

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780192

研究課題名(和文) キンギョのまだら模様体色パターン形成における体色調節ホルモンの役割

研究課題名(英文) Role of melanotropin in the formation of calico pattern on goldfish skin

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：キンギョのまだら模様は皮膚の色素胞の分布の違いによってもたらされる。本研究では色素胞の分化と維持に体色調節ホルモンが果たす役割を検討した。シュブンキン(Shubunkin)の黒色素胞と黄色素胞ならびにワキン(Wakin)の黄色素胞において特異的に発現するMCH受容体とMSH受容体が、これらの色素胞の分化と維持に関わることが明らかとなった。一方、MSH受容体のアンタゴニストであるASPIは、シュブンキンのまだら模様形成に関与しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Teleosts can change their skin color in response to lighting conditions. Typical hormonal peptides associating color changes are melanin-concentrating hormone (MCH) generated in hypothalamus, melanocyte-stimulating hormone (MSH) generated in pituitary, and agouti-signaling protein (ASP) in skin. These peptides cause color pigments to be dispersed or concentrated, and control the proliferation and maintenance of chromatophores. Shubunkin, a breed of goldfish, has a calico pattern on the skin. This study was undertaken to elucidate the function of these hormonal peptides in the pattern formation of this fish. The results suggested that: 1) specific subtypes of MCH receptor and MSH receptor (MCHR2, MC1R, and MCSR) might have an important role in the proliferation and maintenance of melanophores and xanthophores, and 2) ASP might not be involved in the formation of the calico pattern.

研究分野：魚類内分泌学

キーワード：キンギョ 皮膚 鱗 体色パターン 体色変化 色素胞 ホルモン 受容体

1. 研究開始当初の背景

黒色素胞刺激ホルモン (MSH) とメラニン凝集ホルモン (MCH) は硬骨魚類皮膚の各種色素胞において色素運動を調節する体色調節ホルモンである。MSH は色素胞の分化も誘導する。MSH の作用を拮抗阻害するアグーチシグナリングタンパク質 (ASP) はキンギョ (ワキン) において腹側の皮膚で特異的に発現し、体色の背腹パターンを形成する。いっぽう、シュブンキンやニシキゴイに見られるような、不定形まだら模様パターンの形成にかかわる分子メカニズムはよくわかっていない。近年、申請者らは色素胞において発現する MSH 受容体の種類とその数が MSH による色素拡散作用に相違をもたらすことを明らかにした。この相違は色素胞の分化にも関わる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではキンギョの 1 品種であるシュブンキンをモデルとして、まだら模様パターン形成における MSH、MCH、およびそれらの受容体と ASP の役割を明らかにすることを目的とした。また黄色素胞のみをもつワキンをモデルとして MSH 受容体と MCH 受容体の発現動態を詳細に解析し、色素胞の分化におけるこれらのホルモンの役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シュブンキン

背景色がシュブンキンの鱗色素胞に及ぼす影響を検証した。シュブンキンを 14 日間白水槽または黒水槽で飼育した後、それぞれの水槽のキンギョを白水槽と黒水槽に分配してさらに 14 日間飼育した。この過程における体色と鱗の色素胞の変化を調べた。

MSH 受容体 (MCR 各サブタイプ)、MCH 受容体 (MCHR 各サブタイプ)、ならびに ASP の皮膚類型別にみた発現分布を明らかにするため、皮膚を部位と色によって類型化し、それぞれの皮膚片から RNA を抽出して、逆転写 PCR (RT-PCR) 法により mRNA を検出した。RT-PCR にはワキンの MC1R ~ MC5R を増幅するプライマーを用いた。本プライマーによって、シュブンキン脳 RNA を鋳型としたときにすべての標的遺伝子が増幅されることを確認した。さらに、鱗を黒色素胞と黄色素胞の有無によって 4 種類に分類し、RT-PCR 法により MCR と MCHR の mRNA を検出した。

(2) ワキン

ワキンの MC1R、MC5R、MCHR、および ASP を cDNA クローニングして mRNA の定量系を新たに構築した。ワキンの鱗の色素胞における MC1R、MC5R、MCHR2 の特異的発現を検証するために、シングルセル PCR 法、マイクロダイセクションと RT-PCR の組み合わせによる方法、ならびに鱗のホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (WISH) 法による各種

mRNA の検出を行った。

ワキンを黒背景または白背景下において一定期間飼育した。鱗 1 枚当たりの黄色素胞数を光学顕微鏡観察により算出した。また鱗内の MC1R、MC5R、MCHR2 mRNA 含量をリアルタイム PCR 法により測定した。さらに脳および下垂体における MCH と MSH 前駆体の mRNA の含量を測定した。

4. 研究成果

(1) シュブンキン

シュブンキンは背景色の明暗に応じて体色の明暗を変化させること、黒色素胞と黄色素胞どちらにおいても、黒背景下では色素顆粒が拡散し、白背景下では色素顆粒が凝集することが明らかとなった。以上の結果から、シュブンキンにおいて鱗の色素胞に対して体色調節ホルモンが作用する可能性が示された。

シュブンキンの皮膚片または鱗から抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR を行った。その結果、皮膚に MC1R、MC5R、MCHR2、ならびに ASP が発現することが RT-PCR 法により示された。さらに MCHR2 の発現は背側皮膚において腹側皮膚よりも多いこと、ASP の発現は腹側皮膚において背側皮膚よりも多いこと、皮膚の色の違いは両者の発現量と関連しないことが示唆された。MC1R と MC5R の発現と皮膚の色との関係は明確ではなかった。また、鱗においては、MC1R と MC5R は黒色素胞と黄色素胞のどちらにも発現するが、MC3R が色素胞またはそれ以外の細胞に発現することが示唆された。皮膚片 (鱗を含む) RNA を鋳型とした RT-PCR において MC3R の mRNA が検出されなかった理由としては、MC3R の発現レベルが MC1R、MC5R に比べて低いことが原因と考えられる。MC1R と MC5R の演繹アミノ酸配列をシュブンキンとワキン間で比較した結果、MC1R には 2 残基 (K104T、S130F、ワキンシュブンキン)、MC5R には 3 残基 (A6S、T26A、F166L) に違いが認められた。シュブンキンとワキン間のアミノ酸一致率は MC1R、MC5R とともに 99% であり、機能には違いがないことが推測された。

(2) ワキン

WISH 法によってワキンの鱗黄色素胞に MC1R、MC5R、ならびに MCHR2 が発現することを明らかにした。

黒背景または白背景下において、ワキンの体色はそれぞれ暗化または明化した。この変化は 15 日以内に起こり、鱗の色素胞数の変化を伴う形態学的体色変化であることを確認した。また、このとき鱗における体色調節ホルモン受容体の発現量が変化することを明らかにした。MSH、MC1R、および MC5R の発現レベルは黒背景下において白背景下よりもおおむね高く、これは MSH - MSH 受容体間の相互作用が盛んになったことを反映していると考えられる。いっぽう、MCH の発現レ

ベルは白背景下において黒背景下よりも高く、背側の鱗において MCHR2 の発現レベルは黒背景下において白背景下よりも高かった。MCHR2 の発現調節には、MCH - MCH 受容体間の相互作用以外の要因が関与する可能性がある。

(3)総括

以上の結果から、シュブンキンにおいてもワキンと同様に体色調節ホルモンが黒色素胞と黄色素胞の調節に関わること、黒色素胞と黄色素胞は、いずれも同種の体色調節ホルモン受容体 (MC1R、MC3R、MC5R、MCHR2) を発現していることが示唆された。ワキンの黄色素胞の解析によって、これらの受容体は色素胞の分化と維持に関わるものと推測された。シュブンキンの皮膚における ASP の発現分布に体色との関連は見いだされなかったことから、まだら模様を規定する部位特異的因子が別に存在する可能性が考えられた。

国内外において本研究に類する研究はこれまでにない。まだら模様は、キンギョの近縁種であるニシキゴイの特徴でもある。模様はニシキゴイの商品価値を決める重要な要素であり、その形成機構の解明が求められている。本研究によって同定された体色調節ホルモン受容体群をマーカーとして、色素胞の分化過程を詳細に調べることにより、本研究分野の一層の進展が見込まれる。

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 10 件)

Mizusawa K, Kawashima Y, Sunuma T, Hamamoto A, Kobayashi Y, Kodera Y, Saito Y, Takahashi A. Involvement of Melanin-Concentrating Hormone 2 in Background Color Adaptation of Barfin Flounder *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol., 214, 140-148, 2015.4. 査読有.

doi:10.1016/j.ygcen.2014.07.008

Kasagi S, Mizusawa K, Murakami N, Andoh T, Furufuji S, Kawamura S, Takahashi A. Molecular and Functional Characterization of Opsins in Barfin Flounder (*Verasper moseri*). Gene 556(2), 182-191, 2015.2. 査読有. doi:10.1016/j.gene.2014.11.054

Kobayashi Y, Mizusawa K, Arai Y, Chiba H, Takahashi A. Inhibitory Effects of β -endorphin on Cortisol Release from Goldfish (*Carassius auratus*) Head Kidney: An *in vitro* study. Gen. Comp. Endocrinol., 204, 126-134, 2014.8. 査読有.

doi:10.1016/j.ygcen.2014.05.001

Amano M, Mizusawa N, Okubo K, Amiya N,

Mizusawa K, Chiba H, Yamamoto N, Takahashi A. 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 Tissue Res., 356(1), 243-251, 2014.4. 査読有.

doi:10.1007/s00441-013-1784-6

Takahashi A, Mizusawa K, Amano M. Multifunctional roles of melanocyte-stimulating hormone and melanin-concentrating hormone in fish: evolution from classical body color change Aqua-BioScience Monographs 7(1), 1-46, 2014.4. 査読有. doi:10.5047/absm.2014.00701.0001

Takahashi A, Mizusawa K. Posttranslational Modifications of Proopiomelanocortin in Vertebrates and Their Biological Significance. Front. Endocrinol., 4, 143, 2013.10 査読有. doi:10.3389/fendo.2013.00143

Takahashi A, Kobayashi Y, Mizusawa K. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.005

Mizusawa K, Kobayashi Y, Yamanome T, Saito Y, Takahashi A. Interrelation between Melanocyte-stimulating Hormone and Melanin-concentrating Hormone in Physiological Body Color Change: Roles Emerging from Barfin Flounder *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol., 181, 229-234, 2013.1. 査読有.

doi:10.1016/j.ygcen.2012.09.026

Mizusawa K, Amiya N, Yamaguchi Y, Takabe S, Amano M, Breves JP, Fox BK, Grau EG, Hyodo S, Takahashi A. Identification of mRNAs Coding for Mammalian-type Melanin-concentrating Hormone and Its Receptors in the Scalloped Hammerhead Shark *Sphyrna lewini*. Gen. Comp. Endocrinol., 179(1), 78-87, 2012.7. 査読有.

doi:10.1016/j.ygcen.2012.07.023

Kobayashi Y, Chiba H, Mizusawa K, Suzuki N, Cerda-Reverter JM, Takahashi A. Pigment-dispersing Activities and Cortisol-releasing Activities of Melanocortins and their Receptors in Xanthophores and Head Kidneys of the Goldfish *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 177(1), 213-214, 2012.5. 査読有.

〔学会発表〕(計 20 件)

水澤寛太, 友松将巨, 高橋明義 光環境が自発摂餌キンギョの成長と摂餌におよぼす影響 平成 27 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学(東京都、品川区) 2015.3.30

笠木 聡, 水澤寛太, 高橋明義 カレイ目魚類における視覚オプシン機能の進化 平成 27 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学(東京都、品川区) 2015.3.28

Kasagi S, Mizusawa K, Takahashi A. Visual perception and neuroendocrine modulation in barfin flounder (*Verasper moseri*). The 39th Annual meeting of the Japan Society for Comparative Endocrinology 基礎生物学研究所(愛知県、岡崎市) 2014.11.08

Mizusawa K, Kanda T, Yamamura Y, Cerda-Reverter JM, Takahashi A. Movement of the xanthophore population induced by reciprocal transplantation of dorsal and ventral scales in goldfish. The 39th Annual meeting of the Japan Society for Comparative Endocrinology 基礎生物学研究所(愛知県、岡崎市) 2014.11.08

栗栖 亮, 千葉洋明, 水澤寛太, 田畑満生, 高橋明義 ヤマメの精子形成とメラニン凝集ホルモン遺伝子発現に及ぼす背景色の影響 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 九州大学(福岡県、福岡市) 2014.9.20

Takahashi A, Kasagi S, Mizusawa K. Relationship between a specific wavelength of light and neuroendocrine system in fish. 27th conference of European Comparative Endocrinologists. University of Rennes (France, Rennes,) 2014.08.26

水澤寛太, 大谷冴葉, 屋代大貴, 高橋明義 LED 光がゼブラフィッシュ仔魚の黒色素胞におよぼす影響 第 27 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 北里大学(神奈川県、相模原市) 2014.8.21

笠木 聡, 水澤寛太, 高橋明義 カレイ目魚類における視覚オプシン機能の進化 第 27 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 北里大学(神奈川県、相模原市) 2014.8.21

笠木 聡, 水澤寛太, 高橋明義 カレイ目魚類における視覚オプシンの構造と機能の特性 平成 26 年度日本水産学会春季大会 北海道大学(北海道、函館市) 2014.3.30

水澤寛太, 大谷冴葉, 屋代大貴, 高橋明義 ゼブラフィッシュ仔魚の黒色素胞の消長と色素拡散度に対する LED 光の効

果 平成 26 年度日本水産学会春季大会 北海道大学(北海道、函館市)

2014.3.29

山村 豊, 水澤寛太, 高橋明義 キンギョの背地色応答に伴う体色変化およびメラノトロピン類の動態 平成 26 年度日本水産学会春季大会 北海道大学(北海道、函館市) 2014.3.29

石塚 光, 千葉洋明, 水澤寛太, 田畑満生, 高橋明義 ヤマメの海水適応とメラニン凝集ホルモン遺伝子発現に及ぼす背景色の影響 平成 26 年度日本水産学会春季大会 北海道大学(北海道、函館市) 2014.3.29

水澤寛太, 高橋明義 小型魚類における特定波長光選好性 第 38 回日本比較内分泌学会大会・第 40 回日本神経内分泌学会学術集会合同大会 宮崎大学(宮崎県、宮崎市) 2013.10.25

笠木 聡, 荒井洸介, 野村洋輔, 水澤寛太, 千葉洋明, 高橋明義 サクラマスのメラノコルチン受容体の発現組織 平成 25 年度日本水産学会秋季大会 三重大学(三重県、津市) 2013.9.20

水澤寛太, 高橋明義 ゼブラフィッシュ仔魚のメラニン凝集ホルモン遺伝子発現に対する単色光の効果 平成 25 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学(東京都、品川区) 2013.3.29

山村 豊, José Miguel Cerda-Reverter, 水澤寛太, 高橋明義 キンギョ皮膚におけるメラノトロピン類受容体の動態 平成 25 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学(東京都、品川区) 2013.3.28

笠木 聡, 水澤寛太, 村上直人, 安藤 忠, 河村正二, 高橋明義 マツカワおよびヒラメ眼球に発現する視物質遺伝子の機能解析 平成 25 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学(東京都、品川区) 2013.3.27

荒井洸介, 水澤寛太, 坂本竜哉, 高橋明義 アカエイにおけるメラノコルチン受容体の構造 第 37 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム 福井大学(福井県、福井市) 2012.11.30

笠木 聡, 水澤寛太, 村上直人, 安藤 忠, 河村正二, 高橋明義 マツカワ眼球に発現する視物質遺伝子の機能解析 第 37 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム 福井大学(福井県、福井市) 2012.11.30

水澤寛太, 高橋明義 小型魚類の光波長選好性 第 25 回「北里大学バイオサイエンスフォーラム」研究会 北里大学(東京都、港区) 2012.8.2

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

北里大学海洋生命科学部
魚類分子内分泌学研究室
<http://www.kitasato-u.ac.jp/fish/contents/lab/l12/k-research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし