

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22340

研究課題名(和文)グリーンインパルス：緑色光により駆動される魚類脳神経ネットワークの解明

研究課題名(英文)Green impulse: neuronal network in fish brain driven by green light

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラニン凝集ホルモン(MCH)の脳脊髄液内投与により、ホシガレイの摂餌量が減少することが分かった。従来MCHは食欲を亢進して摂餌量を増加させると想定してきたが、本研究の結果はこの前提を再考する必要性を示した。同様の処置を施した個体の脳における食欲関連ホルモン遺伝子の発現を定量したところ、アグチ関連ペプチド1遺伝子と神経ペプチドY遺伝子の発現量の低下が認められた。これら2つの遺伝子を発現するニューロンとMCHニューロンによる脳内ネットワークが食欲調節に関連することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホシガレイの摂餌量と成長は緑色光照射によって促進される。この飼育条件下でメラニン凝集ホルモン(MCH)遺伝子の脳内での発現量が上昇すること、また哺乳類ではMCHが食欲を亢進することにもとづいて、MCHを緑色光-脳内作用(食欲亢進)-成長をつなぐインターフェースとして想定してきた。しかし本研究において示された可能性は、従来とは真逆の食欲抑制作用である。これはキンギョで示されている作用と同様である。よって、MCH以外のホルモンをインターフェースに設定して、研究計画を再構築する必要性が生じた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to identify the neuron network related to somatic growth facilitated by green light irradiation. We found that feeding in spotted halibut was reduced upon the administration of melanin-concentrating hormone (MCH) into the cerebrospinal fluid via an aperture made on the head. The results of this study discredited a hypothesis considering MCH as an appetite-inducing peptide hormone. MCH administration suppressed the expression levels of genes encoding agouti-related protein-1 (AGRP-1) and neuropeptide Y (NPY), which were known as appetite inducers, in the brain of fish. These results suggest that the neuron networks corresponding to MCH, AGRP1, and NPY may regulate the appetite and feeding behavior in fish. Furthermore, they suggest the existence of a functional neuron network comprising these three hormonal neurons. Since MCH may not stimulate the feeding behavior, it is necessary to identify other hormonal factors and neurons instead of just the hormone.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：カレイ 緑色光 成長 食欲 神経ペプチド メラニン凝集ホルモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類養殖は優良なタンパク質を供給する手法として、今後各国で重要性が増していくことが確実視されている。世界的には食糧増産に寄与し、国内的には高齢化社会での省力化に対応できる。近未来を視野に入れた生産増と生産コスト削減のためには、養殖魚の成長促進を導くことが最重要課題である。

魚類の成長は飼育環境に依存する。これまでに申請者らは、カレイの仲間のマツカワ、ホシガレイ、ヒラメの成長に及ぼす光環境の効果を明らかにしてきた (Shimizu et al., 2019, 2021; Takahashi et al., 2016, 2018)。一連の成果の中で特筆すべき点は、波長 518 nm をピークとする緑色光を一定時間照射するのみでカレイの成長が促進し、さらに肥満度も増加したことである。エサが血肉となる増肉係数も良好になることから、革命的な魚類養殖技術として導入される機運が高まっている。緑色光を魚類養殖に活用するためには、成長を導く仕組みを明らかにして、本来魚類に備わっている特性を導くものであることを社会に周知する必要がある。これは新技術に科学的な裏付けを与え、食の安全性への疑念払拭のために必要である。

成長には食欲亢進と同化作用が重要である。食欲亢進には脳内で産生される複数のホルモンが関与する (Parker and Bloom, 2012; Volkoff et al., 2010)。成長そのものには脳下垂体から分泌される成長ホルモン、同化作用には膵島のランゲルハンス島から分泌されるインスリンが特に重要であるため、(Andoh, 2007; Kawachi et al., 1986) これらホルモンの遺伝子発現や血液中濃度に対する緑色光照射の影響を調べてきた。これまでに明瞭な変動が認められているのは、食欲亢進作用を有するとされるメラニン凝集ホルモン (MCH) の脳内での発現上昇のみである (Shimizu et al., 2019; Takahashi et al., 2016, 2018)。成長ホルモンとインスリンには変動が認められない。さらには、MCH の食欲亢進作用は哺乳類において示されているのみであり、魚類では証明されていない。このように緑色光がカレイの成長を促進する仕組みは、MCH の関与が浮上してはいるが、ほとんど不明のままである。仮に、MCH の食欲亢進作用が証明されたとしても、MCH だけですべてを説明できるわけではない。

2. 研究の目的

緑色光を照射したカレイでは摂餌量が増加することから、食欲が刺激されることは間違いない。行動を観察したところ、通常は水槽底面に静止していることが多いカレイが、緑色光を照射するとその直後から行動が活発になり水槽中を泳ぎまわって餌を頻繁に食べることが分かった。この現象は、緑色光照射直後、摂餌行動に係わる脳細胞が極めて短時間の間に発火し、その活動が持続することを強く示唆する。そこで本研究は緑色光により駆動される魚類脳細胞の探索を目的とした。そして、得られる成果に基づいて、緑色光により駆動される脳神経ネットワークを、*c-fos* を探索マーカーに用いて説明することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験魚

本研究には、国立研究開発法人 水産研究・教育機構宮古庁舎で生産されたホシガレイ (*Verasper variegatus*) を用いた。

(2) ホシガレイ *c-fos* の研究

ホシガレイ *c-fos* の cDNA クローニング

タイセイヨウオヒョウ (*Hippoglossus hippoglossus*) の *c-fos* 塩基配列 (ID: KF941297, 約 1.1 kb) をもとにほぼ全長を含む cDNA 断片 (約 1 kb) を増幅するプライマーを設計した。ホシガレイ当歳魚の全脳 total RNA を ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて抽出し、Recombinant DNase (RNase free) (タカラバイオ) を使用しゲノム DNA を除去した。この RNA と One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用い、前述のプライマーを用いて RT-PCR を行った。増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (タカラバイオ) を用いて精製し、pGEM-T EASY vector systems (プロメガ) を用いて cDNA クローニングを行った。DNA 塩基配列の解析には BigDye terminator および 3130xl DNA sequencer (アプライドバイオシステムズ) を用いた。

ホシガレイ *c-fos* の定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

ホシガレイ *c-fos* の cDNA クローンを、制限酵素 *Sal I* (タカラバイオ) で直鎖化した。T7 RNA polymerase (タカラバイオ) により *c-fos* RNA の *in vitro* 転写を行った。合成された RNA は DNase 処理の後に標準的な方法で精製し、qRT-PCR の標準 RNA として用いた。qRT-PCR に用いたプライマーおよび TaqMan プローブは、上記のホシガレイ *c-fos* クローンの塩基配列をもとに PrimerExpress (アプライドバイオシステムズ) を用いて設計した。

緑色 LED 光照射下 (対照は環境光) で 30 日間、水温約 9 で飼育したホシガレイから抽出した全脳サンプルを材料とし、上記と同様に total RNA を抽出、DNase 処理を行った。前述した *in vitro* 転

写したホシガレイ *c-fos* RNA を段階希釈 (10 fg – 10pg) し標準 RNA とした。One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ)を用い、LightCycler96 (ロシュダイアグノスティクス)を使用して qRT-PCR を行った。

ホシガレイ *c-fos* タンパク質の免疫組織化学検出

上記の過程において得られたホシガレイ *c-fos* cDNA をもとに演繹アミノ酸配列を得た。種間比較の結果、ゼブラフィッシュ *c-fos* タンパク質とロイシンジッパードメインを中心に高い相同性を認めた。市販のゼブラフィッシュ *c-fos* 抗体 (Anti *c-Fos* E-8、サンタクルーズバイオテクノロジー) を用い、ホシガレイ全脳抽出物からウェスタンブロッティング法で *c-fos* の検出を試みた。

(3) ホルモンの脳脊髄液内投与

ホルモン投与

手術後の個体を収容するストック水槽を以下のように準備した。黒色円形 500 L 水槽 12 基を天井の照明蛍光灯点灯中の屋内に設置した。ただし蛍光灯直下は避けた。海水は 200 L とした。自然水温、止水とし、エアーストーンを一個により空気を補給した。ストック水槽中の個体 (1 歳魚, 140-160 g) 実験 3 日前から無給餌とした。実験前日に、予備 1 個体を含む 2 個体を実験水槽に移した。実験当日、最初の手術を 9 時に開始した。水温は 13.7 °C であった。0.075% 2-フェノキシエタノールに 3 分間浸漬して麻酔した個体の頭部にドリルで穴を開けた。その穴から MCH 溶液あるいは生理食塩水溶液 (対照) を投与した。1 個体への最大投与液量は 5 µL とした。穴は、同じ個体から切り取った尾鱗片をボンドで固定してふさいだ。投与後の個体は直ちに実験水槽に移した。予備個体をストック水槽に戻したのち、実験水槽では直ちに手撒き給餌を行った。給餌は摂餌状態を観察しながら 3 時間継続し、給餌量 (配合飼料の粒数) を求めた。これらから遺伝子発現分析用に、脳と下垂体を採取しドライアイス上で凍結した。また、胃内容物の有無と性別を確認した。なお MCH 投与から 10 分以内に体色の明化が肉眼で確認された。

脳内ホルモン遺伝子発現

上記個体の脳における各種ホルモン遺伝子の発現を qRT-PCR により調べた。対象としたホルモンは以下のとおりであり、いずれも摂餌行動への関与が想定されるものである; メラニン凝集ホルモン (MCH) 1 および MCH2, 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP), プロオピオメラノコルチン- α (POMC-C), アグチ関連タンパク質 (AGRP) 1 および AGRP-2, オレキシン (ORX), および神経ペプチド Y (NPY)。標準 mRNA の調製や反応条件は既報の論文に準じた (Shimizu et al., 2019; Takahashi et al., 2016, 2018)。

4. 研究成果

(1) ホシガレイ *c-fos*

緑色 LED 光照射下で 30 日間飼育したホシガレイ脳における *c-fos* mRNA 含量には、対照群との間に差は認められなかった。この結果は、緑色 LED 光照射に反応して発現が亢進する *c-fos* 発現細胞は、存在するとしても細胞数が少なく、本手法では発現の差異を検出できない可能性を示唆する。これを検証するために市販のゼブラフィッシュ *c-fos* 抗体による免疫組織染色を試みた。しかしウェスタンブロッティングにおいてホシガレイ脳抽出物中に *c-fos* タンパク質を検出できなかったため、免疫組織染色による、*c-fos* 遺伝子が活性化する細胞の検出は断念した。

(2) ホシガレイの摂餌に対する MCH の効果

MCH は哺乳類では食欲を亢進して摂餌行動を活発にするホルモンとして知られている (Qu et al., 1996)。MCH は脳でつくられ、そのニューロンのほとんどが脳内に投射するため、作用のほとんどは脳内におけるものと解釈される (Nahon, 1994)。魚類では、MCH ニューロンは脳内に投射するほか、下垂体神経葉にも投射し、神経内分泌作用により血流中に分泌され、その末梢における代表的な作用として鱗や皮膚の色素を拡散して、体色を明るく、あるいは薄くする (Vallarino et al., 2009)。

魚類の食欲に対する MCH の直接的な効果はキンギョにおいて示されている (Matsuda et al. 2006, 2007)。キンギョでは、MCH の脳室内投与によって摂餌量が減少することから、MCH は食欲を抑制するホルモンであると考えられている。一方、カレイ類を白背地で飼育すると体色が明化することに加えて、摂餌行動が活発になり成長も促進される。この時脳内の MCH 遺伝子発現量が上昇することから、MCH は食用亢進作用を有し、白背地で産生量が増えた MCH が食欲を亢進させると解釈されている (Takahashi et al., 2018)。そこで本研究では、ホシガレイの摂餌行動に対する MCH の直接的効果の解明に取り組んだ。

キンギョでは、薄く透きとおっている頭頂部から脳室に狙いを定めて穿刺することにより、試験液を投与することが可能である。しかし左右非対称であり、頭頂部が厚いホシガレイにキンギョと同様の手法を適用することはできない。本研究では次善の策として、研究の方法に記したように、脳脊髄液

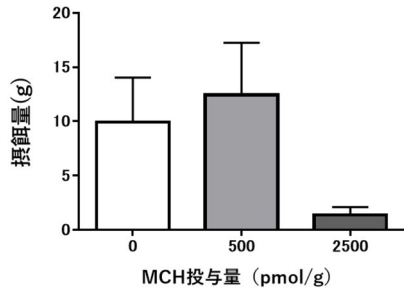


図1 脳脊髄液内に MCH を投与したホシガレイの摂餌量

への投与を行った。その結果, 図1に示すとおり, MCH 2500 pmol/g 投与群において, 摂餌量の減少が認められた。投与直後から体色が明化に転じたことから, MCH が脳脊髄液から血液に移行して, 末梢作用としてメラニン凝集作用を発揮した可能性がある。傍証ではあるが, MCH が魚体内に首尾よく投与されたことを示唆する。MCH を投与した個体の摂餌量が減少したことは, MCH が脳内の食欲中枢に作用したことを示唆する。この結果は, 生体内での MCH 産生の上昇が食欲亢進と密接に関連するとの仮説の見直しを迫るものであり, 白背地および緑色光照射により成長が促進される現象を, MCH のみでは説明が困難になった。ただし, 実験例が少ないことから, 投与量の適否や再現性を含めて MCH の食欲もしくは摂餌行動に対する効果について検討を進める必要がある。

(3) ホシガレイ脳ホルモン遺伝子の発現に対する MCH の効果

ホシガレイにおいて従来は, MCH 遺伝子発現量の高い個体の成長が優れていたことから (Shimizu et al., 2019, 2021), 同ホルモンを食欲亢進ホルモンと考えてきた。しかし前節で記したように, MCH はホシガレイにおいて食欲を抑制する可能性が生じた。促進的あるいは抑制的に作用するにせよ, MCH が食欲調節に関与するホルモンであるならば, 脳内の食欲関連ホルモンの遺伝子発現に対する MCH の効果を解明することは, MCH を軸として緑色光により駆動される脳神経ネットワークを理解することにつながる。

本研究では MCH の脳脊髄液内投与によって摂餌量が減少した個体群の脳における, 各種ホルモン遺伝子の発現を調べた。結果を図2に示す。対象とした数種類のホルモン遺伝子のうち, *agrp1* と *npy* の発現に減少が認められた。MCH がこれらホルモン遺伝子の発現に影響を及ぼすことは, これら遺伝子を発現するニューロンに MCH 受容体が存在することを示唆する。あるいはこれらのニューロンと MCH ニューロンの間に別のニューロンが介在していることも考えられるが, MCH ニューロン, AGRP1 ニューロン, NPY ニューロンの3者が脳内でネットワークを形成し, 食欲調節に関与していることが示唆される。以上の結果により, 不調に終わった *c-fos* を指標とするニューロンネットワークの解明は不調だったが, これは挽回できた。

AGRP1 と NPY はどちらも食欲を亢進するホルモンと考えられている。ホシガレイにおいて, MCH が食欲を抑制するホルモンであるならば, MCH のその機能の一端は AGRP1 と NPY に起因する食欲を抑制することにあると考えられる。

以上のように本研究ではホシガレイにおいて食欲に関する脳内ホルモンネットワークの一部を解明でき, さらに MCH が食欲を抑制する可能性を見出した。これらの成果はホシガレイをはじめとするカレイ類の成長に対する光の効果を解明するための起点となる。

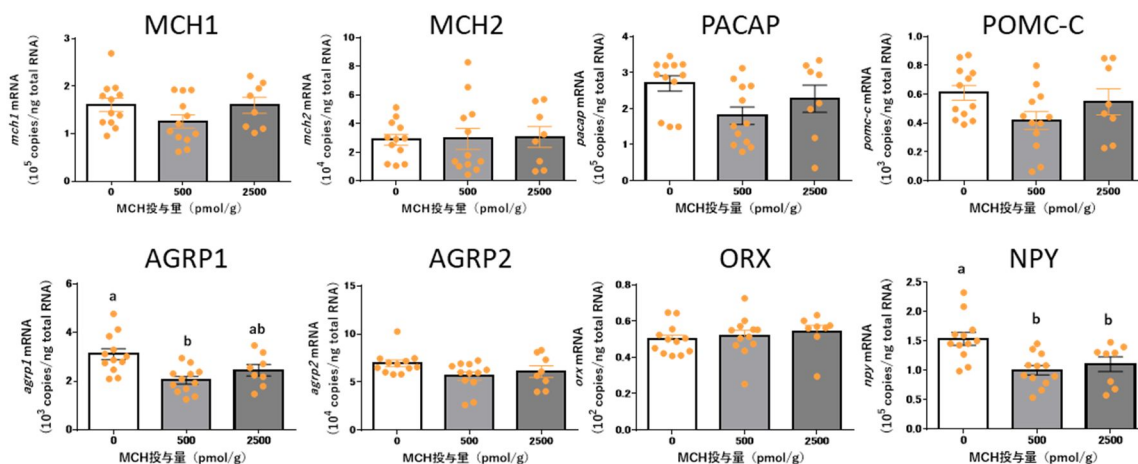


図2 脳脊髄液内に MCH を投与したホシガレイの脳内における, 食欲関連ホルモンをコードする遺伝子の発現量

文献

- Andoh, T., 2007. Amino acids are more important than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *General and Comparative Endocrinology* 151, 308–317.
- Kawauchi, H, Moriyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirahata, K., Kubota, J., Hirano, T., 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 244, 542–552.
- Matsuda, K., Shimakura, S.I., Maruyama, K., Miura, T., Uchiyama, M., Kawauchi, H., Shioda, S., Takahashi, A., 2006. Central administration of melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses food intake, but not locomotor activity, in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroscience Letter*. 399, 259–263.
- Matsuda, K., Shimakura, S.I., Miura, T., Maruyama, K., Uchiyama, M., Kawauchi, H., Shioda, S., Takahashi, A., 2007. Feeding-induced changes of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in goldfish brain. *Cell and Tissue Research*. 328, 375–382.
- Nahon, J.-L., 1994. The melanin-concentrating hormone: From the peptide to the gene. *Critical Reviews in Neurobiology* 8, 221–262
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, J., Kanarek, R., Maratos-Flier, E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 242–247.
- Shimizu, D., Kasagi, S., Takeuchi, R., Maeda, T., Furufuji, S., Mizusawa, K., Andoh, T., Takahashi, A., 2019. Effects of green light on the growth of spotted halibut, *Verasper variegatus*, and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and on the endocrine system of spotted halibut at different water temperatures. *General and Comparative Endocrinology* 271, 82–90.10.1016/j.ygcen.2018.11.005. “Corrigendum; *General and Comparative Endocrinology* 2019. 279, 203–205.”
- Takahashi, A., Kasagi, S., Murakami, N., Furufuji, S., Kikuchi, S., Mizusawa, K., Andoh, T., 2016. Chronic effects of light irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology* 232, 101–108.
- Parker, J. A., Bloom, S R., 2012. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63, 18–30.
- Takahashi, A., Kasagi, S., Murakami, N., Furufuji, S., Kikuchi, S., Mizusawa, K., Andoh, T., 2018. Effects of different green light intensities on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology* 257, 203–210.
- Shimizu, D., Mizusawa, K., Maeda, T., Yamaguchi, D., Takahashi, A., 2021. An evaluation of the growth-promoting effects of green light on spotted halibut for its practical application in aquaculture. *Fisheries Science* 87, 113–119.
- Vallarino, M., Bruzzone, F., Vaudry, H., 2009. Neuroanatomical distribution of MCH in the brain and pituitary of submammalian vertebrates. *Peptides* 30, 1973–1978.
- Volkoff, H, Hoskins L. J., Tuziak, S. M., 2010. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in aquaculture. *General and Comparative Endocrinology* 167, 352–359.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 高橋明義	4. 巻 46
2. 論文標題 光と成長をつなぐホルモン・インターフェイスの研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 水澤寛太, 高橋明義	4. 巻 42
2. 論文標題 緑色光によるカレイ類の成長促進現象～魚の生態と光環境～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 586-591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahashi, A., Shimizu, D., Satoshi, K., Mizusawa K.
2. 発表標題 Visual and endocrine systems mediating green-light effect on fish growth
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	阿見彌 典子 (Amiya Noriko) (20588503)	北里大学・海洋生命科学部・講師 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	清水 大輔 (Shimizu Daisuke) (40443361)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(塩釜)・グループ長 (82708)	
研究分担者	水澤 寛太 (Mizusawa Kanta) (70458743)	北里大学・海洋生命科学部・准教授 (32607)	

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