

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658165

研究課題名（和文）高輝度蓄光顔料を利用した魚類の超省エネ成熟誘導技術開発への挑戦

研究課題名（英文）Manipulation of fish reproductive performance by long-afterglow phosphorescent pigment tools

研究代表者

竹村 明洋（TAKEMURA AKIHIRO）

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：40222103

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高輝度蓄光性顔料（ルミノーバ）を人工光源の代わりに利用することで、魚類（ルリスズメダイ）の成熟を制御する新たな方法を開発することに挑戦した。ルミノーバシートで水槽を被って魚を飼育するか、魚の頭部にルミノーバペレットを装着することで、ルリスズメダイの成熟期を延長したり非成熟期に卵巣発達を誘導したりできた。以上の結果から、ルミノーバを利用して電気エネルギーの消費を抑えた魚類の成熟誘導が可能であると結論づけられる。

研究成果の概要（英文）：

The effectiveness of the long-afterglow phosphorescent pigment (LumiNova) on the reproductive performance of the sapphire devil *Chrysiptera cyanea* was examined. When the fish were reared in aquaria covered with LumiNova sheets under natural photoperiod and temperature during the breeding season, they maintained high gonadal activity. Rearing the fish with a LumiNova pellet on their head under a programmed light-dark cycle during the non-breeding season resulted in induction of gonadal development. Because LumiNova continues to emit green light during dark phase, the extended light conditions probably contributed to active reproduction in the fish. In conclusion, long-afterglow phosphorescent pigment can be used for energy-efficient aquaculture to regulate the reproduction of fish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水圏応用科学・水圏生命科学

キーワード：サンゴ礁、ルリスズメダイ、高輝度蓄光剤、光受容体、ルミノーバ

1. 研究開始当初の背景

水圏の脊椎動物として繁栄している魚類は、生息環境の周期的な変動を感じ取りながら繁殖活動を繰り返している。温帯域に生息する魚類は一年の特定の時期（繁殖期）に生殖腺を発達させ、卵発達リズムに応じた産卵を繰り返す。この場合、繁殖に利用されている環境要因は日長や温度の周期性であり、実際に光や温度を人為的に制御することにより非繁殖期にある魚類に生殖腺の発達を誘導することができる。

光周性に基づく生殖腺の発達に網膜外光受容体が関与することがアユで報告されている。網膜外光受容体として同定されているのは Exo-rhodopsin や Vertebrate ancient-long (VAL) opsin などで、これらの網膜外光受容体は緑から青緑に最大吸収波長を持つことが明らかにされている。すなわち、網膜外光受容体の発現を制御することで魚類の成熟を自由に操れる可能性がある。環境を利用して魚類の成長や成熟を刺激しようとする試みは古くなされてきた。光をこれ

らの目的に利用する場合、白熱灯や蛍光灯がもっぱら使われてきた。近年では、発光ダイオードを利用して電力消費を抑えながら、効率の良い成長や成熟統御法の確立が模索されている。いずれの場合も、電気エネルギーを消費することによって変わりなく、人工光源の耐水性・耐塩性、さらにはメンテナンスの煩雑さなどに問題が生じている。

2. 研究の目的

本研究では、人工光源を魚類の繁殖制御に利用する時に起こる問題を一挙に解決する方法を確立することに挑戦する。そのために、高輝度蓄光性顔料を水産の現場にはじめて導入を試みる。本研究では長日条件下で生殖腺の発達が促進されるルリスズメダイを実験材料に用い、1) 成熟促進における網膜外光受容体関与の確認、2) 生体外照射による成熟誘起、そして3) 生体内照射による成熟誘起、に関する研究を期間内に行う。

3. 研究の方法

研究期間前半では、研究対象魚類の網膜外光受容体のクローニングを行うとともに、脳内における発現部位を特定する。研究期間後半では、高輝度蓄光性顔料を利用した長日条件を作出して非成熟期にある魚を飼育し、生殖腺の発達を誘起する。その方策の一つとして高輝度蓄光性顔料を含んだシートで飼育水槽を被い生体外から光を照射する。もう一つの方法として、網膜外光受容体が発現している脳の近傍に高輝度蓄光性顔料を含むペレットを装着する。対照区には蓄光性顔料を含まないシートやペレットを使って魚を飼育する。高輝度蓄光性顔料の成熟誘起効果は実験群と対照群の魚の生殖腺を組織学的に観察することで行う。

4. 研究成果

実験前段階として、ルミノーバが蓄光後に発する光を視認した。その結果、蓄光した後に2時間以上緑色の光を発光していることが確認できた(図1)。

ルミノーバの発光波長とほぼ同様の吸収波長帯をもつ網膜光受容体 (VAL opsin) の遺伝子をクローニングし、推定アミノ酸配列に基づくペプチド抗体を作成した。作成した抗体は脳及び網膜抽出物は特異的に反応し、Western blottingで 47kDa 付近に一本のバンドが認められた。また、同抗体を用いた免疫組織化学的検出の結果、眼においては網膜の水平細胞やアマクリン細胞周辺とガングリオン細胞に陽性反応が確認された。また、脳においては、間脳域の第三脳室下部の外側隆起核背部に陽性反応が確認さ

