

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248023

研究課題名(和文) 脳内光スイッチによる魚類の成長と成熟の人為制御

研究課題名(英文) Artificial promotion of fish growth and reproduction via brain function in response to a photic environment

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) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：水産重要種であるマツカワ(Verasper moseri)の成長が、対照(屋内光)に対して、発光ダイオードを光源とする特定波長光によって促進された。この効果は、マツカワがほとんど摂餌をしない(すなわち一定の実験期間に体重が減少する)低水温でも有効であった。本研究の成果は、特定波長光照射が養殖魚の生産に有効であること示唆する。一方、成長と摂餌行動に係わる神経内分泌系の遺伝子発現は従来の知見とは異なる挙動を示したことから、特定波長光が成長を促進するしくみの解明については、今後一層の研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We found that, compared to the growth of fish under ambient lighting, the somatic growth of the barfin flounder (Verasper moseri) was stimulated by irradiation with a specific wavelength of light from a light-emitting diode (LED). The significant effects of LED light, especially green LED light, on growth promotion were observed even under low water temperature when body weight decreased because of reduced food intake during the experimental period. Our results suggest that irradiation with a specific wavelength of light could be useful in improving fish growth in aquaculture. Unexpected fluctuations were observed in the expression of hormonal genes associated with growth and feeding behavior. Thus, further experiments are necessary to understand the neuroendocrine mechanisms linking LED light and fish growth.

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：魚類 成長 特定波長光 発光ダイオード メラニン凝集ホルモン 黒色素胞刺激ホルモン マツカワ
キンギョ

1. 研究開始当初の背景

(1) 光環境と成長・成熟の関連

魚類では、まず成長促進系が優先的に働く。体サイズが成熟可能な大きさに達すると成長促進系の働きが抑制されるとともに、成熟促進系が働くようになる。魚類の成長と成熟は脳を中心とする神経内分泌系に支配される。この系に大きな影響を及ぼすのが日照時間などの光環境である。例えば、サケ科魚類を終日照明下で飼育すると、成長が著しく早まる。逆に日照時間が減少すると成熟が進む。このように、光環境が魚類生理に影響することは間違いないが、そのしくみはまだ良く判っていない。しかし、申請者らは、全色光ではなく光スペクトル中の特定波長光が魚類の神経内分泌系に作用し、これが食欲と成長に直結している可能性を示した。

(2) 光環境と食欲・成長に関する新展開

カレイ目マツカワの体重は、白色水槽では黒色水槽中よりも約40%増加する。白色水槽中の摂餌頻度が黒色水槽中よりも高いことから、白色が食欲を刺激し摂餌量の増加が成長に反映されたと考えている。白色水槽中では、代表的な食欲亢進ホルモンであるメラニン凝集ホルモン(MCH)の産生量が多いことから、結局MCHが食欲と成長を促進したと考えられる。屋内自然光において各種フィルターで水槽を覆ってマツカワを飼育したときに、成長は緑、無フィルター、青、赤の順に良好であった。蛍光灯を光源とした実験でも同様な結果が得られた。これらが示す重要な現象は、緑色光が成長を促進し、赤色光が成長を抑制することである。すなわち、養殖魚を適切な光環境下で飼育することで生産増が可能であることを示した。緑色光はニジマス稚魚の成長も促進することから、他の養殖魚にも有効であることが大いに期待される。

(3) 特定波長光の成熟への影響

上述の通り、白色水槽中ではMCH発現量が増加する。しかし、MCHニューロンが単独で活性化するのではなく、関連するニューロンにも光環境の影響が及ぶことは間違いない。そこで、成熟と性行動に関与し食欲抑制活性も有する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の脳内含量をマツカワで調べた。その結果、脳内GnRH含量は、MCHとは逆に白色水槽で低く、黒色水槽で高かった。GnRHニューロンはMCHニューロンの上流に位置してい

ることから、GnRHがMCHの産生を制御している可能性がある。これらの脳ホルモンは相反する作用によって食欲調節に関与している可能性が極めて高い。また、MCHの新たな機能として成熟への関与も考えられる。このように、背景色(白黒)が隣接して作用するMCHニューロンとGnRHニューロンの活性に影響することが明らかになった。そして、白と黒の水槽においてMCHとGnRHの産生量が逆の動態を示すことから、これらホルモンの産生ニューロンを介して成長と成熟に関わる魚類生理が特定波長光によるホルモン遺伝子の発現調節、いわば脳内光スイッチにより切り替わる可能性が生じた。

2. 研究の目的

本研究の目的を()特定波長光が魚類の食欲・成長と成熟に関わる脳ホルモンの発現調節に及ぼす効果の解明、さらに、()太陽光から有用な特定波長光を選別することに基づく、新しい効率の魚類増産システム(光養殖)の構築とした。目的達成のための主な研究内容は、次の通りとした。(A)食欲・成長と成熟に関わる様々な魚類脳ホルモンの発現に対する特定波長光の影響の解明。(B)魚類の摂餌行動と性行動に対する、特定波長光の影響を解明。(C)色覚を司る網膜タンパク質の機能を調べることによる、特定波長光が各種脳ホルモンの発現を調節するしくみの解明。(D)特定波長光と各種水産重要魚種の食欲・成長と成熟の関連の研究。実験魚には水産重要魚類のカレイ類、サケ・マス類、タイ類およびフグ類、ならびに、モデル実験魚のキンギョとゼブラフィッシュを用いることとした。

以上の目的を達成するために本研究を開始した。しかしながら、研究過程で低水温下におけるマツカワの成長促進に発光ダイオード光照射が有効であるという、重要な現象を発見をしたため、実験対象にはマツカワを中心に据え、究明する生理現象として、成長に重点をおいた。

3. 研究の方法

(1) 特定波長照射飼育

マツカワ: 光源に青(ピーク波長464 nm)、緑(518 nm)、あるいは赤色光(635 nm)を発する発光ダイオード(LED)を使用して、

その照射下でマツカワを飼育した。飼育水温は 14℃, 10℃ もしくは 7℃, 各色 LED 光照射期間を 4 週間, 水面上の光量子束密度を約 7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 照射時間を 06:00 ~ 16:30 (10.5L:13.5D) とした。屋内自然光群を対照とした。1 日 1 回, 昼前後に飽和給餌を行なった。

キンギョ: 上記と同様の LED 光照射下でキンギョを飼育した。飼育水温は 26℃, 各色 LED 光照射期間を 4 週間, 水槽底面の光量子束密度を約 4.7~6.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 照射時間を 07:00~19:00 (12L:12D) とした。1 日 1 回, 午後 1 時に飽和給餌を行なった。

(2) 分子クローニング

オブシンおよび各種ホルモンの 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 pGEM-T ベクターあるいは pT7 Blue-T ベクターに挿入し, 組換え体を調製した。これを塩基配列分析に付した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

マツカワの肝臓から調製したゲノム DNA を制限酵素 *Eco* RI, *Pst* I および *Sac* I を用いてそれぞれ切断した。アガロースゲル電気泳動後, 上記組換え体から増幅した全長オブシン cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。

(4) 視物質再構成

pGEM-T ベクターに挿入したマツカワの各種オブシン cDNA を pMT5 ベクターに組換えた。これを COS1 細胞に導入して発現させた後, 11-*cis* レチナルを添加し培養した。この再構成視物質を生成し, 吸光度を測定した。

(5) 遺伝子発現定量

各種光環境下で飼育したマツカワとキンギョにおいて, 脳内および脳下垂体内の各種ホルモン遺伝子の発現量を定量リアルタイム PCR 法により調べた。

(6) 受容体 mRNA の組織分布

キンギョの各種組織から MSH 受容体 mRNA を 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。

4. 研究成果

(1) 特定波長光とマツカワの成長

14 飼育において青, 緑および赤色 LED 光群のいずれも対照群に比べて有意に日間成長率 (体重) が増加した。LED 群の中では青

色 LED 光群に最大の値が認められた。また, 青色 LED 光群と緑色 LED 光群の日間成長率は赤色 LED 光群に対して有意に高かった。10 飼育でも同様の傾向が認められた。7 飼育では, 飼育期間中に対照群の体重が減少した。これは代謝エネルギー量が摂取エネルギー量より勝っていたためだと考えられる。このような条件でも LED 群は顕著な成長を示した。最大の効果は緑色 LED 光群において認められた。摂餌量にも日間成長率と同様の推移が認められた。

以上から, LED を光源とする特定波長光照射は, マツカワの摂餌行動を活発にし, それに応じて増加した摂餌量が成長に結びついたものと考えられる。餌量転換効率の増加に対する特定波長光の寄与は少ないであろう。

(2) 特定波長光とマツカワの神経内分泌

対照群 (屋内光下飼育群) に体重減少が認められた低水温 (7℃) 下でのマツカワにおいて, 栄養状態および食欲調節に係わるホルモン遺伝子の, 脳と脳下垂体における発現量を調べた。青色光, 緑色光および赤色光被照射群の血糖値は対照群に比べていずれも高い値を示した。これらのうち緑色光照射群の値に有意差が認められた。血中遊離脂肪酸濃度にも, 全ての実験群において対照群よりも低い値が認められた。青色光および緑色光被照射群の値は有意に低かった。これらの結果は, 緑色光被照射群の栄養状態が, 特に緑色光被照射群において良好であることを示す。

脳で発現する食欲亢進ホルモン遺伝子のうち, 青色光照射下で飼育した群の MCH 遺伝子の発現は, 対照に比べて有意に低い。緑色光被照射群の同発現量も低い, 有意差は認められなかった。赤色光被照射群での値は対照群と同等であった。オレキシンと神経ペプチド Y 遺伝子の発現に, 変動は認められなかった。一方, 食欲を抑制する黒色素胞刺激ホルモンをコードするプロオピオメラノコルチン遺伝子の発現は青色光および緑色光被照射魚において, 対照群に対して増加した。

脳下垂体で発現し, 食欲亢進に関与する成長ホルモン遺伝子の発現は, 青色光および緑色光被照射群において, 有意差は認められないものの, 減少傾向が認められた。一方, これらの実験魚において, プロオピオメラノコルチン遺伝子の発現は有意に高かった。

以上を要約すると, LED 光被照射下で日間

成長率が対照群よりも優れているにもかかわらず、食欲亢進ホルモンをコードしている遺伝子の発現量が低く、逆に食欲抑制ホルモンをコードしている遺伝子の発現量が高い。低水温下で、特定波長光がマツカワの食欲もしくは成長促進に係わる神経内分泌系および内分泌系の作用機構は、従来認められてきた様式と異なっている可能性がある。

(3) マツカワ・オプシンの特性

マツカワの光受容能を理解するために桿体オプシン(RH1)、紫外線型オプシン(SWS1)、青型オプシン(SWS2)、緑型オプシン(RH2)、および赤型オプシン(LWS)のcDNAクローニングを行った。これらオプシンのcDNAを用いて視物質を再構成して測定した最大吸収波長は以下のとおりであった; 552 nm (LWS), 506 nm (RH2-B), 490 nm (RH2-C), 482 nm, (SWS2A), 416 nm (SWS2B), 367 nm (SWS1), 494 nm (RH1)。SWS2Aは構造上は青色感受性オプシンであるが、マツカワでは緑色感受性オプシンとして機能していると考えられる。また、RH2-Aは偽遺伝子として存在していることがわかった。

一方、各オプシン遺伝子の眼球内 mRNA を成長段階別に定量した。その結果0歳齢から1歳齢にかけて約1/4~1/10に発現が減少するオプシン(LWS, SWS2BとSWS1)と、発現が変動しないオプシン(RH2BとSWS2A)、約2倍に発現が上昇するRH1の群に分かれた。

RH1は桿体において薄明視に関与し、錐体オプシンは色弁別に関与する。本研究の結果から、マツカワにおいては0歳齢から1歳齢にかけて薄明視が発達するとともに、短波長光(青色光)および長波長光(赤色光)に対する感受性が相対的に低下することが示唆された。このことはマツカワの成長に対する特定波長光の効果が成長段階によって変化する可能性を示唆する。マツカワは稚魚期には浅海に生息するが、成長に伴ってより深い海域に移動する。光量は深くなるにつれて減少するが、相対的に緑色光が多くなる。マツカワの光感受性の変化はその生態と関連していることが示唆される。

(4) 第二のメラニン凝集ホルモン

マツカワにおいて第二のメラニン凝集ホルモン(MCH2)を同定し、その特性を明らかにした。cDNAクローニングによればプレプロMCH2は25アミノ酸残基で構成されるMCH2を

含む。質量分析によって、本配列と同等のペプチドをマツカワ視床下部中に見出した。MCH2は視床下部においてプレプロMCHから翻訳後プロセッシングにより切り出されることになる。MCH2の*in vitro*色素拡散活性はMCH1と同等であった。MCH2は動物細胞中で発現させた2種類のMCH受容体相互作用した。その親和性はMCH1と同等であった。白背地で飼育したMCH2遺伝子の発現量は黒背地飼育群の値よりも高かった。これもMCH1遺伝子と同等の共同であった。一連の結果は、MCH2はMCH1とともに、マツカワ皮膚において色素凝集活性を通じて体色調節に関与することを示す。

(5) 特定波長光とキンギョの神経内分泌

キンギョを青、緑、赤LED光照射下の黒背地水槽および、蛍光灯照射下の黒背地水槽、あるいは白背地水槽で3週間飼育した。それぞれの飼育群を青/黒、緑/黒、赤/黒、蛍/黒、蛍/白と称する。

蛍/白群のMCH遺伝子発現量は蛍/黒群よりも有意に高かった。緑/黒群と赤/黒群の値は蛍/白群の値よりも有意に低かったが、蛍/白群と青/黒群の間に差は認められなかった。キンギョ脳内のMCH遺伝子発現は、必ずしも全色光ではなく、青色光等の特定波長光で誘起される可能性が示された。

一方、プロオピオメラノコルチン遺伝子の発現量は、有意差は認められなかったが、蛍/黒群が蛍/白群よりも高い傾向を示した。LED光照射群の中では、緑/黒群と赤/黒群の値が蛍/白群よりも有意に高かった。青/黒群と蛍/白群の間に有意差は認められなかった。キンギョ脳下垂体中のMCH遺伝子発現は、緑色光あるいは赤色光等の特定波長光で誘起される可能性が示された。

(6) キンギョの新規プロオピオメラノコルチン遺伝子

キンギョから黒色素胞刺激ホルモンをコードする新規プロオピオメラノコルチンcDNAを2種類クローニングした。これらをb1型およびb2型と称する。従来の知見によればこれら遺伝子のおもな発現組織は脳と脳下垂体である。これらは頭腎でも発現することから、黒色素胞刺激ホルモンがストレス応答や白血球産生などの頭腎機能に関与することが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 29 件)

Takahashi, A., Mizusawa, K., Amano, M. (2014). Multifunctional roles of melanocyte-stimulating hormone and melanin-concentrating hormone in fish: evolution from classical body color change. *Aqua-BioScience Monographs*. 7, 1-46. doi:10.5047/absm.2014.00701.0001 [査読有]

Kakizawa, S., Kaiya, H., Takahashi, A. (2014). Posttranslational modification of intercellular messenger systems. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. doi: 10.3389/fendo.2014.00027. [査読有]

Takahashi, A., Mizusawa K. (2013). Posttranslational modifications of proopiomelanocortin in vertebrates and their biological significance. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. doi: 10.3389/fendo.2013.00143. [査読有]

Takahashi, A., Kobayashi, Y., Mizusawa, K. (2013). The pituitary-interrenal axis of fish: a review focusing on the lamprey and flounder. *General and Comparative Endocrinology* 188, 54-59.

10.1016/j.ygcen.2013.03.005. [査読有]
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. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.026. [査読有]

Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Chiba, H., Tagawa M., Takahashi, A. (2012). Further evidence on acetylation-induced inhibition of the pigment-dispersing activity of α -melanocyte-stimulating hormone. *General and Comparative Endocrinology* 176, 9-17. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.

12.001. [査読有]

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

Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Saito, Y., Takahashi, A. (2012). Melanocortin systems on pigment dispersion in fish chromatophores. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* doi:10.3389/fendo.2012.00009.[査読有]

Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Sunuma, T., Asahida, T., Saito, Y., Takahashi, A. (2011). Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology* 171, 75-81. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.12.008. [査読有]

Kobayashi, Y., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Schiöth, H.B., Takahashi, A. (2010). Differential expressions of melanocortin receptor subtypes in melanophores and xanthophores of barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology* 168, 133-142. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.04.017. [査読有]

〔学会発表〕(計 68 件)

Takahashi, A., Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Saito, Y. (2013). Biological significance of the N-terminal acetyl group of α -melanocyte-stimulating hormone. 17th International Congress of Comparative Endocrinology. 7 月 16 日 (Barcelona).

Mizusawa, K., Takahashi, A. (2013). Light wavelength-specific response of melanin-concentrating hormone expression and skin melanophore in zebrafish larva. 17th International Congress of Comparative Endocrinology. 7 月 16 日 (Barcelona).

Kasagi, S., Mizusawa, K., Murakami, N., Andoh, T., Kawamura, S., Takahashi, A. (2013). Isolation and functional analysis of flounder opsins. 17th International Congress of Comparative Endocrinology. 7月16日 (Barcelona). 高橋明義, 水澤寛太, 古藤澄久, 菊地重人. (2013). 特定波長光を活用した魚類養殖技術の開発. シンポジウム: 水産における光利用技術と基礎研究の動向 平成25年度日本水産学会春季大会. 3月30日 (東京). Takahashi, A., Kobayashi, Y., Mizusawa K. (2012). Roles of two simultaneously expressed melanocortin receptor subtypes on the activity of α -MSH. 26th Conference of European Comparative Endocrinologists. 8月22日 (Zurich, Switzerland). 高橋明義, 山野目健, 阿見彌典子, 水澤寛太, 天野勝文. (2012). 特定波長光が魚類の神経内分泌系に影響を及ぼす可能性について シンポジウム: 魚類における神経内分泌現象研究の最新動向. 日本下垂体研究会第27回学術集会. 8月11日 (天童). Takahashi, A., Kobayashi, Y. (2010). Acetylation-induced changes in α -MSH activity may be related to concomitant expression of different melanocortin receptor subtypes. 6th international melanocortin meeting. 7月10日 (Utrecht, The Netherlands).

〔図書〕(計1件)

高橋明義, 奥村誠一 (共編) (2012). ナマコ学 生物・産業・文化 pp. 1-227. 成山堂書店, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 特定波長光照射によるカレイ目魚類の養殖方法
発明者: 高橋明義, 水澤寛太, 古藤澄久, 菊地重人
権利者: 学校法人北里研究所, スタンレー電気株式会社, 株式会社ケイ・エムアクト
種類: 特許
番号: 特願 2012-68668
出願年月日: 平成 24 年 3 月 26 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計1件)

名称: 多段式濾過装置
発明者: 村上圭佑, 高橋明義
権利者: 学校法人北里研究所, 株式会社ケイ・エムアクト
種類: 特許
番号: 特許第 5527663 号
取得年月日: 平成 26 年 4 月 25 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

北里大学海洋生命科学部
海洋分子生物学研究室ホームページ
<http://www.kitasato-u.ac.jp/fish/contents/lab/l12/index.html>

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

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

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

水澤 寛太 (MIZUSAWA, Kanta)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号: 70458743

朝比奈 潔 (ASAHINA, Kiyoshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 10147671

安東 宏徳 (ANDO, Hironori)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 60221743

大平 剛 (OHIRA, Tsuyoshi)
神奈川大学・理学部・准教授
研究者番号: 10361809