

1. 研究テーマ

環境依存的な体サイズ規定分子の解明

2. 研究の目的

生態系を構成している生物種の体の大きさは様々であり、体サイズに起因する物理的・化学的な制約を受けて適応・進化していると考えられる。脊椎動物に限っても最小のシラスウオ属の一種では2 mg、最大のシロナガスクジラは100 tにもなる。一方で、数種の魚類ではその環境に応じて体サイズを変えることが経験的に知られている。コイは小さい水槽で飼育するとその水槽の対角線上より大きくならないといわれているが、自然界の池や川に生息するコイはその年齢に応じて成長し、1 m 前後になる個体もいる。しかし、同じコイ目コイ科であるゼブラフィッシュは自然界と実験水槽でさほど大きさが変わらず、体サイズ規定が環境依存的に行われている魚種と、低依存的な魚種がいると考えられる。これらは生育環境に適応するためにエピジェネティックな変化を及ぼした結果だと推察される。環境依存的な例を挙げると、高飼育密度は体サイズの主要な規制プロセスである (Lorenzen & Enberg, 2002)。また、他にも温度、水の透明度、水位などの環境要因も、魚の体細胞成長に大きな役割を果たすと言われている (Haugen, Winfield, Fletcher, Ben, & Stenseth, 2007) (Vøllestad & Olsen, 2007) (Davidson, Letcher, & Nislow, 2010)。これらは生育環境に適応するためにエピジェネティックな変化を及ぼした結果だと推察される。環境依存的な体サイズ規定という生命現象は非常に興味深いものであるが、環境依存的な体サイズ制御がどのようなメカニズムで行われているのかは未だ不明である。魚類は他の生物同様に骨格・筋肉・表皮の組織幹細胞の働きによってその体サイズが制御されていると考えられる。これまで、幹細胞そのものが生まれる仕組みや生まれた幹細胞が維持されるための仕組みなどの基本構成要素に関しては、それらの必須遺伝子や働くシグナル経路に関する知見が蓄積されてきた。しかし、生育環境によりそれら幹細胞の増殖や分化といった活性がどのように変化し体サイズが規定されるのか、その仕組みはほぼ未解明である。そこで本研究では、環境依存的な体サイズ規定分子の解明を目的とした。

3. 研究状況

予備実験として本事業による助成前に、密度の異なる環境で成魚のゼブラフィッシュの飼育を行った。3尾区（3匹/1.2 L）、6尾区（6匹/1.2 L）、12尾区（12匹/1.2 L）に分け、4週間飼育し、体長と体重の変化率を算出した。その結果、各飼育密度で摂餌量が同等にも関わらず、3尾区で体サイズが大きくなる傾向が見られた（図1）。そのため、摂餌量以外の要因が密度による体サイズ変化を引き起こす可能性が示唆された。

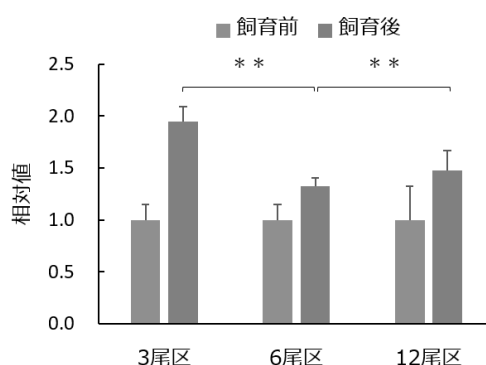


図1 飼育前後の成魚の体重の相対値

4. 研究方法

助成期間では①飼育環境認識器官の検討、②飼育環境の違いによる体サイズ制御分子の検討の2つに焦点をあて研究を進めた。

① 飼育環境認識器官の検討

魚類は飼育環境を認識し、体サイズ調節すると予測されるが、どの器官で環境を認識しているか未解明である。そこで認識を行うと推測される視覚や側線感覚を制限して飼育し、成長率を比較することで、環境認識を視覚と側線のどちらで行っているかを検討した。ゼブラフィッシュの稚魚を3尾区（3匹/1.0 L）、6尾区（6匹/1.0 L）に分け、それぞれの水槽を3つずつ用意した。これをcontrol、視覚制限区、側線封鎖区に割り振り4週間の飼育を行い、体長と体重を測定した。飼育前後の成長率を算出し、controlと各制限区を比較した。

② 飼育環境の違いによる体サイズ制御分子の検討

ゼブラフィッシュの稚魚を3尾区(3匹/1.2L)、6尾区(6匹/1.2L)に分けて飼育し、1週間ごとに各水槽を1つずつサンプリングした。4週間の飼育後、体長・体重の変化と成長関連遺伝子の発現量測定を行い、いつ体サイズ調節が行われているか、またどのような因子が関わっているかを検討した。

