

博士論文

異体類の体色異常と色素細胞の分化に関する研究

平成24年 3月

三重大学大学院生物資源学研究科

山田敏之

目 次

| | |
|---|----|
| 要 旨 | 51 |
| 序 論 | 52 |
| 第1章ヒラメの色素細胞および成体型色素細胞前駆細胞の動態 | 54 |
| 1-1 はじめに | 54 |
| 1-2 材料と方法 | 54 |
| 1-2-1 供試魚および飼育条件 | 54 |
| 1-2-2 色素細胞系列関連遺伝子の抽出と PCR, クローニングおよび配列解析 | 54 |
| 1-2-3 色素細胞系列マーカー遺伝子の発現解析(in situ hybridization) | 56 |
| 1-2-4 DiI および DiO の顕微注入による前駆細胞の追跡 | 56 |
| 1-2-5 凍結切片の作成 | 56 |
| 1-2-6 画像解析 | 56 |
| 1-3 結 果 | 57 |
| 1-3-1 ヒラメの色素細胞の出現動態 | 57 |
| 1-3-2 ヒラメ仔魚期の色素細胞系列マーカー遺伝子の in situ hybridization による 発現解析 | 60 |
| 1-3-3 ヒラメ成体型色素細胞前駆細胞の動態とその細胞運命 | 67 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 1-4 考 察 | 73 |
| 1-4-1 仔魚期における色素細胞前駆細胞の局在 | 77 |
| 1-4-2 ヒラメの成体型色素細胞の鰭基部からの供給 | 78 |
| 1-4-3 異体類特異的な左右非対称な体色パターンの決定要因 | 79 |
| 第2章 ホシガレイの体色異常発現に及ぼすコルチゾルの影響 | 80 |
| 2-1 はじめに | 80 |
| 2-2 材料と方法 | 80 |
| 2-2-1 供試魚および飼育条件 | 80 |
| 2-2-2 コルチゾルの投与 | 81 |
| 2-2-2-1 実験1 | 81 |
| 2-2-2-2 実験2 | 81 |
| 2-2-3 色素細胞分化および体色パターンの評価 | 82 |
| 2-2-4 PCR、クローニングおよびシーケンス | 82 |
| 2-2-5 In situ hybridization | 82 |
| 2-2-6 統計解析 | 82 |
| 2-3 結 果 | 82 |
| 2-3-1 実験1：成体型色素細胞の発生に対するコルチゾルの影響 | 82 |
| 2-3-2 実験2：変態ステージ依存的なコルチゾルの効果 | 84 |
| 2-3-3 変態過程における黒色素芽細胞の分布 | 87 |

| | |
|----------------|----|
| 2-4 考 察..... | 87 |
| 第3章 総合考察 | 89 |
| 引用文献..... | 93 |
| 謝 辞..... | 97 |

要 旨

異体類の種苗生産過程で今なお大きな問題である体色異常の発生機構を解明し、その防止策を探るためには、まず異体類特異的な左右非対称な体色パターンの形成機構を明らかにする必要がある。異体類の体色パターンは変態後半期以降に出現する成体型色素細胞の分布様式によって決定されていることから、変態期における成体型色素細胞前駆細胞の動態を明らかにすることが左右非対称な体色発現機構の解明の第一歩になると考えられる。

本研究では、まず第1章で、ヒラメを材料として、発生過程における色素細胞系列のマーカー遺伝子の発現解析と蛍光標識による前駆細胞の追跡によって、仔魚期の成体型色素細胞前駆細胞の動態を検討した。その結果、変態後の成体型色素細胞の分布は左右非対称であるにもかかわらず、仔魚期の前駆細胞の分布および動態は、左右対称性を示すことがわかった。すなわち、前駆細胞は主に背鰭基部および臀鰭基部領域に左右対称に局在しており、この部位から体側部に向けて左右対称に移動していくことが明らかとなった。さらに、変態完了後、鰭基部から体側部に移動した蛍光標識細胞が、有眼側（左体側）では、成体型黒色素胞、虹色素胞に分化し、無眼側（右体側）では、虹色素胞に分化することが明らかになった。

そこで、第2章では、哺乳類で色素細胞の分化を誘導することが知られており異体類ではstage E-Fに大量に分泌されるコルチゾルを変態期のホシガレイに投与することにより、前駆細胞の分化運命に左右非対称性が生じる時期を明らかにすることを試みた。コルチゾル投与実験の結果、変態期に高濃度コルチゾルを投与することによって、本来、虹色素胞だけが分化する無眼側においても成体型黒色素胞や黄色素胞の分化が誘導され、有眼側と同様な複雑な紋様を形成し両面有色となった。さらに、このような、

無眼側における成体型黒色素胞や黄色素胞の分化誘導は、stage E-Fにコルチゾルを投与した場合にのみ見られ、stage G以降の投与ではこのような効果は認められなかった。さらに、stage E-Fのコルチゾルの投与により、黒色素胞およびその前駆細胞特異的に発現するメラニン形成酵素遺伝子 *dct* の強い発現が誘導されることも確認できた。これらの結果は、stage E-Fまでは左右両体側の前駆細胞はともに、成体型黒色素胞、虹色素胞、黄色素胞にも分化することができ、左右対称性を維持しているが、stage Gにはすでに左右両体側に分布する前駆細胞が無眼側においてこれら色素細胞に分化できない非対称性が生じていることを強く示唆した。さらに、コルチゾルの分泌が増大するstage E-Fにコルチゾルを投与することで、成体型黒色素胞と黄色素胞の分化を誘導したことから、内因性のコルチゾルが変態期における成体型黒色素胞と黄色素胞の分化に関与している可能性をも強く示唆した。同時に、コルチゾルの投与によって両面有色個体の出現が増大したことから、変態期のストレスが体色異常発生の要因となりうる可能性も示唆された。

序 論

異体類の多くは重要な水産資源であり、養殖や栽培漁業の対象種として種苗生産技術の開発が進められてきた(有瀧, 1995)。すでにヒラメや一部のカレイ類では種苗量産技術が確立されているが、種苗生産過程で生じる体色異常はいまも大きな問題であり、その発生機構についての知見は未だに限られている(Bloker and Hill, 2000; 青海, 2003; Hamre et al., 2007; Burton, 2010)。異体類の体色異常の発生機構を明らかにし、その発生を防ぐためには、脊椎動物の中でも極めて特殊で異体類に特有な左右非対称な体色パターンの形成機構を明らかにすることが必要である。本研究では、異体類の左右非対称な体色パターン形成機構の一端を明らかにすることを目的とした。

背腹軸に沿った色彩の極性は、脊椎動物全般に共通する最も基本的な体色パターンである。一般に、黒色素胞の発現は背側皮膚でのみおこり、腹側では黒色素胞が発現しないか、発現しても微弱であることが多い。このため、背側の体色は濃い色彩となり、腹側は淡いまたは白い色彩を示す。また、この背腹軸に沿った体色パターンは左右相称である(Ohsugi and Ide, 1983; Fukuzawa et al., 1995; Candille et al., 2004)。

しかし、異体類は、このような背腹軸に沿った体色パターンを形成せず、変態後には、その体色パターンは明瞭な左右非対称性を示すようになる。眼は二つとも左右のどちらかの体側に位置し、有眼側の体色は濃く、無眼側の体色は青白い(Seikai et al., 1987; Matsumoto and Seikai, 1992; Seikai, 1992)。このような左右非対称な体制と体色パターンは、進化の過程で背腹軸から左右軸への体軸の転換が起こった可能性を想起させる。

硬骨魚類を含む変温脊椎動物の体色は、神経冠細胞由来の複数種の色素細胞、黒色素胞、黄色素胞、虹色素胞、白色素胞等の空間的配置によっ

て決定されている(Bagnara, 1998; Parichy et al., 2006)。異体類においても、その体色パターンは、これらの色素細胞によって形成されている。さらに、これまでの研究で、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* やイシガレイ *Kareius bicoloratus* では、形態的に異なる二つのタイプの黒色素胞が発生ステージの異なるタイミングで出現することが明らかにされている(Seikai et al., 1987, 1993; Matsumoto and Seikai, 1992)。一方は、ふ化前後に左右対称にまばらに出現する大型の幼生型黒色素胞で、他方は、変態の完了に伴って有眼側のみに大量に出現する成体型黒色素胞である。成体型黒色素胞は変態期の間未分化な前駆細胞、メラノブラストとして存在していると考えられている(Seikai et al., 1987; Matsumoto and Seikai, 1992)が、その分布、動態は明らかとなっていない。異体類に特異的な左右非対称な体色パターンは、おもに、この成体型黒色素胞の有眼側に限定された出現によって規定されている(Seikai et al., 1987, 1993; Matsumoto and Seikai, 1992; Hamre et al., 2007)。黄色素胞は、仔魚期には左右対称に分布しているが、変態に伴って有眼側でのみ顕著に出現が増大し、これも左右非対称な体色パターンの形成に寄与する(Matsumoto and Seikai, 1992; Nakamura et al., 2010)。虹色素胞は変態の完了期に左右の両体側に出現するが、その分布は左右の体側で異なっており、有眼側では、多数の虹色素胞が集まった斑紋を多数形成するのに対し無眼側では分散して分布する。虹色素胞の分布パターンもまた、異体類特異的な体色パターンに寄与している(Seikai et al., 1987; Matsumoto and Seikai, 1992)。

色素パターン形成のモデル生物であるゼブラフィッシュ *Danio rerio* においても、仔魚型の色素細胞と変態後に出現する成体型色素細胞の存在が知られている(Parichy et al., 2000a; 2000b)。そして、その研究の過程で色素細胞系列のマーカー遺伝子を発現する成体型色素細胞の前駆

細胞の動態が詳細に検討されてきた (Parichy et al., 1999, 2000a,b, 2003, 2006; Rawls et al., 2001; Parichy and Turner, 2003a,b; Quigley et al., 2004, 2005; Budi et al., 2008)。前駆細胞の動態、すなわち前駆細胞の時間的空間的な分布パターンの分析は、成体型の体色パターンの形成機構を明らかにするために極めて重要である。異体類の左右非対称な体色パターン形成機構解明のためにも、このアプローチは極めて重要であるが、異体類においては、Watanabe (2008) による報告を除いて、そのような研究はほとんどない。

飼育条件下の異体類は、仔魚期の体色パターンの形成過程の異常により、しばしば有眼側白化や両面有色のような体色異常を生じる (Seikai et al., 1987; Matsumoto and Seikai, 1992; Seikai et al., 1993; Miwa and Yamano, 1999; Venizelos and Benetti, 1999; Bolker and Hill, 2000; 青海, 2003; Hamre et al., 2007; Burton, 2010; Yamada et al., 2010)。有眼側白化は、有眼側が全体的または部分的に無眼側のような白い配色となってしまう現象であり、その部分では成体型黒色素細胞が欠落している。両面有色は、無眼側が全体的または部分的に有眼側と同様の配色となる現象で、その部分では、通常分化するはずの無い成体型黒色素細胞が大量に分化している。

Burton (2010) や彼が引用する文献の中で、仔魚期のストレスが体色異常の原因となりうるということが指摘されている。筆者らも、多くのこれまでのホシガレイ *Verasper variegatus* の種苗生産の経験から、体色異常の出現は、変態期の飼育環境下のストレス、たとえば水質、餌の品質、過密や病気等、と関係があるという印象を受けていた。魚類においてはコルチゾルレベルの上昇が主要なストレスに対する内分泌学的反応であるので (Barton, 2002)、ストレスによるコルチゾルの分泌亢進が体色異常の出現に関与する可能性がある。また、コルチゾルは、ストレスに対する反応としてではなく、変態期には一過性に体内レベルが上昇する (de Jesus et al., 1991;

Yamano et al., 1991; Prez et al., 1999; Hotta et al., 2001; King, 2006)。このことは、コルチゾルが魚の変態期の発生過程に何らかの影響を及ぼしていることを示唆する。さらに、哺乳類ではグルココルチコイドが黒色素胞 (melanocyte) の分化を促進したり、黒色素芽細胞の増殖を阻害したりすることが知られている (Ito et al., 1991; Hirobe, 1996; Oskina et al., 2010)。これらの知見は変態期に体内レベルが上昇するコルチゾルが異体類の体色パターン形成に関与している可能性を示唆する。しかし、今までのところ、変態過程、特に体色パターン形成に関するコルチゾルの影響に関する信頼にたる情報は無い。

本研究では、第1章において、ヒラメを材料として、まず仔魚型色素細胞および成体型色素細胞の出現動態の詳細な記載を行う。続いて、異体類特異的な左右非対称な体色パターンの形成機構解明にとってもっとも基礎的な知見である成体型色素細胞前駆細胞の動態を色素細胞系列のマーカー遺伝子の発現解析と蛍光色素標識による前駆細胞の追跡によって明らかにすることを試みた。さらに、変態後、蛍光標識前駆細胞の細胞運命を確認した。第1章では、成体型色素細胞の前駆細胞が鰭基部から左右対称に体側部へ供給されていることが明らかになったので、第2章では、ホシガレイを材料として、コルチゾルの投与実験により、コルチゾルが異体類の成体型色素細胞の分化に及ぼす影響を明らかにするとともに、左右対称に供給された前駆細胞の分化運命に左右非対称性が生じる時期を明らかにすることを試みた。最後に第3章では、第1章と2章で得られた結果および既往の知見を総合し異体類の体色パターン形成機構について検討を加える。

第1章ヒラメの色素細胞および成体型色素細胞前駆細胞の動態

1-1 はじめに

本章では、まずヒラメの仔魚期から変態完了後の稚魚までの色素細胞の出現動態を詳細に記載し、次に色素細胞系列のマーカー遺伝子である *colony-stimulating factor 1 receptor (csflr)*, *dopachrome tautomerase (dct)* および *kit* の仔魚期から変態完了期までの空間的な発現パターンを検討することにより、この間の成体型色素細胞の前駆細胞の分布を明らかにした。ゼブラフィッシュ *D. rerio* では *csflr* は黄色素胞系列の前駆細胞と仔魚型黒色素胞 (embryonic melanophore: Parichy et al., 2000b) の前駆細胞で発現することが知られており (Parichy et al., 2000b; Parichy and Turner, 2003a), さらに, *kit* 非依存型の成体型黒色素胞の前駆細胞の発生に必要であることが明らかとなっている (Parichy et al., 2000b; Parichy and Turner, 2003a)。*dct* はメラニン形成酵素の一つであり黒色素胞系列の後期マーカーとして使われている (Kelsh et al., 2000)。*kit* はチロシンキナーゼ型の受容体でメラノフォアとその前駆細胞で発現する (Parichy et al., 1999; Parichy and Turner, 2003b)。

ヒラメにおける上記色素細胞系列のマーカー遺伝子の発現解析の結果、これらの遺伝子が、仔魚期の間、将来成体型色素細胞が大量に出現する有眼側 (左体側) の体側部にはなく、主に胴部の背側と腹側の縁辺部、すなわち、背鰭基部と臀鰭基部にそった領域に左右対称に、強く発現することが明らかとなった。そこで、次に仔魚期から変態完了期までの間に、成体型色素細胞の前駆細胞が背鰭および臀鰭基部から体側部に供給されている可能性を検討するために、仔魚期の発生ステージごと (stage C, D, E, F, G, H) (南, 1982) に背鰭および臀鰭基部領域に分布する細胞に蛍光色素 CellTracker CM-DiI (Molecular Probes), SP-DiO (Molecular Probes) を注入することにより蛍光標識をおこない、その移動と細胞運命を追跡した。

1-2 材料と方法

1-2-1 供試魚および飼育条件

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の受精卵を民間の種苗生産機関から購入し、ふ化した仔魚を実験に使用した。受精卵および仔魚は水温 18-20°C で飼育をおこない、仔魚にはワムシとアルテミアのノープリウス幼生を成長に合わせて給餌した。仔魚および稚魚は、南 (1982) に従って発生ステージの分類を行った (Fig. 1)。

1-2-2 色素細胞系列関連遺伝子の抽出と PCR, クローニングおよび配列解析

stage E から stage G のヒラメ仔魚から ISOGEN (NIPPON GENE) をもちいて全 RNA を抽出し、これを鋳型として ReverTra Ace- α -[®] (TOYOBO) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。全 RNA の抽出および cDNA の合成方法はともに付属のマニュアルに従った。次に、ヒラメの色素細胞系列の関連遺伝子 *colony-stimulating factor 1 receptor (csflr)*, *dopachrome tautomerase (dct)* および *kit* 増幅のためのプライマーを設計した。プライマーは、複数の脊椎動物間でよく保存された領域をもとに設計した; *csflr* (forward: aacaactacaccttcatcgacc; reverse: ggttccagcacacatcttcatgac), *dct* (forward: cgctcttctctatcagcgagag; reverse: gtagacgggcattgcctttgac), *kit* (forward: tgatagccacgcagcactggg; reverse: ccacaaagatggggtcattggc)。そして、ヒラメ仔魚から得られた cDNA を鋳型として PCR を行い、ヒラメ *csflr*, *dct* および *kit* の部分配列を増幅した (94°C 2分, 98°C 10秒, 50-53°C 30秒, 72°C 2分, 45 サイクル)。PCR 反応は Takara Ex Taq[™] Hot Start Version (Takara) を用い、反応液の組成は付属のマニュアルにしたがった。PCR 反応で得られた cDNA は、QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した後、QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen) を用いてクローニングをおこなった。これらの操作は付属のマニュアルに従った。シークエンスは BigDye -terminator sequencing chemistry (Applied Biosystems)

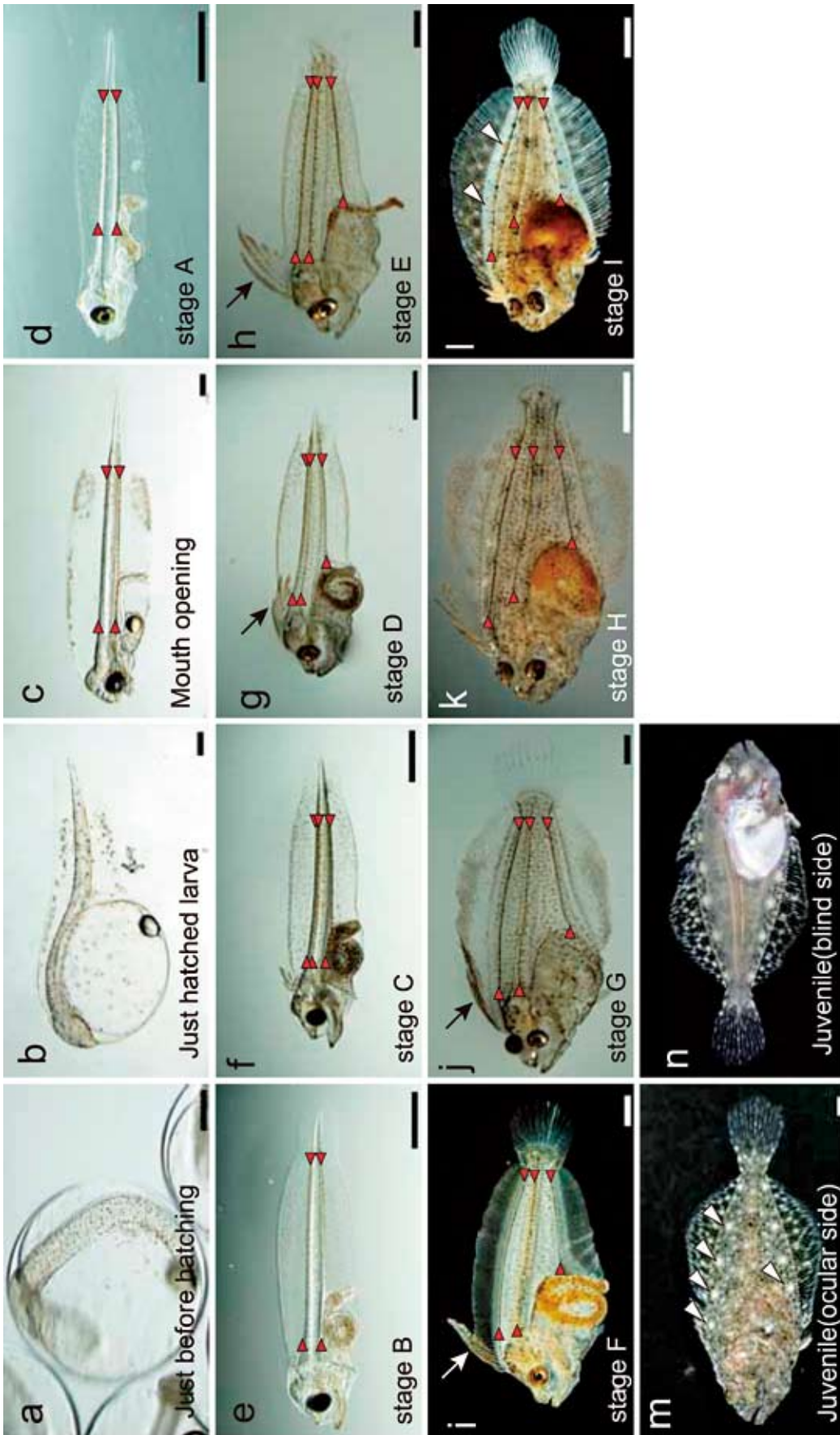


Fig. 1. Postembryonic developmental stages of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. a: Embryo at 48 hr after fertilization. b: Newly hatched yolk sac larva at 2 days after fertilization. c: Mouth opening larva at 2 days after hatching (dah). d: Stage A larva at 8 dah. e: Stage B larva at 10 dah. f: Stage C larva at 12 dah. g: Stage D larva at 18 dah. h: Stage E larva at 20 dah. i: Stage F larva at 22 dah. j: Stage G larvae at 26 dah. k: Stage H larva at 28 dah. l: Stage I larva at 30 dah. m,n: Metamorphosed juvenile at 52 dah. m: ocular side, n: blind side. Red horizontal arrowheads in panels c–l indicate the pigment cell stripes. Black arrows in panels g–j indicate the expanded dorsal fins. White arrowheads in panel l–m indicate the cluster of iridophores. Scale bars = 200 μm in a–c, 1 mm in d–j, 2 mm in k–n.

