

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380115

研究課題名(和文) 魚類におけるストレス系と摂食・生殖系との関連

研究課題名(英文) Relationship between stress and feeding-reproductive systems in teleost fish

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円、(間接経費) 3,810,000円

研究成果の概要(和文)：魚類におけるストレス系と摂食・生殖系との関連を調べた。ニホンウナギ、マダイ、トラフグ、チョウザメ、メダカなどの多くの魚類の脳内にはストレス関連ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)が存在すること、および、ニホンウナギではCRHが生殖を制御する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)とネットワークを形成することを組織学的に明らかにした。ニホンウナギの飼育実験により、飼育背景色が体色、摂餌量、成長血中コルチゾル濃度および視床下部CRH mRNA量に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Relationship between stress and feeding-reproductive system in teleost fish was examined as a basis for aquaculture. The stress-related corticotropin-releasing hormone (CRH) was detected in many teleost fishes such as Japanese eel, red seabream, tiger puffer, sturgeon and medaka by immunohistochemistry. Furthermore, it is indicated that reciprocal connections exist between the CRH neurons and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the Japanese eel. It is also indicated that background color affects body color, feeding, somatic growth, plasma cortisol levels and hypothalamic CRH mRNA levels in the Japanese eel.

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：ストレス 摂食 生殖 神経ペプチド 魚類 CRH GnRH コルチゾル

## 1. 研究開始当初の背景

長期的ストレスが魚類の摂食系と生殖系に負の影響を及ぼすことが水産増養殖において大きな問題となっている。これはおそらく、長期的ストレスが視床下部下垂体標的器官系に作用するためであると考えられるが詳細は不明である。

カレイ目マツカワを黒背景色で飼育すると白背景色で飼育する場合よりも成長が遅く、短期的ストレスの指標であるコルチゾルの血中濃度が高いため、黒背景色飼育は長期的ストレスの実験モデルとなりうる。さらに注目すべきは、黒背景色では視床下部のメラニン凝集ホルモン(MCH)の遺伝子発現量が低い点である。MCHはメラニンを凝集して体色を明化させるホルモンとして発見されたが、最近では中枢で食欲を促進する作用が注目されている。魚類のコルチゾル分泌は、視床下部下垂体間腎腺系によって制御される。すなわち、視床下部で産生される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)が下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌を促進し、ACTHが間腎腺に作用してコルチゾルが血中に分泌される。このようにCRHはストレス応答の中核をなす神経ペプチドホルモンであるが、CRH-ACTHコルチゾル系について詳細に調べた研究は魚類においては少ない。MCHも視床下部で産生される神経ペプチドホルモンであるので、視床下部におけるCRHとMCHの関係について多角的に調べることで、長期的ストレスと摂食系との関連を解明できると考えられる。

長期的ストレスは魚類の生殖系にも負の影響を及ぼす。魚類の生殖は、視床下部下垂体生殖腺系によって制御される。すなわち、日長・水温などの環境刺激に応じて視床下部で生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が産生され、下垂体からの生殖腺刺激ホルモン(GTH)の分泌を促進し、GTHが生殖腺に作用して性ステロイドホルモンの分泌を促進する。さらに性ステロイドホルモンが視床下部と下垂体にフィードバックしてGnRHとGTH分泌を制御することで性成熟が進行する。したがって、長期的ストレス条件下にあると考えられる黒背景色飼育魚をモデルとして生殖関連ホルモンの変動を調べることで、長期的ストレスと生殖との関連を明らかにできると考えられる。

長期的ストレスの影響は、摂食量、摂食リズムや遊泳活動リズムにも現われるであろう。たとえばニホンウナギは、低密度飼育環境下では夜間活動型であるが、養殖環境と同様の高密度飼育環境下では活動の日周リズムが消失し、結果的に摂餌量が増加して成長が良好となる。このように、魚類における長期的ストレスと摂食・成長との連関は複雑であることが想定されるが、その徹底的な理解は水産増養殖においても重要である。

## 2. 研究の目的

以上の学術的背景の下で本研究は「魚類におけるストレス系と摂食・生殖系との関連」と題し、ストレス系を制御するCRH-ACTHコルチゾル系と摂食と生殖を制御する神経ペプチドホルモン(MCHとGnRH)との関連を解明し、さらに環境制御によるストレス制御の基礎的知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 水産重要魚種におけるCRHニューロンの脳内分布

神経ペプチドの脳内分布はその機能を探る重要な情報となるが、CRHの脳内分布はテラピアなど限られた魚種で報告されているにすぎない。魚類全般におけるCRHニューロンの分布の普遍性あるいは種特異性を解明することを目的として、免疫組織化学染色で水産重要魚種のCRHニューロンの脳内分布を調べた。実験魚として、ニホンウナギ、マダイ、トラフグ、チョウザメ、メダカ、グッピー、ヒラメ、マツカワ、サクラマス、コイを用いた。脳をブアン液で固定後、パラプラストに包埋し、8 $\mu$ mの切片を作製し、市販の抗CRH抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。吸収試験に用いるCRHペプチド類は、市販の哺乳類型CRHおよび本研究で解明したニホンウナギ型CRHを併用した。必要に応じて、抗ACTH抗体および抗黒色素細胞刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)抗体も併用し、CRH免疫陽性繊維の下垂体への投射についても調べた。