5. 結果と考察

① 飼育環境認識器官の検討

視覚と側線を遮断して飼育した際の成長率を表1に示した。何も制限していないcontrolでは、3尾区の成長率が高かった。一方、視覚または側線などの感覚器官を制限した区ではcontrolと比較すると成長率が低くなることが分かった。

表1 各区の体重の成長率

区名	成長率 (%) ± SD	
	3尾区	6尾区
コントロール	343.8 ± 51.6	293.2 ± 49.5
視覚制限区	82.3 ± 12.3	77.7 ± 6.4
側線封鎖区	18.1 ± 5.0	38.2 ± 8.2

成長率が、controlに比べ低いことは、それぞれの制限に起因していると考えられる。本実験では、視覚制限は、水槽外の周りの環境を認知できないようにすることを制限とした。controlや通常の飼育の際の水槽は透明で、魚体が水槽の容器に反射して映る。これまでの研究で、疑似個体として映像を用いた際に、実際の魚群はディスプレイ上の疑似個体の魚に同期して泳ぐという報告がある(兼近, 川嶋, & 松山, 2014)。このことから、魚は実際の魚でなく、反射した自身や他者の姿をも魚と認識するのではないかと考えた。そこで、視覚制限区では、不透明な容器を用いることで魚体が反射ないように設定した。こうすることで、魚は「周囲に魚がいる」という状況を認識できなくなった。側線封鎖区では、事前に行った実験を踏まえて、側線封鎖には塩化コバルトを用いた。先行研究に基づいて、0.1 mMの塩化コバルト溶液に80分間浸漬した(Karlsen & Sand, 1987)(添

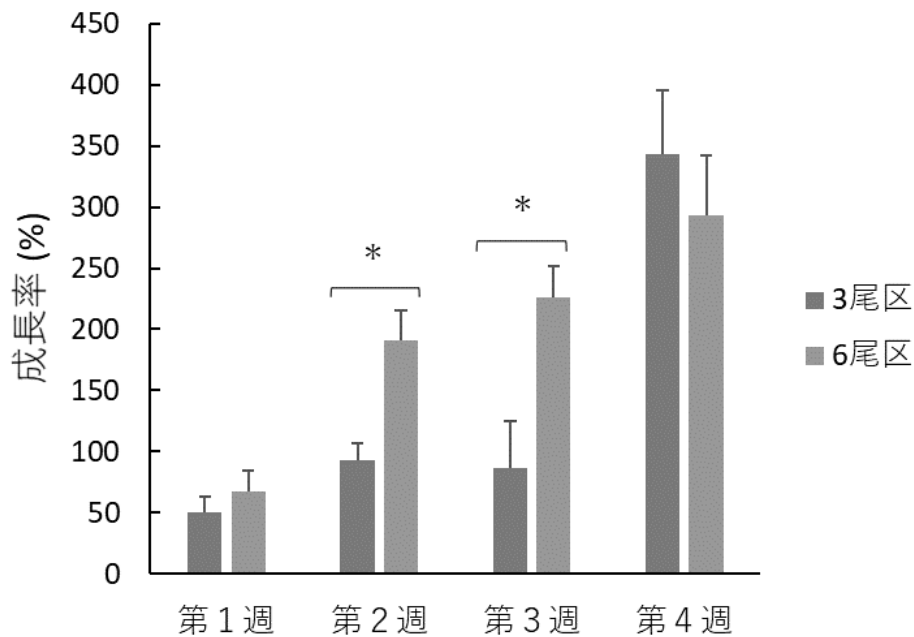
田 & 畠山, 1998)。薬品の効果を持続させるために 24 時間ごとに処理を行った。そのため、両者とも通常の飼育環境よりも、制限された状況にある。よって、これらの制限が成長率を低くしたのだと考えられる。

視覚を制限した際の成長率は、6 尾区と 3 尾区で変わらなかったのに対し、側線を制限した際の成長率は、6 尾区の方が高かった。3 尾区の成長率が高かった control とは異なる結果になったことより、側線を封鎖されたことにより環境の認識が正確にできなかったことが考えられる。これらのことより、ゼブラフィッシュでは視覚と側線の両方で環境認識をすること、そのうち特に側線の影響が強いことが示唆された。

② 飼育環境の違いによる体サイズ制御分子の検討

異なる飼育環境で飼育したゼブラフィッシュを 1 週間ごとにサンプリングし、成長率の経時変化を図 1 に示した。3 週目までは 6 尾区の方が有意に高いが、4 週目で 3 尾区の成長率が高くなる傾向が見られた。

また、体サイズ制御には成長関連因子が関わることから、経時的な成長関連遺伝子発現量を網羅的に測定した。今回は中でも大きな違いがあった IGF-1 と IGFBP-1a について報告する。IGF-1 と IGFBP-1a において、どちらも 3 週目で 6 尾区の発現量が増加し、4 週目でまた 3 尾区と同程度にまで下がった。IGF-1 は、静止細胞が細胞増殖を開始するために必要であり (Bower & Johnston, 2010)、体が大きいゼブラフィッシュの筋肉において高い発現量を示す (Amaral & Johnston, 2012) (Huang, et al., 2012)。IGFBP-1 は、食物欠乏、栄養失調、ストレス、損傷、小胞体ストレス、低酸素などの様々な条件下で誘導される (Kajimura & Duan, 2007) (Kajimura, Aida, & Duan, 2006)。また、IGF 活性を阻害し、発育および増殖の速度を低下させることが明らかになっている (Maures & Duan, 2002)。今回の実験では、飽食給餌を行っていたので、飢餓による発現などは考えにくい。飼育の条件を加味すると、ストレスまたは低酸素状態が発現を誘導したと考えられる。すなわち、3 尾区より密度が高い 6 尾区において低酸素状態により 3 週目で IGFs を発現したことによって、IGF-1 発現が抑えられ、成長率が 4 週目で逆転したと考えられる。3 週目まで 6 尾区のほうが高い成長率を示したが、環境認識に要する日数も含め、今後引き続き検討する。



n=3~6, mean ± SD, *p<0.05, student's t-test

図 2 異なる密度で4週間ゼブラフィッシュを飼育した際の成長率の経時変化

6. 総括と今後の展望

本研究によって、魚類の環境認識は視覚と側線で行われているが、特に側線の働きが大きいことがわかった。また、高密度による低酸素状態が特定の遺伝子の発現を誘発し、成長を制限していることが示唆された。今後は、環境認識の観点も踏まえ、体サイズ規定分子の詳細なメカニズムの探索を行う。

本研究のさらなる展開により、場所が限られている陸上養殖でも、体サイズを大きくすることが可能である。山梨県のブランド魚である「富士の介」を始め、県内で盛んに養殖されているサケマス類、ニシキゴイなどにも応用が可能であることから、山梨県内の効率的な内水面漁業に貢献できると考えられる。

また、飼育環境によって成長率が変わるメカニズムを応用することにより、より少ない餌で大きくすることが可能となることから、山梨県の誇る綺麗な河川を汚染することなく、環境にも優しい内水面漁業の一助となる。

7. 参考文献

- Amaral, I., & Johnston, I. (2012). Experimental selection for body size at age modifies early life-history traits and muscle gene expression in adult zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 215(Pt 22), 3895-3904.
- Beverton, R., & Holt, S. (1957). *On the Dynamics of Exploited Fish Populations* (1 ed., Vol. 2). London: H.M. Stationery Office.
- Bower, N., & Johnston, I. (2010). Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS One*, 5(6), e11100.
- Davidson, R., Letcher, B., & Nislow, K. (2010). Drivers of growth variation in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Animal Ecology*, 5(1113-1121), 79.
- Haugen, T., Winfield, I., Fletcher, J., Ben, J. J., & Stenseth, N. (2007). Density dependence and density independence in the demography and dispersal of Pike over four decades. *Ecological Monographs*, 77(4), 483-502.
- Huang, C., Li, Y., Hu, S., Chi, J., Lin, G., Gong, H., . . . Wu, J. (2012). Differential expression patterns of growth-related microRNAs in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Science*, 90(12), 4266-4279.
- Kajimura, S., & Duan, C. (2007). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1: An evolutionarily conserved fine tuner of IGF actions under catabolic conditions. *Journal of Fish Biology*, 71, 309-325.
- Kajimura, S., Aida, K., & Duan, C. (2006). Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: in vitro and in vivo analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 1142-1155.
- Karlsen, H., & Sand, O. (1987). Selective and Reversible Blocking of the Lateral Line in Freshwater Fish. *Journal of Experimental Biology*, 133(1), 249-262.
- Lorenzen, K., & Enberg, K. (2002). Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation of fish populations: evidence from among-population comparisons.

Biological sciences, 269(1486), 49-54. doi:10.1098/rspb.2001.1853

Maures, J., & Duan, C. (2002). Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology*, 143(7), 2722-2731.

McMahon, T., & Bonner, T. (1984). *On Size and Life*. New York: Scientific American Books.

Vøllestad, L., & Olsen, E. (2007). Non-additive effects of density-dependent and density-independent. *Oikos*, 117(11), 1752-1760.

兼近悠, 川嶋宏彰, 松山隆司. (2014). 映像疑似個体を通じた魚群のインタラクシオン解析のためのカメラ・ディスプレイシステム. 情報処理学会研究報告, 2014(CVIM-192), NO.29.

添田秀男, 畠山良己. (1998). 魚類の聴覚生理 : 魚の音感知能力を探る. (川村軍蔵, 編) 新宿区: 恒星社厚生閣.

8. 謝辞

本研究の一部は、令和4年度山梨県若手研究者奨励事業費補助金の交付により遂行したものである。本研究に対し多大なるご支援をいただいたことに、この場をかりて深く感謝いたします。