

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660157

研究課題名(和文)色波長照射によるトラフグ仔魚攻撃行動の刷り込み制御

研究課題名(英文)Effect of LED colors on stress responses in pufferfish (Takifugu rubripes) larvae

研究代表者

山口 明彦 (YAMAGUCHI, AKIHIKO)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10332842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグ仔魚に赤色LEDを照射すると、水槽壁に寄り“つつく行動”が誘導される。発眼卵からの赤色照射はストレス性の矮小化を誘導する。一方青波長と暗黒は同じ効果を持ち、仔魚の分散を誘導する。青波長は網膜-脳神経回路で暗黒シグナルへ変換された可能性がある。遊泳力のないトラフグ仔魚は、赤波長をストレス(危険)青波長を安全色と認識し、巧みに生息環境を感じとる。仔稚魚の種苗管理には単一LED光ではなくバランスのとれた環境光が重要である。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of LED on the growth and behavior of the larvae of Japanese pufferfish, Takifugu rubripes. Under the red wavelength, the fries moved to the water tank wall as a stress response. The dwarf fishes grew irradiating starts on the eye-formed late embryo stage. Switching the wavelength from red to blue or darkness, the fries dispersed immediately off the wall. It indicates blue signal induce the similar behavior to the darkness. We conclude pufferfish larvae recognize the red color as a danger signal, the blue color as a safe signal to determine their best position in the water. The balance of light colors may be important physical factor to control larvae's growth and behavior in their birth place of the ocean as well as aquatic culture farm.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：ストレス行動 色覚 LED ニューロステロイド

1. 研究開始当初の背景

動物は外界の情報を得るため様々な感覚センサーを備えている。魚類は環境応答能に優れており、その反応性をそれぞれ独自に利用することで、個体や種の保存に役立ててきた。環境因子のなかで、光は物理的には光子が振動する電磁波であり、その振動数により短波長(紫外光)から長波長(赤外光)に分けられる。私たちの通常感じる可視光の領域は、色光の3原色(赤R・緑G・青B)で構成される。光強度や色波長は、網膜の桿体細胞や錐体細胞、また松果体等の非視覚系の器官にあるオプシン蛋白質で受容され、脳神経回路で処理され末梢神経に伝達後、行動を引き起こす。光周期や色が魚の成長や繁殖特性に大きく影響することは知られるが、人工的透過光色の効果についての研究は、カレイ目マツカワ等の一部の魚種の成長や生殖腺の性分化についての報告があるのみであった。色が生命活動や生命維持に対してどのような役割を担うのか本質的な結論は得られていないが、明確な物理的要因(色波長)をいかに利用するかは、生物進化上重要であったことに間違いはない。これは分子進化解析による色感受性のオプシン蛋白質のあと、光感受性のロドプシンが派生した事実からも支持される。

トラフグはR・G・Bの3色のオプシン遺伝子を持つが、多くの魚種に存在する紫外線領域のオプシンは存在せず、可視光領域の解析で十分と考えられた。先行実験ではトラフグ仔魚期に赤色LED照射を行うと、仔魚が一斉に壁に向かいつつく行動を行う事が明らかになっていた。トラフグは攻撃性が高く、仔稚魚から成魚に至るまで共食いや噛み合いによる斃死が多い。そのため攻撃行動の制御が望まれている。一方、トラフグ仔魚期に照射された青色波長は活動性を弱めるので、赤色は摂食・攻撃行動を促進する波長と予想した。しかし赤色で誘導される壁を“つつく”行動が、摂食・攻撃なのか、あるいはストレス性のものなのか、明確な結論が得られていなかった。またLED照射の開始時期や他波長の効果についても検討が不足していた。そこで本研究では、孵化前の発眼期からLED(R・G・B)の単一波長の照射を行い、ビデオによる行動観察と成長解析を行った。また、脳神経系ニューロステロイドホルモンとして、攻撃性に関与すると考えられるエストロゲンの合成を司る酵素であるアロマターゼの発現細胞の発現時期を調査した。

2. 研究の目的

(1) 私達人類が信号機や車のテールランプの赤を物理的な危険信号と感じる社会ルール、昆虫や両生類などが自らの持つ毒を危険と知らせるために皮膚等に赤色を呈示する現象等と同じく、トラフグ仔魚の特徴的な壁を“つつく行動”は、水生動物の魚類では孵化直後から色波長を生命活動に有効利用する

可能性を示唆する。この仮説を証明するために、本実験では各色波長が成長や行動に与える影響について調査した。また、遠赤外線照射により暗黒での行動観察も行い光と色波長の役割について考察することにした。