および ABI377 automated sequencers (Applied Biosystems) を用いて付属のマニュアルにしたがっておこなった。得られた塩基配列情報は、NCBI blast を使用して、既知の *csflr*, *dct* および *kit* 遺伝子の配列と相同性検索をおこなった。本研究で得られた塩基配列は以下のとおり DNA Data Bank of Japan に登録した。*csflr* (714bp, accession numbers: AB546838), *dct* (709bp, accession numbers: AB546840), *kit* (697bp, accession numbers: AB546839)

1-2-3 色素細胞系列マーカー遺伝子の発現解析 (in situ hybridization)

仔魚期の発生過程における色素細胞の前駆細胞の挙動を検討するために、色素細胞系列のマーカー遺伝子の発現パターンを whole mount in situ hybridization 法によって追跡した。whole mount in situ hybridization は、既述 (Parichy et al., 2000b; Budi et al., 2008) の方法に従ったが、若干の改変を加えた。具体的には、ハイブリダイゼーション時間を長く取り (72 時間) ハイブリダイゼーション温度も高く設定した (55 ~ 60°C)。DIG ラベル RNA プロブ (*csflr*, *dct* と *kit*) は、Ampliscribe T7 High Yield Transcription kit (Epicentre Technologies) を用いて、付属のマニュアルに従って作成した。

Parichy et al. (2000b) に従い、ハイブリ時の試薬の浸透を促すため、それぞれの発生ステージの仔魚は最水和の前に両刃カミソリで横方向に切断し数 mm のスライスを作成した。in situ hybridization のために、2 日おきにサンプリングを行い、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。

1-2-4 DiI および DiO の顕微注入による前駆細胞の追跡

CM-DiI (Molecular Probes) は、2.5mg/ml のエタノール溶液を作成しこれをストック溶液とし、仔魚に顕微注射する直前に、さらに 0.3M サッカロースで希釈し最終濃度 0.25mg/ml となるように調整した (Sakaguchi et al., 2006)。SP-DiO (Molecular Probes) は、はじめ 1.0mg/ml のエタノール溶液を作成し、さらに 0.3M サッカロ

ースで最終濃度 0.1mg/ml となるように調整した。そして、stage C から stage H までの各ステージの仔魚 (Fig.1,10,11,12,13) の背鰭基部および臀鰭基部に、これら CM-DiI および SP-DiO 溶液を顕微注射してこの領域に分布する細胞に蛍光標識を施し、標識細胞の移動および細胞運命を追跡した。顕微注射直後に胴部筋節および鰭先端部に蛍光色素が漏れ出した仔魚は取り除き、実験に使用しなかった。CM-DiI および SP-DiO 標識個体の一部を、顕微注射後 2 ~ 7 日後に 4% パラフォルムアルデヒド (pH7.2) で固定し蛍光標識細胞の移動の観察に使用した。残りの標識個体は変態完了まで飼育を継続した後 4% パラフォルムアルデヒド (pH7.2) で固定し、標識細胞の細胞運命の確認をおこなうために使用した。固定サンプルは、ホールマウント蛍光顕微鏡観察および凍結切片作製まで、4% パラフォルムアルデヒド中 4°C で保存した。

1-2-5 凍結組織切片の作成

ホールマウント in situ hybridization をおこなった (*csflr*, *dct* および *kit*) 仔魚は、凍結切片作成のために、4% パラフォルムアルデヒドで再固定をおこなった。この再固定サンプルと 4% パラフォルムアルデヒドで固定した DiI および DiO 標識仔魚および稚魚サンプルは、10%, 20%, 30% のスクロースで置換後 OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) で包埋した。次に 8-12 μ m の横断凍結切片を Microm 505E cryostat (Zeiss) を使用して作成した。

1-2-6 画像解析

ホールマウント標本は、蛍光双眼実態顕微鏡 Leica MZ16F (Leica) で観察し、オリンパス DP71 デジタルカメラ (オリンパス) を用いて画像撮影をおこなった。凍結切片は Zeiss Axiophot 蛍光顕微鏡 (Zeiss) で観察し、オリンパス DP71 デジタルカメラ (オリンパス) を用いて撮影をおこなった。撮影画像は、Adobe Photoshop software を用いて最適化をおこなった。さらに、DiI および DiO 標識細胞の撮影画像は、蛍光イメージと明視野イメージの合成画像を作成した。

1-3 結果

1-3-1 ヒラメの色素細胞の出現動態

ヒラメの体色パターン形成機構を理解するための最初のステップとして、本種の色素細胞の出現過程を再検討した。ヒラメ仔魚期の発生ステージは形態学的な基準(南, 1982)に基づいて、stage Aからstage Iまでに区分した(Fig.1)。受精48時間後に、はじめて2種類の樹枝状の色素細胞の出現を確認した。これら2種類の細胞は共に体節と卵黄上に左右対称に分布していた。透過光による顕微鏡観察では、一方は茶褐色から黒色、もう一方は黄色がかった茶色であり(Fig.1a)識別は容易ではなかった。しかし反射光による観察により、前者がメラニン色素を持つ黒色素胞で、後者が白い反射光を発する白色素胞であることが明らかであった(Fig.2a)。また、前者の黒色素胞は出現タイミングと50 μ mを超える細胞サイズから仔魚型黒色素胞であると結論した(Fig.2a)。ふ化直後の仔魚では(Fig.1b)、仔魚型黒色素胞と白色素胞はさらに樹枝状の突起を発達させた(Fig.2b)。これらの細胞は胴部、卵黄、背鰭及び臀鰭上に左右対称に分布した。ふ化後2日目の開口期仔魚(Fig.1c)では、白色素胞と仔魚型黒色素胞はさらに樹枝状の形状を発達させ(Fig.2c)ながら背鰭及び臀鰭基部に直線上に分布し、2本の前後方向のストライプを形成した(Fig.2d)。ふ化後8日目のstage A(Figs.1d, 2e-f)になって初めて、胴部と背鰭・臀鰭上に黄色素胞が出現した。黄色素胞は透過光顕微鏡観察では黄色い色素が観察され、また、白色素胞とことなり反射光下でも反射的な色調を示さなかった。stage Aには、白色素胞は背鰭および臀鰭縁辺部にそって高密度に分布した(Fig.2f)。stage B(ふ化後10日目, Fig.1e, 2g-h)には、黄色素胞はさらに発達した(Fig.2g)。このstage Bには、背鰭基部および臀鰭基部上、脊髄と脊索の接線上にあわせて3本の前後方向の色素細胞(仔魚型黒色素胞と白色素胞)によって形成されるストライプが観察された(Fig.2h, 赤矢じり)。これらのストライプは、変態が完了するstage Iまで確認できた(Fig.1l)。stage D(ふ

化後18日目, Fig.1g)以降には、白色素胞は、よく発達した伸張鰭条上に高密度で分布するようになった(Fig.1g-j, 矢印)。stage E(ふ化後20日目, Fig.1h)には、上記のストライプ上に、仔魚型黒色素胞と白色素胞に加えて黄色素胞が分布するようになった(Fig.3a)。右眼が左体側(将来の有眼側)にむかって移動を開始するstage G(Fig.1j)には、黄色素胞は左右の両体側でより発達した(Fig.3b)。さらに、stage Gの後半には小さな反射性のある虹色素胞が左右の両体側に出現し、同時に白色素胞は減少した(Fig.3c)。虹色素胞と白色素胞はともに反射性物質を含んでいるが、細胞のサイズと形態が異なっている。白色素胞は虹色素胞に比較して極めて大きく、よく発達した樹枝状の形状をしている。一方虹色素胞は点状の形状を示す(Fig.3a,c)。stage Hの後期(Fig.1k)には、白色素胞は背鰭基部および臀鰭基部以外から消失した(Figs.3d-e)。その後、多くの虹色素胞が出現し、有眼側(左体側)の背鰭および臀鰭上と体側部において複数のクラスターを形成した(Fig.3d-e)。このころ、無眼側(右体側)の虹色素胞はまばらに分布し、クラスターを形成することはなかった。stage I(Fig.1l)には、有眼側上では小型の成体型黒色素胞が大量に出現した(Fig.3f-g)が無眼側には出現しなかった(Fig.3h)。成体型黒色素胞は、その細胞のサイズから明瞭に仔魚型黒色素胞と識別できた。stage I以降、変態を完了した稚魚において、虹色素胞は有眼側全体でクラスターを形成した。このころ、虹色素胞は無眼側全体にも大量に分布するようになるが、クラスターを形成することはなく一様な分布を示した(Fig.3h)。stage I以降、黄色素胞は、有眼側でさらによく発達したのと対照的に、無眼側では減少し最終的に消失した(Fig.3f-h)。有眼側では、変態後、成体型色素細胞、虹色素胞、黄色素胞と少数の仔魚型黒色素胞が構成的に配置されることで複雑な体色パターンを形成した。一方無眼側では、一様に分布した多数のイリドフォアとまばらな仔魚型黒色素胞が単調な青白い体色パターンを形成した。

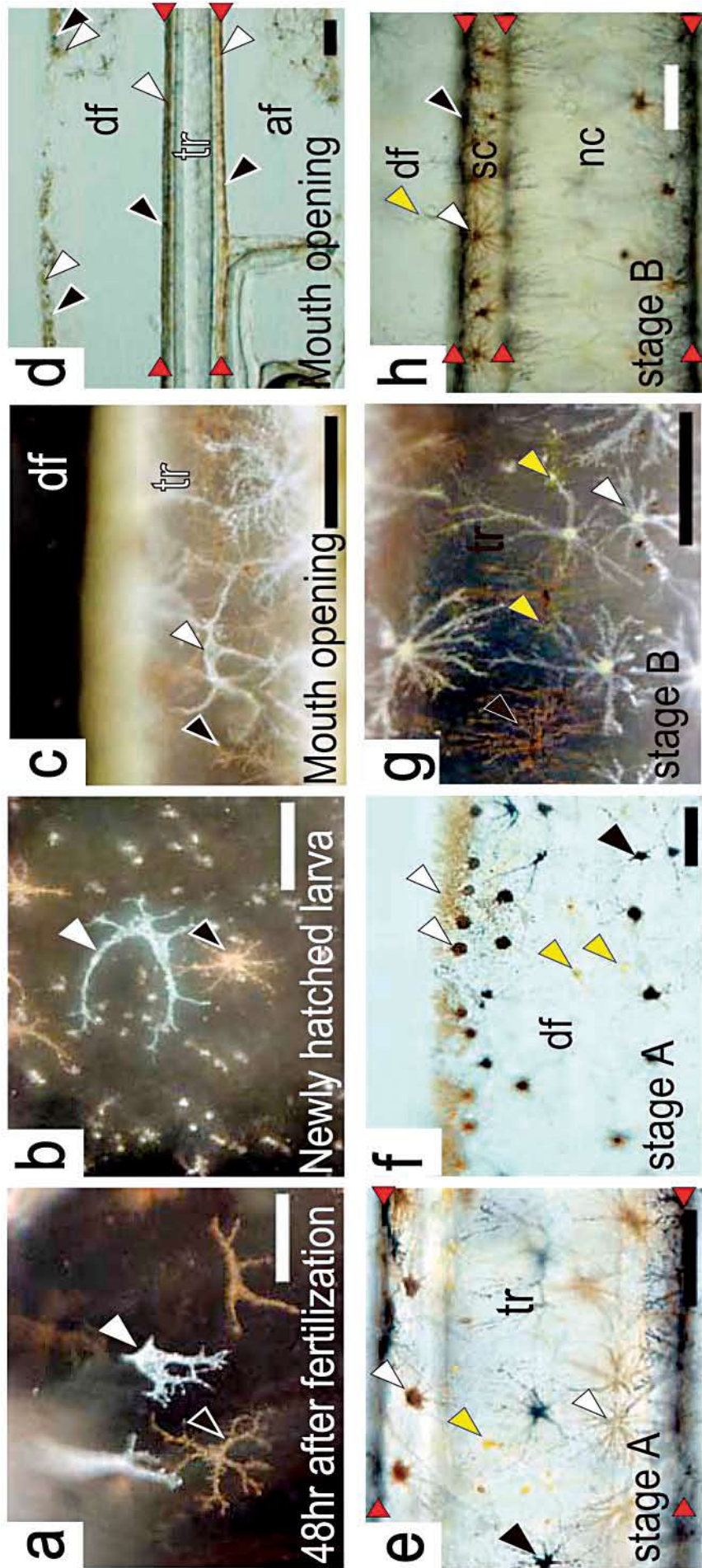


Fig.2. Five distinct types of pigment cells appear during the late embryonic and postembryonic development of *P. olivaceus*. a, b: larval melanophores and leucophores on the trunk of the body at 48 hr after fertilization (stage in Fig. 1a) and newly hatched larva at 2 days after fertilization (stage in Fig. 1b). Black arrowheads show larval melanophores, and white arrowheads show leucophores. c, d: in mouth opening larva at 2 days after hatching (dah; stage in Fig. 1c). c: leucophores and larval melanophores developed more dendritically on the flank symmetrically. Black arrowheads show larval melanophores, and white arrowheads show leucophores. d: Two stripes of pigment cells (red arrow heads) appear on the dorsal and ventral margins of the flank. These stripes were composed of larval melanophores and leucophores. e, f: At stage A (8dah, stage in Fig. 1d), xanthophores became detectable on the trunk (e), and dorsal (f) and anal fin. Yellow arrowheads show xanthophores. In panel f, leucophores (white arrowheads) well developed along the dorsal fin tip. g: Xanthophores developing dendritically on the trunk at stage B (10dah, stage in Fig. 1c). h: At stage B, three stripes of pigment cells on the dorsal and ventral margins of the flank and the upper edge of notochord.

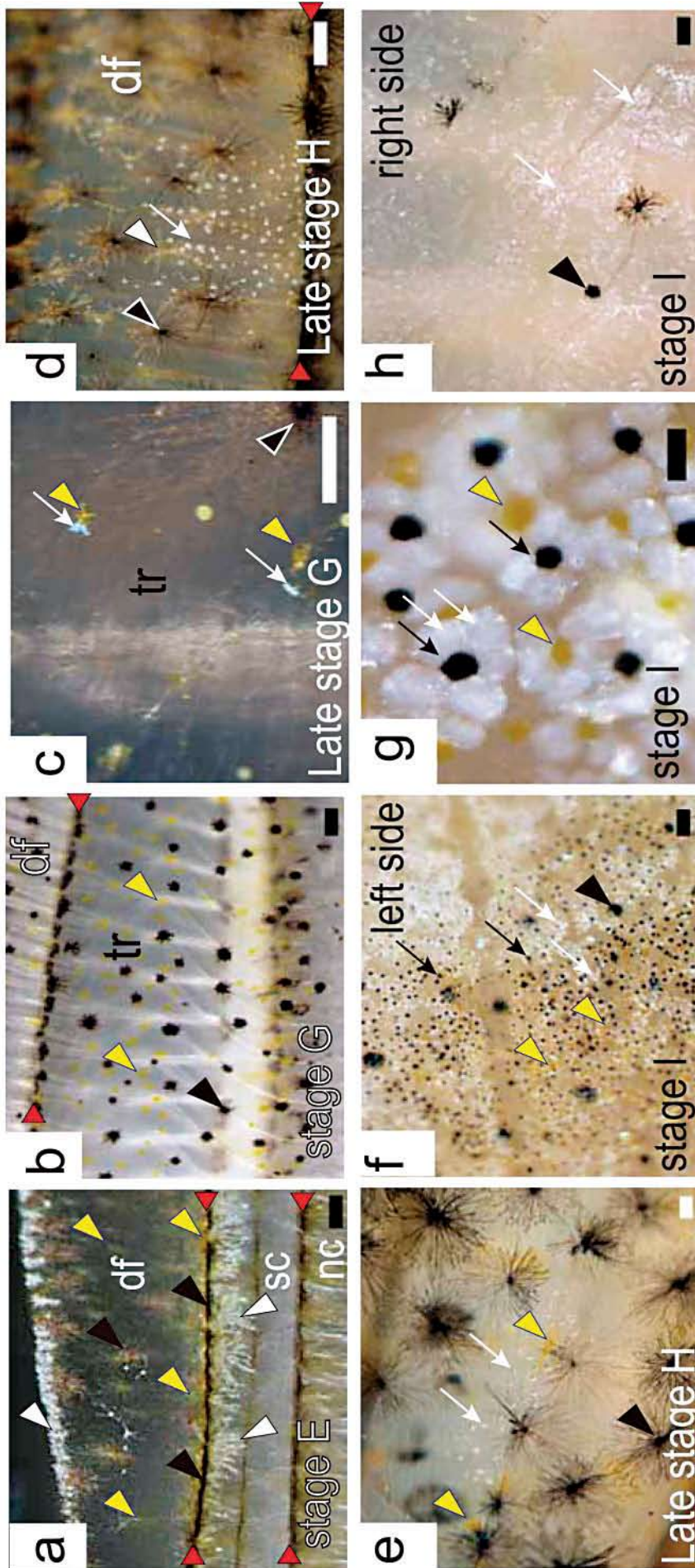


Fig. 3. a: Xanthophores appear in pigment stripes at stage E (20 dah). Yellow arrowheads show xanthophores. Black arrowhead shows larval melanophores and white arrowheads show leucophores, respectively. b: Xanthophores (yellow arrowheads) more developed on the flank at stage G (26 dah). The black arrowhead shows a larval melanophore. Panel b shows the left side, but it is the same on the right side. c: Iridophores appear on both left and right sides of the body at late stage G. White arrows show iridophores. d,e: Iridophores appear and begin to form several clusters along the fin folds (d) and trunk (e) on the ocular side at late stage H (28 dah). f-h: at stage I. On the ocular side (f,g), adult-type melanophores, larval melanophores, iridophores and xanthophores distribute constitutively. g: Higher magnification view of f. On the blind side (h), only iridophore and larval melanophore distributed dispersely. Black arrows show adult-type melanophores, and white arrows show iridophores. c, f, h: Taken under reflected light. b: Taken under transmitted light. a, d, e: Taken by superimposing the images under reflected light and transmitted light. df, dorsal fin; af, anal fin; sc, spinal cord; nc, notochord. View in all except h: anterior to the left and dorsal to the top; in o: anterior to the right and dorsal to the top. Red horizontal arrowheads in d, e, h, a, b and d indicate the pigment cell stripes. Scale bars = 50 μ m.

本章においてヒラメの胚期後期から変態完了までの体色パターン形成過程を詳細に観察した。得られた結果は、以下のように要約できる。すなわち、白色素胞と仔魚型黒色素胞が左右対称にふ化直前の受精後48時間で出現し、その後、この2種類の色素細胞はさらに樹枝状に発達する。しかし、白色素胞は変態期の後期には減少し消失した。黄色素胞は、仔魚型黒色素胞、白色素胞より遅れて、ふ化後8日目のstage Aに始めて左右対称に出現した。その後、仔魚型黒色素胞、白色素胞、黄色素胞が背鰭基部上と臀鰭基部上、および脊髄と脊索の接線上に前後方向の3本のストライプを形成した。このストライプは変態の完了まで観察することができた。黄色素胞は、有眼側ではよく発達するのに対して、変態完了後無眼側からは消失した。虹色素胞は、stage Gの後期に左右対称に出現したが、その後左右非対称な分布を示すようになり、有眼側ではクラスターを形成して斑紋上の白斑を形成するのに対し、無眼側では、一様に分布することにより全体として青白い単調な体色を形成した。成体型黒色素胞は、他の色素細胞に比較して、最も遅れてstage Iになって始めて有眼側にだけ出現し、黄色素胞、虹色素胞とともに有眼側の複雑な体色パターンを形成した。

1-3-2 ヒラメ仔魚期の色素細胞系列マーカー遺伝子の in situ hybridization による発現解析

変態後期から変態完了期になってはじめて出現する成体型色素胞の起源を明らかにするために、色素細胞系列のマーカー遺伝子、*csflr*, *dct*, *kit* の仔魚期における発現パターンを in situ hybridization により検討し成体型色素細胞の前駆細胞の分布動態を明らかにした。

1-3-2-1 ヒラメ仔魚期における *csflr* 遺伝子の発現

ヒラメでは、*csflr* は仔魚期を通じて強く発現していた (stage B から stage H まで; Fig.4,7) が、特に背鰭基部および臀鰭基部領域で主に強く発現していた (Fig.4b-c,7)。また、この領域の *csflr* 発現細胞は、stage B から stage G まで (Fig.4b-c,7) の間、左右対称に分布していた。

Stage H の後期、背鰭基部および臀鰭発現における *csflr* の発現は左右非対称性を示し、右体側 (無眼側) での発現は相対的に弱かった (Fig.7h)。また、*csflr* は、背鰭と臀鰭上 (Fig.4f-i) および体側部 (Fig.4j-m) の体表でも発現が認められたが、体側部での発現レベルは、stage H の後期 (Fig.4i) をのぞく仔魚期の間中、鰭基部 (Figs.4b-c,7) や鰭上 (Fig.4f-i) に比較して弱かった (Fig.4j-m)。加えて、*csflr* は、背鰭と臀鰭の縁辺部でも強く発現 (Fig.4f-g) していたが、この領域は白色素胞が高密度で分布している領域と一致した (Figs.1f-j,2f,3a)。また、背鰭、臀鰭上および体側部においても、stage B から stage G までの *csflr* 発現細胞の分布は左右対称であったが、stage H の後期には *csflr* の発現パターンは左右非対称性を示し、特に左体側 (有眼側) の腹部で高度に発現した (Fig.4l)。 *csflr* は成熟した仔魚型黒色素胞上でもある程度の発現が認められたが (Fig.4f,i)、主要な発現細胞はメラニンを形成していない細胞であった (Fig.4b-m)。

1-3-2-2 ヒラメ仔魚期における *dct* 遺伝子の発現

ヒラメにおいて、*dct* は主にメラニンを生成している黒色素胞上での発現が目立ったが (Fig.5)、メラニンを形成していない細胞上でも発現が認められた (Fig.5c,g)。発現細胞の分布は stage G まで左右対称であった (Fig.8)。また *dct* の発現は *csflr* の発現に比較すると相対的に弱い傾向が見られたが、stage B から stage G までは、背鰭基部および臀鰭基部にそって *csflr* 同様の強い発現が認められた (Figs.5b-c,8)。stage H には、鰭基部での *dct* の発現は検出できなかった。しかし、この時期、背鰭、臀鰭上および体側部上の成熟した仔魚型黒色素胞上で、弱い *dct* の発現を確認することができた (Fig.5d,e,i)。

