

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380115

研究課題名（和文） 光があやつる魚類脳ホルモン

研究課題名（英文） Relationship between photic environment and neuropeptides in fish

研究代表者

高橋 明義（TAKAHASHI AKIYOSHI）

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：10183849

研究成果の概要（和文）：環境光下での飼育に比べて、カレイ目マツカワの成長は緑色光照射下においてすぐれ、赤色光照射下において劣る。緑色光が成長を促進し、赤色光が抑制することが示唆される。光環境の変化に应答する代表的なホルモンは視床下部・脳下垂体系で産生されるメラニン凝集ホルモンと黒色素胞刺激ホルモンである。これらは食欲調節作用も有する。光環境と魚類の成長や食欲との関連解明の道具として、これらホルモンの受容体をクローニングし、その局在を示した。

研究成果の概要（英文）：The growth of flounders was faster under green-light illumination and slower under red-light illumination than that of fish reared under environmental light conditions. Thus, these results suggest that green light stimulates growth, whereas red light inhibits growth of the fish. Melanin-concentrating hormone and melanocyte-stimulating hormone are neuropeptides of the hypothalamo-pituitary axis. Further, these neuropeptides are associated with regulation of food intake. Molecular cloning of the receptors for these neuropeptides was performed in order to accumulate molecular tools for investigating the relationships between photic environment and fish physiology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：細目：水産学・水産学一般

キーワード：マツカワ、キンギョ、黒色素胞刺激ホルモン、メラニン凝集ホルモン、特定波長光、発光ダイオード、黒色素胞刺激ホルモン受容体、メラニン凝集ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) カレイ目マツカワが示した光と魚類脳ホルモンの関係

魚類の体色は背景色(棲息環境や水槽などの色)に応じて変化する。これには脳、および脳の指令によって脳下垂体から分泌されるホルモンが深く関与している。しかし、申

請者らはこれまでの一連の研究により、背景色が魚類の摂餌行動にも影響を及ぼすことを発見した。すなわち、白背景で飼育したカレイ目マツカワの体色は明るい。しかも、黒背景飼育魚に比べて遊泳行動量が多く、摂餌頻度は高く、成長も早い。これは、背景色が食欲に関わるマツカワの脳機能に影響を及

ばすことを示唆するものであり、魚類の生理学と生産に関わる重要な現象である。

魚類では一般に、白背景において体色を明るくするメラニン凝集ホルモン（MCH）の脳での産生量が増加する。このとき、体色を暗くする黒色素胞刺激ホルモン（MSH）の脳下垂体での産生量は減少する。一方、哺乳類にも MCH と MSH が存在するが、これらの主たる機能は体色調節ではなく、食欲調節である。すなわち、MCH は食欲を増進し、MSH は逆に抑制する。白背景色下のマツカワでは MCH 産生が高く、MSH 産生が低いことから、これらのホルモンはマツカワの食欲に対しても、哺乳類と同様に拮抗する作用を發揮していることが示唆される。この仮説が正しいならば、背景色を適切に整えて MCH と MSH の産生量を制御することによって、魚類の（少なくともマツカワの）品質にとって重要な因子である体色を良好に保ちつつ、しかも成長促進を図ることが可能である。

しかしながら、現時点では MCH と MSH の産生に対する白あるいは黒背景色の効果はよく知られているが、これ以外の色調や光の影響に関しては、マツカワのみならず魚類全体でも断片的な知見しかない。一方で、申請者らは、照度の差異はマツカワの摂餌行動に影響を及ぼさないという知見を得ていた。さらに、各種カラーフィルターを用いる光照射下でマツカワを飼育したところ、特定波長域の光に応じて体色に変化が生じることも認めていた。これらは、ある種の波長の光が MCH と MSH の遺伝子発現や産生・分泌に影響を及ぼし、最終的に体色と食欲に変化が現われるという生体内情報伝達経路の存在を示すものであった。以上に述べた経緯によって、魚類の体色と食欲に関わる脳ホルモンと脳下垂体ホルモンの産生、およびこれらホルモン遺伝子の発現に及ぼす、光の影響を解明することが急務となった。

(2) キンギョが示した光と魚類脳ホルモンの関係の複雑さ

MCH が食欲を増進すると考えられるマツカワは東北・北海道地域における産業上極めて重要な魚種である。しかし、カレイ・ヒラメ類の頭部形態の特徴からホルモンを脳内に投与することは困難である。そこで、申請者らはキンギョを実験魚として、脳内投与によ

り MCH と魚類食欲の関連の解明を試みた。当初は、マツカワにおいて認めていた現象にもとづいて、MCH が食欲を増進するものと予測していた。しかし、MCH の脳内投与により単位時間あたりの摂餌量が減少した。これとは別に、MCH 抗体を脳内に投与したところ、摂餌頻度が増加した。これは MCH の作用が抗体によって打ち消されたためである。このように、キンギョにおいては、MCH は食欲を抑制するホルモンであることが示された。以上の結果は、食欲に対する MCH の作用はマツカワとキンギョでは異なっており、一部の魚種で得られた結果を魚類全体に普遍化できないことを示す。従って、光と MCH が関わる生命現象との関連を解明するためには、少なくとも分類上の目レベルで代表種を選定し、それぞれの魚種における特性を知る必要が生じた。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 光による魚類脳ホルモン制御機構を解明すること、および(2) 得られた知見に基づいて環境への付加を軽減する魚類生産システムの提言を目的とした。そのための主な研究項目は、次のとおりである。体色および食欲調節ホルモン遺伝子の同定、体色および食欲調節ホルモン遺伝子の発現と特定波長光の関連解析、魚類の行動に及ぼす特定波長光の効果、体色および食欲調節ホルモン受容体遺伝子の同定、体色および食欲調節ホルモンのニューロンネットワークと特定波長光の関連、体色および食欲調節ホルモンの末梢での作用と特定波長光の関連。実験魚には水産重要魚種のマツカワ、および汎用実験魚のキンギョを使用し、それぞれの特性と相互の共通点を明らかにすることとした。得られる情報は当該魚種、および近縁魚種の飼育環境整備のための基礎知見とすることとした。

3. 研究の方法

(1) 光環境飼育

白黒水槽飼育：マツカワを白あるいは黒色水槽で飼育し、摂餌行動等を観察した。マツカワは自然水温および自然日長下で飼育し、摂餌量を自発摂餌法によって測定した。

蛍光灯の青、緑、あるいは赤フィルター透過光照射下でマツカワを 14 週間飼育した。

また、屋内水槽を青、緑、あるいは赤フィルターで覆った水槽中でマツカワを 14 週間飼育した。この光源（環境光とよび）は自然光と作業のために点灯する蛍光灯とした。対照水槽にはフィルターを設置しなかった。

発光ダイオード光照射飼育：マツカワおよびキンギョを青、緑、あるいは赤の LED 光照射下で 3 ないし 9 週間飼育した。マツカワは自然水温で一定光周期下（明期 8:00-17:00）、キンギョは 25 で一定光周期下（明期 7:00-19:00）で飼育した。

(2) 分子クローニング

cDNA は逆転写 (RT) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法、5' RACE 法、および 3' RACE 法によって増幅した。増幅 cDNA は pT7 Blue-T ベクターに挿入し、塩基配列分析に付した。

(3) 受容体 mRNA の組織分布

組織片からの増幅：マツカワおよびキンギョの各種組織から MSH 受容体および MCH 受容体 RT-PCR 法により mRNA を増幅した。増幅はアガロースゲル電気泳動法により調べた。

単離細胞からの増幅：マツカワ鱗の皮膚から色素胞等を単離した。これらを材料として MSH 受容体の増幅の有無を調べた。

(4) 遺伝子発現定量

各種光環境下で飼育したキンギョの脳内 MCH 遺伝子発現量を、定量リアルタイム PCR 法により調べた。

(5) MSH と MCH の作用

色素拡散作用：マツカワ皮膚の黑色素胞と黄色素胞中の色素拡散に対する、各種 MSH の活性を調べた。活性の評価は Hogben と Slome の方法に基づいた。

薬理作用：キンギョ MCH 受容体 cDNA を HEK293 細胞中で強制発現させた。この受容体の特性をカルシウム流入を指標として調べた。

4. 研究成果

(1) 魚類の成長と光環境

白あるいは黒色水槽で飼育したマツカワの摂餌量を自発摂餌法によって調べたところ、白色水槽での摂餌量が黒色水槽中のものよりも多かった。このことから白色がマツ

カワの食欲を亢進するものと考えられる。各色フィルター透過蛍光灯光を照射して飼育したところ、マツカワの成長は緑、青、赤色光照射の順にすぐれていた。屋内マツカワ水槽を各色フィルターで覆って飼育したところ、成長は緑フィルター、青フィルター、赤フィルター照射光の順にすぐれていた。対照群の成長に対して、緑フィルター下で飼育した群は優れていたが、赤フィルター下のは劣っていた。

