metamorphosis from leptocephali to glass eels in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Poster. Plant & Animal Genome Conference XXIV. San Diego, CA, U.S.A. 08-13 Jan 2016

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 26 年度日本水産学会春季大会. 口頭発表. 東京海洋大学, 2015 年 3 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 竜介 （ SUDO, Ryusuke ）
国立研究開発法人 水産研究・教育機構・
増養殖研究所・研究員
研究者番号：60722676

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()