1-3-2-3 ヒラメ仔魚期における *kit* 遺伝子の発現

csflr, *dct* と同様に、*kit* も stage B, stage C, stage D, および stage G に背鰭基部および臀鰭基部上で左右対称な強い発現が認められた (Fig.9)。また、*kit* は鰭上および体側部上でも

csf1r expression

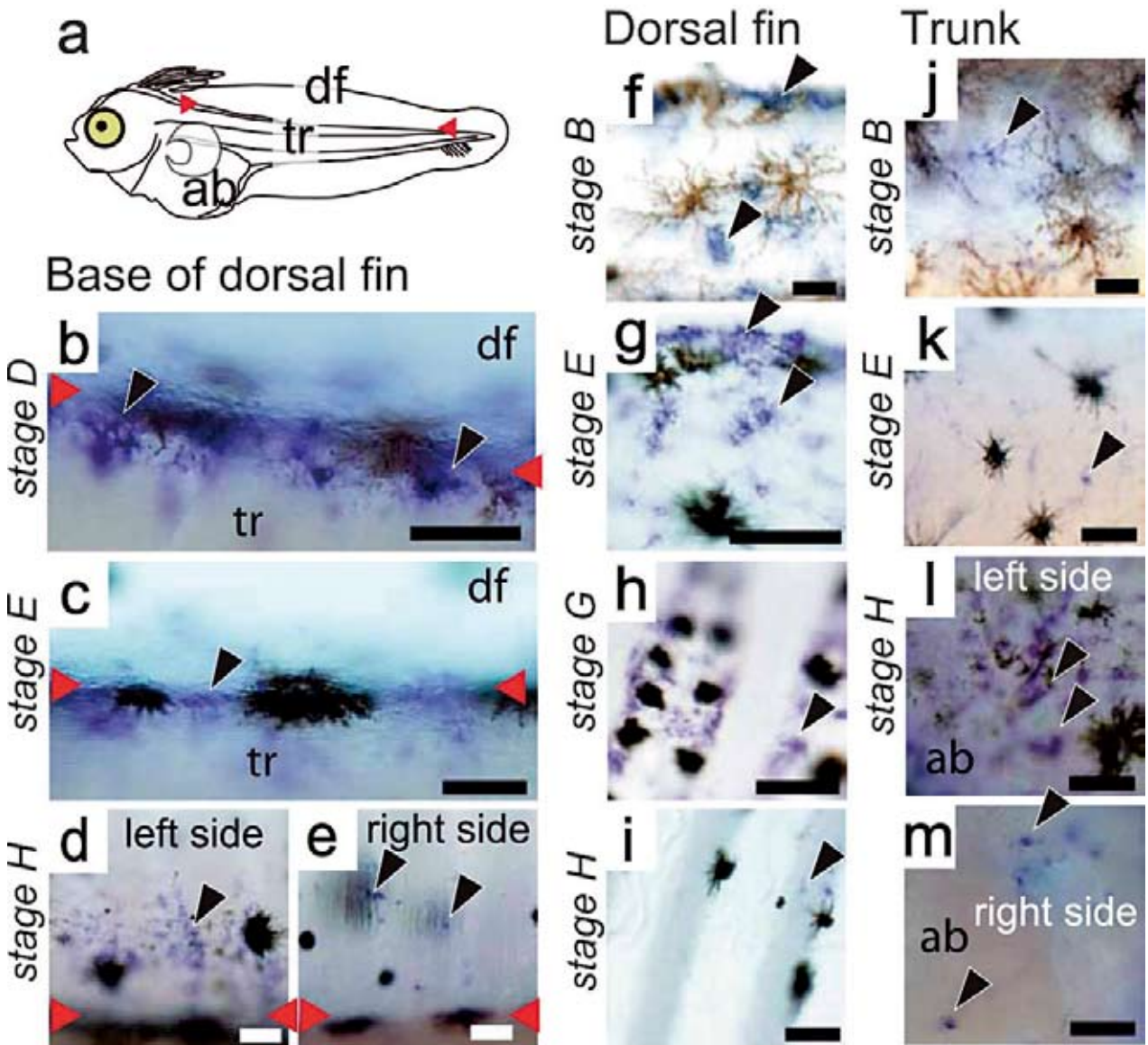


Fig. 4. The expressions of pigment cell lineage marker gene *csf1r* in whole-mount larvae. a: Schematic views of the regions of the body in *P. olivaceus* larva. df, dorsal fin; tr, trunk; ab, abdominal area. Red horizontal arrowheads indicate the pigment cell stripe located along the dorsal margin of the flank. b-e: the expression of *csf1r* on the dorsal margin of the flank. b and c: *csf1r* expression (e.g., black arrowheads) at stage D and E, respectively. d and e: *csf1r* expression at stage H on the ocular side (d) and on the blind side (e). f-i: *csf1r* expression at stage B, E, G and H in the dorsal fin. j-m: *csf1r* expression at the stage B (j), E (k), H (l: ocular side; m: blind side) on the trunk. View in all except e, m, anterior to the left and dorsal to the top. Scale bars = 50 μ m.

発現していたが、これらの領域における発現は、*csf1r*, *dct* よりも弱いものであった。これらの発現細胞以外にも、多くの小さな *kit* 発現細胞が胴部の表皮内に見つかった (Fig.6i-j,9e)。成熟した色素細胞や *csf1r*, *dct* を発現する色素細胞前

駆細胞はすべて表皮と体節の境界領域に分布していたことから (Fig.7,8), 表皮内に分布する *kit* 発現細胞 (Fig.9e) は色素細胞系列の細胞ではないのかもしれない。また、これら表皮内の *kit* 発現細胞のサイズが *csf1r*, *dct* を発現する色素細

dct expression

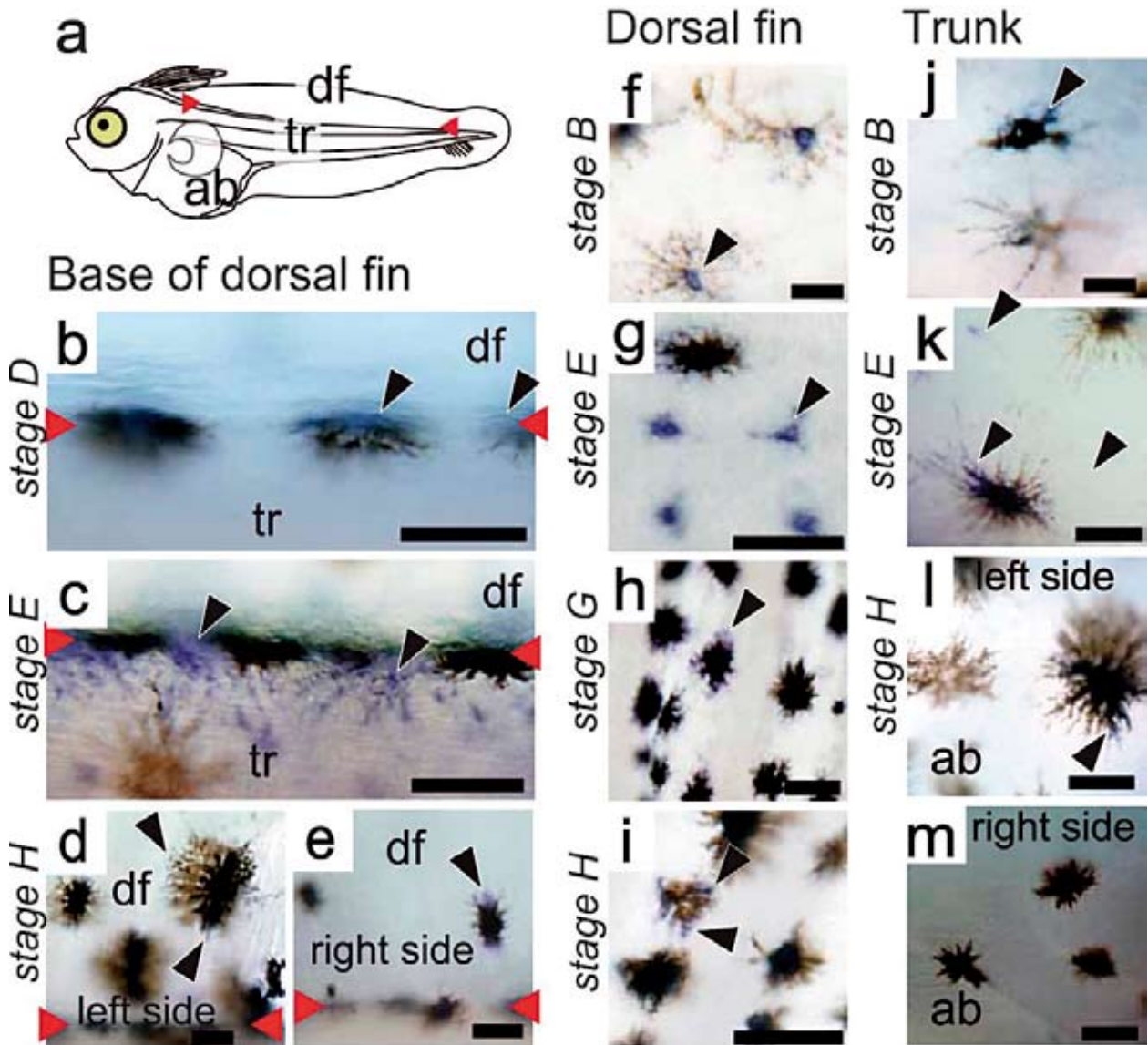


Fig. 5. The expressions of pigment cell lineage marker gene *dct* in whole-mount larvae. a: Schematic views of the regions of the body in *P. olivaceus* larva. df, dorsal fin; tr, trunk; ab, abdominal area. Red horizontal arrowheads indicate the pigment cell stripe located along the dorsal margin of the flank. b-e: the expression of *dct* on the dorsal margin of the flank. b and c: *dct* expression (e.g., black arrowheads) at stage D and E, respectively. d and e: *dct* expression at stage H on the ocular side (d) and on the blind side (e). f-i: *dct* expression at stage B, E, G and H on the dorsal fin. j-m: *dct* expression at the stage B (j), E (k), H (l: ocular side; m: blind side) on the trunk. View in all except e, m, anterior to the left and dorsal to the top. Scale bars = 50 μ m.

胞前駆細胞に比較して著しく小さいことも表皮内の *kit* 発現細胞が色素細胞前駆細胞ではないことを示唆する。stage Hになると、鰭基部および鰭上の発現は検出できなかったが、同じ時期の *csflr* と同様に有眼側の腹部で強い発現が見られ

た (Fig.6k)。この時期、無眼側での発現は認められなかった (Fig.6l)。

以上の発現解析の結果から、3つの色素細胞系列のマーカ遺伝子 *csflr*, *dct* および *kit* は、いずれも仔魚期には長期にわたって主に背鰭基

kit expression

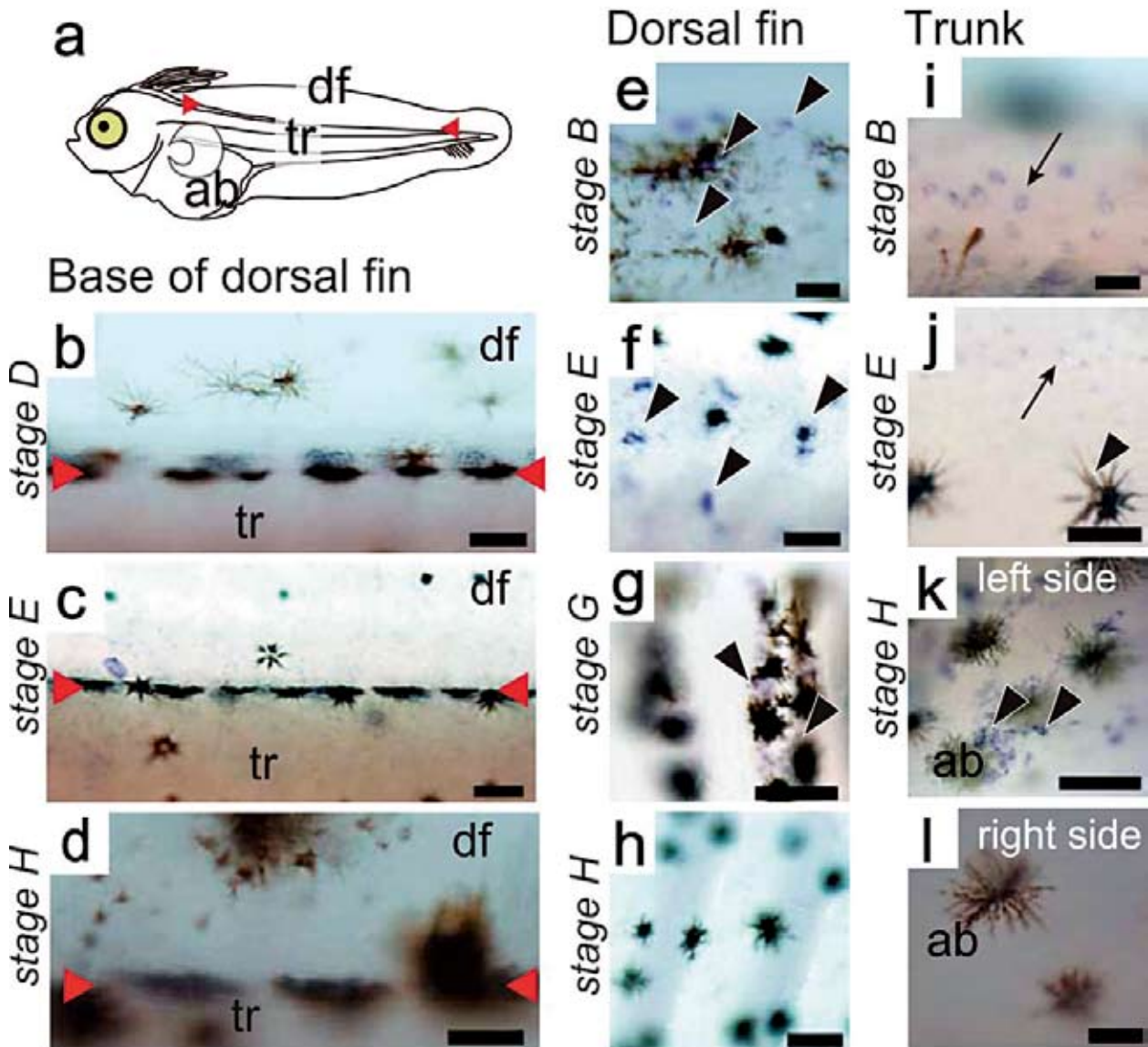


Fig. 6. The expressions of pigment cell lineage marker gene *kit* in whole-mount larvae. a: Schematic views of the regions of the body in *P. olivaceus* larva. df, dorsal fin; tr, trunk; ab, abdominal area. Red horizontal arrowheads indicate the pigment cell stripe located along the dorsal margin of the flank. b-e : the expression of *kit* on the dorsal margin of the flank. b and c: *kit* expression (e.g., black arrowheads) at stage D and E, respectively. d and e: *kit* expression at stage H on the ocular side(d) and on the blind side (e). f-i: *kit* expression at stage B,E,G and H in the dorsal fin. j-m: *kit* expression at the stage B(j), E(k), H(l: ocular side; m: blind side) on the trunk. View in all except e, m, anterior to the left and dorsal to the top. Scale bars = 50 μ m.

部および臀鰭基部で発現することが明らかとなった。このことは、これらのマーカー遺伝子を発現する未分化な色素細胞前駆細胞がおもに背鰭基部および臀鰭基部に局在していることを示唆した。

csf1r expression

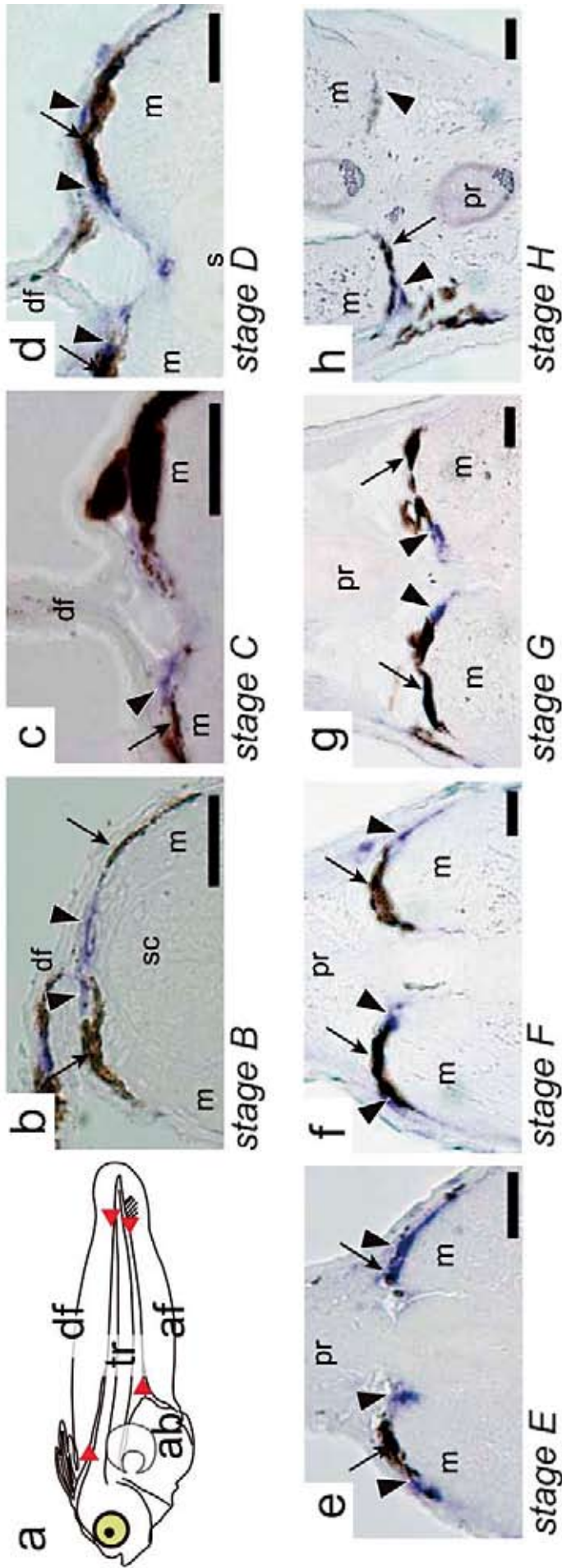


Fig.7. Pigment cell lineage marker gene *csf1r* expression on the dorsal and ventral margins of the flanks during the postembryonic larval development. All panels are views of 12-mm cryosections through the middle trunk of the larvae. Black pigments (arrows) are stripes of melanophores located on the dorsal (all except h) and ventral (h) margin of the flanks. b-h: the gene *csf1r* is expressed at the dorsal and ventral margins of the flank bilaterally (e.g., arrowheads) throughout the larval stages, while the expression on the left side becomes more intensive at stage H (h).m, myotome; df, dorsal fin; sc, spinal cord; pr, proximal radial; e, epidermis. View in all : left side to the left and dorsal to the top. Scale bars = 20µm.

dct expression

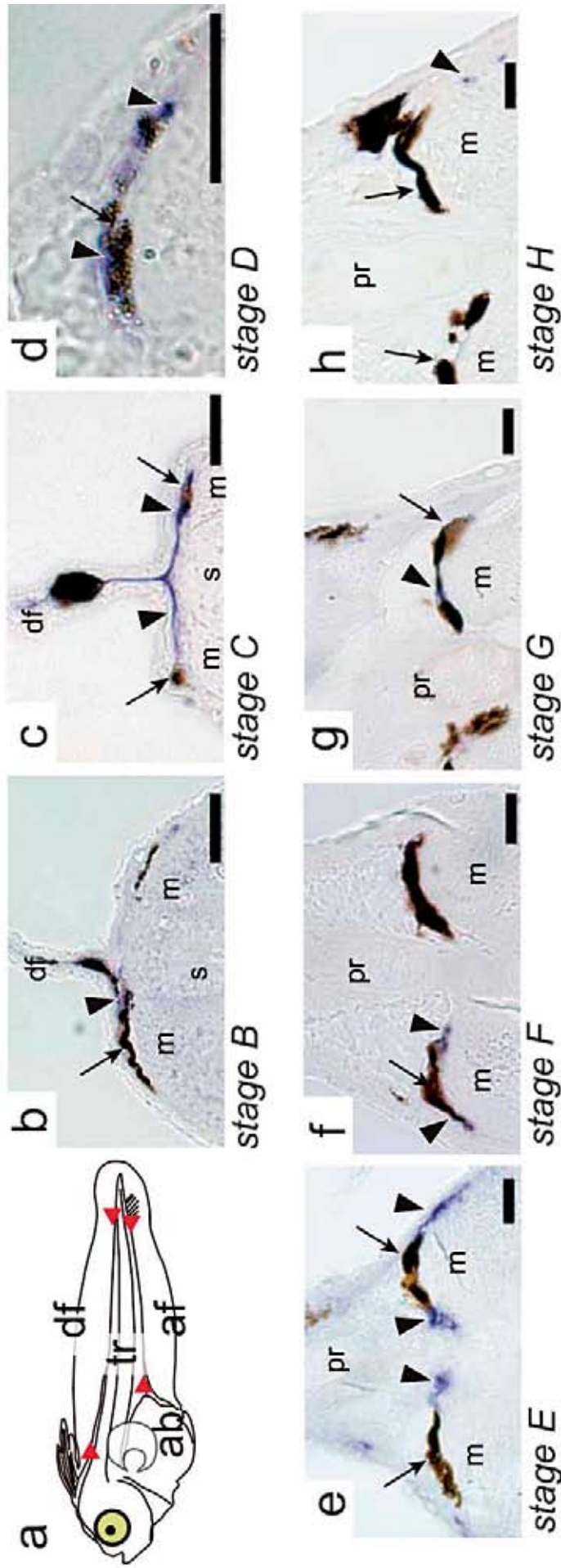


Fig.8. Pigment cell lineage marker gene *dct* expression on the dorsal margins of the flanks during the postembryonic larval development. All panels are views of 12-mm cryosections through the middle trunk of the larvae. Black pigments (arrows) are stripes of melanophores located on the dorsal margin of the flanks. b-h: the gene *dct* is expressed at the dorsal margins of the flank bilaterally (e.g., arrowheads) throughout the larval stages. m, myotome; df, dorsal fin; se, spinal cord; pr, proximal radial; e, epidermis. View in all : left side to the left and dorsal to the top. Scale bars = 20µm.

kit expression

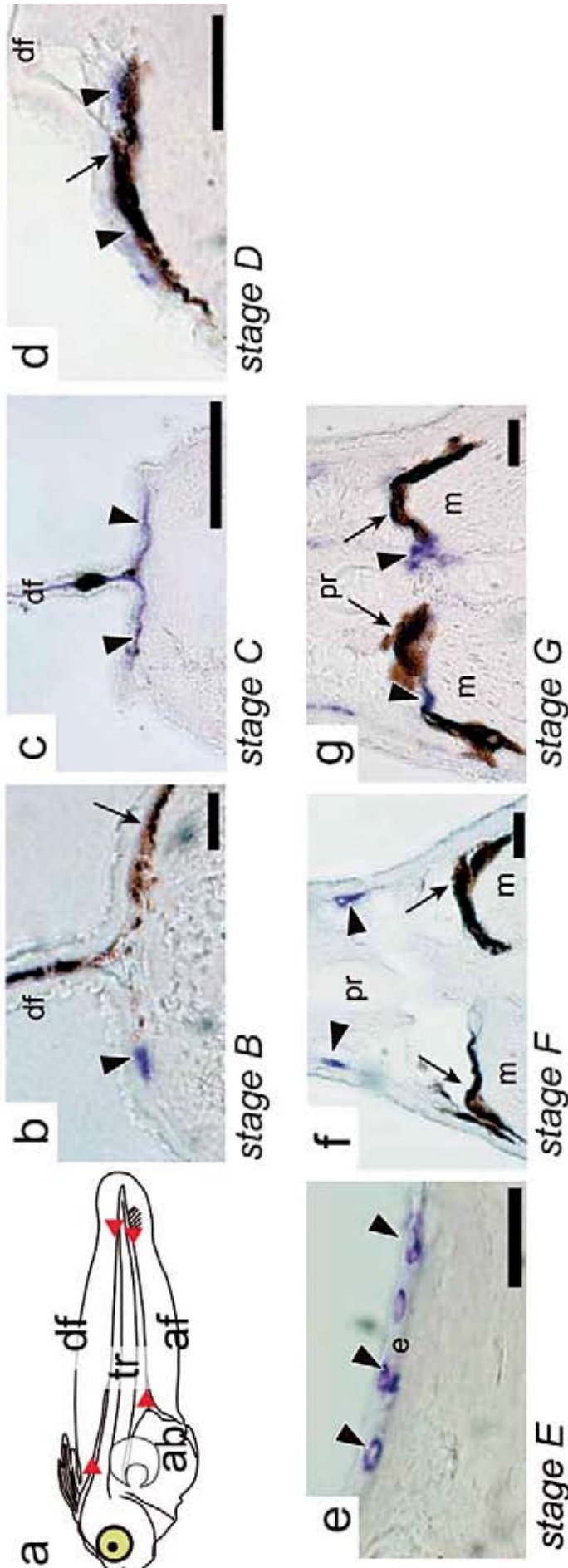


Fig. 9. Pigment cell lineage marker gene *kit* expression on the dorsal margins of the flanks during the postembryonic larval development. All panels are views of 12-mm cryosections through the middle trunk of the larvae. Black pigments (arrows) are stripes of melanophores. *kit* expression (e.g., arrowheads) on the dorsal margins of the flank is bilaterally symmetric similar to *csf1r* and *det* expressions at stage B (b), stage C (c), stage D(d), stage E (e), stage F(f), and stage G (g), while at stage E (e), stage F(f), and stage H were not detectable on the margin of the flank. Arrowheads in e show the *kit*-positive unknown cells. m, myotome; df, dorsal fin; sc, spinal cord; pr, proximal radial; e, epidermis. View in all: left side to the left and dorsal to the top. Scale bars = 20µm.