(2) 多くの脊椎動物ではストレスや攻撃行動は脳内のニューロステロイドの中でも特にエストロゲンを介して制御されることが知られる。エストロゲンはアンドロゲンからアロマターゼを介し合成される。トラフグ仔魚でも脳型アロマターゼ発現細胞(放射状グリア)を同定し、その発現時期を免疫組織学的に解析する。また仔魚期にBrdUの取り込みを行い脳切片の観察により、各波長色による細胞分裂頻度(脳の発生)の違いについて調査した。

3. 研究の方法

(1) 外光の遮断した小屋の中に農業用LED照明を1トン水槽上部に設置し、孵化前の発眼期のトラフグ仔魚を赤色(R:625, 660nm)・緑色(G:515nm)・青色(B:450, 465nm)の単独照射区、青波長混合照射区(RB)を設定する(明期・暗期14-10時間、照度0.1~0.2KLux)。孵化直後から各区での仔魚の行動を水中カメラで観察した。特に赤色(R)照射から青色または暗闇への変化で起こる行動変化を数回に渡りビデオ撮影し記録した。1週間間隔で仔魚を固定し体長測定を行った。また初期減耗の調査時には、孵化後41日から100日まで死亡数をカウントし、標本個体数を除いた出発仔魚数(4000)から差し引いた数を初期減耗数(40日目まで)として計算した。

(2) トラフグ網膜(成魚)由来cDNAライブラリーを作製し、オプシンcDNA(全4種)のクローニングを行った。RT-PCR法により各オプシン遺伝子の発現時期を特定した。

(3) 孵化後一定間隔でBrdUの取り込みを行い、脳切片作製により細胞分裂頻度を調査した。また、抗アロマターゼ抗体を用いた免疫組織化学法により仔魚期のアロマターゼ発現細胞(放射状グリア細胞)の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 赤色LEDの成長阻害効果

孵化1週目から赤色LED照射した場合は、翌週(2週令)ですでに他区(青区・自然光区)と平均長および分散度に違いが生じたのに対し、本実験の孵化前胚形成後期(発眼期)からの赤色LED照射では、4週令以降で他区と顕著な有意差が生じた(図1)。赤色区は自然光だけではなく他のLED区(青、緑)に比べても矮小化が見られ、初期減耗数も多い傾向にあった。また初期減耗率(0-40日)は青色区が1に対し、赤青混合区は1.6であ

った。以上の結果より、赤色照射は孵化前・孵化後の開始時期の違いに関わらず成長阻害を誘導するが、早いステージからの照射はその影響をより強く表現型として表すことが示された。

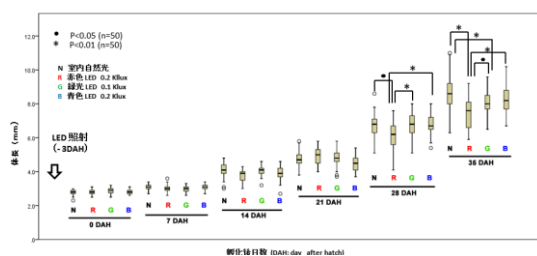


図1 トラフグ発眼卵からのLED照射と成長

(2) 行動観察による色波長の役割の検証

赤色照射により孵化後1週目ぐらいから水槽壁へ移動しつづく行動が観察できる。赤色から青色光へ切り替えると壁に寄っていた仔魚は一斉に分散する。青色は赤色と真逆の効果をもつ波長と考えられたので、赤外線(IR)カメラを用いた光のない暗黒下での行動観察をおこなった(図2)。30分以上の赤色と赤外線波長(740 nm)の連続混合照射では仔魚の行動に影響はないことを確認後、赤色光を消灯し暗闇に変化させた。仔魚は青色光と同様に即座に壁から分散した。この結果は青色波長は光のない暗黒シグナルと同等の情報であることを示す。すなわち、青波長の光は網膜-脳神経系で光のないシグナルと同等の処理を受けたと考えられた。赤色波長は海の表面色である。赤色の成長阻害効果と考え合わせると、赤波長はトラフグ仔魚に危険を知らせるシグナルと考える。水槽内での長期間の刺激はストレスとなり、結果として成長阻害が起きたと結論づけられた。一方、青色波長は水中では深層色であり、安全を意味する波長である。遊泳力のない仔魚は、物理的な色シグナルを最大限に利用し生存に適した場所へ移動すると推定できた。

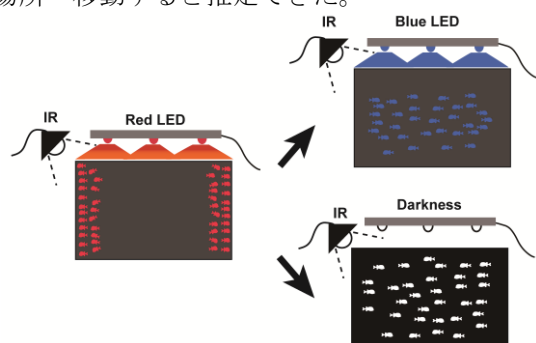


図2 IR照明を用いた暗黒下での行動観察

(3) 網膜の構造およびオプシン遺伝子の仔魚期での発現

ブアン固定した仔魚の網膜構造をパラフィン切片により調査したが、現在までに各LED照射区での異常は発見できていない。オプシン遺伝子は桿体細胞にあるロドプシン

(OPN2)、錐体細胞の3種視覚オプシン(OPN1、RGB)3種のcDNAクローニングを終了した。緑オプシンはENSEMBLゲノム情報では2種類あることがわかっていたが、1種類のみしかクローニングできず、1つは偽似遺伝子と推定された。赤色波長を認識するオプシンはゲノムデータベースからは1種類しか見つからなかった。現在各照射区でのOPN遺伝子群の発現パターンを調査中である。

(4) 仔魚期の脳の発達およびアロマターゼ発現細胞の同定

各LED照射区において、BrdUの取り込みを行い免疫組織化学染色法によって細胞分裂の頻度を調査した(孵化後3週令)。現在までに各区において目立った差は見つけれない。

環境応答においてエストロゲンが脳神経回路で重要な働きをすることが知られている。仔魚期のストレス性反応と関連付けるためにアロマターゼ発現細胞の同定を行った。その結果、孵化後21日目の終脳でアロマターゼ陽性の放射状グリア細胞が確認できた。赤色感受性の“つつく”行動の誘導時期からすでにエストロゲンが脳で局所的に合成・機能することを意味する。

(5) まとめ

本研究のLED照射実験により、トラフグ仔魚の色波長を巧みに利用した移動能力が明らかとなった。これは進化的に保存された色覚を用いた情動行動の一面を提示している。我々人類は信号の赤色を危険と感じる。これは赤色波長が陸上(空气中)では一番遠くまで届く波長であることを利用している。水中では赤波長は海表面の色であり、餌となるプランクトン等が多いが捕食の危険が多いことを示す波長である。一方、青色光は深層まで届くため、餌は少ないが安全性を保障するシグナルである。遊泳力のない仔魚にとってはこれらの色波長が危険回避のための重要なシグナルとなっているのかもしれない。また本実験からバランスのとれた色波長から構成される環境光が仔魚成長に大切であることが示された。色そのものは魚の生存のための必須の因子ではない。単一LED波長照射でも仔魚は全滅することなく、青色光で1年以上生育した雄でも精子形成も確認できている。しかし行動パターンは画一的となり、結果として健全な成魚には育たない。環境光への適応能力がなくなり、アイポップ(眼が飛び出る病気)などの症状が出現しやすい。おそらくRGB各波長で脳内シグナル処理の仕組みが異なるため、単一の波長では脳神経回路の発達が未熟となり、結果としてニューロステロイドや内分泌系等にも異常が起きると推定される。

LED光は明るく寿命も長いコストパフォーマンスの良さが強調されるが、種苗養殖

現場においては使用時期や照射色等をしつかりと選択し理解して使用することが望まれる。赤色照射を受け続けストレス過多になった魚の脳はストレスなしの脳とどのような差があるのか、また色ストレスに打ち勝った仔魚はストレス耐性の優良な親魚として育つのか？今後、色波長効果を利用することにより魚のストレス耐性機構の解明や選抜育種技術の改良につながることを期待できる。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 山口明彦, 中野里美, 通山香奈子, 元嶋克宏, 松山倫也
成熟期トラフグ下垂体全ホルモン分泌細胞の分布と特徴 三学合同大会(日本動物学会) 2015年05月24日(福岡大学)

(2) 山口明彦, 元嶋克宏, 祖田佳奈, 中野里美, 松山倫也
トラフグ下垂体における膜型エストロゲン受容体の分布 日本動物学会第85回大会 2014年09月13日(東北大学)

(3) 通山香奈子, 恒松智子, 宮田昌賢, 松山倫也, 山口明彦
トラフグ下垂体に存在するアロマトーゼ発現細胞と活性化機構の解析 日本動物学会第85回大会 2014年09月13日(東北大学)

(4) 元嶋克宏, 恒松智子, 松山倫也, 山口明彦
トラフグ脳における脳型アロマトーゼおよびエストロゲン受容体の発現と分布 日本動物学会第84回大会 2014年09月27日(岡山大学)

(5) 山口明彦, 祖田佳奈, 通山香奈子, 元嶋克宏, 恒松智子, 松山倫也
単一色波長照射によるトラフグ仔魚の行動と成長の解析 日本動物学会第84回大会 2014年09月26日(岡山大学)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
研究代表者ホームページ
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sui1/lmb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
山口明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)
九州大学・農学研究院・助教
研究者番号：10332842

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：