れた。

ルミノーバの発光波長と同様の吸収波長帯をもつ光受容体分子 (Rhodopsin) を遺伝子クローニングし、RT-PCR による発現組織の特定を行った。その結果、この遺伝子が網膜と脳に発現することが確認された。Rhodopsin mRNA の網膜および脳における発現局在を *In situ* hybridization で調べた結果、網膜では外核層に、脳では間脳域の外側隆起核といった第三脳室周縁の細胞に発現シグナルが確認された。

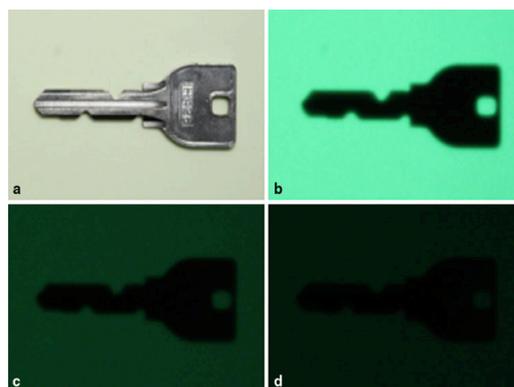


図1. ルミノーバの発光特性. a; 蓄光中のシート, b; 暗条件での発光 5 分後, c; 同 30 分後, d; 同 1 時間後.

高輝度蓄光性顔料を含むシートで水槽を被う群 (実験群) と同顔料を含まないシートで水槽を被う群 (対照群) を設け、産卵期の魚を飼育して生殖腺体指数 (GSI) を比較した結果、実験開始 45 日目までの実験群および対照群の GSI に有意な差は認められなかったが、同 60 日と 75 日目において、実験群の GSI は対照群のそれよりも有意に高くなった (図2)。卵巣を組織学的に観察した結果、実験開始 30 日と 45 日後の実験群および対照群の卵巣内は成熟した卵母細胞で占められていた。60 日後の実験群の卵巣内

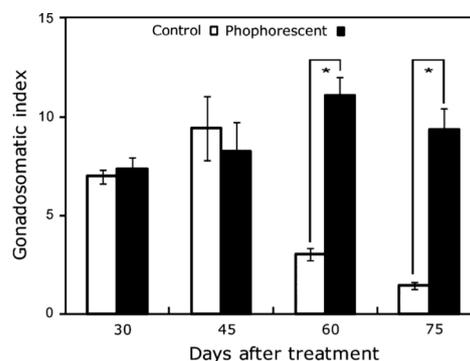


図2. 繁殖期のルリスズメダイにルミノーバ光を照射したときの生殖腺体指数の変化. ■; ルミノーバシート群, □; 対照群.

は第一次卵黄球期から第三次卵黄球期までの成熟した卵母細胞で占められていた。一方、同期間の対照群の卵巣は周辺仁期や油球期などの未熟な卵母細胞だけであった。75日後の実験群では第三次卵黄球期などの卵母細胞が観察されたのに対し、多くの対照群では周辺仁期の未熟な卵母細胞で占められていた。以上の結果から、ルミノーバから発せられる光は産卵期のルリスズメダイの産卵期延長効果を持つことが明らかとなった。

ルミノーバを含有するペレットを作成し、このペレットを非成熟期の魚(実験群)の頭部に装着した。対照群にはルミノーバを含まないペレットを同部位に装着した。明期12時間・暗期12時間の光周期と水温26°Cの条件を与えて、実験群および対照群の魚を4週間飼育して生殖腺の発達を比較した結果、実験群の魚の生殖腺体指数は対照群のそれよりも増加していた。また、卵巣を組織学的に観察した結果、実験群の卵巣には卵黄形成途上の卵母細胞が観察できたのに対し、対照群の卵巣は周辺仁期の卵母細胞のみで占められた。ルミノーバを含むペレットは暗期開始後もしばらく発光していることから、実験群の魚は長日条件におかれていたと考えられる。先行研究で眼球除去したルリスズメダイを長日条件で飼育した場合に卵巣発達を誘導できたことから、脳深部に発現する光受容体がルミノーバで作成された光を感受している可能性があった。

以上の結果から、ルミノーバを利用して電気エネルギーの消費を抑えた魚類の成熟誘導が可能であると結論づけられる。

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2件)

- (1) Bapary, M.A.J., Imamura, S. and Takemura, A. (2012). Long-afterglow phosphorescent pigment is a potent tool for manipulation of reproductive performance in the tropical damselfish *Chrysiptera cyanea*. *Fisheries Science* 78: 337-342. (査読有)
DOI: 10.1007/s12562-011-0448-2
- (2) Bapary, M.A.J., Amin, M.N. and Takemura, A. (2012). Food availability as a possible determinant for initiation and termination of reproductive activity in the tropical damselfish *Chrysiptera cyanea*. *Marine Biology Research* 8: 154-162. (査読有)
DOI: 10.1080/17451000.2011.605146

[学会発表](計14件)

- (1) Takeuchi, Y., Imamura, S., Hada, N., Nikawadori, Y. and Takemura, A. (2012). Seasonal recognition mechanisms in the photoperiodic ovarian development of the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*. Okinawa Science Canpuru 2012 Symposium (20th December), University of the Ryukyus, Okinawa.
- (2) Badruzzaman, Md., Bapary, M.A.J. and Takemura, A. (2012). Dopaminergic activity in the brain of a tropical damselfish *Chrysiptera cyanea*: possible roles of environmental light and melatonin. Okinawa Science Canpuru 2012 Symposium (20th December), University of the Ryukyus, Okinawa.
- (3) 竹内悠記・今村聡・竹村明洋(2012). ルリスズメダイの眼球内メラトニン合成におけるメラノプシンの関与. 日本動物学会第83回大会(9月13-15日), 大阪大学, 豊中市.
- (4) Sawada, Y., Takeuchi, Y. and Takemura, A. (2012). Immunohistochemical detection of nonvisual photoreceptors of the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*. International Symposium on Human Well-being and the Marine Environment in the Pacific Islands (17-18 May), Okinawa Convention Center, Okinawa.
- (5) Imamura, S., Bapary, M.A.J. and Takemura, A. (2012). Induced sexual maturation in the tropical damselfish under long-day conditions by phosphorescent pellets. International Symposium on Human Well-being and the Marine Environment in the Pacific Islands (17-18 May), Okinawa Convention Center, Okinawa.
- (6) Bapary, M.A.J., Takeuchi, Y. and Takemura, A. (2012). Light quality influences the reproductive activity in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. International Symposium on Human Well-being and the Marine Environment in the Pacific Islands (17-18 May), Okinawa Convention Center, Okinawa.
- (7) 五十嵐修吾・Bapary, M.A.J.・竹村明洋(2011). ルリスズメダイ *Chrysiptera cyanea* の雄の繁殖に伴う性ステロイドホルモン合成量の変化. 熱帯生物圏研究センターシンポジウム「沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用」(12月9-11日), 海洋博記念公園管理財団総合研究センター, 沖縄.
- (8) 今村聡・Bapary, M.A.J.・竹村明洋(2011).

高輝度蓄光シートを利用した熱帯性スズメダイの卵発達制御. 熱帯生物圏研究センターシンポジウム「沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用」(12月9-11日), 海洋博記念公園管理財団総合研究センター, 沖縄.

- (9) Bapary, M.A.J.・Takeuchi, Y.・Takemura, A. (2011). Influence of wavelengths of light on the ovarian development in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. 熱帯生物圏研究センターシンポジウム「沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用」(12月9-11日), 海洋博記念公園管理財団総合研究センター, 沖縄.
- (10) 竹内悠記・Bapary, M.A.J.・澤田 悠詩・許成杓・竹村明洋 (2011). ルリスズメダイの光周期性卵巣発達における光周期認識機構に関する研究. 熱帯生物圏研究センターシンポジウム「沖縄における水棲動物生殖の基礎と応用」(12月9-11日), 海洋博記念公園管理財団総合研究センター, 沖縄.
- (11) Takeuchi, Y., Bapary, M.A.J., Hur, S.P. and Takemura, A. (2011). A mechanism of the photoperiodic signal transduction in the ovarian development of the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*. The 8th International Workshop on the Oceanography & Fisheries Sciences of the East China Sea (24-25 November), Okinawa Jichi-kaikan, Okinawa.
- (12) Imamura, S., Bapary, M.A.J. and Takemura, A. (2011). Long-afterglow-phosphorescent pigment is a potent tool for manipulation of reproductive performance in the tropical damselfish *Chrysiptera cyanea*. The 8th International Workshop on the Oceanography & Fisheries Sciences of the East China Sea (24-25 November), Okinawa Jichi-kaikan, Okinawa.
- (13) Bapary, M.A.J., Takeuchi, Y. and Takemura, A. (2011). Long wavelengths of light stimulate the ovarian development of a tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. The 8th International Workshop on the Oceanography & Fisheries Sciences of the East China Sea (24-25 November), Okinawa Jichi-kaikan, Okinawa.
- (14) 竹内悠記・Bapary, MAJ・朴 龍柱・許成杓・竹村明洋 (2011). ルリスズメダイの光周期性卵巣発達に関わる網膜外光受容体の探索. 日本動物学会第82回大会(9月21-23日), 旭川市大雪クリスタルホール, 北海道.

[その他]
ホームページ等
<http://www.takemura-lab.jp/index>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 明洋 (TAKEMURA AKIHIRO)
琉球大学・理学部・教授
研究者番号：40222103