1-3-3 ヒラメ成体型色素細胞前駆細胞の動態とその細胞運命

筆者は、色素細胞系列のマーカー遺伝子の発現パターンから、未分化な色素細胞の前駆細胞は主に背鰭基部および臀鰭基部に局在しており、変態期にこの領域から前駆細胞が体側部に供給され、変態期後期になって体側部で成熟した色素細胞に分化するのではないかという仮説を設定した。そして、この仮説を検証するために、背鰭基部および臀鰭基部領域に分布する細胞を蛍光色素 CM-DiI および SP-DiO で蛍光標識し、蛍光標識細胞の移動とその細胞運命を追跡した。なお、CM-DiI および SP-DiO の顕微注入による蛍光標識は、stage C、stage D、stage E、stage F、stage G、stage H の各ステージごとに実施した。

1-3-3-1 背鰭基部および臀鰭基部から体側部への蛍光標識細胞の移動

stage C に蛍光標識をおこなってから2日後に、背鰭基部および臀鰭基部から体側部と背鰭と臀鰭の先端に向かって移動した標識細胞が多数観察された (Fig.10c-f)。さらに、これらの細胞の移動は、将来有眼側となる左体側に移動するだけでなく、将来無眼側となる右体側にも

移動した。すなわち、この細胞の移動は左右対称なものであった (Fig.10c-f)。さらに、stage D、E、F、G、H の各ステージに背鰭基部と臀鰭基部の細胞に蛍光標識した場合に、標識後4日から7日後には同様の細胞の移動が観察された (Fig.11-13; Table1)。また、標識個体の横断切片の観察から (Fig.14)、鰭基部から体側部への細胞の移動経路が、表皮と筋節との間に沿った側方経路だけでなく、正中線に沿った中央部経路もあることが観察された。

標識の2~7日後に体側部や鰭先端方向への移動が確認された細胞の大部分は色素を産生していない細胞であったが、一部の移動細胞は色素を有する仔魚型の色素細胞であった。すなわち、分化した仔魚型黒色素胞、黄色素胞も鰭基部領域から体側部と鰭先端部に向かって左右対称に移動することが分かった (Fig.15)。

また、上記の細胞の移動と逆方向の細胞移動の可能性を検討するため、背鰭の先端部に DiI を注入し先端部の細胞に標識を行い移動の有無を確認した。しかしながら、鰭先端部から体側中央部方向の移動は認められなかった (Fig.16)。

以上の結果から、仔魚期の stage C から stage

Table1. Cell migration from the margin of the flank based on DiI and DiO labeling

| Stage at labeling | Laveling site | Stages at Observation of migration | Days after labeling | N ^b | N of migration ^c | Direction of migration ^d | figure |
|-------------------|---------------|------------------------------------|---------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------|
| C | dmf | D | 2 | 7 | 7 | L,R,Tf | 10c,d |
| | vmf | D | 2 | 10 | 10 | L,R,Tf | 10e,f |
| D | dmf | E-F | 7 | 5 | 5 | L,R,Tf | 11c,d |
| | vmf | E | 4 | 10 | 10 | L,R,Tf | 11e,f |
| E | dmf | E-F | 5-7 | 26 | 26 | L,R,Tf | 12c,d,18a |
| | vmf | E-F | 5 | 12 | 12 | L,R,Tf | 12e,f |
| F | dmf | F-G | 5 | 29 | 29 | L,R,Tf | 13c,d |
| | vmf | F-G | 4-7 | 20 | 20 | L,R,Tf | 13e,f |
| G | dmf | H-I | 7 | 17 | 17 | L,R,Tf | 17a |
| | vmf | I | 16 | 22 | 22 | L,R,Tf | - |
| H | dmf | I | 6-21 | 15 | 15 | L,R,Tf | - |
| | vmf | I | 14 | 5 | 5 | L,R,Tf | - |

^admf, the dorsal margin of the flank; vmf, the ventral margin of the flank. ^bN, Number of specimens investigated. ^cN of migration, Number of spesimens in which labeled cells migrated. ^dL, Toward the left lateral side of the body; R, Toward the right lateral side of the body; Tf, Toward the tip of fin.

Table2. Number of specimens in which DiI or DiO labeled pigment cells exist after metamorphosis^a

| Stage at labeling | Site of labeling ^b | N ^c | Side of the body | Number of specimens which has labeled pigment cells: | | | | | figure |
|-------------------|-------------------------------|----------------|------------------|--|----|-----|-----|-----|--------------------------------|
| | | | | adm | lm | xan | iri | non | |
| C | dmf | 2 | L | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 17b |
| | | 2 | R | 0 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| | vmf | 3 | L | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | |
| | | 3 | R | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | |
| D | dmf | 3 | L | 3 | 2 | 0 | 0 | 3 | |
| | | 3 | R | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | |
| E | dmf | 10 | L | 10 | 9 | 7 | 2 | 9 | 17c, 17e, 17f 18a, 18b, 18c |
| | | 10 | R | 0 | 3 | 8 | 1 | 10 | |
| | vmf | 10 | L | 9 | 7 | 1 | 0 | 5 | |
| | | 10 | R | 0 | 3 | 1 | 0 | 7 | |
| F | dmf | 18 | L | 18 | 17 | 8 | 1 | 11 | 17a, 17d |
| | | 18 | R | 0 | 11 | 12 | 1 | 13 | |
| | vmf | 10 | L | 10 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | | 10 | R | 0 | 5 | 0 | 0 | 10 | |
| G | dmf | 7 | L | 7 | 6 | 3 | 1 | 5 | 17a, 17d 18d |
| | | 7 | R | 0 | 3 | 5 | 1 | 7 | |
| | vmf | 11 | L | 11 | 11 | 0 | 0 | 7 | |
| | | 11 | R | 0 | 8 | 0 | 0 | 11 | |
| H | dmf | 8 | L | 8 | 6 | 0 | 5 | 6 | 17g 18e |
| | | 8 | R | 0 | 2 | 2 | 5 | 6 | |
| | vmf | 4 | L | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | |
| | | 4 | R | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |

^a Differentiated pigment cells which migrate from labeling site to lateral body side is investigated. ^b dmf, the dorsal margin of the flank; vmf, the ventral margin of the flank. ^c N, Number of specimens investigated; ^d adm, adult type melanophore. lm, larval melanophore; xan, xanthophore; iri, iridophore; non, non-pigmented cell

H の間に、多数の細胞が背鰭基部および臀鰭基部領域から左右の両体側と鰭先端部に向かって移動していくことが明らかとなった。さらに、移動元である背鰭基部および臀鰭基部は *csflr*, *dct* および *kit* がもっとも強く発現していた領域であった。これとは逆に、鰭の先端部から胴の中央部方向への細胞の移動は確認できなかった。すなわち、この細胞の移動は特異的な方向性を持ったものであることが示唆された。

1-3-3-2 仔魚期の各ステージに鰭基部から体側部へ移動した細胞の細胞運命

次に、鰭基部領域から体側部へと移動した細胞の細胞運命を明らかにするために、stage C, D, E, F, G, H の各ステージに DiI または DiO を背鰭基部および臀鰭基部に顕微注入したヒラメ仔魚を変態完了まで継続して飼育した。

Stage C に DiI を注入された仔魚では、変態完

了後、DiI 5 で標識された成体型黒色素胞 (Fig. 17b)、仔魚型黒色素胞、黄色素胞が有眼側の背鰭および臀鰭基部から離れた胴部で確認された (Table 2)。また無眼側の胴部では DiI 標識された仔魚型黒色素胞、黄色素胞が観察された (Table 2)。stage D に DiI を注入された変態後の稚魚では、有眼側の胴部で DiI 標識された成体型黒色素胞が観察され、無眼側の胴部では標識仔魚型黒色素胞が観察された (Table 2)。stage E, stage F, stage G に DiI または DiO を注入された変態後の稚魚では、有眼側の胴部で標識された成体型黒色素胞 (Fig.17a,c,d)、仔魚型黒色素胞 (Fig.17a,e)、黄色素胞 (Fig.17a,f)、虹色素胞 (Fig.17a) が観察された。また、無眼側の胴部では、仔魚型黒色素胞 (Fig.18a,b,d)、黄色素胞 (Fig.18a,c)、そして虹色素胞が観察された (Table 2)。stage H に DiI または DiO を注入された変態後の稚魚では、有眼

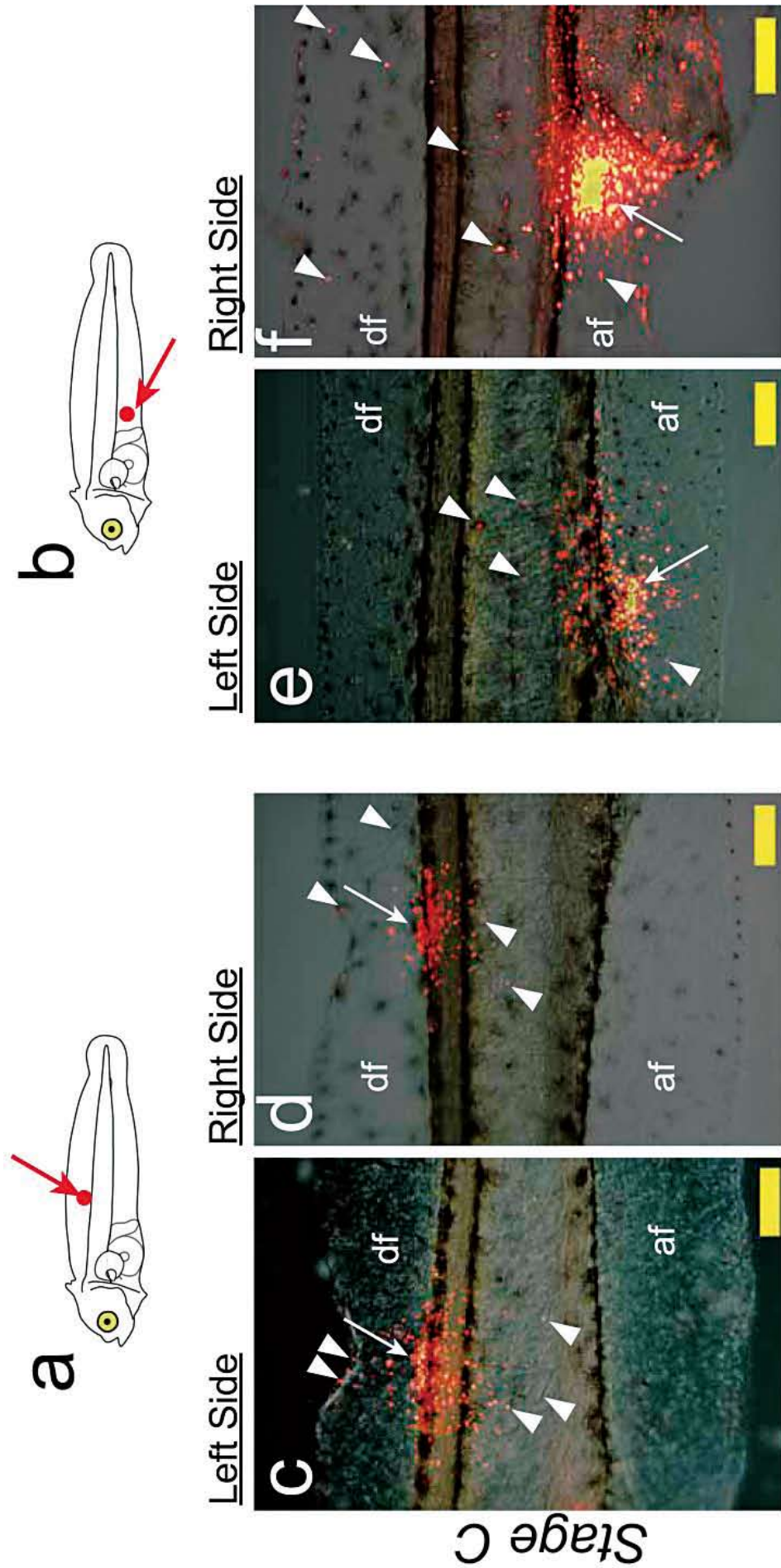


Fig. 10. Dil labeling of the cells on dorsal and anal margins of the flank at stage C and the migration of labeled cells to the flank of the left and right both sides. a and b: Schematic views of labeling stages and labeling points. Red dot indicate the focal labeling points and labeling points. Arrows indicate migration points. c-d: Labeling at dorsal margin of the flank. e-f: Labeling at ventral margin of the flank. Arrows indicate labeling point. c-d: Labeling at dorsal margin of the flank. e-f: Labeling at ventral margin of the flank. Observation of the labeled cells carried out 2 days after labeling. View in c-d: anterior to the left; in e-f: anterior to the right. df, dorsal fin; af, anal fin. Scale bars = 200 μ m.

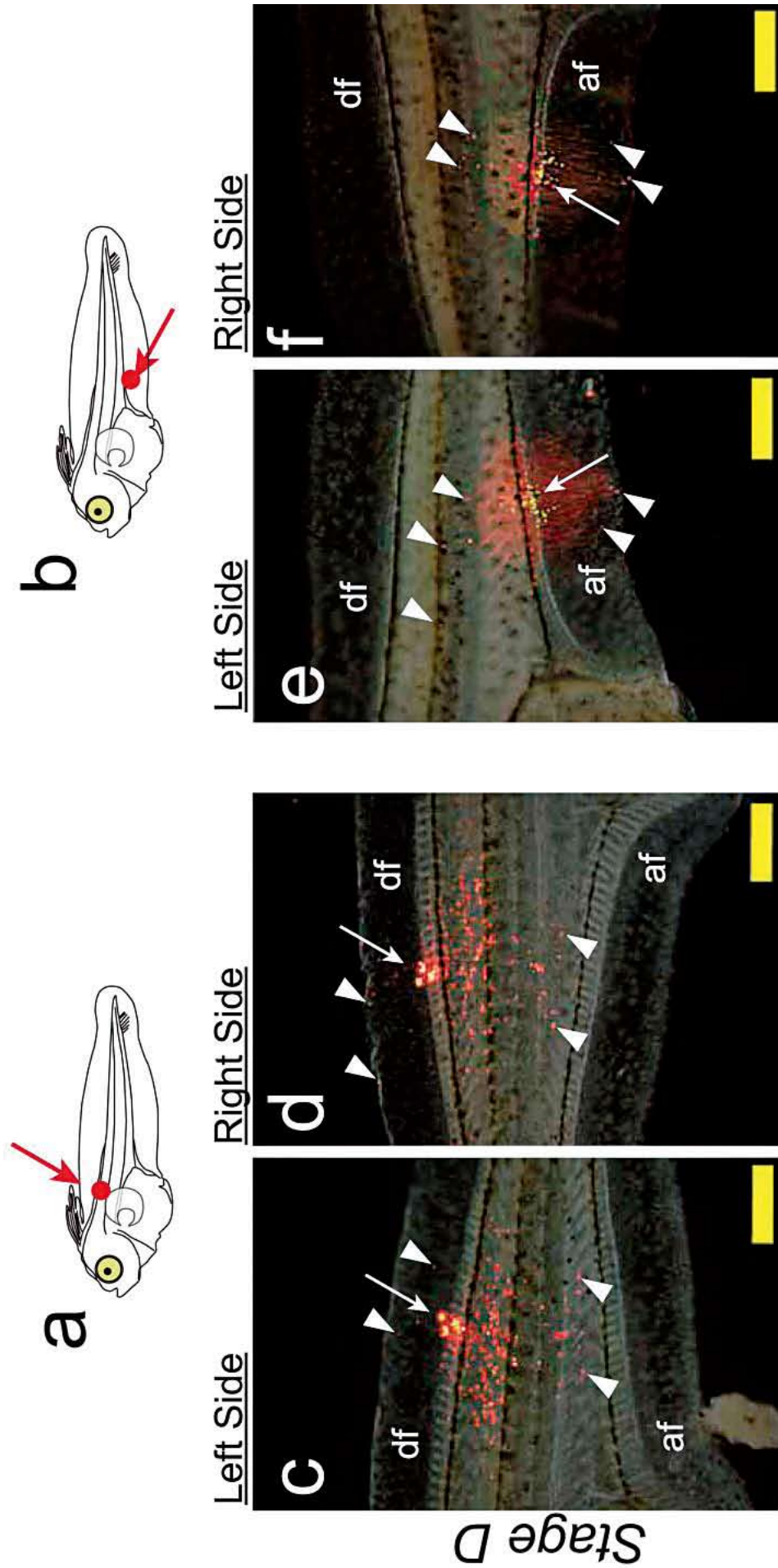


Fig.11. DiI labeling of the cells on dorsal and anal margins of the flank at stage D and the migration of labeled cells to the flank of the left and right both sides. a and b: Schematic views of labeling stages and labeling points. Red dot indicate the focal labeling points of DiI. c-f: Migration of labeled cells indicated by arrowheads. Arrows indicate labeling point. c-d: Labeling at dorsal margin of the flank. e-f: Labeling at ventral margin of the flank. Observation of the labeled cells carried out 4 days after labeling. View in c-d: anterior to the left; in e-f: anterior to the right. df, dorsal fin; af, anal fin. Scale bars = 200 μm.

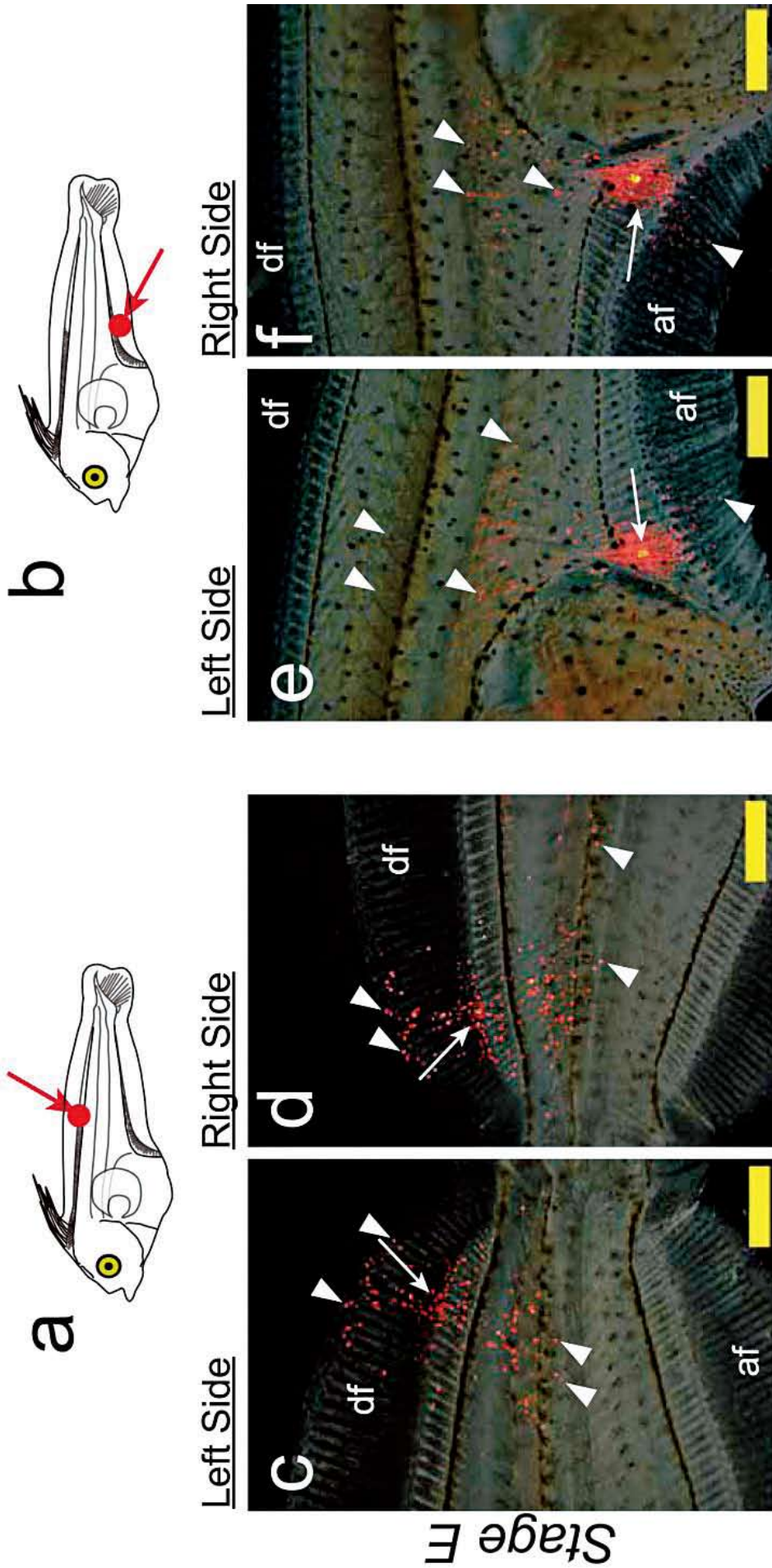


Fig. 12. Dil labeling of the cells on dorsal and anal margins of the flank at stage E and the migration of labeled cells to the flank of the left and right both sides. a and b: Schematic views of labeling stages and labeling points. Red dot indicate the focal labeling points of Dil. c-f: Migration of labeled cells indicated by arrowheads. Arrows indicate labeling point. c-d: Labeling at dorsal margin of the flank. e-f: Labeling at ventral margin of the flank. Observation of the labeled cells carried out 2 days after labeling. View in c-d: anterior to the left; in e-f: anterior to the right. df, dorsal fin; af, anal fin. Scale bars = 200 μ m.

