

## 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 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580200

研究課題名（和文） 発光ダイオード単波長照射によるトラフグの性転換誘導

研究課題名（英文） Effect of LED light spectra on the behavior, growth and gonadal sexual differentiation in the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*

## 研究代表者

山口 明彦（YAMAGUCHI AKIHIKO）

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：10332842

研究成果の概要（和文）：攻撃性の高いトラフグ仔魚にLED単波長を照射し、色覚による行動パターンと成長および生殖腺の性分化への影響を調査した。赤色照射群は水槽壁を“つつく”特徴的な攻撃・逃避行動を示したが、青色照射群は分散傾向にあった。赤色群は青色群に比べ成長がばらつき、初期減耗が観察された。一方、ストレス性の性転換は確認できなかった。これらの結果は、自然環境下において色波長がトラフグ仔魚の活動要因の一つであることを示す。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of two different wavelengths-blue (peak at 465 nm) and red (peak at 625nm) on the behavior, somatic growth and sexual gonadal differentiation of the young Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. The light sources were used as LED with one wave length. Under the red light condition, the fry (one week after hatch) showed the strange behaviors that they moved to the edge of the water tank, gathered and picked at the wall with the high aggressiveness. In contrast, under the blue light, they kept constant distance and swam apart from the water tank wall. Pufferfish bred by each wavelength has the gonadal sex identical to the genetic sex. As for the puffer bred by a red light, unevenness was confirmed to the total length after irradiation in comparison with natural light or blue light within one week, and the tendency continued afterwards. These results indicate that the color wavelength is one of the factors to decide the actions (aggression, escape, relief etc.) of the pufferfish larvae under the natural environment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生殖生物学・内分泌学・細胞生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：育種、アロマトーゼ、環境情報、生殖細胞、色波長

1. 研究開始当初の背景  
魚類は色覚が発達しており、成魚では色情報

が視物質（オプシン）を介し、性ホルモンの合成、性行動を誘導する例も知られる。しか

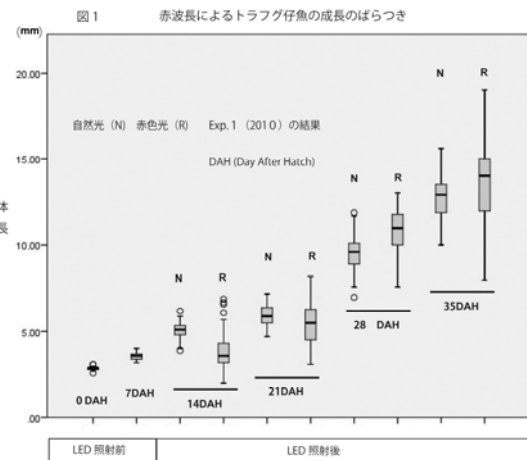
し、色覚が魚類仔稚魚の行動、性分化、成長にどのような影響を及ぼすのかはほとんど解明されていない。そこで本研究では、発光ダイオード (LED) 光源を用いた単一波長環境下で孵化直後からトラフグを飼育し、個体の成長および生殖腺の発達を調査すると同時に、脳内でさまざまな作用を行うエストロゲン (E2) の合成を制御する脳型アロマターゼの発現、局在、活性機構についての解析を進めている。生殖腺の性分化、性転換は脳神経回路、視床下部や脳下垂体からのホルモンによって制御されており、これらの伝達経路の解明が性操作法の開発に有効と考えられる。脳神経系は環境情報の入り口である視細胞と連結している。魚類にとって、外界からの光シグナルは重要な情報源であり、ゼブラフィッシュやキンギョ、メダカなどでは色を見る視物質 (オプシン) に関しては、赤 (R)、青 (B)、緑 (G) に加え紫外線領域 (U) に吸収波長をもつ4種類あり、ヒト (3色)、マウス (2色) と比べむしろ発達している。これらは魚類がさまざまな光環境の中で適応した結果と考えられる。トラフグでは孵化後から、G と B、一週齢からは R が発現し発育段階における光感受性の変化が確認されていた。また、種苗飼育の現場では“クロレラ入りの青、緑色が稚魚を落ち着かせ共食いを防ぐ”などの経験則が知られ、色覚とホルモンの相関が考えられている。実際、栽培魚種のマツカワ (大型のカレイ) を用い、緑色での成長促進や、赤色光での性の偏りを報告している [J. Exp. Zool. A. 311(2), 73-79, 2009]。しかし、稚魚期の色覚感受性と性ステロイドホルモン合成および生殖腺の性分化との関連についてはほとんど研究されていないのが現状であった。トラフグではすでに性決定領域が明らかになっており、稚魚期から個体ごとに性判別可能であった。また、稚魚期に高温 (29 度) 処理しても性転換が起きず、それ以上の温度では生殖細胞が死滅する事、一方深層海水などの低温では雄に性が偏るなどの報告もあった。また、当研究室でのアロマターゼ阻害実験では、全て雄に性転換したことから、性分化期 (5-6 週齢) でのアロマターゼ活性が性分化に重要であることは判明していた。しかしアロマターゼは脳型・卵巣型の2種類あり、どちらのアロマターゼが性分化に重要なのかは不明であった。トラフグを本研究に用いる利点としては、(1) 色照射により安全に環境情報による性転換が可能であれば、白子の価値の高い雄トラフグを効率よく生産可能であり、(2) トラフグゲノムデータベースを利用することにより、各色波長によって影響を受ける可能性のあるエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ (Cyp19b) や神経ホルモン等の脳での発現量や領域が詳細に解析できると考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 一般に海産魚の場合、青～緑色 (450～550 nm) を好み、赤色 (620-660 nm) を嫌うといわれている。これは水深 10メートル以上の海水では赤色はほとんど吸収され見えないからと考えられている。しかし、仔魚は餌を求め水面下に集まることも多く、この仮説が一般的であるかどうかはわかっていない。単波長 LED (赤、青) 照射下で孵化直後からトラフグを飼育し、それぞれの波長間で性比に違いがあれば、性分化期に色覚情報を介した脳神経からエストロゲン合成までの伝達経路の存在が示唆される。そこで、異なった単一色波長で飼育することにより、トラフグ仔稚魚の行動を観察し、成長を記録する。さらに性分化完了まで飼育後、性転換の有無を確認する。
- (2) 脳型アロマターゼが光 (色覚) 情報と性分化や行動との接点を担う可能性がある。そこでまず成魚においてアロマターゼおよびエストロゲン受容体についてその発現時期や部位を調べることで、仔稚魚期のエストロゲンの機能解析のための基盤構築を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) LED 照射区の仔稚魚の成長と行動観察



孵化後 1 週間目の仔魚期から 1 トン水槽を暗室内にセットし、発光ダイオード (LED) 光源を水槽上部から、赤色光 (625 nm)、青色光 (465 nm) ・ 14 時間明期 (0.25 kLux) の条件下で照射し飼育を行った。各水槽 5000 粒から孵化した稚魚を用いた。孵化直後の稚魚から幼魚にかけての色覚と性分化および成長・行動について解析を行った。また、自然光区も同様に調査を行った。1 週間から 10 日間隔で、仔稚魚をホルマリン固定し、50%エタノール下で体長測定、および写真撮影を行った。3 か月飼育後生殖腺を摘出し、mRNA を抽出後 cDNA 合成を行い、精巣特異的転写因子 DMRT1 および卵巣で発現量の多い Cyp19a のプライマーを用いた RT-PCR 法により雌雄判別を行った。また生殖腺の組織切片を用い

た判別も併用した。遺伝的性判別にはトラフグ性染色体特異的な領域 (f2006) 内部特異的プライマーを用いた STR 解析により判別した。給餌は 30 日間 S 型、または L 型ワムシを用いて、またアルテミアは 20 日齢から 40 日齢まで配合飼料と併用した。40 日齢以降は配合飼料のみで飼育を行った。

行動観察は広角水中カメラと上部からは一般ビデオカメラ (HandyCam) を用いて撮影した。

LED 照射実験は計 3 回行った。

実験 1 2010 年 4 月～7 月 (赤単独区のみ)

実験 2 2011 年 4 月～7 月 (赤単独区 青単独区) 実験 3 2013 年 3 月～ (赤青混合区 青単独区、現在続行中)