### (2) ニホンウナギにおけるCRHとGnRHおよびCRHとMCHの脳内ネットワーク

CRHとGnRHおよびCRHとMCHとの脳内ネットワークの有無を組織学的に明らかにすることを目的とした。実験1でCRH免疫染色性が確認されたニホンウナギを用いた。抗CRH抗体と抗GnRH抗体(GnRHの共通アミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体)、および抗CRH抗体と抗MCH抗体を用いて二重免疫組織化学染色を施し、CRH神経線維がGnRH細胞体とMCH細胞体にコンタクトしているか否かを調べた。

### (3) ニホンウナギCRHのcDNAクローニングとリアルタイム定量PCR法の確立

他魚種(コイ、ニジマスなど)の既知のCRH cDNAの塩基配列を基にして縮重プライマーをデザインし、PCR法でニホンウナギCRH cDNAをクローニングした。得られた塩基配列を元にプライマーを作製し、ウナギ視床下部cDNAを鋳型としてCRHと $\beta$ -ActinのcDNA部分断片をクローニングし、塩基配列を確認した。リアルタイム定量PCR法におけるスタンダードRNAとして、得られたクローンからcRNAを合成した。遺伝子のイントロン挿入部位を予測し、ゲノムDNAのPCRによって確認

した。リアルタイム PCR 用の TaqMan プローブとプライマーを作製した。TaqMan プローブは十分長いイントロン挿入部位を含むよう設計した。cDNA を鋳型とした PCR によって単一の増幅産物が得られることを確認した。その後、ニホンウナギの視床下部サンプルから total RNA を抽出し、濃度を 10 ng/microL に調製した。上記の RNA サンプルを 1 microL ずつ用いて CRH と  $\beta$ -Actin のリアルタイム定量 PCR を行った。

(4) 飼育背景色がニホンウナギの摂食および生殖に及ぼす効果

飼育背景色がニホンウナギのストレス系に及ぼす影響について検討した。ニホンウナギ幼魚を白水槽または黒水槽に収容し、水温 25℃、明暗条件下(明期 12 時間暗期 12 時間)で一定時刻に給餌して飼育した。摂食量を毎日計測し、実験開始 20 日後と 34 日後に体色、体長および体重を比較した。さらに、血中コルチゾル濃度を時間分解蛍光免疫測定法で、視床下部 CRH mRNA 量をリアルタイム定量 PCR 法で測定した。

(5) ニホンウナギにおける血中コルチゾル濃度のコントロール法

CRH - 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 系へのコルチゾルのフィードバック機構を解明するための基礎として、人為的な血中コルチゾル濃度のコントロール法を検討した。ニホンウナギを個別飼育し、コルチゾル含有餌を与えて正確な摂餌量を算出した。給餌 3 時間後に採血して血中コルチゾル濃度を時間分解蛍光免疫測定法で測定した。

(6) CRH ペプチドの測定法の確立

脳および下垂体内の CRH ペプチド量測定のための時間分解蛍光免疫測定法を確立した。96 穴マイクロプレートに 2 次抗体で固相化した。洗浄後、BSA でブロッキングした。洗浄後、抗 CRH 抗体を 4℃で一晩反応させた。さらに、標準試料または未知試料を加えて攪拌後、ビオチン標識 CRH を加えて 4℃で一晩競合反応させた。洗浄後、ユーロピウム (Eu) 標識ストレプトアビジンを加えて 4℃で一晩反応させた。洗浄後、増強試薬を添加して Eu を遊離させて蛍光強度を測定し、標準曲線を得た。本測定系の有効性を確認するために、他の神経ペプチドとの交差率および最小検出量を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 水産重要魚種における CRH ニューロンの脳内分布

ニホンウナギ、マダイ、トラフグ、チョウザメ、メダカ、グッピーでは、基本的に CRH 免疫陽性細胞体は視床下部に、CRH 免疫陽性細胞体は脳全体に検出された。染色の特異性は吸収抗体で確認した。一方、ヒラメ、マツカ

ワ、サクラマス、コイでは、CRH 免疫陽性反応は微弱であった。

ニホンウナギにおいては、ニッスル染色を併用して CRH 免疫陽性細胞体の分布を詳しく調べた。その結果、CRH 免疫陽性細胞体は、終脳腹側野交連上部、視索前核、視索前核大細胞部、視索前核巨大細胞部、室周囲後結節核、視蓋前域、視床中心後核、内側縦束核、上綱様体核、青斑核などに検出された。その中で免疫反応性は、視索前核大細胞部、視索前核巨大細胞部、および上綱様体核において強かった。視床下部からの CRH 免疫陽性細胞体は、下垂体では前葉の ACTH 細胞と中葉の MSH 細胞に投射していた。

(2) ニホンウナギにおける CRH と GnRH および CRH と MCH の脳内ネットワーク

CRH 免疫陽性細胞体は視床下部および中脳被蓋の GnRH 免疫陽性細胞体とコンタクトしている様子が観察された。また、GnRH 免疫陽性細胞体が視索前核大細胞部の CRH 免疫陽性細胞体とコンタクトしている様子も観察された。以上の結果、CRH と GnRH が脳内でネットワークを形成する知見が得られた。なお、MCH 抗体では免疫陽性反応を検出することができなかった。

(3) ニホンウナギ CRH の cDNA クローニングとリアルタイム定量 PCR 法の確立

ニホンウナギ CRH cDNA は 902bp からなり、翻訳領域は、シグナルペプチド配列、cryptic ペプチド配列および CRH ペプチドをコードする部分からなっていた。演繹アミノ酸配列は 41 残基で哺乳類 CRH と 3 残基のみ異なっていた。得られた塩基配列情報を基に CRH のリアルタイム定量 PCR 法を確立した。

(4) 飼育背景色がニホンウナギの摂食および生殖に及ぼす効果

体色は、白水槽では明化、黒水槽では暗化した。1 個体当たりの摂餌量は黒水槽で多く、体重も黒水槽で重かった。血中コルチゾル濃度は実験開始 20 日後には両水槽間に有意差はなかったが、実験開始 34 日後には黒水槽で高い傾向があった。視床下部 CRH mRNA に関しては、まず、CRH と  $\beta$ -Actin を TaqMan 法で絶対定量し、total RNA 当たりのコピー数を算出した。ANOVA の結果、実験群間で  $\beta$ -Actin の mRNA 量 (コピー数) に有意なばらつきが認められたため、CRH と  $\beta$ -Actin の mRNA 量比を比較した。ANOVA の結果、個体差が大きく統計学的には有意ではなかったが、視床下部 CRH mRNA 量は飼育背景色の影響を受ける可能性が示唆された。今後、生殖に關与する血中の各種性ステロイドホルモンを時間分解蛍光免疫測定法で測定し、飼育背景色と生殖との関連を調べる予定である。

(5) ニホンウナギにおける血中コルチゾル濃度のコントロール法

コルチゾル含有餌摂取量と血中コルチゾル濃度との間に有意な正の相関がみられたことから、血中コルチゾル濃度のコントロールにはコルチゾルの経口投与が有効であることがわかった。今後は、視床下部 CRH mRNA 量を測定し、血中コルチゾル濃度との相関を調べる予定である。

(6) CRH ペプチドの測定法の確立

標準試料 1.6 ng/ml から 100ng/ml の範囲で標準曲線が得られた。最少検出量は 2ng/ml (100pg/well) であった。CRH と構造の類似しているウロテンシン および との交差率はともに 0.3% 以下と低く、本測定系の特異性が高いことが判明した。代表的な魚種の組織抽出物の競合曲線と標準曲線との平行性の有無を解析中である。

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4件)

Amano M, Mizusawa N, Okubo K, Amiya N, Mizusawa K, Chiba H, Yamamoto N, Takahashi A (2014) Cloning of corticotropin-releasing hormone (CRH) precursor cDNA and immunohistochemical detection of CRH peptide in the brain of the Japanese eel paying special attention to gonadotropin-releasing hormone. Cell and Tissue Research 356, 243-251.  
DOI: 10.1007/S00441-013-1784-6  
Takahashi A, Mizusawa K, Amano M (2014) Functional diversity of melanocortins and melanin-concentrating hormone: evolution from classical body color change. Aqua- BioScience Monographs 7, 1-46.

DOI: 10.5047/absm.2014.00701.0001  
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*. Zoological Science 29, 43-48.  
DOI: 10.2108/zsj.29.43

Mizusawa K, Amiya N, Yamaguchi Y, Takabe S, Amano M, Breves JP, Fox BK, Grau EG, Hyodo S, Takahashi A (2012) Identification of mRNAs coding for mammalian-type melanin-concentrating hormone and its receptors in the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini*. General and Comparative Endocrinology, 179, 78-87.

DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.07.23

[図書](計2件)

天野勝文, 小林牧人, 金子豊二, 会田勝美 (2013) 第6章 内分泌. 増補改訂版 魚類生理学の基礎, 会田勝美・金子豊二編, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 122-148.

Amano M (2013) Involvement of neuropeptides in gonadotropin secretion in teleost fish. In "Sexual plasticity and gametogenesis in fishes", Senthilkumaran B (ed). Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 1-16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

阿見彌 典子 (AMIYA, Noriko)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号: 20588503