

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19153

研究課題名(和文) 魚類の日周リズムは低水温で消失し、緑色光で回復する

研究課題名(英文) Is the circadian clock of fish lost at low water temperatures and restored 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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメ・カレイ類に緑色光を照射すると成長が促進される。成長促進効果は特に冬季に顕著である。本研究は、メダカとホシガレイにおいて低水温が多くの時計遺伝子の発現量を増大させ、発現リズムの減弱あるいはピーク時刻のずれをもたらすこと、ホシガレイにおいて緑色光照射が時計遺伝子の発現量に及ぼす影響は水温の違いによる発現変化に比べて小さいことを明らかにした。さらに、ホシガレイ脳における甲状腺ホルモンの活性化酵素の発現量が、低水温と緑色光照射のいずれによっても増加することを示した。本研究により、甲状腺ホルモンがカレイ・ヒラメ類における緑色光の成長促進効果に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らの研究成果がテレビや新聞で報道されたことにより、ヒラメ・カレイ類の緑色光照射飼育が、日本各地に導入されつつある。しかし緑色光による成長促進機構の全貌は明らかになっていない。本研究によって、甲状腺ホルモンが、低水温に対する適応だけでなく緑色光による成長促進現象にも関与することが初めて示唆された。本研究の成果は緑色光による成長促進機構の解明につながるものであり、緑色光照射飼育の普及を後押しする効果が期待される。また、本研究は、魚類で初めて甲状腺ホルモンの働きに環境光の波長スペクトルが関わることを示した。これは、学術的にも画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：Irradiating flounder with green light promotes their growth. The growth-promoting effect is particularly pronounced in winter. This study revealed that low water temperature increases the expression levels of many clock genes in medaka and spotted halibut, resulting in a weakening of the expression rhythm or a shift in the peak time, and that the effect of green light irradiation on the expression levels of clock genes in spotted halibut is smaller than the effect of water temperature on the expression levels of these genes. Furthermore, we showed that the expression of thyroid hormone-activating enzymes in the brains of spotted halibut is increased by both low water temperature and green light irradiation. This study suggests that thyroid hormones are involved in the growth-promoting effects of green light in flounder.

研究分野：魚類分子内分泌学

キーワード：メダカ カレイ 緑色光 水温 光波長 光量 時計遺伝子 甲状腺ホルモン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、緑色光照射がヒラメ・カレイ類の成長を促進することを明らかにした (Yamanome et al., 2009; Shimizu et al., 2019, 2021)。ヒラメ・カレイ類においてメラニン凝集ホルモン (MCH) は環境光に応答して体色を調節するホルモンとして働く (Mizusawa et al., 2013, 2015; Takahashi et al., 2004)。一方、哺乳類では MCH は脳の摂食中枢において摂食亢進因子として働く (Qu et al., 1996)。これらのことから緑色光照射が脳内の MCH を介して摂食中枢に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、緑色光照射がカレイ脳内の MCH 遺伝子発現量に及ぼす影響を調べた結果、緑色光照射によって MCH 遺伝子発現量が増えることも減ることもあることが判明した (Shimizu et al., 2019; Takahashi et al., 2016, 2018)。緑色光による成長促進において MCH が何らかの役割を果たす可能性は否定できないが、MCH 以外の要因が関わるということが強く示唆された。

近年、哺乳類における MCH の機能に新たな発見があった。MCH 神経はオレキシンや γ -アミノ酪酸神経とともに体内時計とエネルギー代謝系によって調節され、餌探索行動や覚醒を促すというものである (Arrigoni et al., 2019)。つまり MCH は摂食活動の起動の仲介役であり、体内時計による睡眠覚醒リズム形成が、起動の一端を担っているといえる。そこで、研究代表者らは、低水温による摂食活動の低下と緑色光照射による摂食活動の回復にも体内時計が関与するのではないかと考えた。研究開始当初、メダカでは冬季の低水温かつ短日条件が時計遺伝子 (体内時計のリズムを作り出すために必須な一連の遺伝子群) の発現量を増大させることが報告された (Nakayama et al., 2020)。しかし、時計遺伝子の発現リズムに対する水温単独の影響は不明であった。また、ヒラメ・カレイ類の体内時計に対する水温の影響や環境の光波長スペクトルの影響についての知見はなかった。