#### (2) ステロイドホルモンの測定

アロマターゼの活性測定には ELISA 法 (CAYMAN, IBL) を用いた。未成熟および発達成熟した精巢をもつ 2-3 年目成魚トラフグから脳の各パーツ (終脳、間脳、視葉、小脳、視床下部下葉、延髄、脳下垂体)、を取り出しリン酸緩衝液でホモゲナイズ後、テストステロン (T)、アンドロステンジオン (AD) を基質に用いエストロゲン (E2)、エストロン (E1) への変換活性を単位タンパク量当たりで換算した。血清中の性ステロイドホルモン (T、11-KT、E2、E1) の測定に関しても ELISA 法を用いた。各個体の成熟度合は GSI 値を用いた。

(3) 脳型アロマターゼを認識するアロマターゼ抗体 (ウサギ血清) を作製し、脳と生殖腺での分布を免疫組織学的に解析した。同様に脳各パーツと精巢片からタンパク質を抽出後、SDS-PAGE で展開しウエスタンブロット法により解析した。また 2 次元電気泳動は 8 M 尿素で抽出した終脳および視床下部下葉の抽出物を 1 次限目アガロースゲル (pI5-10)、二次元目は SDS-PAGE により展開し、ウエスタンブロットにより脳型アロマターゼ蛋白質の等電点を確認した。

### 4. 研究成果

(1) LED 照射によるトラフグ仔魚の成長への影響 (図 1)

赤色波長は 2 回の実験 (Exp1,2) で照射後 1 週間以内に成長阻害が確認できた。測定体長は分散傾向にあり自然光と比べ有意差が認められた。個体数も減少が激しかったためか、その後は大きく成長する個体の分散化がさらに進んだ。青色光は 2 週齢での体長測定で体長平均値にばらつきが自然光よりも少なく平均化していた。このことは赤色波長が一部の個体によっては成長促進を促すこともあるが、ほとんどの個体には阻害効果がある

と考えられた。自然光でのばらつきは、赤色波長による影響と推測される。残存率は自然光と青色光には差がなかったが、赤色光では低減率が激しかった。そこで赤色と青色の混合比の調節によりバランスのとれた成育が可能になると考えられたので、現在 Exp3 により赤青各波長の照射時間の比を変え、解析を行っている。

#### (2) 単波長照射による生殖腺性分化への影響

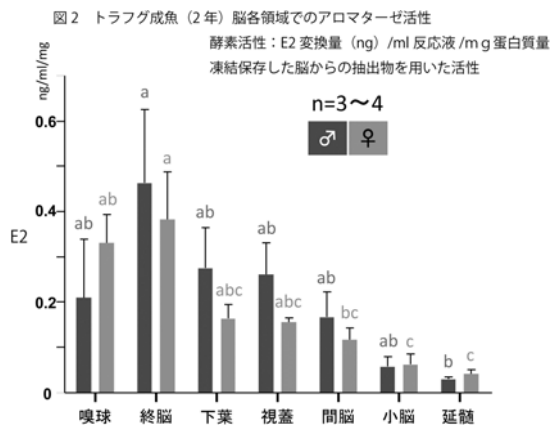
魚種によっては赤色光により性転換が起きる報告があるが、3 か月飼育後のトラフグで解析した結果、性転換が起きた個体はみつからなかった。また、生殖腺の発達異常なども確認できなかった。このことは、トラフグが遺伝的な性決定後は、ストレスなどによって誘導されるコルチコイド系ステロイドホルモン経路では性転換しない型の魚種であることを示唆している。

#### (3) 単波長照射による仔魚の行動解析

赤色照射によりトラフグ仔魚に特徴的な行動が見られた。水槽壁側に集まり群れて壁をついたり互いに攻撃したりする。我々はこれを“つつく”行動と呼んでいるが、同じ照度の青色では同様の行動は見られなかった。自然光でも同様のつつく行動は見られるが、赤色ではその誘導の再現性が高く興味深い。約 1 か月間この行動は確認できる。つつく行動は、攻撃・逃避・ストレス反応に類似したものと考えられるが、更なる研究調査が必要である。赤色照射群は深い位置まで潜る傾向があったが、一方青色照射群は海面下に群がる傾向にあった。ビデオ撮影によりトラフグ仔魚は単波長を認識することが結論づけられた。すなわち仔魚の行動が生息環境の色波長の混合比で決定される可能性があるという事である。

#### (4) 脳型アロマターゼの発現と酵素活性

他魚種の研究から、色波長と行動をリンクさせるものとしてアロマターゼおよびエストロゲン受容体の解析が必要と考えられた。そこで、抗アロマターゼ抗体を用い、成魚の脳領域での分布を調査した。トラフグでは、特に終脳と視床下部下葉で発現が著しく高く、ラジアルグリア細胞での発現が確認できた。また、脳でのアロマターゼ分子量は SDS-PAGE 上では 50 kDa であり、cDNA からの推定分子量 55 kDa より小さかった。二次元電気泳動による等電点が 7.0 であることから、翻訳後に N 末の疎水性膜貫通領域がトリミングされるものと考えられた。テストステロンを基質と用いた ELISA による酵素活性 (E2 変換量) と発現領域は完全に一致した (図 2)。



脳型アロマターゼは脳だけでなく成熟精子でもっとも強い発現がみられたが、活性が確認できなかったことから、成熟精子はエストロゲンの合成には関与していないと考えられた。また、脳下垂体でも強い発現が確認できた。魚類での脳型アロマターゼの転写はエストロゲン(E2)のエストロゲン受容体(ER)を介した自己転写増幅によって制御されることが提案されている。

そこで、アロマターゼ(Cyp19b)および数種のERで定量PCRを行ったところ、アロマターゼ酵素活性とCyp19bおよびER $\alpha$ 等のmRNA転写量とに正の相関が認められた。このことはトラフグ脳でも自己増幅ループが機能していることを示唆する。

トラフグは他魚種と異なり、雌の成熟が雄より遅れる。(雄では通常2年、雌では3-4年)卵巣の発達が遅い雌では卵巣型アロマターゼ活性が低く、2-3歳魚までは周年を通して血中エストロゲン濃度はオスのほうが高い傾向がある。従って、雄のエストロゲンの合成・作用機構の解析には良い材料となる。雄では脳でエストロゲン合成、分泌の可能性があり現在、その領域の特定を行っている。

## 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 1 件)

① 山口明彦、岩谷美穂、小川真理子、北野載、松山倫也、In vitro characterization of the RS motif in N-terminal head domain of goldfish germinal vesicle lamin B3 necessary for phosphorylation of the p34cdc2 target serine by SRPK1. FEBS Open Bio 査読有 2013 3, 165-176.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.03.003>

[学会発表] (計 6 件)

① 山口明彦、魚類卵核胞(GV)ラミンB3の核局在シグナルに依存しない核輸送機構、日本動物学会第83回大阪大会2012 9.14。(大阪大学・豊中キャンパス)

② 恒松智子、入路光雄、松山倫也、山口明彦、トラフグ脳型アロマターゼの組織特異的発現と酵素活性、日本動物学会第83回大阪大会2012 9.14。(大阪大学・豊中キャンパス)

③ 山口明彦、Nuclear localization signal-independent nuclear import of fish germinal vesicle lamin B3 in Xenopus Oocytes. 第45回日本発生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会2012 5.29。(神戸国際会議場)

④ 松藤由佳、李在萬、日下部宜弘、北野載、松山倫也、山口明彦、トラフグ初期生殖腺器官培養系を用いたFSHの機能解析、第9回日本水産増殖学会2010 10.30。(唐津市民会館・佐賀)

⑤ 松藤由佳、李在萬、日下部宜弘、菊池潔、鈴木讓、北野載、米田道夫、松山倫也、山口明彦、トラフグ初期生殖腺器官培養系を用いたFSHの機能解析、第81回日本動物学会2010 9.25。(東京大学・駒場キャンパス)

⑥ 山口明彦、硬骨魚類ラミンB3のcdc2部位をリン酸化するSRPK1キナーゼの機能解析、第81回日本動物学会2010 9.25。(東京大学・駒場キャンパス)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/~q-kaiyos-eibutu/html/lmb.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 10332842

(2) 研究分担者 (2010~2011)

松山倫也 (MATSUYAMA MICHIIYA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 00183955

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: