

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780181

研究課題名（和文） 孵化仔魚における食欲調節の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of feeding regulation in larval fish

研究代表者

水澤 寛太（MIZUSAWA KANTA）

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：70458703

研究成果の概要（和文）：

特定の波長光がゼブラフィッシュの孵化仔魚の摂食行動ならびに成長に影響することを明らかにした。また、特定の波長光を照射された孵化仔魚において、哺乳類と硬骨魚類における摂食調節因子の1つであるメラニン凝集ホルモンを含む複数のホルモン関連遺伝子が発現変動を示すことを明らかにした。さらに脳に発現するが皮膚において発現しない新たなメラニン凝集ホルモン受容体を同定した。

研究成果の概要（英文）：

This study shows that the feeding and growth of larval zebrafish are modified by certain wavelengths and some hormone-relating genes, which include melanin-concentrating hormone, exhibit changes in expression levels in response to certain wavelengths. Molecular cloning has identified a mammalian-type melanin-concentrating hormone receptor, which is expressed in the brain but not in the skin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：遺伝子、ゼブラフィッシュ、仔魚、摂食、成長、発光ダイオード、マイクロアレイ、メラニン凝集ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類では一般に環境の背景色に応じて体色が変化する。この体色変化は交感神経による指令とメラニン凝集ホルモン（MCH）およびメラニン細胞刺激ホルモン（MSH）による指令によって制御される。MCHは色素を凝集させ、MSHは色素を拡散させる作用を持つ。MCHとMSHは齧歯類において脳中枢に作用し

それぞれ食欲増進作用および食欲抑制作用を持つことが報告された。近年、国内においてMCHとMSHの魚類脳中枢への作用が調べられ、マツカワおよびキンギョにおいてもMCHとMSHが食欲調節に関わっていることが示唆された。魚類においてはMCHとMSHは光環境に応答して視床下部および脳下垂体において産生されるホルモンであることから、光環

境が魚類の食欲を調節する際の情報伝達物質として重要な働きを担っていると予想された。

研究代表者はこれまでにイワナ・ニジマスの摂餌活性が環境照度に影響されること、さらにカレイ目魚類のマツカワでは緑色光が成長を促進することを見出した。特定の波長光はどのようにして魚類の食欲に影響を及ぼすのであろうか？ その謎を解く鍵として、研究代表者はMCHに着目した。

(2) 仔魚が孵化後に速やかに餌を得ることができるか否かは仔魚の生残率に重大な影響を与えることから、仔魚の摂餌行動を高める技術が求められている。仔魚における食欲中枢のはたらきや発達過程を明らかにするためには成魚における食欲調節の分子メカニズムだけでなく、胚発生期における分子のダイナミズムを明らかにすることが重要である。

ゼブラフィッシュは脊椎動物の遺伝学における重要なモデル生物として魚類の中で最も遺伝子情報が集積されており、発生学における重要なモデル生物として世界中で用いられている。ゼブラフィッシュの仔魚は受精後3日目に孵化し、4日目には背景色に応じた体色変化を示すようになり、受精後5日目には遊泳と摂餌を開始する。以上のことから仔魚の食欲調節遺伝子の研究においてゼブラフィッシュは有用なモデルになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究はゼブラフィッシュをモデルとして孵化仔魚の食欲調節の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。(1) 仔魚の摂餌量定量系の開発、(2) 光環境が仔魚の摂餌行動に及ぼす効果の検討、(3) 食欲調節ホルモン遺伝子・受容体遺伝子の同定、および発現分布の解析、(4) 光環境が食欲調節ホルモン遺伝子の発現動態に及ぼす効果の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 孵化仔魚の餌であるシオミズツボワムシ、ゾウリムシ、またはアルテミアを計数し、単位時間当たりの摂餌量を求められるか検証した。また摂餌量と成長の関係を調べた。

(2) 発光ダイオード(LED)を用いてゼブラフィッシュの視物質の吸収極大波長に近い単色光を仔魚に照射し、摂餌量ならびに成長におよぼす効果を検証した。

(3) MCH 遺伝子ならびに MCH 受容体遺伝子の cDNA クローニングを行い、成魚における発現組織分布を逆転写ポリメラーゼ連鎖反

応によって調べた。また in situ ハイブリダイゼーション法により、仔魚における MCH 遺伝子の発現部位を調べた。さらに背景色の違いと絶食が MCH 遺伝子の発現におよぼす影響を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって半定量的に調べた。