2. 研究の目的

本研究は、広い温度域に順応できるという特徴を持つメダカと水産重要魚種のホシガレイを対象として、時計遺伝子の発現動態に対する水温と光刺激の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メダカの時計遺伝子発現リズムに対する水温と光量の効果の検証

水温 25℃ または 10℃、水面光量子束密度 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (強光) または 4.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (弱光) の明暗周期 (LD12:12、6 時点灯) において、メダカを 1 週間馴致した。その後、脳と尾部 (肛門から後方の全組織) を 16 時から翌 16 時まで 4 時間毎に採取し、qRT-PCR によって時計遺伝子 *cry1a* と *cry5* の発現量を定量した。

(2) ホシガレイの時計遺伝子発現に対する水温と波長光の効果の検証

水温 21℃ または 6℃、白色光または緑色光の明暗条件 (LD12:12) 下でホシガレイを 10 日間飼育した後、暗期 (明期開始 2 時間前) と明期 (明期開始 2 時間後) に脳と肝臓を採取し、時計遺伝子 *cry1a*、*per2*、*bmal1a*、*clockb* ならびに甲状腺ホルモンを活性化する 2 型脱ヨウ素酵素の遺伝子 *dio2* の発現量を qRT-PCR によって測定した。

4. 研究成果

(1) メダカの時計遺伝子発現リズムに対する水温と光量の効果

強光条件において、水温 25℃ では脳と尾部における *cry1a* と *cry5* の発現量は明期開始直後の 8 時に増加する 24 時間リズムを示したが、水温 10℃ あるいは弱光条件では、リズムが消失するか、発現量のピーク時刻が変化した。*cry1a* と *cry5* に共通して、25℃ に比べて 10℃ において発現量が高い傾向が認められた。さらに、*cry1a* では強光条件に比べて弱光条件で発現量が高い傾向が認められた。*cry5* においても、25℃ の尾部での発現動態を除いて強光条件に比べて弱光条件で発現量が高い傾向が認められた。以上の結果は、メダカにおける中枢と末梢それぞれの体内時計のリズムが、明暗周期が一定であっても水温や光量によって複雑に変化することを示唆する。

メダカでは冬季の低水温かつ短日条件が *per2*, *cry2*, *clockb*, *bmal1* などの時計遺伝子の発現量を増大させることが本研究の開始当初に報告されていた (Nakayama et al., 2020)、しかし、*per2* と並んで明期開始時の体内時計のリセットに重要な *cry1* の発現に対する水温の影響は不明であった。本研究により、*cry* ファミリーの遺伝子発現に対する水温の影響の全容が初めて明らかにされた。さらに本研究によって、体内時計の遺伝子発現に水温が及ぼす影響は中枢と末梢とで異なり、さらに光量によって変化することが初めて明らかにされた。本研究によって得られたこれらの知見は、魚類の体内における複数の体内時計が、水温と光という環境要因に同調するメカニズムを明らかにする上で重要である。

(2) ホシガレイの時計遺伝子発現に対する水温と波長光の効果

脳における *per2* の発現量は 21℃ 区において暗期に比べて明期で有意に増加した。また、*cry1a*, *per2*, *bmal1a*, *clockb* の発現量は 21℃ 区に比べて 6℃ 区で有意に増加した。しかし、緑色光による時計遺伝子の発現動態への影響は認められなかった。脳における *dio2* の発現量は 21℃ 区に比べて 6℃ 区で有意に増加し、緑色光照射下ではさらに増加した。一方、肝臓における *dio2* の発現量は緑色光照射下の 21℃ 区において暗期に比べて明期で有意に減少した。以上の結果は、ホシガレイにおいて時計遺伝子の発現リズムが水温の影響を受けること、ならびに緑色光が脳および肝臓における *dio2* 発現に影響することを示唆する。

研究代表者らの研究成果がテレビや新聞で報道されたことにより、ヒラメ・カレイ類の緑色光照射飼育が、日本各地に導入されつつある。しかし緑色光による成長促進機構の全貌は明らかになっていない。甲状腺ホルモンは、さまざまな動物において低温に対する適応に関わることが知られている (Grau, 1988; Little, A. G., Seebacher, 2014)。本研究によって、甲状腺ホルモンが、低水温に対する適応だけでなく、緑色光による成長促進現象にも関与することが示唆された。本研究の成果は緑色光による成長促進機構の解明につながるものであり、緑色光照射飼育の普及を後押しする効果が期待される。甲状腺ホルモンの機能に環境光の波長スペクトルに関わることは鳥類では知られている (Gharahveysi et al., 2020)。しかし、研究代表者の知る限り、魚類での報告は本研究が初めてである。

【引用文献】

Arrigoni, E., Chee, M. J., Fuller, P. M. (2019). To eat or to sleep: That is a lateral hypothalamic question. *Neuropharmacology*, 154, 34-49.

- Gharahveysi, S., Irani, M., Kenari, T. A., Mahmud, K. I. (2020). Effects of colour and intensity of artificial light produced by incandescent bulbs on the performance traits, thyroid hormones, and blood metabolites of broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 1-7.
- Grau, E. G. (1988). Environmental influences on thyroid function in teleost fish. *American Zoologist*, 28(2), 329-335.
- Little, A. G., Seebacher, F. (2014). The evolution of endothermy is explained by thyroid hormone-mediated responses to cold in early vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 217(10), 1642-1648.
- Mizusawa, K., Kawashima, Y., Sunuma, T., Hamamoto, A., Kobayashi, Y., Kodera, Y., Saito, Y., Takahashi, A. (2015). Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology*, 214, 140-148.
- Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Yamanome, T., Saito, Y., Takahashi, A. (2013). Interrelation between melanocyte-stimulating hormone and melanin-concentrating hormone in physiological body color change: roles emerging from barfin flounder *Verasper moseri*. *General and comparative endocrinology*, 181, 229-234.
- Mullur, R., Liu, Y. Y., Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews*.
- Nakayama, T., Okimura, K., Shen, J., Guh, Y. J., Tamai, T. K., Shimada, A., ... & Yoshimura, T. (2020). Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9594-9603.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, 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, 243-247.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Takahashi, A., Kosugi, T., Kobayashi, Y., Yamanome, T., Schiöth, 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. *General and comparative endocrinology*, 151(2), 210-219.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yang Tingshu, Kasagi Satoshi, Takahashi Akiyoshi, Mizusawa Kanta	4. 巻 312
2. 論文標題 Effects of background color and feeding status on the expression of genes associated with body color regulation in the goldfish <i>Carassius auratus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113860 ~ 113860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2021.113860	査読の有無 有
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 Sato Iku, Kasagi Satoshi, Takahashi Akiyoshi, Mizusawa Kanta	4. 巻 787
2. 論文標題 Expression dynamics of visual opsin genes in marbled sole <i>Pseudopleuronectes yokohamae</i> during metamorphosis from the larval to the juvenile stage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145622 ~ 145622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145622	査読の有無 有
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 Daigo Yamaguchi, Satoshi Kasagi, Daisuke Shimizu, Tomoki Maeda, Akiyoshi Takahashi, Kanta Mizusawa	4. 巻 未定
2. 論文標題 A low body-color regulating ability of spotted halibut <i>Verasper variegatus</i> : Evaluation of the roles of melanin-concentrating hormone and proopiomelanocortin systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Sciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-022-01600-6	査読の有無 有
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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口大悟, 笠木聡, 清水大輔, 前田知己, 高橋明義, 水澤寛太
2. 発表標題 ホシガレイ下垂体におけるPOMC遺伝子発現の異常な背地応答性
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2021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	水澤 寛太 (Mizusawa Kanta) (70458743)	北里大学・海洋生命科学部・准教授 (32607)	
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・水産技術研究所(長崎)・グループ長 (82708)	

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
---------	---------