(2) メラノコルチン受容体とメラニン凝集ホルモン受容体

マツカワにおいて、MSHの受容体であるメラノコルチン (MC) 2型受容体および5型受容体のcDNAをクローニングし、アミノ酸配列の概要を明らかにした。キンギョにおいてMC1型、2型、および3型受容体cDNAをクローニングし、アミノ酸配列の概要を明らかにした。キンギョにおいて2種のMCH受容体cDNAをクローニングし、アミノ酸配列の概要を明らかにした。哺乳類細胞で強制発現させたキンギョのMCH受容体は、1型および2型ともMCHに反応した。これら2種類のMCH受容体のうち、2型のMCHに対する反応は百日咳毒素によって抑制されたが、1型の反応はほとんど抑制されなかった。この現象は哺乳類の同族受容体とは逆であり、当該受容体の機能分化に重要な知見を与える。

(3) 体色調節および食欲調節ホルモン遺伝子の発現と特定波長光の関連

キンギョを青、緑および赤色の発光ダイオード光照射下で3ないし4週間飼育したところ、脳内のMCH mRNA量は青色光照射魚が最大であり、赤色光照射魚は最小であった。蛍光灯照射下の白水槽飼育魚の同mRNA量は黒水槽飼育魚よりも高いが、青色光照射魚では同白水槽飼育魚よりも著しく高かった。以上の結果から、特定波長光が脳内ホルモン遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を示した。青、緑、赤の発光ダイオード光照射下でマツカワを9週間飼育し、脳内MCH遺伝子発現量をPCR法で調べた。その結果、同遺伝子の発現量に有意差はなかったが、緑、青、赤色光照射の順に高い傾向が認められた。ただし、緑色光

照射魚の値は、対照とした白色光照射魚での値よりも有意に高かった。以上のように、キンギョとマツカワにおいて、特定波長光が脳内MCH遺伝子の発現に影響を及ぼすことを示した。

(4) 体色調節および食欲調節ホルモン受容体の分布

マツカワにおいて、MSH受容体1型が発現する主な組織は脳、眼球、精巣、皮膚であった。2型では脳、頭腎、精巣であり、5型では脳、心室、腸、精巣、皮膚であった。既報のごとく、4型は脳、眼球、精巣、皮膚で発現する。これらの成績から、頭腎と皮膚を除く組織において、MSHが未知の生命現象に関わっていることが示唆される。

キンギョにおいて、MCH受容体が脳下垂体、脳、眼、鰓、心臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、筋肉、脂肪組織などで発現することを見出した。これにより、MCHが体色調節と食欲調節以外にも様々な生命現象に関わる可能性を示した。

(5) 体色および食欲調節ホルモンの末梢での作用

マツカワの皮膚では、MSHをコードするプロオピオメラノコルチン遺伝子が色素胞以外の皮膚細胞で発現することを見出した。これにより、MSHが傍分泌的に作用することを示した。マツカワの皮膚において α -MSHは黄色素および黒色素の拡散を刺激する。アミノ末端のアセチル化は黄色素胞刺激活性を増強するが、黒色素胞刺激活性を無効にする。黄色素胞ではMC1型受容体が発現し、黒色素胞では同1型受容体と5型受容体が発現する。これにより、異なる受容体サブタイプの共発現が、アセチル基の有無による α -MSHの活性調節に関与する可能性を示した。

(6) まとめ

本研究ではマツカワとキンギョにおいて、光環境と視床下部脳下垂体系のホルモンであり体色と食欲に係わるMCHとMSHの関係の一端を明らかにした。従って、第一の目的である「光による魚類脳ホルモン制御機構の解明」に一定の成果が得られた。また、マツカワにおいて緑色光が成長促進効果を示し

たことから、第二の目的である「環境への負荷を軽減する魚類生産システムの提言」に係わる重要知見が得られた。分子クローニング等の成績を合わせると、本研究は所期の目的を大きく超える成果を得たと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計36件)[「2」以外は全て査読有り]

1. Kobayashi, Y., Tuchiya, K., Yamanome, T., Schioth, H.B., Takahashi, A. (2010). Differential expressions of melanocortin receptor subtypes in melanophores and xanthophores of barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* in press
2. 山野目健、高橋明義 (2009). 光環境と魚類生理～マツカワの無眼側黒化から成長促進へ 比較内分泌学 35, 93-98.
3. Matsuda, K., Kojima, K., Shimakura, S., Takahashi, A. (2009). Regulation of food intake by melanin-concentrating hormone in goldfish. *Peptides* 30, 2060-2065.
4. Mizusawa, K., Saito, Y., Wang, Z., Kobayashi, Y., Matsuda, K., Takahashi, A. (2009). Molecular cloning and expression of the two melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. *Peptides* 30, 1990-1996.
5. Amano, M., Takahashi, A. (2009). Melanin-concentrating hormone: A neuropeptide hormone affecting the relationship between photic environment and fish with special reference to background color and food intake regulation. *Peptides* 30, 1979-1984.
6. Takahashi, A., Kobayashi, Y., Amano, M., Yamanome, T. (2009). Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder. *Peptides* 30, 1374-1382.
7. Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Yamanome, T., Chiba, H., Takahashi, A. (2009). Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 419-424.
8. Sunuma, T., Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A., Yamamori, K. (2009). White background stimulates the food intake of a pleuronectiform fish the barfin flounder, *Verasper moseri* (Jordan et Gilbert). *Aquaculture Res.* 40, 748-751.

9. Matsuda, M., Kojima, K., Shimakura, S., Miura, T., Uchiyama, M., Shioda, S., Ando, H., Takahashi, A. (2009). Relationship between melanin-concentrating hormone- and neuropeptide Y-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 153, 3-7.
10. Yamanome, T., Mizusawa, K., Hasegawa, E., Takahashi, A. (2009). Green light stimulates somatic growth in the barfin flounder *Verasper moseri*. *J. Exp. Zool.* 311A, 73-79.
11. Kobayashi, Y., Chiba, H., Amiya, N., Yamanome, T., Mizusawa, K., Amano, M., Takahashi, A. (2008). Transcription elements and functional expression of proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of the barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 259-267.
12. Shimakura, S., Kojima, K., Nakamachi, T., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., Takahashi, A., Matsuda, K. (2008). Neuronal interaction between melanin-concentrating hormone- and α -melanocyte-stimulating hormone-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Peptides* 29, 1432-1440.
13. Amiya, N., Amano, M., Iigo, M., Yamanome, T., Takahashi, A., Yamamori, K. (2008). Interaction of orexin/hypocretin-like immunoreactive neurons with melanin-concentrating hormone and -melanocyte-stimulating hormone neurons in the brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder. *Fish Sci.* 74, 1040-1046.
14. Takahashi, A., Kobayashi, Y., Moriyama, S., Hyodo, S. (2008). Evaluation of posttranslational processing of proopiomelanocortin in the banded houndshark pituitary by combined cDNA cloning and mass spectrometry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 41-48.
15. Shimakura, S., Miura, T., Maruyama, K., Nakamachi, T., Uchiyama, M., Kageyama, H., Shioda, S., Takahashi, A., Matsuda, K. (2008). α -Melanocyte-stimulating hormone mediates melanin-concentrating hormone-induced anorexigenic action in goldfish. *Hormones and Behavior* 53, 323-328.
16. Matsuda, K., Nejigaki, Y., Satoh, M., Shimaura, C., Tanaka, M., Kawamoto, K., Uchiyama, M., Kawauchi, H., Shioda, S., Takahashi, A. (2008). Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on prolactin and somatolactin release from the goldfish pituitary *in vitro*. *Regul. Pept.* 145, 72-79.
17. Kobayashi, Y., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Schiøth, H.B., Kawauchi, H., Takahashi, A. (2008). Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 280-287.
18. Amiya, N., Amano, M., Yamanome, T., Yamamori, K., Takahashi, A. (2008). Effects of background color on GnRH and MCH levels in the barfin flounder brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 88-93.
19. Yamanome, T., Chiba, H., Takahashi, A. (2007). Melanocyte-stimulating hormone facilitates hypermelanosis on the non-eyed side of the barfin flounder, a pleuronectiform fish. *Aquaculture* 270, 505-511.
20. Moriyama, M., Kasahara, M., Amiya, N., Takahashi, A., Amano, A., Sower, S. A., Yamamori, K., Kawauchi, H. (2007). RFamide peptides inhibit the expression of melanotropin and growth hormone genes in the pituitary of an agnathan, the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Endocrinology* 148, 3740-3749.
21. Kobayashi, Y., Sakamoto, T., Iguchi, K., Imai, Y., Hoshino, M., Lance, V. A., Kawauchi, H., Takahashi, A. (2007). cDNA cloning of proopiomelanocortin (POMC) and mass spectrometric identification of POMC-derived peptides from snake and alligator pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 73-81.
22. Haitina, T., Klovins, J., Takahashi, A., Lowgren, M., Ringholm, A., Enberg, J., Kawauchi, H., Larson, E. T., Fredriksson, R., Schiøth, H.B. (2007). Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes. *BMC Evol Biol.* 7, 101-114.
23. Matsuda, K., Shimakura, S., Miura, T., Maruyama, K., Uchiyama, M., Kawauchi, H., Shioda, S., Takahashi, A. (2007). Feeding-induced changes of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in the goldfish brain. *Cell Tissue Res.* 328, 375-382.
24. Haitina, T., Takahashi, A., Holmen, L., Enberg, J., Schiøth, H.B. (2007). Further evidence for ancient role of ACTH peptides at melanocortin (MC) receptors; pharmacology of dogfish and lamprey peptides at dogfish MC

- receptors. *Peptides*. 28, 798-805.
25. Yamanome, T., Amano, M., Amiya, N., Takahashi, A. (2007). Hypermelanosis on the blind side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is diminished by rearing in white tank. *Fish. Sci.* 73, 466-468.
 26. Takahashi, A., Kosugi, T., Kobayashi, Y., Yamanome, Y., Schioth, H.B., Kawauchi, H. (2007). The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 210-219.
 27. Amiya, N., Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Yamamori, K. (2007). Profiles of α -melanocyte-stimulating hormone in the Japanese flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay and immunohistochemistry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 135-141.
 28. Amiya, N., Amano, M., Oka, Y., Iigo, M., Takahashi, A., Yamamori, K. (2007). Immunohistochemical localization of orexin/hypocretin-like immunoreactive peptides and melanin-concentrating hormone in the brain and pituitary of medaka. *Neurosci. Lett.* 427, 16-21.

[学会発表]計48件

1. Mizusawa, K., Saito, Y., Wang, Z., Kobayashi, Y., Matsuda, K., Takahashi, A. Characterization of two melanin-concentrating hormone receptor subtypes in goldfish. 16th International Congress of Comparative Endocrinology (Hong Kong, China) 2009.6.23
2. Kobayashi, Y., Yamanome, T., Takahashi, A. Identification of cells expressing proopiomelanocortin and its receptors in the skin of barfin flounder. 16th International Congress of Comparative Endocrinology (Hong Kong, China) 2009.6.23
3. Takahashi, A., Kobayashi, Y. Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to the barfin flounder. First Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society. International Symposium on Biological Active Peptides: Peptide Diversity (Sendai, Japan) 2008. 8.31
4. Kobayashi, Y., Amiya, N., Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A. Molecular

cloning of a receptor for melanocyte-stimulating hormone in masu salmon. 5th World Fisheries Congress (Yokohama, Japan) 2008.10.23-24.

5. Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Amiya, N., Yamanome, T., Amano, M., Takahashi, A. Expression of the proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of barfin flounder does not always correlated to background color. 24th Conference of European Comparative Endocrinologists (Genoa, Italy) 2008.9.3
6. Takahashi, A., Kobayashi, Y., Moriyama, M., Hyodo, S. Evaluation of posttranslational processing of proopiomelanocortin in the banded houndshark pituitary by combined cDNA cloning and mass spectrometry. Sixth International Symposium on Fish Endocrinology (Calgary, Canada) 2008.6.25

[図書](計3件)

1. 川内浩司、高橋明義、森山俊介(2007). 下垂体ホルモンの多様性 内分泌と生命現象 シリーズ 21 世紀の動物科学 10 (長濱嘉孝、井口泰泉編) pp.7-39 培風館、東京
2. 高橋明義(2007). 鎮痛ペプチド ホルモンハンドブック 新訂 eBook 版 日本比較内分泌学会編 pp. 346-407 南山堂、東京
3. 高橋明義(2007). プロオピオメラノコルチン由来のホルモン ホルモンハンドブック 新訂 eBook 版 日本比較内分泌学会編 pp. 697-775 南山堂、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 明義 (TAKAHASHI AKIYOSHI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：10183849

(2) 研究分担者

天野 勝文 (AMANO MASAFUMI)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：10296428
松田 恒平 (MATSUDA KOHEI)
富山大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：60222303
森山 俊介 (MORIYAMA SHUNSUKE)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：50222352