(4) 仔魚に LED 光を照射し、光刺激によって発現が変動する遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) シオミズツボワムシおよびゾウリムシの正確な定量が困難であることから、餌生物をゾウリムシからアルテミアに変更した。受精後 10 日目までは、仔魚の全長を成長の指標にし、受精後 10 日目以降はアルテミアの被摂餌量を摂食量の指標とすることで、仔魚の成長と摂餌量の測定を可能にした。

(2) 受精後 4 日目から 8 日目まで LED (青色光, 476 nm, $2.7 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; 緑色光, 533 nm, $3.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; 赤色光, 590 nm, $3.4 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) または蛍光灯 (0.8 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) を 1 日あたり 13 時間照射し、全長を測定した。その結果、赤色光および青色光被照射個体はコントロール個体 (蛍光灯照射) に匹敵する成長を示したが、緑色光被照射個体は青色光被照射個体より有意に低い成長を示した (表 1)。

受精後 10 日目以降のゼブラフィッシュに LED 光 (極大波長 355, 410, 476, 533, 590 nm) を照射し、仔魚が摂食したアルテミア個体数を調べた。その結果、波長光が短い群から順に高い平均摂食量を示した。また、それぞれの波長光群 (N=6) の平均摂食量の大小は実験終了時の平均体サイズの大きさをほぼ反映した。

表 1. LED 照射が仔魚の成長に及ぼす影響

照射光	全長(mm, 平均±標準誤差)
実験開始時	3.61 ± 0.02 (N = 39)
蛍光灯	3.80 ± 0.02 ^{AB} (N = 34)
476 nm	3.81 ± 0.02 ^A (N = 36)
533 nm	3.71 ± 0.03 ^B (N = 35)
599 nm	3.82 ± 0.03 ^{AB} (N = 35)

(3) MCH の 1 型サブタイプ (MCH1) と 4 つの MCH 受容体の cDNA をクローニングして全長塩基配列を決定した。これらの遺伝子の成魚における発現組織を調べた結果、全てが脳において発現することが確認された。一方、MCH 受容体のサブタイプのうち 3 種類 (MCH-R1a, MCH-R1b, および MCH-R2) は皮膚におい

て発現するが、残り1種類(MCH-R2 β)は皮膚において発現しないことが示唆された。このMCH-R2 β はMCHの主要なホルモン作用である皮膚の色素凝集反応に関与せず、脳における何らかの機能に関与することが示唆された。

MCH-R2 β は本研究によって初めて同定されたMCH受容体であり、既知の魚類MCH-R2よりもヒトMCH-R2に構造的に近い。ヒトはMCH受容体遺伝子を2つ(MCH-R1とMCH-R2)有する。MCH-R1とMCH-R2はいずれも脳において発現し、食欲調節に関与すると考えられている。しかしMCH-R1に比べてMCH-R2の機能は不明な点が多い。その理由の1つとして、MCH-R2がげっ歯類において偽遺伝子化していることがあげられる。モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュのMCH-R2 β はヒトのMCH-R2の機能を探る上で重要な遺伝子である。

MCH1のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、受精後5日目の視床下部においてMCHが発現することを明らかにした。このことから少なくとも受精後5日目からMCHが体色調節あるいは食欲調節に関与することが示唆された。

仔魚におけるMCH1遺伝子の発現に背地応答がおよぼす効果を検討した。受精後から摂餌を開始する5日目まで遮光条件あるいは明暗条件において飼育し、胚のMCH1遺伝子発現量を逆転写PCR法によって半定量的に調べた。その結果、両光条件による有意な差は見られなかった。さらに受精後5日目まで底面が白または黒いプレート中で飼育した胚のMCH1遺伝子発現量を調べたところ、底面が白いプレートのほうが高くなる傾向が見られた。この結果から、摂餌開始時期の胚における背地応答にMCH1遺伝子の転写調節が関与することが示唆された。

(4) 照射光の波長の違いによって成長に差があったことから、成長に関連する何らかの遺伝子の発現に波長光が影響することが示唆された。そこで受精後4日目から8日目までLED光を照射した仔魚の頭部から全RNAを抽出し、転写産物量が異なる遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に検出した。転写産物シグナルが検出された遺伝子38,956個のうち、青色光、緑色光、および赤色光群間で転写産物シグナルに2倍以上の違いがあり、かつ転写産物シグナルが十分大きい(>0.1)遺伝子は合わせて445遺伝子であった。これらのうち、ホルモンあるいはその受容体遺伝子をコードする遺伝子は14個であった。その中にはMCH1遺伝子も含まれていた。

MCH1遺伝子は青色光および緑色光被照射個体において赤色光被照射個体の約2倍の転写産物シグナルを示した。同じ実験で青色光被照射個体は緑色光被照射個体よりも高い

成長を示したが、赤色光被照射個体との成長の差はなかった。したがってMCH1遺伝子の転写産物レベルの違いは成長の違いとは無関係である。少なくとも光波長の違いによる成長差はMCH1遺伝子の発現動態だけでは説明できない。

青色光被照射個体において緑色光被照射個体よりも2倍以上高い転写産物シグナルを示したホルモン関連遺伝子として、ソマトラクチン α が見いだされた。ソマトラクチンは成長ホルモンと構造が良く似ており、脂質代謝や体色調節に関連することが報告されている。

一方、青色光被照射個体において緑色光被照射個体よりも2倍以上低い転写産物シグナルを示したホルモン関連遺伝子として、インスリン遺伝子と1型インスリン様結合タンパク質(IGFBP-1)が見いだされた。インスリンはグリコーゲン合成、脂肪合成、タンパク質合成を促進し糖新生を抑制する。さらに、筋肉、脂肪組織における糖取り込みを促進し、成長因子として成長、分化促進作用を示す。IGFBP-1は栄養状態の悪い場合やインスリン濃度が低い場合に、濃度が上昇し、インスリン様結合タンパク質(IGF)の成長促進作用やインスリン様作用を抑制する。おおまかにいえばインスリンは成長を促進し、IGFBP-1は成長を抑制する。LED光照射によるIGFBP-1転写産物シグナルの変化は仔魚の成長の違いに符合するともいえるが、IGFBP-1発現の波長応答性について、また仔魚の成長とIGFBP-1の作用の関係についてさらに検討が必要である。

以上、仔魚の脳において食欲調節に関与するホルモンと体細胞レベルの成長・代謝に関わるホルモンの一部が、特定波長光の照射によって発現変動することが、本研究によって初めて示された。ホルモン関連遺伝子の作用は相互に影響しあうので単純に論ずることはできない。今後は各ホルモン関連遺伝子の発現変動と仔魚における作用を明らかにする必要がある。

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8件)

- ① Amiya N, Mizusawa K, Kobayashi Y, Yamanome T, Amano M, Takahashi A. (2012). Food deprivation increases the expression of the prepro-orexin gene in the hypothalamus of the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zool. Sci.* 29:43-48. 査読有. doi: 10.2108/zsj.29.43

② 高橋明義, 小林勇喜, 山野目健, 水澤寛太. (2011). 魚類・光・内分泌～体色と食欲の深い仲. ビオフィリア 7, 31-36. 査読無.
<http://annex.biophilia.jp/index.php/biophilia/article/view/397>

③ Hamamoto A, Mizusawa K, Takahashi A, Saito Y. (2011). Signalling pathway of goldfish melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2. Regul. Pept. 169:6-12. 査読有. DOI: 10.1016/j.regpep.2011.04.001

[学会発表] (計 14 件)

① Mizusawa K, The MCH System of Shark is More Closely Related to the MCH System of Mammals than That of Teleosts, The 7th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2012 年 3 月 5 日, Kuala Lumpur, Malaysia

[その他]

ホームページ等

<研究代表者の所属する研究室のホームページ>

<http://www.kitasato-u.ac.jp/fish/contents/lab/112/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水澤 寛太 (MIZUSAWA KANTA)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号：70458703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし