

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25年 6月 7日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658060

研究課題名（和文） 背景色は神経・内分泌系を介して海水適応に影響する

研究課題名（英文） Background color may modulate seawater adaptability in fish

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

研究成果の概要（和文）：以前、われわれは白背地で飼育したサクラマス (*Oncorhynchus masou*) の海水適応能が黒背地飼育群よりも優れていることを見出した。そこで、本研究では背地色の変化に応じて産生量に変化する、視床下部-脳下垂体系ホルモンの海水適応や電解質代謝への関与を調べた。主要な成果は以下の通りである。第一、にサクラマス稚魚を淡水白背地で飼育したところ、体色の明化とともに鰓の $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (NKA) 活性が増加した。第二に、視床下部由来のメラニン凝集ホルモンが *in vivo* で (NKA) 活性を高めた。そして第三に、鰓の塩類細胞においてメラニン凝集ホルモン受容体遺伝子の発現が認められた。以上の結果は、背地色がメラニン凝集ホルモンを介して鰓での浸透圧調節に関与することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：We previously found that masu salmon (*Oncorhynchus masou*) reared on a white background showed better seawater adaptability than those reared on a black background. Herein, we investigated the association of the hypothalamo-pituitary system, in which the production of hormones varies in response to background color changes, with seawater adaptability and electrolyte metabolism. The following important results were obtained. Firstly, rearing masu salmon on a white background resulted in a paler body color and an increase in the activity of $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (NKA) in gills. Secondly, *in vivo* treatment with melanin-concentrating hormone, which is produced in the hypothalamus, increased gill NKA activity. Finally, expression of the melanin-concentrating hormone receptor gene was detected in the chloride cells in gills. These results suggest that background color influences osmoregulation in gills via melanin-concentrating hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

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：水産学, 生理学, 光環境, 海水適応, 水・電解質代謝

1. 研究開始当初の背景

われわれは白色水槽中のマツカワ (カレイ目の一種) の成長は黒色水槽中よりも早いことを見出した。一般に、白背景では体色を明

化するメラニン凝集ホルモン (MCH) の視床下部含量が増える。MCH は食欲を亢進することも考えられているため、白背景での飼育によって産生量が増加した MCH が食欲をも同時に

刺激し、増加した摂餌量が成長に結びついた可能性が高いと考えられた。従来、背景色が影響を及ぼす代表的な魚類生理は、皮膚の色素胞に含まれる色素顆粒の運動、すなわち体色調節であった。われわれの成果は、背景色が魚類食欲にも影響することを示した画期的な事例である。カレイ目に続いてサケ・マス類でも白背景の成長促進効果を試したところ、シロサケではほぼ同様な結果が得られた。ところが、サクラマスは意外な結果を示した。

サケ・マス類は川で生れ海で育ち川に戻って繁殖する、代表的な溯河回遊魚である。シロサケ稚魚は孵化後短期間で海水適応能を獲得するのに対し、サクラマスは1年半後に獲得する。成長への白色水槽の効果をまずシロサケ稚魚で調べたところ、効果は淡水中では認められたが、海水中では認められなかった。サクラマス幼魚で同様の実験を行ったところ、淡水中ではシロサケと同様に白色水槽で成長が促進された。ところが、海水中では黒色水槽中で多くの個体が死亡した。これにより、海水中でサクラマス幼魚の成長に及ぼす背景色の効果を調べることは不可能となった。しかし逆に、背景色がサクラマス幼魚の海水適応能に影響するという、これまでに知られていなかった重要な現象が存在する可能性が提起された。

魚類の体色暗化には黒色素胞刺激ホルモン (MSH) が関わる。そこで、MSH 含有コレステロールペレットを海水白色水槽中のサクラマス幼魚の筋肉中に埋め込んだところ、60日以内にすべて死亡した。この実験は一度しか行っていないが、MSH がサクラマス幼魚の海水適応を阻害することを示唆する、重要なデータであった。

2. 研究の目的

申請時、本研究は代表的な体色調節ホルモンである MSH がサクラマス幼魚の海水適応に対して影響するか否かを解明することを目的とした。そのために次の4課題の解明を目的とした。(1) 海水適応に及ぼす MSH の効果。(2) MSH 遺伝子の発現に及ぼす背景色の影響。(3) MSH 遺伝子の発現に対する塩分濃度の影響。(4) MSH 受容体の発現分布と浸透圧調節との関連。

一方、メラニン凝集ホルモン (MCH) はいくつかの生命現象に関して MSH とは相反する

作用を示す視床下部ホルモンである。まず、メラニン顆粒を凝集させて体色を明るくする。また、食欲を増進して摂餌量を増やす。さらに、脳下垂体に作用して MSH の分泌を抑制する。このような相互関係がサクラマスの降海時にも延長して適用されるならば、MSH とは逆に、MCH は海水適応に対して有利に作用する可能性を考慮する必要がある。そこで、MCH についても MSH と同様に研究を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 供試魚

サクラマス (ヤマメ) (*Oncorhynchus masou*) を用いた。

(2) 白・黒水槽飼育と成長

サクラマス0歳魚(尾叉長11cm, 体重21g)を用いて、白色もしくは黒色に塗装した水槽で50尾ずつ12月から360日間飼育した。飼育9ヶ月後に体重、体長および生殖腺重量を測定した。また、脳を採取し、遺伝子発現定量に用いた。

(3) 体色関連分子のクローニング

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 をプラスミドベクターに挿入し、塩基配列分析に付した。

(4) 体色関連ホルモン受容体の組織分布

①RT-PCR 法によりサクラマスの各種組織から MSH 受容体および MCH 受容体 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。

②サクラマスの鰓を採取し、組織切片作成に用いた。DIG 標識プローブを合成し、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって体色関連ホルモン受容体の発現部位を調査した。一方、 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (NKA) α -subunit に対する特異抗体を用いた免疫染色によって塩類細胞の同定を行なった。

(5) 背景色と鰓の NKA 活性の関連

ヤマメ0歳魚(尾叉長12cm, 体重21g)を夏(8月)に、同1歳魚(尾叉長16cm, 体重56g)を秋(10月)と冬(12月)に、白色および黒色の水槽でそれぞれ40尾ずつ3週間飼育した。飼育後に鰓を採取し凍結保存した。凍結した鰓を用いて NKA 活性の測定を行った。

(6) MCH 投与が鰓の NKA 活性に及ぼす効果

ヤマメ 0 歳魚(尾叉長 12 cm, 体重 19 g)を用いて *in vivo* および *in vitro* で鰓の NKA 活性に対する MCH の効果を調べた。*In vivo* 実験では 0 (対照群), 0.1 および 1.0 $\mu\text{g}/\text{BW}$ 量の MCH を腹腔内に投与した。開始から 72 時間後に鰓を採取して凍結保存し, NKA 活性を測定した。*In vitro* 実験では MCH 濃度をそれぞれ 0 (対照群), 25, 50, 100 および 200 pmol/ml とし, ヤマメから切り出した鰓弁片を入れ, 11°C で培養した。培養開始から 24 および 48 時間後に鰓を凍結保存し, NKA 活性を測定した。

(7) 背景色と海水適応能の関連

上記実験の秋および冬季には, 飼育実験に引き続き海水移行試験を行った。人工海水を入れた白色および黒色水槽に, 秋にはそれぞれ 13 個体, 冬にはそれぞれ 16 個体を移行し, 48 時間後の生残率を比較した。

4. 研究成果

(1) 背地色と成長および遺伝子発現

白色水槽飼育群の成長は黒色水槽飼育群に比べ明らかに促進された。MCH 遺伝子の発現量は白色水槽飼育群で高い傾向がみられたものの, 黒色水槽飼育群との間に有意な差が認められなかった。しかし, 雌雄間では両水槽飼育群ともに雄の MCH 遺伝子の発現量が雌のそれより高く, 特に白色水槽飼育群において雌雄間に有意な差が認められた。さらに精子形成中の個体の MCH 遺伝子の発現量は精子形成を開始していない未熟な個体のそれより高い傾向を示した。このことから本研究で見られた MCH 遺伝子の発現量の増加は雄の性成熟に関連した現象であることが示唆された。

