

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06228

研究課題名(和文) 顕微鏡技術の組み合わせによる魚類の青色素胞を構成する青色色素成分の同定への試み

研究課題名(英文) Identification the blue pigment components of fish cyanophores by combining microscopic techniques.

研究代表者

武井 史郎 (Shiro, Takei)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：60398576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、いまだ未知である魚類における青色素胞を構成する色素物質の同定である。青色素胞はネズボ科魚類の2種においてのみ報告されている、ごく限られた魚類においてのみ見られる色素胞であるが、その色素を構成する物質は未知であった。本研究は青色素胞を持つニシキテグリを用い、質量顕微鏡法を主体とする色素分子の同定を行った。その結果、質量電荷比184.07、197.94、309.19の3種類の候補分子が発見され、この分子は青色色素と同じ組織部位に合致するように組織内で分布していた。そのため、この分子が青色色素を構成する分子と推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により青色色素の物質の解明につながる結果が得られた。これらの結果はニシキテグリにおける青色色素の機能学的意義につながりうる結果であるとともに、魚類における青色素胞の意義と起源にも追求できる。また他魚種においても同様の組織学的形態と色彩が観察できた際には、本研究で示した方法によって、より広範な青色色素の機能学的意義にも追求することができる。本研究は基礎研究であるため、直接的に社会的意義に寄与するものではないが、本研究を通じて生物多様性の理解の一端になりえるほか、一般の人々への興味や理科教育における自然生物への関心に寄与できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the pigment substances that make up the cyanophores in fish, which are still unknown. Cyanophores have been reported in only two species of Nezhidae, and are found only in a limited number of fish, and still, the blue pigment in cyanophores is unknown. In this study, we used imaging mass spectrometry to identify the pigment molecules mainly in the blue chromatophores of known fish species, *Synchiropus splendidus*. As a result, three candidate molecules, which were found at mass-to-charge ratios of 184.07, 197.94 and 309.19, were distributed in the tissue in a manner consistent with the same tissue site as the blue pigment. Therefore, this molecule was presumed to be a component of the blue pigment.

研究分野：解剖学一般(含組織学・発生学) / 水圏生命科学関連

キーワード：魚類 青色素胞 質量顕微鏡法 電子顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

青色素胞はごく限られた魚類においてのみ見られる色素胞であるが、その色素を構成する物質は未知である。無脊椎動物や植物などでは青色素を持つ生物はよく知られ、フラボノイド、テトラピロール、プテリジンなどの様々な色素物質が明らかとなっている(伊藤祥輔ら編、色素細胞第2版、2015)。一方で、脊椎動物における青色素に関する知見ははるかに少ない。サンゴ礁や外洋域で生息する魚のように青色の体色を持つ魚類など、脊椎動物が持つ青い体色はほとんどが虹色素胞による構造色であり、構造色を生み出す反射小板を構成する物質は白い物質であるグアニンである(Bargana et al, Pigment Cell Res 20, 14-26, 2007)。しかし、1995年にGoda and Fujiiは、スズキ目ネズボ科に属する2種類の魚であるニシキテグリ *Synchiropus splendidus* とスポットマンダリンフィッシュ *Synchiropus picturatus* において、青色素顆粒を持つ青色素胞が存在することを、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による形態学的解析により明らかにした(図1、Goda and Fujii, Zool Sci 12, 811-813, 1995)。しかしながら、この青色素胞に関する化学的な研究は全く行われておらず、脊椎動物における青色素物質は不明なままである。その理由として、これらの魚が小型であるために青色素物質を十分に抽出、精製できない為であると思われる。

微量な生体内分子を検出、同定する方法として、質量顕微鏡法がある。質量顕微鏡法は組織切片表面を顕微鏡レベルの解像度で走査、質量分析を行い、検出した各分子のイメージング情報を網羅的に取得できる(武井, 矢尾, インナービジョン 29, 53-57, 2014)。この方法により、通常の質量分析(LC-MSなど)では抽出できないような、組織内のごく小さい範囲でわずかに存在する物質をも、その成分を解析することが可能となる。しかし、質量顕微鏡法は医学の分野で特に発展してきた技術であるために自然生物に対する適用例はまだ少なく、特に魚類における質量顕微鏡解析は申請者の知る限りメダカ(Zaima et al., J Oleo Sci 58, 415-419, 2009)やゼブラフィッシュ(Dueñas et al., Sci Rep 7, 14946, 2017など)しかなく、自然環境の生息する魚種を用いた例はまだない。本法が青色素胞と青色素を同定する方法として確立できれば、他の魚類や生物に対しても本法を適用できる可能性を大いに有しており、生物における色素胞の研究に大きな貢献が期待できる。もし青色素を構成する物質を人工合成できた場合には、新しい青色素としての新たな色彩技術の誕生にかかわる応用研究に結びつく可能性がある。さらに、青色素の合成にかかわるメカニズムや遺伝子が同定できた場合には、脊椎動物としては初めてとなるため、遺伝子改変動物を用いた研究などへの応用にも結びつく可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、いまだ未知である魚類における青色素胞を構成する青色素物質の同定を目指すことである。脊椎動物の青色素胞を研究した論文は1995年以降、存在せず、本研究の学術的独自性は非常に高い。特に、現在のところ、青色素を持つ魚に関する報告は、サンゴ礁域に住むネズボ科の魚と、ごく限られている。一方で、申請者は他にも青色素を持つ魚はまだ多く存在すると考えている。青色素胞と青色素がネズボ科魚類の共通する色素であることが分かれば、学術的に大きな進展が期待できる。

3. 研究の方法

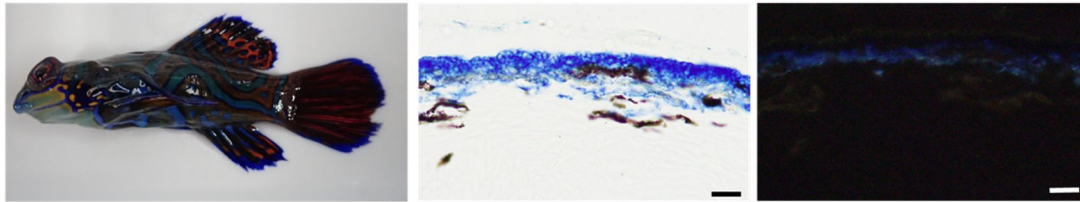
青色素胞を持つ魚種として、ニシキテグリ *Synchiropus splendidus* を用いた。これらの魚は観賞魚として流通しており、小売店より生体を購入した。各個体は麻酔を行ったのち、青色素胞を持つ組織を摘出し、凍結切片による光学顕微鏡観察で形態を確認した後、質量顕微鏡法解析に用いる試料を作製した。以下の方法に従って行った。凍結切片はITOコートスライドガラス(20松浪硝子工業)に貼り付け、その後、マトリックス噴霧前処理装置(TM Sprayer, HTX Imaging)によるマトリックスのコートを行った。マトリックスは2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)(40 mg/ml in 50% MeOH)を用いた。

作製した試料は質量顕微鏡装置(Mass Microscope Prototype, 島津製作所)を用いて解析を行った。質量分析範囲はm/z 100-1000、イオンモードは陽イオンモード、レーザー径は5 μm、空間解像度は20 μmによる条件で計測した。

4. 研究成果

まずニシキテグリを用い、質量顕微鏡法で用いる新鮮凍結切片が、青色素組織においても適用可能であるかの確認を行った(図1)。青色素胞を持たないルリスズメダイ *Chrysiptera cyanea* とを比較して組織切片の観察を行った結果、ニシキテグリにおいてのみ、明視野における青色の組織が皮膚組織の表皮で明瞭に観察できた。一方、青色素胞を持たないルリスズメダイでは組織切片上では青色の組織は確認できず、暗視野観察において光反射を行う虹色素胞を持つ組織が観察された。以上から、青色素組織および青色素胞は新鮮凍結切片においても色および形態を保持できているため、この標本が質量顕微鏡法解析においても適用可能であることがわかった。

(a) *Synchiropus splendidus* (Cyanophore)



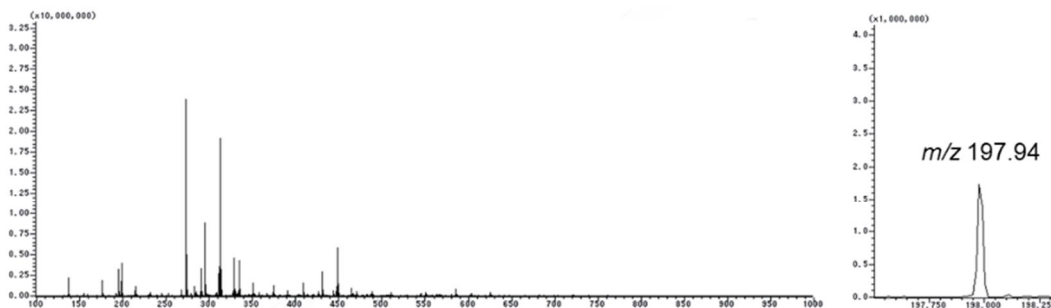
(b) *Chrysiptera cyanea* (Iridophore)



図1 ニシキテグリ(a)とルリスズメダイ(b)における新鮮凍結切片を用いた組織観察

次にここで作製した組織標本を用いて、質量顕微鏡解析を行った。測定を終えたのち、青色組織を持つ組織部位である表皮と、青色組織を持たない組織部位である真皮を対象とし、両部位のマススペクトルを比較した(図2)。両部位におけるマススペクトル全体では大きな違いは見られなかったが、いくつかの分子において、青色組織組織での発現が高い分子が見つかった。例えば、 $m/z=197.94$ の分子では青い組織において約2.5倍の高発現を示していたため、この分子も青色組織を構成する分子の一つと考えられた(図2)。

(a) Positive area (cyanophore)



(b) Negative area (dermis)



図2 青色組織(a)と真皮(b)におけるマススペクトルの比較

質量顕微鏡装置に装備される光学顕微鏡像との比較し、青色組織においてのみ顕著に発現する分子の探索した。その結果、本研究では $m/z=184.07$ 、 $m/z=197.94$ 、 $m/z=309.19$ の3種類の分子が検出できた(図2)。これらの分子はそれぞれ、表皮組織に局在しており、青色素胞を構成する分子である可能性が示唆された。しかしながら、これらの分子はオンラインデータベースである Human Metabolome Database (HMDB)で合致する分子が見つけれず、新規の分子である可能性が示唆された。またこれらの分子に対するタンデム質量分析も試みたが、分子の存在量が少ないためか、フラグメントイオンを検出することができなかった。

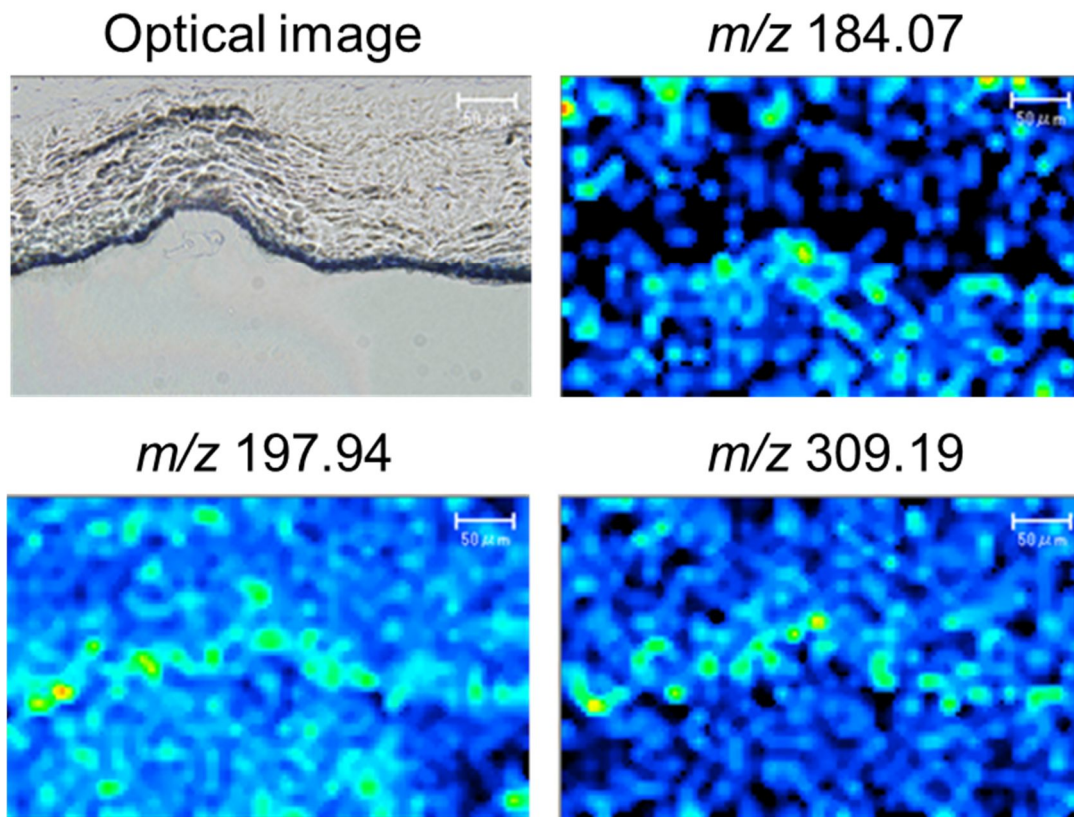


図3 質量顕微鏡解析によって検出された青色素胞と思われる分子群

本研究により、明確な色素分子を同定することができなかったが、質量顕微鏡法により、候補となりうる分子を見つけ出すことに成功した。既知文献においても青色素胞を同定した報告はまだ存在しないが、近年、バランベラ *Labrus bergylta* (Clark et al., J Fish Biol 89, 2070-2084, 2916)、ウォールアイ *Stizostedion vitreum* (Ghosh et al., RSC Adv 12, 20296-20304, 2022)においてピリベルジンと関連タンパク質が青色を表現していると報告されてきている。本研究においても、ピリベルジンを標的とした分析を試みたが、ピリベルジンの分子である $m/z=583.3$ は検出できなかった。そのためニシキテグリはこれらの魚種とは異なる、独自の青色素胞を持っている可能性が高いと思われた。今後は検出方法や分析条件をより多角的に行い、青色素胞を構成する分子の同定をより推進していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------