(2) 体色関連分子のクローニング

サクラマス的大脑から 2 種類の MCH cDNA をクローニングした。また, 2 種類の MCH 受容体 (MCH-R1 と MCH-R2) cDNA をクローニングした。さらに 5 種類の MSH 受容体 (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, および MC5R) cDNA をクローニングした。

(3) 体色関連ホルモン受容体の組織分布

MSH 受容体遺伝子の発現部位を, 特に浸透

圧調節に関連する組織に注目して RT-PCR 法により調べた。その結果, 各組織で以下のような各受容体遺伝子の発現が認められた。鰓: MC2R。心房: MC2R, MC4R, MC5R。心室: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R。腸: MC1R, MC2R。体腎: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R。

MCH 受容体遺伝子について同様の実験を行ったところ, 鰓で MCH-R1 遺伝子の顕著な発現が認められた。MCH-R1 mRNA 発現細胞は鰓の鰓弁上皮に多数存在していた。NKA 免疫陽性細胞も同様の部位に分布していたことから, MCH-R1 は鰓の塩類細胞で発現していることが示唆された。

(4) 背景色と鰓の NKA 活性の関連

白色水槽飼育魚において著しい体色の明化が認められた。この状態の個体において, 鰓の NKA 活性値は, 秋および冬季において黒色水槽飼育群よりも白色水槽飼育群で有意に高い結果となった。

(5) MCH 投与が鰓の NKA 活性に及ぼす効果

In vivo 実験においては, MCH 投与濃度が高いほどヤマメの体色の明化が促進された。MCH を 0.1 および 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ BW 量投与した群の NKA 活性値は, 対照群と比較して有意に高くなった。*In vitro* 実験では, MCH を添加した鰓の NKA 活性に, 1 日目および 2 日目ともに, いずれの濃度においても変化は見られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 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.
- ② Hamamoto, A., Mizusawa, K., Takahashi, A., and Saito, Y. (2011). Signalling pathway of goldfish melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2. *Regul Pept.* 169, 6-12.
- ③ Kobayashi, Y., Mizusawa, K., Saito, Y., Takahashi, A. (2012) Melanocortin systems on pigment dispersion in fish chromatophores. *Front. Endocrinol.* 3, Article 9, 1-6, doi:10.3389/fendo.2012.00009.

- ④ Iwata, M., Kinoshita, K., Moriyama, S., Kurosawa, T., Iguma, K., Chiba, H., Ojima, D., Yoshinaga, T., Arai, T.
(2012) Chum salmon fry grow faster in seawater, exhibit greater activity of the GH/IGF axis, higher Na⁺, K⁺-ATPase activity, and greater gill chloride cell development. *Aquaculture* 362-363, 101-108.

[学会発表] (計4件)

- ① 石塚光, 栗栖亮, 小林勇喜, 山野目健, 水澤寛太, 千葉洋明, 高橋明義 サクラマス¹の海水適応におけるメラニン凝集ホルモンの関与 平成23年度日本水産学会秋季大会(長崎) 2011.9.30
- ② 栗栖亮, 石塚光, 小林勇喜, 山野目健, 水澤寛太, 千葉洋明, 高橋明義 サクラマス¹におけるメラニン凝集ホルモン遺伝子発現に対する水槽色の効果 平成23年度日本水産学会秋季大会(長崎) 2011.9.30
- ③ 高橋明義, 山野目健, 阿見彌典子, 水澤寛太 天野勝文 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(天童) 2012.8.11
- ④ 高橋明義, 水澤寛太, 古藤澄久, 菊地重人 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(東京) 2013.3.30

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

千葉 洋明 (CHIBA HIROAKI)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号: 50236816

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

(3) 連携研究者

なし