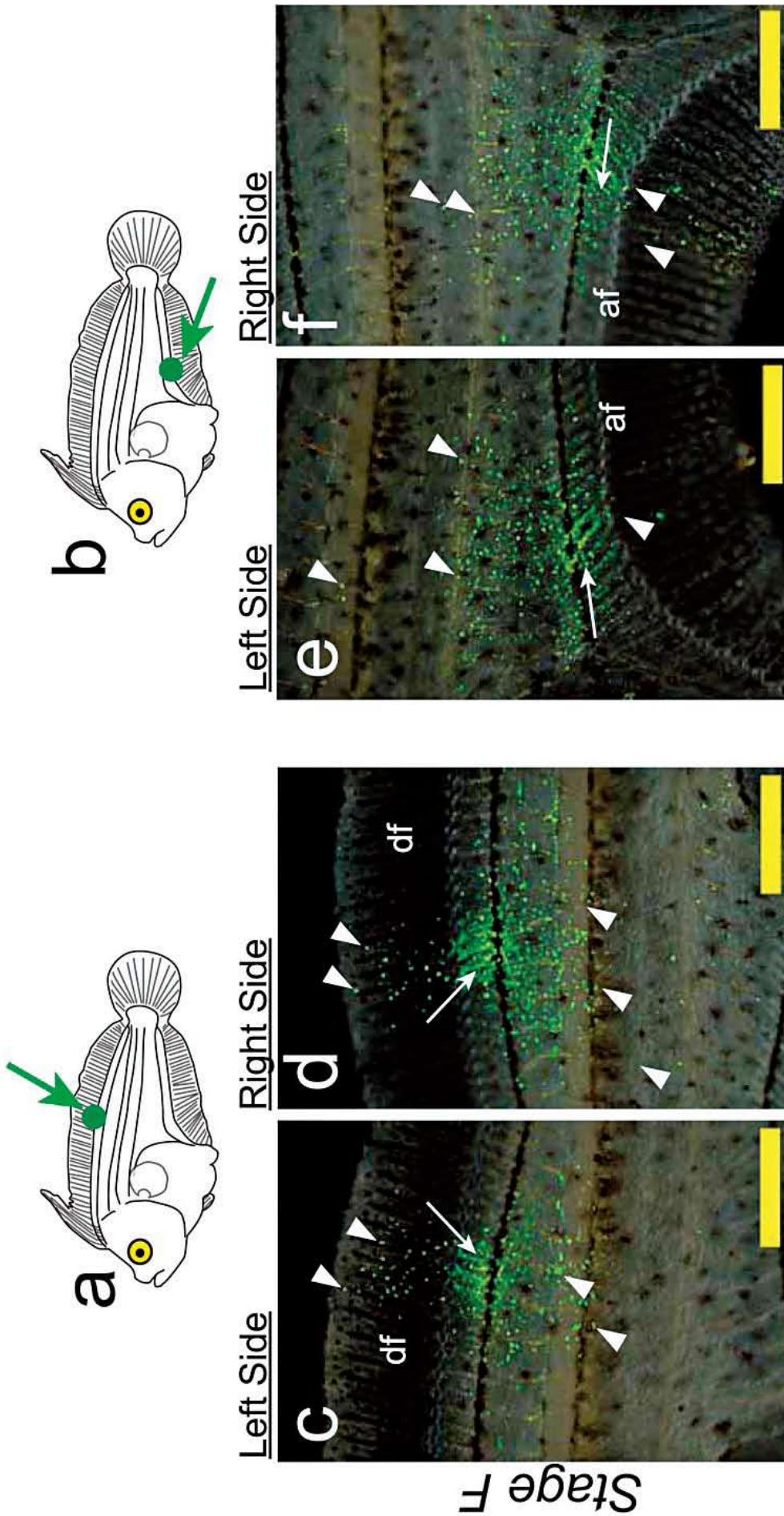


Fig. 13. DiO labeling of the cells on dorsal and anal margins of the flank at stage F and the migration of labeled cells to the flank of the left and right both sides. a and b: Schematic views of labeling stages and labeling points. Green dot indicate the focal labeling points of DiO. c-f: Migration of labeled cells indicated by arrowheads. Arrows indicate labeling point. c-d: Labeling at dorsal margin of the flank. e-f: Labeling at ventral margin of the flank. Observation of the labeled cells carried out 5 days after labeling. View in c-d: anterior to the left; in e-f: anterior to the right. df, dorsal fin; af, anal fin. Scale bars = 200 μ m.

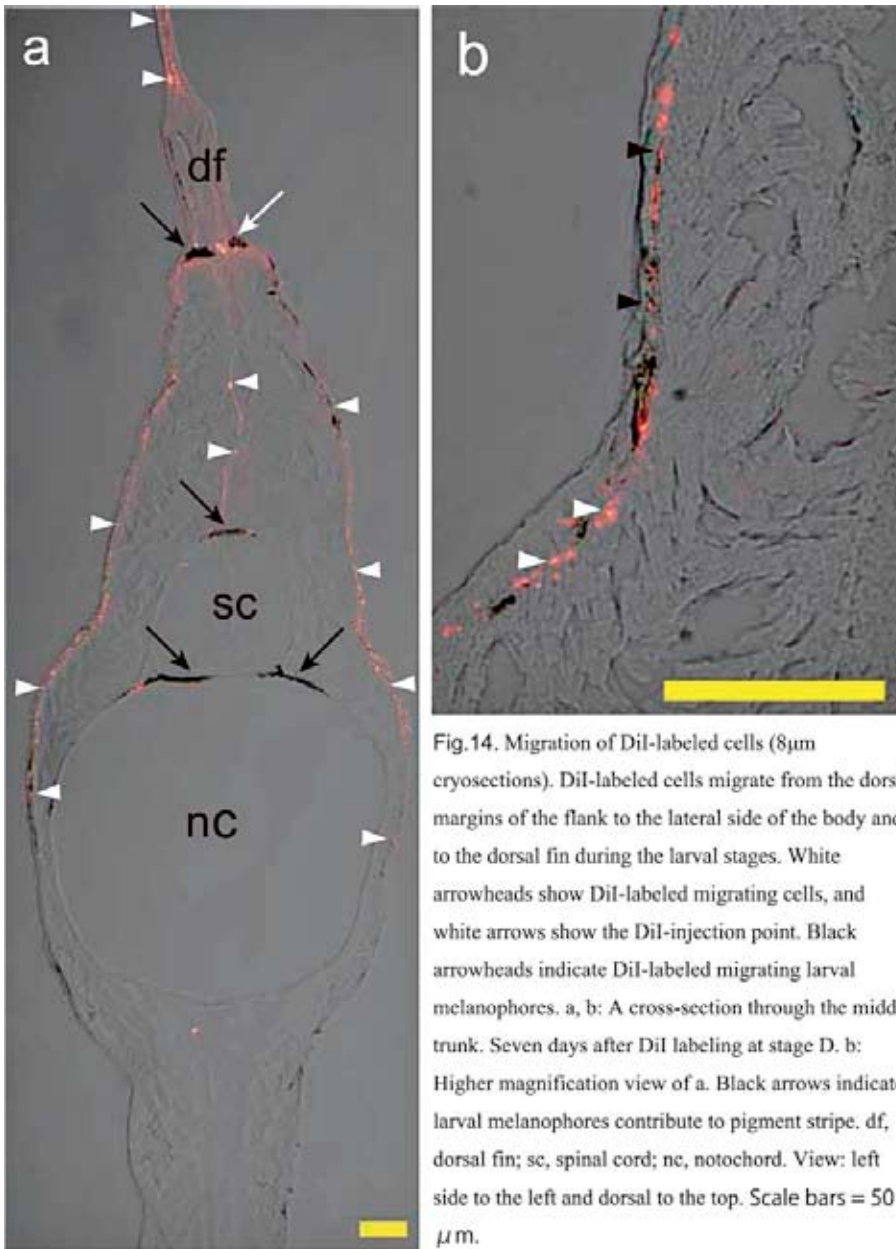


Fig.14. Migration of Dil-labeled cells (8 μ m cryosections). Dil-labeled cells migrate from the dorsal margins of the flank to the lateral side of the body and to the dorsal fin during the larval stages. White arrowheads show Dil-labeled migrating cells, and white arrows show the Dil-injection point. Black arrowheads indicate Dil-labeled migrating larval melanophores. a, b: A cross-section through the middle trunk. Seven days after Dil labeling at stage D. b: Higher magnification view of a. Black arrows indicate larval melanophores contribute to pigment stripe. df, dorsal fin; sc, spinal cord; nc, notochord. View: left side to the left and dorsal to the top. Scale bars = 50 μ m.

側の胴部に成体型黒色素胞, 仔魚型黒色素胞そして虹色素胞 (Fig.17g) が, 無眼側の胴部では仔魚型黒色素胞, 黄色素胞, 虹色素胞 (Fig.18e) が観察された (Table2)。さらに, 各ステージに DiI または DiO を注入された変態後の稚魚では, 標識された成体型色素細胞が背鰭と臀鰭の先端方向にも移動していることを確認した。また, 変態後のすべての稚魚で移動した色素を持たない標識細胞が確認された (Table 2)。

ここまでに述べた様に, 鰭基部から有眼側の体側部へ移動した DiI または DiO 標識細胞は, 変態完了後, 成体型黒色素胞, 虹色素胞に分化

していることが確認された。さらに, 変態後に, 体側部へ移動した標識仔魚型黒色素胞, 黄色素胞も観察されたが, 仔魚型黒色素胞は分化直前から分化しており, 黄色素胞は変態期にすでに分化しているものもあるので, これらの標識細胞が移動後 (変態後) に分化したのか, あるいは標識されたときにすでに分化していて, その分化した細胞が移動したのかは不明である。

以上の結果から, stage C から stage H に背鰭基部および臀鰭基部に局在していた未分化な色素細胞の前駆細胞が, 変態後の体側部の成体型色素細胞の起源となっていることが明らかとなった。

1-4 考察

異体類の左右非対称な体色パターンの形成機構を明らかにするための第一歩として, 筆者は, 成体

型色素細胞とその前駆細胞の動態を明らかにすることを試みた。まず, 胚期の後期から変態完了までの期間の色素細胞の出現を観察した。次に, 仔魚期の各ステージ (stage B から stage H) における色素細胞の前駆細胞の分布を, 色素細胞系列のマーカー遺伝子である *csflr*, *dct*, *kit* (Parichy et al., 1999, 2000b; Kelsh et al., 2000; Parichy and Turner, 2003b) の時間的空間的発現パターンを分析することにより検討した。さらに, これら色素細胞の前駆細胞を CM-DiI および SP-DiO で蛍光標識することで追跡し, その細胞運命を明らかにすることを試みた。その結果,

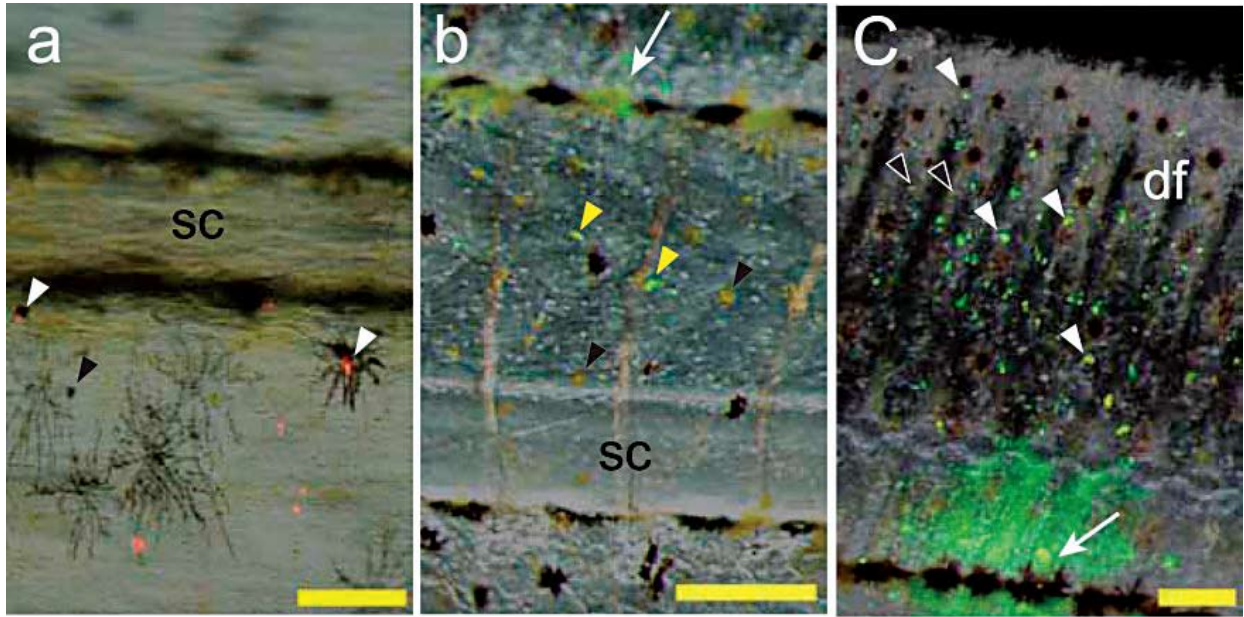


Fig.15. Migration of DiI (DiO) -labeled mature pigment cells during the first days of labeling. a: DiI-labeled (at stage C) larval melanophores migrate from ventral margin of the flank to near the spinal cord on the left lateral side. In panel a, a black arrowhead indicates a non-labeled larval melanophore. White arrowheads show DiI-labeled larval melanophores. b: DiO-labeled (at stage E) xanthophores migrate from the dorsal margin of the flank to near the spinal cord on the left lateral side. Yellow arrowheads show DiO-labeled xanthophores, and black arrowheads indicate non-labeled xanthophores. c: Migration of DiO-labeled (at stage E) xanthophores from the dorsal margin of the flank to the dorsal fin. Yellow arrowheads show DiO-labeled xanthophores, and black arrowheads indicate non-labeled xanthophores. A white arrow shows the DiO injection point. Observation of the migrating labeled cells carried out at 2 days after labeling at a; 5 days after labeling at c-d. sc, spinal cord; df, dorsal fin. View in a, b, c: anterior to the left and dorsal to top. Scale bars =100 μ m.



Fig.16. DiI labeling of the cells on dorsal fin at stage F. White arrow indicates DiI labeling point. No labeled cell migrated from the dorsal fin to the lateral side of the body. Scale bar = 1mm.

Ocular Side

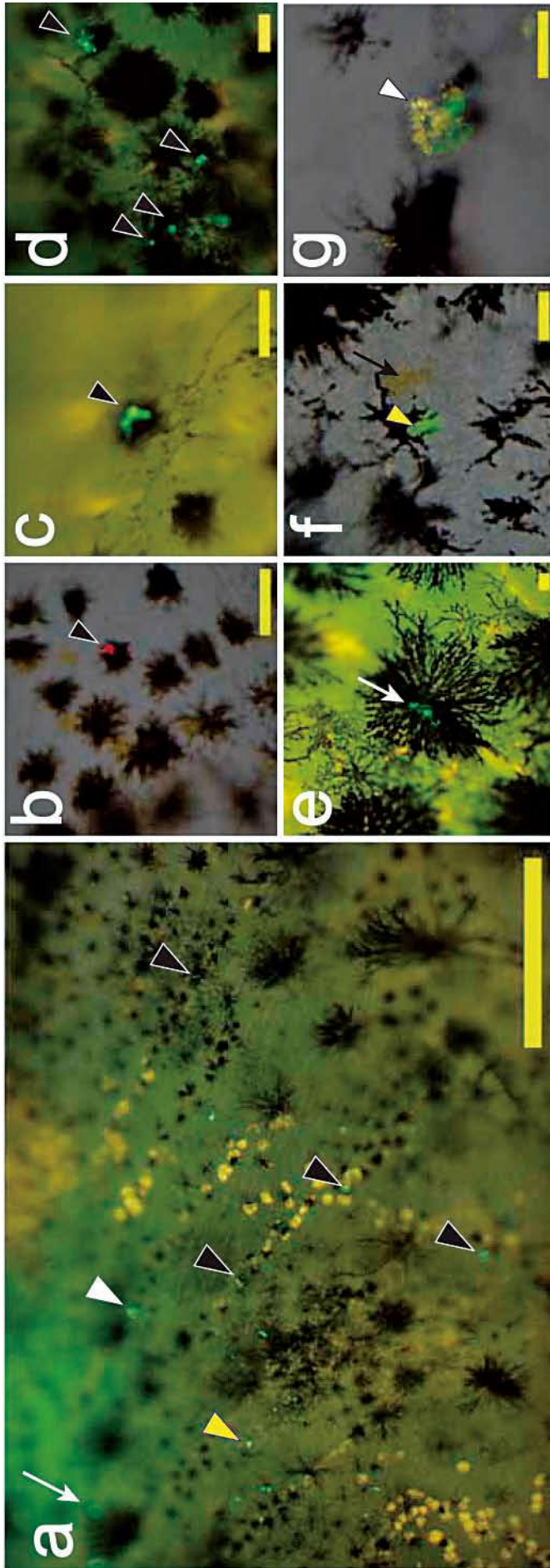


Fig. 17. The differentiation of DiI- and DiO-labeled cells into pigment cells. The cells labeled with DiI and DiO on the dorsal and ventral margins of the flanks at stage C–H migrated to the left and right lateral side and differentiated into pigment cells after metamorphosis. a–g: Differentiated labeled pigment cells on the ocular (left) side after metamorphosis. a: The view of wide-area ocular side trunk at stage I. In this panel, DiO-labeled adult-type melanophores (adm, black arrowhead), larval melanophores (Lm, white arrow), iridophores (iri, white arrowhead), and xanthophores (xan, yellow arrowhead) are observable. This individual is labeled at stage G on the dorsal margin of the flank. b: DiI-labeled adm, labeled at stage E. c: DiO-labeled adm, labeled at stage E. d: DiO-labeled adm, labeled at stage G. e: DiO-labeled Lm, labeled at stage E. f: DiO-labeled xan (yellow arrowhead), labeled at stage E. g: DiO-labeled iri, labeled at stage H. Scale bars = 200 μm in a, 20 μm in b–g.

Blind Side

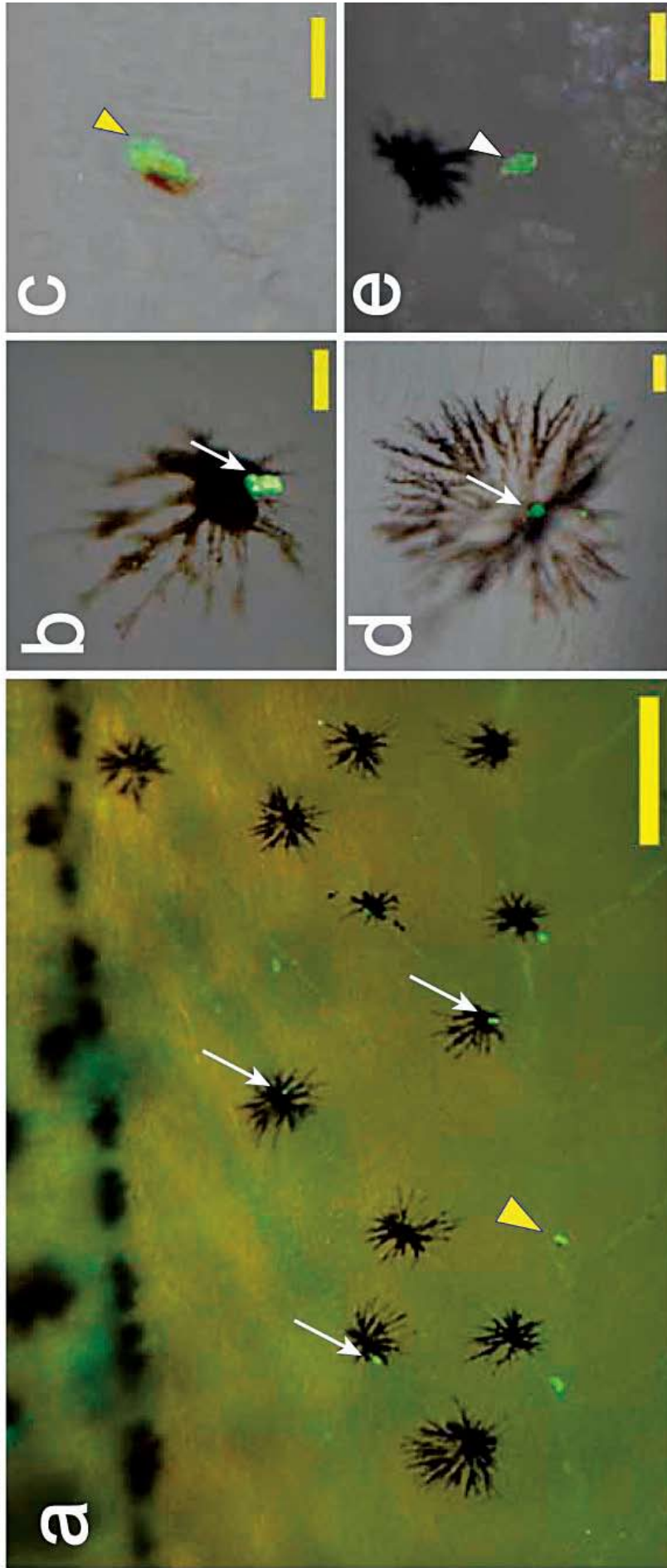


Fig. 18. The differentiation of Dil- and DiO-labeled cells into pigment cells. The cells labeled with Dil and DiO on the dorsal and ventral margins of the flanks at stage C–H migrated to the left and right lateral side and differentiated into pigment cells after metamorphosis. a–e: Differentiated labeled pigment cells on the blind (right) side after metamorphosis. a: The view of wide-area blind side flank at stage I. In this panel, DiO-labeled Lm (white arrow), DiO-labeled xanthophore (yellow arrowhead) are observable. This individual is labeled at stage E. b: DiO-labeled Lm on the blind side, labeled at E stage. c: DiO-labeled xanthophore, labeled at E stage. d: DiO-labeled Lm, labeled at stage G. e: DiO-labeled iri, labeled at stage H. In this figure, only the examples of labeled pigment cells are shown. Scale bars = 200 μm in a 20 μm in b–e.

仔魚期を通じて色素細胞の前駆細胞は背鰭基部と臀鰭基部に沿った領域に主に局在していることが明らかとなった。また、仔魚期にこれらの前駆細胞が継続的に体側部と鰭先端部に向けて左右対称に移動していくことがわかった。さらに、変態期の終期ごろから、これらの移動した前駆細胞が成体の体色パターンを形成する成体型色素細胞に分化することがわかった。

1-4-1 仔魚期における色素細胞前駆細胞の局在

これまでに、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の成体型体色パターンの形成機構を明らかにすることを目的として多くの研究がおこなわれてきた。これらの、研究では、体色パターンの形成期 (pigment pattern metamorphosis) の色素細胞系列前駆細胞や冠細胞の分布パターンが観察されている。変態期のゼブラフィッシュでは色素細胞前駆細胞は主に胴部に分布しており、さらに、変態後の黒色のストライプ (melanophore stripe) 予定領域では黒色素胞 (metamorphic melanophore) の前駆細胞が、白色ストライプ (inter(light) stripe) 予定領域では虹色素胞の前駆細胞が局在していた (Parichy et al., 2000a, 2000b, 2003; Parichy and Turner, 2003a; Quigley et al., 2004)。すなわち、ごく最近まで、ゼブラフィッシュでは、変態期の色素細胞前駆細胞は、それらが将来成熟した色素細胞として出現し種特異的な体色パターンを形成する領域付近に分布していると捉えられていた。ゼブラフィッシュの前駆細胞の動態については近年新たな知見が得られているので、それについては第3章で触れる。

ヒラメでは、このようなゼブラフィッシュの報告とは対照的に、stage B から stage H にかけての変態期に色素細胞系列のマーカー遺伝子 (*csflr*, *dct* および *kit*) は、鰭や体側部にもある程度の発現は認められたが、おもに背鰭基部と臀鰭基部にそって左右対称に発現しており、この領域に前駆細胞が局在していることが明らかとなった (Fig.4-9)。この結果は、次の2つの点で注目すべき結果である。すなわち、まず、ヒラメでは変態後成体型色素細胞が大量に発現する体側部ではなく、鰭基部すなわち、胴の縁辺部

に前駆細胞が局在していたこと、さらに、異体類では変態後に左右非対称な成体型色素細胞が出現するにもかかわらず、鰭基部における前駆細胞の局在は左右対称であったという点である。

ヒラメの *dct*, *kit* はメラニンを形成している黒色素胞上でも発現していたことから考えると、*dct*, *kit* 発現細胞は、黒色素胞系列の細胞であると容易に推察することができる。一方、ヒラメ *csflr* は、おもに、メラニンを形成していない細胞で発現していた。それ故、*csflr* 発現細胞が、どの色素細胞系列の前駆細胞であるのか明確ではない。*csflr* は黄色素胞細胞系列で発現することがよく知られているが、ゼブラフィッシュでは、*csflr* が黄色素胞の細胞系列だけでなく、より未分化な分化多能性を有する色素細胞前駆細胞で発現することも報告されている。さらに、*csflr* は、ゼブラフィッシュの *kit*-非依存的な late metamorphic melanophore (変態期以降に出現する *kit* の発現を伴わない成体型黒色素胞) の分化にとって必要であることも報告されている (Parichy et al., 2000b; Parichy and Turner, 2003a)。このことから、ヒラメにおいても *csflr* が分化多能性を有した状態の色素細胞前駆細胞で発現し、そのうちの一部が黄色素胞や成体型黒色素胞に分化するという可能性が考えられる。

これとは別に、ゼブラフィッシュの *csflr* はマクロファージや破骨細胞系列の細胞でも発現することが知られている (Parichy et al., 2000b; Walters et al., 2009)。しかし、背鰭基部と臀鰭基部に沿った領域や鰭上、体側部の表皮と体筋筋の間に発現するヒラメ *csflr* の発現パターンは、*dct*, *kit* と非常に類似した発現パターンを示しており、マクロファージ等の発現パターンとは異なるので、この領域における *csflr* の発現細胞は色素細胞の前駆細胞であると考えられる。

また、ゼブラフィッシュでは、白色素胞は分化しないが、ヒラメでは、白色素胞は分化直前の後期胚から仔魚期を通じて多数観察される。特に背鰭基部および臀鰭基部に沿った領域と背鰭と臀鰭の縁辺部に多く (Fig.2f,3a), 伸張鰭条上

にはさらに高密度で分布する (Fig.1g-j 矢印)。 *csflr* が、これらの領域で強く発現 (Fig. 4f-g; 伸長鰭条上の発現データは示していない) することから考えて、 *csflr* は、白色素胞の系列細胞でも発現している可能性が示唆される。

1-4-2 ヒラメの成体型色素細胞の鰭基部からの供給

変態期には色素細胞の前駆細胞が鰭基部に沿った領域に主に局在していることから、仔魚期に間に未分化な色素細胞の前駆細胞が背鰭基部および臀鰭基部から体側部へと移動し、それが変態期後期以降に成体型色素細胞に分化するという仮説を設定した。この仮説を検証するために、筆者は、この領域に分布する細胞に CM-DiI と SP-DiO により蛍光標識を行い、その移動と細胞運命を追跡した。

その結果、stage C から stage H のすべての発生ステージに、背鰭基部および臀鰭基部から体側部と鰭先端に向かう標識細胞の移動が観察された (Fig.10-14; Table 1)。しかも、変態後の成体型色素細胞の分布は左右非対称なものであるにもかかわらず、これら標識細胞の移動は、左右対称なものであった (Figs.10-13; Table 1)。さらに、変態完了後には、これらの鰭基部から移動していった標識細胞が、鰭基部から遠く離れた体側部や鰭先端部で複数種の成体型色素細胞に分化していることが確認された。そして、有眼側では、標識細胞は成体型黒色素胞と虹色素胞に分化し、無眼側では虹色素胞に分化した (Fig.17-18; Table 2) ことが確認された。蛍光標識された仔魚型黒色素胞と黄色素胞も、変態後に左右の両体側で観察されたが (Fig.15)、これらの色素細胞は仔魚期にすでに分化しており、また、変態期中の移動も確認されている。特に仔魚型黒色素胞の変態後の分化は報告されていないので、移動が確認された仔魚型黒色素胞については、仔魚期にすでに分化していたものが鰭基部から体側部に移動したことが明らかである。おそらく、背鰭基部および臀鰭基部のストライプを構成していた仔魚型黒色素胞の一部が移動したものだと考えられる。一方、黄色素胞については、黒色

素胞と同様に、サイズと出現時期が異なる仔魚型黄色素胞と成体型黄色素胞の二つのタイプの黄色素胞の存在が報告されている (Haga et al., 2005; Nakamura et al., 2010)。このことから考えて、変態後に観察された体側部および鰭先端部の蛍光標識黄色素胞には、仔魚期に標識された仔魚型黄色素胞が体側部および鰭先端部へ移動した場合と、標識された前駆細胞が体側部へ移動してそれが変態後に成体型黄色素胞に分化した場合の二通りの可能性があり、おそらく、本研究では両方の現象が起こっていたと考えられる。

成体型色素細胞の前駆細胞と仔魚型色素細胞は背鰭基部および臀鰭基部から左右の体側部と背鰭および臀鰭に移動した。しかしながら、その逆の鰭先端から鰭基部や体側部への移動は認められなかった (Fig.16) ことは、色素細胞とその前駆細胞の移動は、ランダムなものではなく、鰭基部から体側部および鰭先端部に向かう二つの特異的な方向性を有していることが強く示唆された。

さらに鰭基部から胴の中央部に向かう細胞の移動経路は、表皮と筋節の間に沿った側方経路だけではなく、正中線に沿った中央経路があることが観察された (Fig.14) が、中央経路に沿って移動した細胞が変態後に色素細胞に分化するのかどうかは不明である。

以上のことから、仔魚期の間、継続的に未分化な色素細胞の前駆細胞が背鰭基部および臀鰭基部から体側部と鰭先端方向に向けて左右対称に供給され、それが変態期の後半以降に左右非対称に成体型色素細胞に分化すること、さらに、前駆細胞だけでなく、すでに分化した仔魚型色素細胞も背鰭および臀鰭基部から体側部と鰭に供給されることが明らかとなった。

1-4-3 異体類特異的な左右非対称な体色パターンの決定要因

本章において、成体型色素細胞の前駆細胞が背鰭基部および臀鰭基部から体側部に左右対称に供給されることを示した。しかし、このような左右対称な前駆細胞の供給にもかかわらず、成体型色素細胞は、変態期後期以降、左右非対称に出現し、その結果左右非対称な体色パターンが形成された。ここで、鰭基部では3種類の色素細胞系列マーカー遺伝子が左右対称に発現しており、そこから左右対称な細胞の移動が観察されたことから、左右の体側部には同じ前駆細胞が供給されていることが予想される。このことは、おそらく左右に移動した前駆細胞集団間で、各色素細胞への分化能については差がないことを強く示唆する。しかも、変態後有眼側では成体型黒色素胞、虹色素胞そして成体型黄色素胞に分化したことから、これらの前駆細胞は分化多能性を有していたか、あるいは、成体型黒色素胞、成体型黄色素胞、虹色素胞のそれぞれに分化するように分化運命が限定された前駆細胞のすべての種類が供給されたと仮定される。このように同じ前駆細胞が供給されていると仮定できるにもかかわらず、左右の体側間で分化してくる色素細胞の種類が異なるということは、前駆細胞が供給されていった先、すなわち左右の両体側の組織環境が異なり、この組織環境が前駆細胞に左右非対称に働きかけた結果、左右で異なる色素細胞が分化してきたのではないかと考えられる。しかも、左右で異なる色素細胞が分化したとしても、実は、有眼側では、成体型黒色素胞、虹色素胞、成体型黄色素胞が分化し、無眼側では虹色素胞しか分化してこないことから、無眼側でより前駆細胞の分化多能性を制限するような組織環境あるいは分化運命を制限するような組織環境になっていることが予想される。異体類においては、体色の左右非対称性が現れるより前に体制の左右非対称性が形成されており、先行して形成された組織環境の左右非対称性が、成体型色素細胞の分化を左右非対称なものにさせている高い可能性が考えられる。

第2章では、哺乳類で色素細胞の分化を誘導することが知られており異体類では stage E-F に大量に分泌されることが知られているコルチゾルを、変態期のホシガレイに投与することにより、コルチゾルが成体型色素細胞の分化に及ぼす影響について検討した。さらに、このコルチゾルの投与実験によって、左右の両体側に供給された前駆細胞の分化運命または分化能が等価なものであるのかを検討し、分化運命に左右非対称性が生じる時期についても検討する。さらに、変態期に大量に分泌されることが明らかになっているが、異体類の変態期におけるその機能についてはほとんど知見のないコルチゾルが異体類の体色パターン形成に及ぼす影響についても検討する。

第2章 ホシガレイの体色異常発現に及ぼすコルチゾルの影響

2-1 はじめに

第1章の結果から、ヒラメでは、仔魚期に背鰭基部および臀鰭基部から体側部に左右対称に供給された前駆細胞が変態完了に伴って左右非対称に成体型色素細胞に分化することが明らかとなった(Yamada et al., 2010)。しかし、左右の両体側に供給された色素前駆細胞の分化運命が、体側部に供給された時点で本当に同等なものであったのか、すなわち将来の無眼側に供給された前駆細胞も将来の有眼側に供給された前駆細胞も同様に成体型黒色素胞あるいは成体型黄色素胞に分化する能力を有していたのか、あるいは、体側部への供給時にすでに分化運命がある程度の限定を受けていたのかは明らかではない。また、体側部への供給時に左右の両体側で分化運命に差が生じていないならば、いつ分化運命に差が生じるのか。これらの問題は、異体類の左右非対称な体色パターンの形成機構の解明にとって極めて重要な課題である。

異体類を含む硬骨魚類では変態期に体内のコルチゾルレベルが上昇することが知られており、コルチゾルが魚の変態期の発生過程に何らかの影響を及ぼしていることが強く示唆される。さらに、哺乳類ではグルココルチコイドがメラニン形成を刺激したり阻害したりすることが報告されていることから(Ito et al., 1991; Hirobe, 1996; Oskina et al., 2010)、変態期に体内レベルが上昇するコルチゾルが異体類の体色パターン形成に関与している可能性も想定される。魚類の変態過程を制御する主要なホルモンである甲状腺ホルモン(Inui et al., 1995)は、変態期の後半に、コルチゾルのピークに続いて体内濃度がピークに達する(de Jesus et al., 1991; Hotta et al., 2001)。ヒラメ仔魚では甲状腺ホルモンの伸長鰭条の吸収に対する効果をコルチゾルが増強することが知られているので、甲状腺ホルモンとコルチゾルの変態過程に対する相乗

作用も可能性がある。興味深いことに、甲状腺ホルモンの過剰な投与は、投与のタイミングに依存して異体類の体色異常を誘導する(Yoo et al., 2000; Tagawa and Aritaki, 2005)。しかし、これまでに異体類のみならず硬骨魚類の体色パターン形成におよぼすコルチゾルの影響に関する信頼出来る情報は無い。

本章では、色素細胞の分化、体色パターン形成に影響する可能性が考えられるコルチゾルをホシガレイ *Verasper variegatus* に投与し、コルチゾルの体色パターン形成に対する影響を検討した。その結果、コルチゾルが成体型色素細胞の分化を誘導することが明らかとなったので、次に、ホシガレイの変態期の各ステージにコルチゾルを投与することにより、コルチゾルが成体型色素細胞の分化を誘導する変態ステージの特定を試み、これによって、各変態ステージにおける左右両体側に分布する色素細胞前駆細胞の分化能を検討した。本来、コルチゾルの投与実験は、第1章と同様にヒラメで行う予定であったが、コルチゾルの投与は、ヒラメの生残に影響してしまい、精度の高いデータが得られなかった。このため、ホシガレイを実験材料として用いた。

2-2 材料と方法

2-2-1 供試魚および飼育条件

ヒト絨毛性腺刺激ホルモン(帝国臓器)を投与し、排卵誘導を行ったホシガレイ天然親魚を用いて、人工授精により受精卵を得た。受精卵はふ化まで14°Cで管理し、その後変態の完了まで約14°Cで飼育を行った。飼育実験には、100リットルポリカーボネイト水槽を用い、シオミズツボムシ、アルテミアノープリウス幼生および市販配合飼料を成長に合わせて餌料として与えた。飼育水には濃縮酸素の通気を行い、溶存酸素濃度8-9mg/Lを維持した。そして、1日当たり100%の換水率となるように注水を行った。仔魚および稚魚は、有瀧(2001)にしたがって発生ステージの分類を行った(Fig.19)。

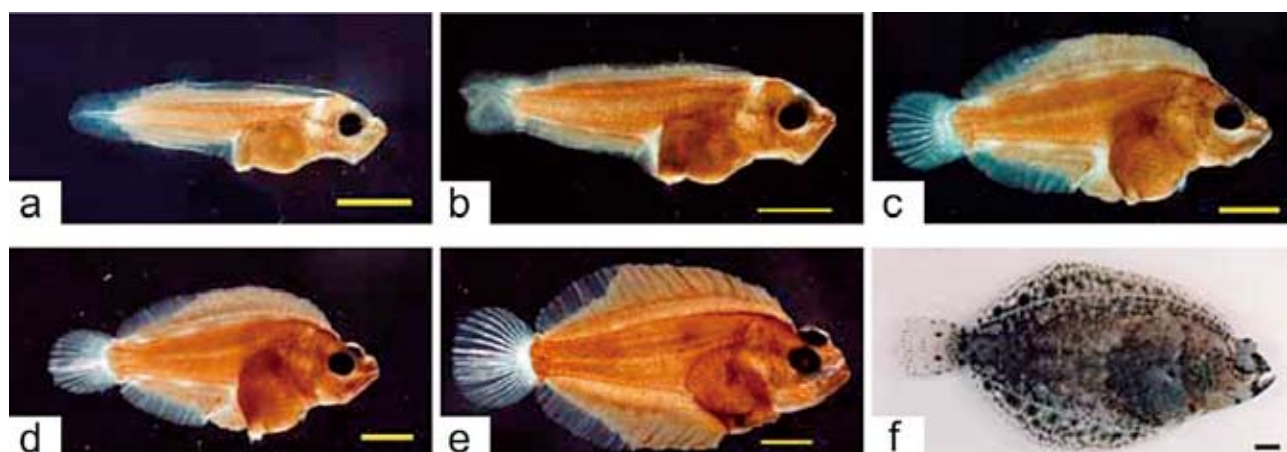


Fig. 19. Developmental stages of spotted halibut *V. variegatus* under the rearing conditions at 14 °C. a: Stage D pre-flexion larva at 18 days after hatching (dah). b: Stage E flexion larva at 26 dah. c: Stage F post-flexion larva at 30 dah. d: Stage G post-flexion larvae at 40 dah; f. From onset of left eye migration to locate on the midline. e: Stage H post-flexion larva at 55 dah; l. Late phase of metamorphosis. f: Stage I juvenile at 75 dah. Scale bars = 2 mm in all panels.

2-2-2 コルチゾルの投与

2-2-2-1 実験 1

ホシガレイの色素細胞分化に対するコルチゾルの影響を検討するために、stage E から stage G の終了までの期間（ふ化後 25 日～50 日）、異なる濃度のコルチゾルを飼育水に添加し浸漬を行った。各試験区 2 水槽を用いた実験を 2 回繰り返した。各水槽への仔魚の収容尾数は 2,000 尾とした。各試験区のコルチゾルの浸漬濃度は、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ および対照区の $0 \mu\text{g/ml}$ とした。コルチゾルはあらかじめエタノール中に 4mg/ml （コルチゾル $1 \mu\text{g/ml}$ 投与区）および 40mg/ml （コルチゾル $10 \mu\text{g/ml}$ 投与区）の濃度になるように溶解し、ストック溶液を作成した。これら各ストック溶液 25ml を 100l 水槽に添加することによって各試験区の浸漬濃度となるようにした。コルチゾル投与区の水槽中のエタノール濃度は 0.25% となるので、対照区にも 25ml のエタノールを投与した。そして、これらの浸漬濃度が投与実験期間中一定となるようにした。すなわち、投与 1 日目には、飼育水槽に必要量のコルチゾル溶液（溶媒エタノール）を直接投与し、同時にそれぞれの飼育水層に 100l の予備水槽を設け、この水槽にも同様にコルチゾルを投与した。そして、予備水槽から飼育水槽へ定量ポンプを用いて 100l/24 時間の注水速

度で新鮮な浸漬液が補充されるようにし、これを実験期間中繰り返した。コルチゾルの投与終了後も変態完了まで仔魚を継続飼育し、変態を完了した稚魚をふ化後 72 日目に全数取り上げた。実験期間中、10 日おきに仔魚のサンプリングを行い、4% パラフォルムアルデヒドで固定し、ホシガレイメラニン形成酵素の一つであり黒色素胞系列の後期マーカーとして使用される *dopachrome tautomerase* (*dct*) の *in situ* hybridization による発現解析に用いた。

2-2-2-2 実験 2

ホシガレイの色素細胞分化に対するコルチゾルの影響が発生ステージに依存的なものであるかどうかを検討するために、実験 2 では、異なる発生ステージのホシガレイ仔魚に対して $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度でコルチゾルの浸漬を行った。試験区は、stage D 投与区（ふ化後 17～26 日）、stage E-F 投与区（26～40 日）、stage G 投与区（40～50 日）、stage H 投与区（50～60 日）とした。各試験区に対し、コルチゾル投与期間中に同量の溶媒エタノールを添加する対照区を設けた。コルチゾルと溶媒の濃度は実験 1 と同じ方法で浸漬実験期間中一定となるようにした。仔魚はコルチゾル浸漬終了後も飼育を継続し、変態を完了したふ化後 72 日目に取り上げた。

2-2-3 色素細胞分化および体色パターンの評価

取り上げた稚魚は、以下のとおり、体色異常の分類をおこない、その出現頻度を求めた。両面有色：成体型黒色素胞が無眼側全体またはその一部に発達したもの。有眼側白化：成体型黒色素胞が有眼側全体またはその一部から欠落したもの。さらに、各水槽につき50個体ずつ有眼側と無眼側をデジタルカメラキャノン EOS kiss (canon) で撮影し、その画像データから pigment index (Yoo et al, 2000) を計算した。Pigment index は、頭部を除く体側部全面積に対する成体型黒色素胞が発達した面積の割合を示し、成体型色素細胞の発達の程度を表す。

2-2-4 PCR, クローニングおよびシークエンス

ホシガレイ全 RNA は、stage E から stage G の仔魚から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて付属マニュアルに従って抽出した。続いて抽出全 RNA を ReverTra Ace - α - (TOYOBO) を用いて付属のマニュアルに従い、逆転写反応を行い cDNA を合成した。得られた cDNA は、PCR のための鋳型として用いた。ホシガレイ *dopachrome tautomerase* (*dct*) 部分配列増幅のためのプライマーは、他の硬骨魚類の *dct* 塩基配列情報 (Kelsh et al, 2000; Yamada et al, 2010) をもとに設計した (forward: cgctcttctctatcagcgagag; reverse: gtgacgggcatgctttgac)。PCR により得られた cDNA は、1章に示した方法で、精製クローニングおよびシークエンスを行った。それから、得られた塩基配列情報は、NCBI blast を使用して、既知の *dct* 遺伝子の配列と相同性検索をおこなった。本研究で得られた塩基配列は以下のとおり DNA Data Bank of Japan に登録した。 *Verasper variegatus dct* (558 bp, accession number: AB631044)。

2-2-5 In situ hybridization

変態期の成体型黒色素胞前駆細胞 (メラノブラスト) の分布を検討するために、黒色素胞細胞系列のマーカー遺伝子 *dct* の発現パターンをホールマウント in situ hybridization 法 (Budi et al, 2008; Parichy et al, 2000; Yamada et al,

2010) を用いて解析した。In situ hybridization は、実験1で得られた仔魚サンプルに対して行い、方法は本研究1章に従った。凍結切片作成の方法も1章に従った。

2-2-6 統計解析

統計解析には Statview 5.2 software (SAS Institute Inc.) を用いた。実験1では、両面有色あるいは有眼側白化の出現頻度については各コルチゾル浸漬群と対照区の間で χ^2 検定を行った。また、pigment index については分散分析 (ANOVA) を適用したあとで、Tukey-Kramer's multiple comparison を行った。実験2では、各ステージにおける対照区とコルチゾル投与区との比較を行うためにスチューデントの t 検定を用いた。

2-3 結果

2-3-1 実験1：成体型色素細胞の発生に対するコルチゾルの影響

実験1では、stage E から stage G までコルチゾルを継続的に投与し、コルチゾルがホシガレイの体色に影響を及ぼしうるかを検討した。Fig.20 は両面有色個体の出現率 (左パネル) と有眼側白化の出現率 (右パネル) を示している。Fig.20 に示すとおり両面有色の出現率は対照区が 50.4% (Trial 1) と 44.6% (Trial 2) であったのが、10 μ g/ml コルチゾル投与区では、97.4% (Trial 1) と 96.3% (Trial 2) に顕著に増大した。一方、1 μ g/ml cortisol の投与によっては、両面有色の出現率に影響を及ぼさなかった：両面有色の出現率 51.1% (Trial 1) および 49.9% (Trial 2)。また、コルチゾルの 10 μ g/ml と 1 μ g/ml の投与は、ともに有眼側白化の出現率に影響を及ぼさなかった。

Fig.21 は、実験1における無眼側 (左パネル) と有眼側 (右パネル) の pigment index を示す。ピグメントインデックスは、左右の両体側それぞれについて、成体型黒色素胞の発達の程度を連続変数として表現したものである。無眼側のピグメントインデックスは、対照区では 6.0% (Trial 1), 7.4% (Trial 2) であったのに対し、10 μ g/ml

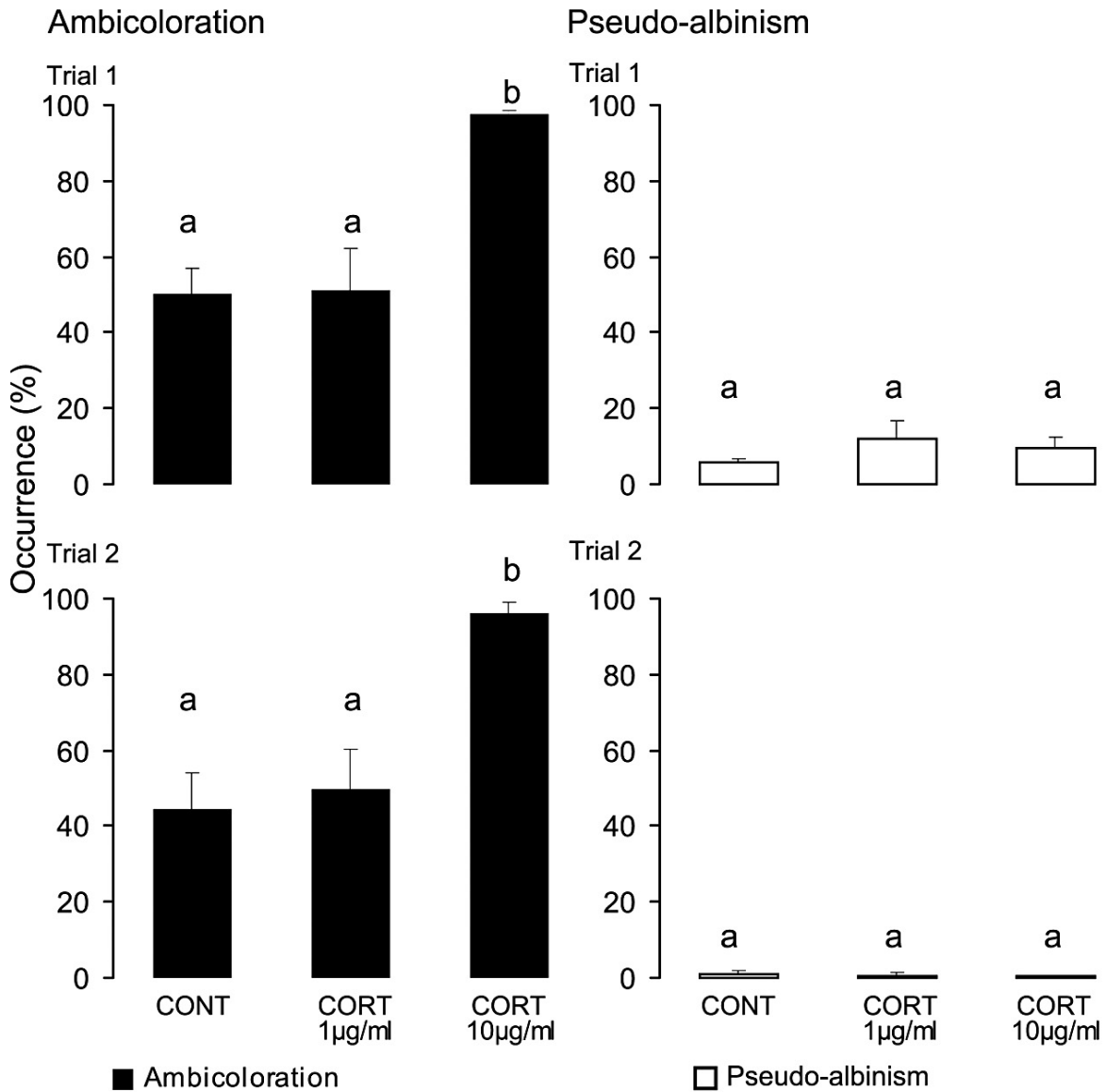


Fig.20. Relationship between the occurrence of ambicoloration (left panel) and pseudoalbinism (right panel) and cortisol concentration of rearing water in experiment 1. Cortisol administrations were performed from stage E to stage G for 25 days. Upper panel shows Trial 1, and lower panel shows Trial 2. Values are the means for duplicate treatments. Vertical lines show standard errors. Different letters at the top of bars indicate significant differences (chi-square test, $p < 0.01$) among experimental groups.

の cortisol の投与により 71.7%(Trial 1) と 66.1%(Trial 2) に増加した。1 µg/ml の cortisol 投与は、無眼側の色素インデックスに影響を及ぼさなかった。これに対して、有眼側の色素インデックスは 10 µg/ml 投与区、1 µg/ml 投与区、対照区間で統計的な差は認められず、どの区も色素インデックスも 90% 以上と非常に高かった。

Fig.22 は、正常な稚魚の有眼側（左パネル）と無眼側（中央パネル）および両面有色個体の無

眼側（右パネル）の写真である。正常魚の無眼側では、仔魚型黒色素胞と虹色素胞だけが分布するのに対して、両面有色個体の無眼側においては成体型色素胞、仔魚型色素胞、虹色素胞、黄色素胞が正常魚の有眼側と同様に分布していた。

これらの結果は、10 µg/ml の cortisol の投与は、無眼側における成体型色素細胞の発生を誘導することを示している。

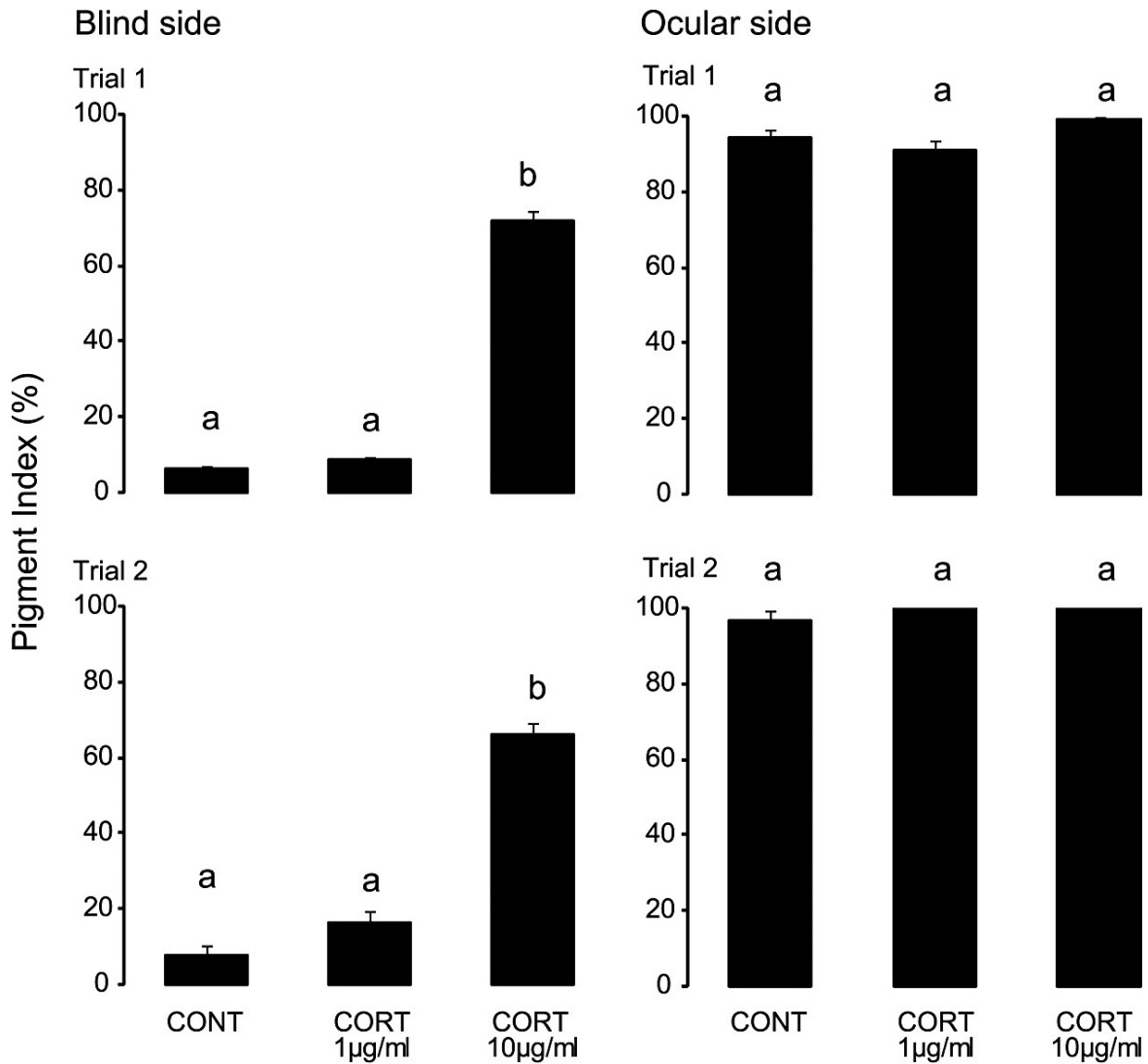


Fig.21. Relationship between the pigment index (left panel shows, the blind side; right panel, the ocular side) and cortisol concentration of rearing water in experiment 1. Cortisol administrations were performed from stage E to stage G for 25 days. Upper panel shows Trial 1, and lower panel shows Trial 2. Values are the means for duplicate treatments. Vertical lines show standard errors. Different letters at the top of bars indicate significant differences (Tukey-Kramer's multiple comparison, $p < 0.01$) between the different administration groups.

2-3-2 実験2：変態ステージ依存的なコルチゾルの効果

実験2では、コルチゾルがホシガレイの成体型色素細胞の分化に影響を及ぼす発生ステージを特定するために、stage D, stage E-F, stage G, stage Hの各ステージに10 µg/mlのコルチゾルの投与を行った。

Fig.23に示すように、stage E-Fにコルチゾルの投与を行った場合に、対照区と比較して著しく無眼側のピグメントインデックスが増大した。対照区のピグメントインデックスが21.8%なのに対し、stage E-Fコルチゾル投与区では

53.9%であった。stage Gとstage Hにおけるコルチゾルの投与では、無眼側のピグメントインデックスを増加させることはなかった。しかしながら、stage Dにおけるコルチゾルの投与は、顕著に無眼側のピグメントインデックスを減少させ、対照区のピグメントインデックスが6.9%であったのに対して、stage D投与区では、1.7%であった。

stage E-F, stage G, stage Hいずれのステージにおけるコルチゾルの投与も、有眼側のピグメントインデックスには影響を与えなかった。そして、対照区とすべての投与区において、有眼側の

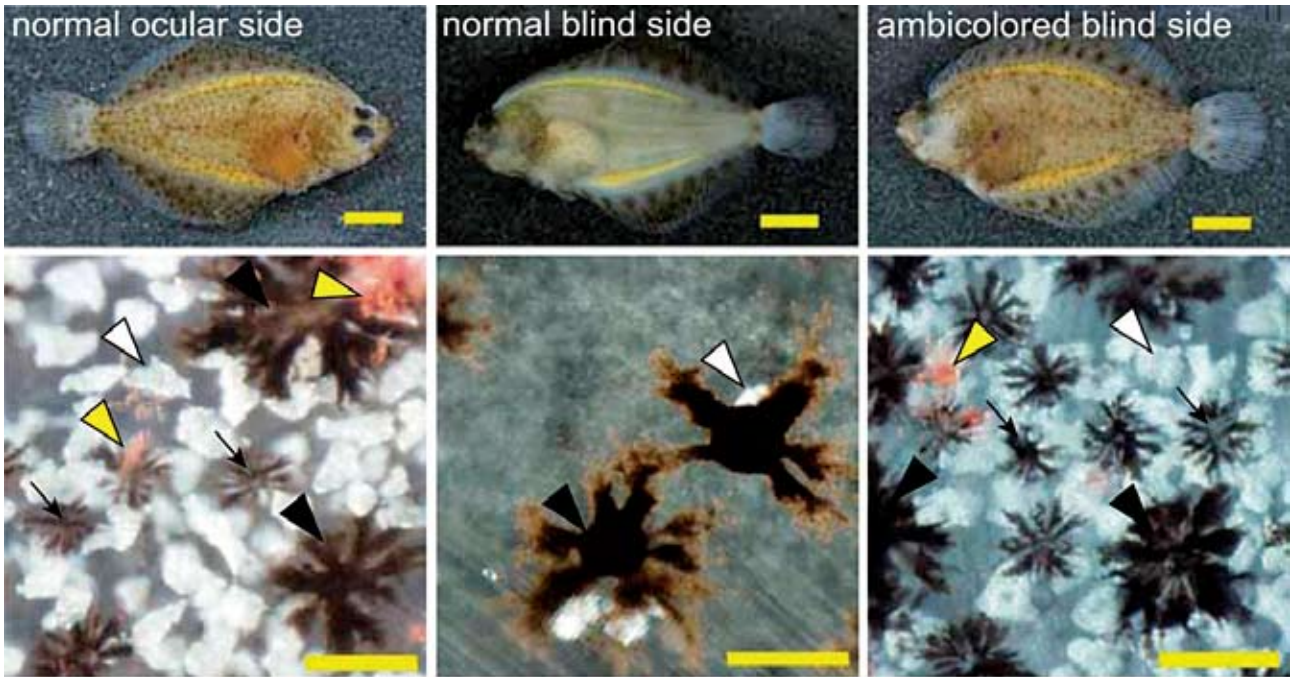


Fig.22. Adult type pigment cells well developed on the blind side of juvenile administered with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cortisol. Left panel shows well-developed adult type pigment cells on the ocular side of a normal juvenile. Middle panel shows the pigmentation of blind side of a normal juvenile. On the normal blind side, only black large-sized larval melanophores and iridescent iridophores were observed. Right panel shows well-developed black small-sized adult type pigment cells on the blind side of an ambicolored juvenile which was administered with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cortisol. Black arrows indicate adult type melanophores. Black arrowheads indicate larval melanophores. Yellow arrowheads indicate orange xanthophores. White arrowheads indicate iridophores. Scale bar in upper panel = 5 mm, scale bar in lower = 50 μm .

ピグメントインデックスは100%に近い値であった。しかしながら、stage Dにおける投与は、有眼側のピグメントインデックスを低下させ、対照

区が94.5%であったのに対して80.1%となった。すなわち、成体型色素細胞の発生に対するコルチゾル投与の影響は変態期の発生ステージに依存

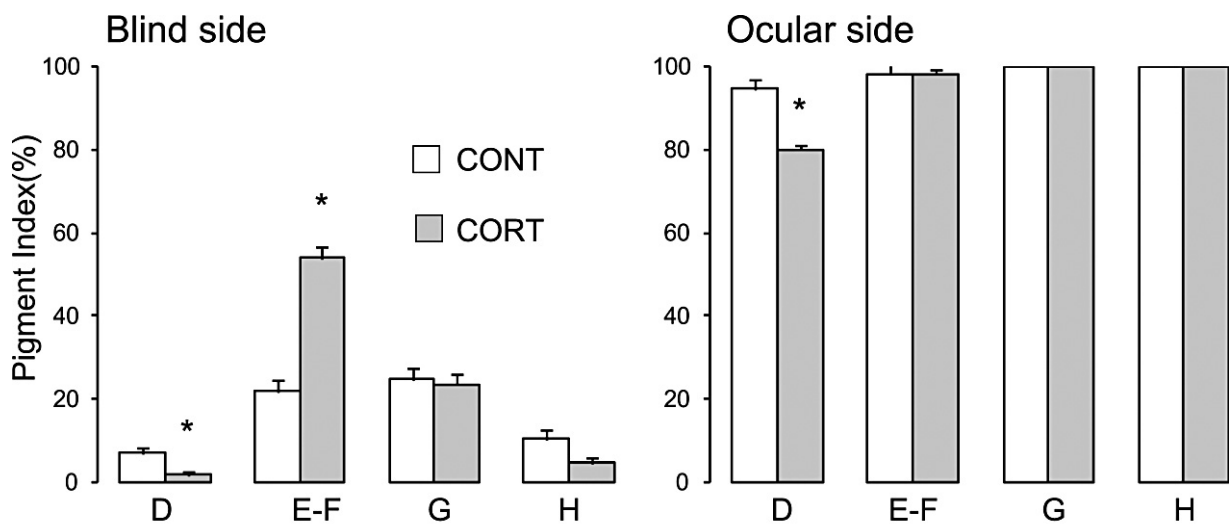


Fig.23. Relationship between the pigment index (left panel, on the blind side; right panel, on the ocular side) and the larval stages administered with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cortisol concentration of rearing water in experiment 2. Values are the means for duplicate treatments. Vertical lines show standard errors. Superscript asterisks indicate significant differences (Student's t test, $p < 0.01$) between the control and cortisol treatment at each administration stage.

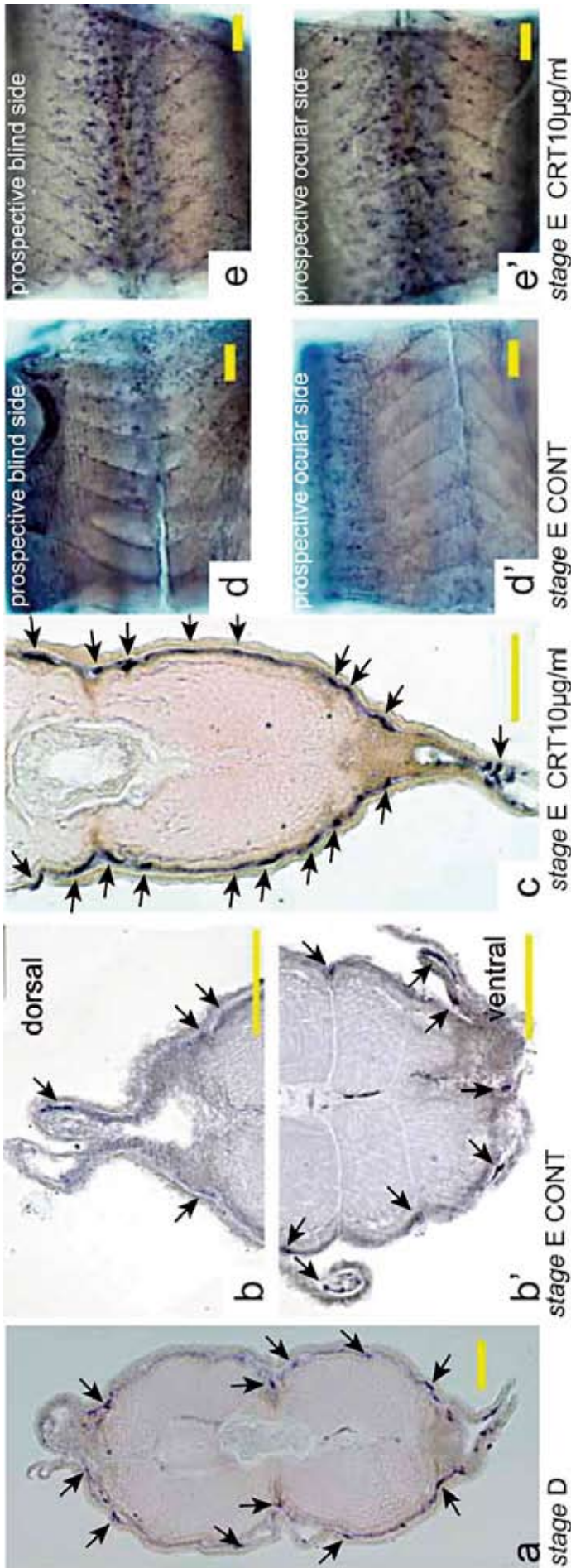


Fig. 24. Distribution of dct positive melanoblasts during the larval stages in experiment 1. Panel a–c are views of 12 µm cryosections through the middle trunk of larvae. In panel a–c, black arrows indicate dct positive melanoblasts (dark blue dots). Panel d–e' are views of the whole trunk of specimens and in these panel dark blue dots show the dct positive melanoblasts. Panel a indicates stage D initial larva. Panel b and b' show a stage E control larva; b shows the dorsal part and b' shows the ventral part. Panel c shows a stage E larva administered with 10 µg/mL cortisol. Panel d (prospective blind side) and d' (prospective ocular side) show a stage E control larva, then e (prospective blind side) and e' (prospective ocular side) show a stage E larva administered with 10 µg/mL cortisol. dct positive melanoblasts distribute left-right symmetrically at stage D and stage E. But stage E larva administered with 10 µg/mL cortisol (c, e, e') exhibit more intensive expression on both prospective blind and ocular sides than control larvae (b, b', d, d'). View in panel a–c: left side to the right and dorsal to the top. Scale bar=100 µm.

して現れることがあきらかになった。

2-3-3 変態過程における黒色胞前駆細胞の分布

変態後に成体型黒色素胞に分化する黒色素芽細胞の分布を検討するために、stage D, stage E, stage G, stage Hのホシガレイ仔魚に対して dopachrome tautomerase (*dct*) の発現パターンを調べた。その結果、正常な変態を終えた稚魚では、成体型色素細胞は左右非対称に分布するのにもかかわらず、対照区の仔魚では、stage D と stage E に *dct* 陽性メラノプラストが胴部、背鰭および臀鰭上、背鰭基部および臀鰭基部に沿った領域に左右対称に分布していた (Fig.24)。stage E から stage G に $10 \mu\text{g/ml}$ の cortisol を投与された仔魚は、対照区の仔魚に対して、stage E における *dct* の発現はあきらかに増強していた (Fig.24)。

2-4 考察

実験 1 では、高濃度 ($10 \mu\text{g/ml}$) のコルチゾルの投与は、両面有色個体の出現を誘導した。この結果は $10 \mu\text{g/ml}$ のコルチゾルの投与が、無眼側における成体型色素細胞の分化を高い再現性を持って誘導したことを示している (Fig.20-22)。レチノイン酸もヒラメの変態過程で両面有色を誘導することが知られている (Miwa and Yamano, 1999)。レチノイン酸の投与では、無眼側ばかりでなく有眼側においても、成体型色素細胞の発生を刺激し、有眼側白化の出現を抑制した (Miwa and Yamano, 1999)。しかし、本章における実験 1 において、高濃度のコルチゾルの投与は、有眼側白化の出現に影響を及ぼさなかった。これは、Miwa and Yamano (1999) では、対照区において有眼側白化が高頻度で出現しており、レチノイン酸が成体型黒色素胞の分化を誘導することにより有眼側白化を抑制したのに対し、本研究では対照区においてもほとんど有眼側白化が出現していなかったことから、有眼側におけるコルチゾルによる成体型黒色素胞の分化誘導効果が見えにくくなっていたものと考えられる (Fig.20-21)。

Fig.22 に示したように、コルチゾルの投与によって誘導された有色領域全体に、成体型黒色素胞だけでなく黄色素胞や虹色素胞もよく発達し、複雑にこれらが配置されていた。この結果は、本来有眼側でのみ分化するはずの成体型黒色素胞と成体型黄色素胞の無眼側における分化を変態期に投与された高濃度コルチゾルが誘導したことを示している。

in situ hybridization によるホシガレイ *dct* の発現解析の結果、対照区においても、stage D と stage E に左右対称に *dct* 発現細胞が分布していた (Fig.24) ことから、将来の無眼側 (左体側) も仔魚期のこのステージには成体型黒色素胞に分化しうる前駆細胞が存在していることが強く示唆された。このような、異体類の色素細胞の前駆細胞の左右対称な分布は、ホシガレイに特異的なことではなく、1章のヒラメの結果とよく一致している (Yamada et al., 2010)。正常な変態過程においては、左右対称に分布する前駆細胞が、無眼側においてのみ、選択的にアポトーシス等によって排除されてしまうか、あるいは選択的に成体型黒色素胞や成体型黄色素胞への分化を阻害されるのかもしれないことが報告されている (Seikai et al., 1987; Matsumoto and Seikai, 1992; Venizelos and Benetti, 1999; Yamada et al., 2010)。

実験 2 では、コルチゾルの両面有色誘導効果、すなわち無眼側に分布する前駆細胞を成体型黒色素胞と成体型黄色素胞に分化させる効果は、投与の発生ステージに依存し、stage E-F 特異的であることが明かとなった (Fig.23)。さらに、stage G 以降のコルチゾルの投与では、無眼側に成体型黒色素胞や成体型黄色素胞の分化が誘導されなかった。stage E-F におけるコルチゾルの投与によって無眼側にも成体型黒色素胞と成体型黄色素胞が分化誘導されたことから、この時期までは左右両体側に存在する色素細胞前駆細胞の分化能、分化運命は同等であることがわかる。対照的に stage G 以降のコルチゾル投与によっては、成体型黒色素胞も成体型黄色素胞も無

眼側で分化誘導されることがなかったことから、この時期には、左右体側に分布する前駆細胞の細胞運命、分化能はすでに、左右対称性を失っていることが強く示唆される。また、stage Eからの高濃度コルチゾルの投与により、stage E 仔魚の左右両体側における *dct* の発現が増強した (Fig. 24c,e,e') ことは、このステージにおけるコルチゾルが左右体側に分布する前駆細胞に直接作用して、その生残や、増殖、成体型色素細胞への分化に関与している可能性をも示唆する。

ホシガレイにおいては、コルチゾルの体内濃度は変態期に増加し、ふ化後 30 日 (stage E-F) ごろにピークに達する (Hotta et al., 2001)。内因性のコルチゾルレベルがピークを示す時期と外因性のコルチゾルが成体型色素細胞の分化を誘導する時期の一致 (stage E-F) は、コルチゾルが、正常な異体類特異的な体色パターン形成過程に関与する可能性を示唆する。対照的に、stage D におけるコルチゾルの投与は、有眼側と無眼側双方で有色領域を減少させた。このことは、高濃度のコルチゾルは、stage D には特異的に成体型色素細胞の発生を抑制する効果を持っていることを示唆する。哺乳類では、メラノサイトの発生、分化、メラニン形成に対してグルココルチコイドが阻害的に働いたり、誘導的に働いたり、相反する影響を示すことが報告されており (Ito et al., 1991; Hirobe, 1996; Oskina et al., 2010)、本研究で得られた結果と一致している。

たとえば、マウスでは、コルチゾルは、表皮メラノブラストの増殖を抑制するが、同時にメラノブラストからメラノサイトへの分化を促進することが報告されている (Hirobe, 1996)。家畜化されたグレイラットでは、妊娠 12-14 日におけるストレスと合成グルココルチコイド、デキサメサゾン投与によって、メラノブラストの移動と発生がおくれ、結果として腹側の体色形成が阻害されることが報告されている (Oskina et al., 2010)。すなわち、これらの研究は、グルココルチコイドの投与は、投与のタイミングによっては、メラノサイトの発生を阻害あるいは

誘導したりしうることを示している。本章の実験 2 の結果は、成体型色素細胞の発生を誘導するか阻害するかというコルチゾルの効果の方向性は、哺乳類の場合と同様に、コルチゾルの投与タイミングによって決定されているのかもしれない。異体類でも Hirobe (1996) が報告したようなコルチゾルの効果があると考えれば、異体類のメラノブラストまたは色素細胞の前駆細胞が主に stage E の始まりより前に増殖し stage E よりもあとには増殖できないと仮定すれば、stage D の外因性のコルチゾルはメラノブラストの増殖を阻害し、結果として変態後の稚魚の体色形成エリアの減少につながるかもしれない。また、この仮定のもとでは、stage E の外因性コルチゾルは stage E までに十分増殖した前駆細胞の成熟色素細胞への分化を誘導し、結果として変態後の稚魚の体色形成領域の増大をもたらす可能性も考えられる。

コルチゾルと色素細胞の発生との関係は、甲状腺ホルモン、チロキシンを介した間接的なものである可能性も考えられうる。なぜなら、コルチゾルと甲状腺ホルモンレベルは共に変態過程の近接した時期に増大し (de Jesus et al., 1991; Hotta et al., 2001)、また、コルチゾルが、甲状腺ホルモンの変態促進効果を増強することが報告されているからである (de Jesus et al., 1990)。さらにチロキシンの投与は、異体類の体色異常を誘導することが報告されており、(Yoo et al., 2000; Tagawa and Aritaki, 2005) 甲状腺ホルモンのこの効果をコルチゾルが増強する可能性も想定されうる。しかし、stage E-F におけるチロキシンの投与は、ヒラメとホシガレイの有眼側白化の出現率を増加させる (Yoo et al., 2000; Tagawa and Aritaki, 2005) ことから考えると、コルチゾルとチロキシンは成体型色素細胞の発生に対して相反する効果を示すものと考えられる。それゆえ、コルチゾルが無眼側の成体型色素細胞を発達させ両面有色を誘導させる機能は、甲状腺ホルモンの機能とは独立している可能性が高いと考えられる。

第3章 総合考察

本研究第1章において、変態期にヒラメの背鰭基部および臀鰭基部に成体型色素細胞の前駆細胞が局在しており、これらの部位から左右対称に体側部に前駆細胞が供給されることが明らかとなった。この成体型色素細胞の前駆細胞の局在とそこから体側部に向けた前駆細胞の左右対称な供給は、硬骨魚類全体を通じて、本研究において初めて発見されたことである。ゼブラフィッシュでは、異体類の研究に先行して変態期の色素細胞の分化および体色パターンの形成機構に関する研究が精力的におこなわれてきた。しかし、その中では、未分化な成体型色素細胞の前駆細胞は、将来体色パターンを形成する領域付近でプレパターンを形成しているものと考えられていた。そして、前駆細胞がプレパターンを形成している領域付近で成体型色素細胞に分化し、その分化した色素細胞の相互干渉等によって体色パターンが形成されると報告されている (Parichy et al., 2000b; Parichy and Turner, 2003a; Parichy et al., 2000b)。しかし、第1章で示した様にヒラメにおける前駆細胞の鰭基部への局在およびその後の体側部への移動が報告されたこと (Yamada et al., 2010)、ゼブラフィッシュにおいても前駆細胞の所在について再検討がおこなわれた。その結果、ゼブラフィッシュにおいても、変態期に背鰭基部および臀鰭基部から体側部に向かって成体型色素細胞の前駆細胞が供給されることが明らかとなった (Buddi et al., 2011)。このように、異体類における新知見が、モデル生物であるゼブラフィッシュにおける新知見発見の端緒となった例はまれであり、本研究が脊椎動物の一般の体色パターン形成機構の解明に対して「変態期に成体型色素細胞前駆細胞が鰭基部から体側部に供給される」という非常に重要なコンセプトを提供したということが出来る。したがって、変態期におけるヒラメの成体型色素細胞前駆細胞の局在とその体側部への移動という現象の発見は、異体類の体色

パターン形成機構の解明のための新知見を与えるにとどまらず、硬骨魚類あるいはより広く下等脊椎動物全般の体色パターン形成機構の解明に影響を与える可能性がある。

Buddi et al. (2011) は、ゼブラフィッシュでは、鰭基部から体側部に供給された前駆細胞は、変態期の間は成体型黒色素胞にも虹色素胞にも分化することができる両能性を維持している可能性を示唆している。1章で明らかにしたように、ヒラメでは、分化多能性を有する未分化な色素細胞の前駆細胞でも発現することが知られている *csflr* が、前駆細胞の供給もとである鰭基部領域で、*dct*, *kit* よりも強く長期間にわたって発現しており、さらに *csflr* は主にメラニンを形成していない細胞で発現していた。このことから、Buddi et al. (2011) がゼブラフィッシュで示唆したように、ヒラメにおいても鰭基部から体側部に供給された前駆細胞は少なくともある時点までは分化多能性を有していたものである可能性が極めて高い。さらに、第1章で示したように、変態期の背鰭基部および臀鰭基部には左右対称に *csflr*, *dct*, *kit* を発現する前駆細胞が分布しており、これらが左右対称に体側部に供給されることから、おそらく、左右に供給された前駆細胞の色素細胞への分化能は左右体側で同等なはずである。

さらに、ゼブラフィッシュでは (Parichy et al., 2000; Parichy and Turner, 2003; Nakamasu et al., 2009; Buddi et al., 2011)、成体型黄色素胞が成体型黒色素胞の生存を促進することが報告されている。ヒラメ、ホシガレイにおいては成体型黄色素胞が分化するのは有眼側だけなので (Nakamura et al., 2010; Yamada et al., 2010; Seikai et al., 2010)、このことが、無眼側には虹色素胞だけが分化し、有眼側には虹色素胞だけでなく成体型黒色素胞も分化してくることと関係しているのかもしれない。

第2章では、ホシガレイを題材として、変態期、特に stage E-F に一過性に体内濃度が上昇するコルチゾルの色素細胞の分化に対する影響を検討した。その結果、外因性の高濃度のコルチゾ

ルは、無眼側においても成体型黒色素胞および黄色素胞の分化を誘導し、両面有色を引き起こした。さらに、この外因性のコルチゾルは、内因性のコルチゾル濃度が上昇する stage E-F に投与された場合に無眼側でも成体型黒色素胞と成体型黄色素胞の分化を誘導した。一方、stage G 以降に投与された場合には、無眼側において成体型黒色素胞と成体型黄色素胞の分化は誘導されなかった。ホシガレイにおいてもヒラメと同様に、仔魚期の間に、成体型色素細胞の前駆細胞が鰭基部から体側部に供給されていると考えられ、第2章の結果は、stage E-F までは、両体側に供給されたそれぞれの前駆細胞の集団は、同等な分化運命を有している、すなわち同等の分化多能性を有しているか、あるいは、ある程度分化運命が限定されているにしても、左右両体側に同等な前駆細胞のセットが供給されていることを強く示唆する。そして、stage G 以降には前駆細胞の分化運命が左右非対称に決定されてしまうか、あるいは左右で異なる方向に限定されてしまっており、有眼側では成体型黒色素胞、成体型黄色素胞、虹色素胞に分化できるのに対して、無眼側では前駆細胞は虹色素胞にしか分化できなくなっていると考えられる。このことが、変態後の左右非対称な成体型色素細胞の分化、すなわち左右非対称な体色パターンの形成に関与していると考えられる。

本研究では、stage G には左右両体側の前駆細胞の分化運命あるいは分化能に左右非対称性を生じさせ、無眼側の前駆細胞の分化運命を虹色素胞に限定する要因を明らかにすることはできなかった。この要因について、筆者は、前駆細胞が供給される体側部の組織環境に左右差が生じ、これが前駆細胞の分化運命に左右非対称性を生じさせているというモデルを想定している。異体類の変態過程では、目の位置をはじめとする体制にも著しい左右非対称性が生じ、その後には体色パターンの左右非対称性が顕在化する。本研究では、stage E-F ステージまでは前駆細胞の多分化能あるいは左右の前駆細胞の同等

な分化運命が維持されており（この間にもある程度は、左右非対称性が形成されつつあるかもしれないが）、stage G には分化能に左右非対称性が生じていることが示されたが、この stage G には目の移動が開始しており、体制の左右非対称性がすでに顕在化していることから、すでに左右の組織環境にも非対称性が生じていることが予想される。

異体類の体制における左右不相称性の出現は、左右軸から背腹軸への体軸の転換が生じたかのような大きな体制転換である。そして脊椎動物一般に共通する背腹軸にそった色彩の極性—すなわち、背側が色素細胞にとみ複雑な模様や暗い色調をなすのに対して、腹側には虹色素胞だけが分化し、白っぽい明るい色調となる体色パターン—にかかわって、異体類では左右軸にそった色彩の極性を形成しており、通常脊椎動物における腹側と異体類の無眼側、異体類以外の背側と異体類の有眼側が体色パターンの点から共通しているように見える。このことから、脊椎動物一般の腹側を白くする要因が異体類の無眼側で、脊椎動物一般の背側を濃い色彩にしている要因が異体類の有眼側で働いている可能性があると考えられる。筆者は、この仮説的な組織環境の左右非対称性として、色素細胞前駆細胞の生残、増殖、分化に関与することが知られている Wnt, Bmp や Noggin のような分泌タンパク質の発現および分布に左右非対称性が生じているのではないかと考えている。実際に、異体類以外の脊椎動物では、背腹軸にそってこれらの分泌タンパクに濃度勾配が生じ、それによって背腹の体色パターンが決定されているという報告がある (Dorsky et al., 1998, 2000; Jin et al., 2001; Lewis et al., 2004; Raible and Ragland, 2005; Hamre et al., 2007; Hess et al., 2008; Yamaguchi et al., 2008)。また、サンショウウオの胚では、黒色素胞が分化してこない腹側で BMP-4 が発現することが知られているが、背側に BMP-4 をしみこませたビーズを埋め込むことによって、背側の黒色素胞の分化が抑制され

ることが報告されている (Hamre et al., 2007)。

さらに Wnt, Bmp, Noggin 等の分泌タンパク質は、初期胚の背腹軸の決定に関与することがよく知られており (Smith et al., 1993; Graff et al., 1994; Maeno et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Funayama et al., 1995; He et al., 1995; Schneider et al., 1996; Sokol, 1996; Sumoy et al., 1999; Cho et al., 2006), 異体類における体軸の転換という視点からも、これら分泌タンパクの左右非対称な分布を想定することは非常に興味深い。

本研究第2章において、コルチゾルが異体類の成体型色素細胞の分化を誘導することを報告したが、色素細胞の増殖・分化に対してコルチゾルが影響を及ぼすことが哺乳類においても報告されている (Ito et al., 1991; Hirobe, 1996; Oskina et al., 2010)。しかし、その作用機序はほとんど、明らかになっていない。コルチゾルが色素細胞の前駆細胞が位置する組織環境に影響して前駆細胞の分化に影響を及ぼすという可能性も否定できない。背腹軸の決定に関与し、色素細胞の分化にも影響する *wnt3* については、コルチゾルの影響をうけてその分泌量が増大するとする報告 (Guan et al., 2004) があるが、これは上記の可能性を支持するのかもしれない。

以上のことを総合して、筆者は現在異体類の左右非対称な体色発現機構について以下のように整理した (Fig. 25)。

- ①異体類の体色パターンを形成する成体型色素細胞は、仔魚期に鰭基部から体側部に向かって供給される。
- ②体側部に供給される前駆細胞は、少なくとも stage E-F までは分化能の点で左右の体側間で違いがない。すなわち、無眼側においても有眼側と同等に成体型黒色素胞や成体型黄色素胞に分化する能力が維持されている
- ③ stage G には左右の体側に分布する前駆細胞の分化運命に非対称性が生じ、無眼側の前駆細胞の細胞運命は虹色素胞に限定される。
- ④前駆細胞の分化運命の左右非対称性、すなわち左右非対称な色素細胞への分化は、左右両体側の組織環境の違いに依存している。
- ⑤左右の組織環境の差は、色素細胞の増

殖・分化に関与することが知られている Wnt, Noggin, Bmp 等の分泌タンパク質の発現動態と関係しているかもしれない。⑥また、左右の組織環境の差を生じさせる引き金としてコルチゾルが関与する可能性が考えられる。

上記の①②③については本研究で明らかとなった。④⑤の仮説の仮説を検証するためには、まず、Wnt 等の分泌タンパクの発現動態を左右の両体側で分析する必要がある。さらに、これらの分泌タンパク質を左右のそれぞれの体側にさまざまな組み合わせで投与し、色素細胞の分化がどのように影響を受けるのか解析することが必要となる。⑥の仮説を検討するためには、コルチゾル投与実験とそのときの Wnt 等の分泌タンパクの発現解析が必要となるだろう。

このような研究は、異体類の体色発現機構の解明に必要なだけでなく、その他の硬骨魚類、あるいは両生類における背腹軸に沿った体色パターンの形成機構の解明にも資するものと期待される。

最後に、2章においてコルチゾルの投与により両面有色が誘導されたことは、種苗生産現場において大きな意味を持つ。仔魚期の飼育環境下では、高密度や不適切な水温など様々なストレス状態に仔魚がおかれている可能性が高い。そして多様なストレスが成体や稚魚だけでなく変態期の仔魚の体内コルチゾルレベルを上昇させることが知られている (Barton, 2002; Jentoft et al., 2002; King, 2006; Alsop and Vijayan, 2008) ので、飼育環境下におけるさまざまなストレスが、コルチゾルの効果によって、両面有色のような体色異常を引き起こす可能性が考えられる。また本研究で示されたように stage D におけるコルチゾルの上昇は有眼側白化を誘導する可能性もある。今後、飼育環境下におけるストレス状態と、そのときのコルチゾルの動態、そしてこれらと体色異常の出現頻度との関係について詳細に検討することで、種苗生産現場における体色異常発生の軽減を図ることができるようになるものと考えられる。

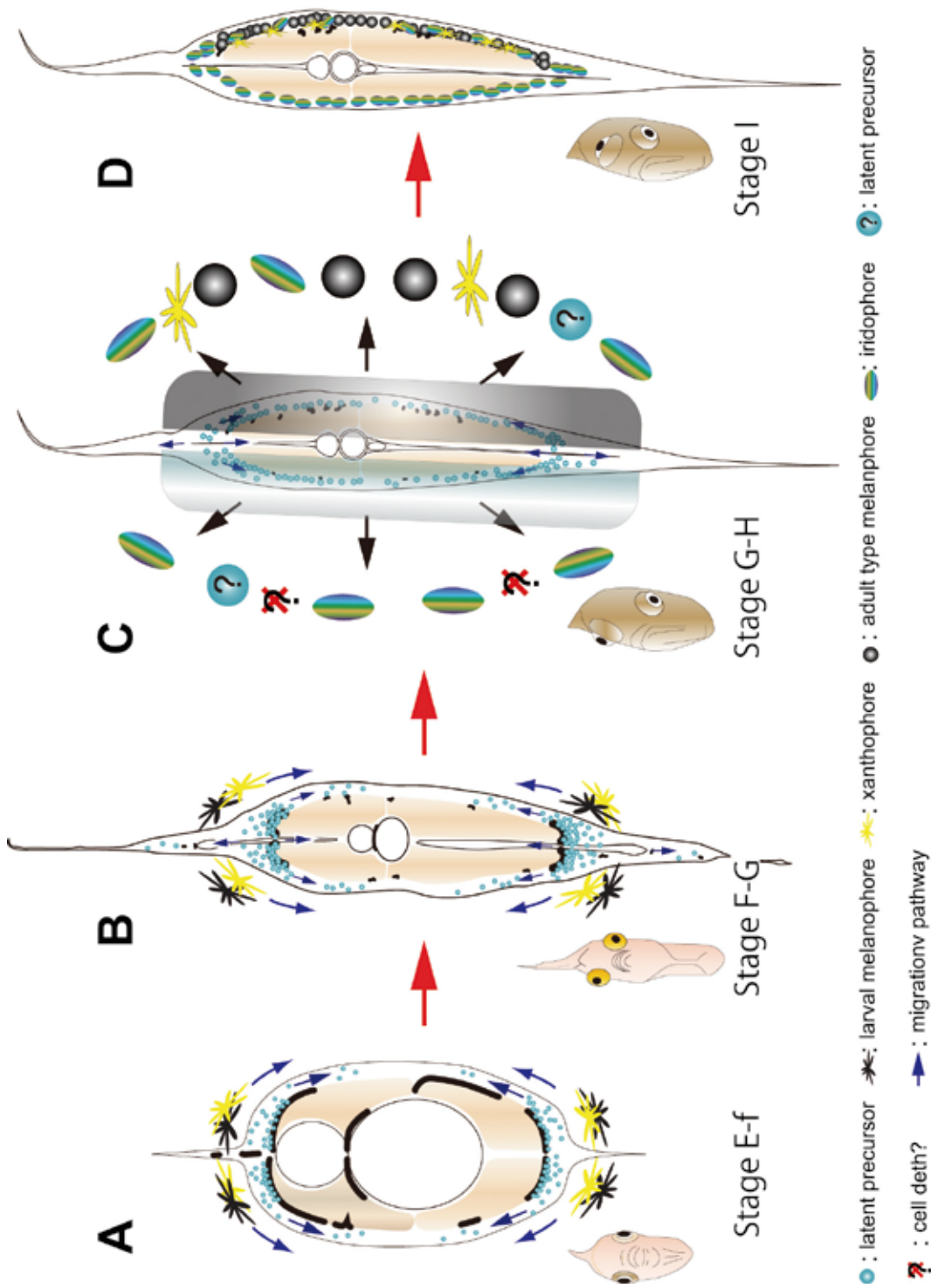


Fig.25. Schematic diagram of flatfish specific pigmentation. A: at stage E-F latent precursor migrate and supply from the margin of the flank. In this stage, precursors are pluripotent. C: Until stage G, left-right asymmetry of organizational environment develop and affect the differentiation of precursor into mature pigment cells body side depending manner. D: At stage I, left-right asymmetry of pigment pattern.

引用文献

- Alsop, D., Vijayan, M.M., 2008. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R711-719
- 有瀧真人, 太田健吾, 堀田又治, 田中克. 2003
ホシガレイ飼育飼育仔稚魚の形態発育と成長. *日本水産学会誌* 67(1):58-660
- Bagnara JT. 1998. Ch. 2. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, editors. *The pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press. p. 9-40.
- Barton, B. A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42: 517-525
- Bolker, J.A., Hill, C.R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish. Biol.* 56:1029-1052
- Budi, E.H., Patterson, L.B., Parichy, D.M., 2008. Embryonic requirements for ErbB signaling in neural crest development and adult pigment pattern formation. *Development* 135:2603-2614
- Budi EH, Patterson LB, Parichy DM. 2011. Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. *PLoS Genetics* 7:e1002044.
- Burton, D., 2010. Flatfish (Pleuronectiformes) chromatic biology. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 20:31-46
- Candille SI, Van Raamsdonk CD, Chen C, Kuijper S, Chen-Tsai Y, Russ A, Meijlink F, Barsh GS. 2004. Dorsoventral patterning of the mouse coat by Tbx15. *PLoS Biol* 2:E3.
- Cho KW, Kim JY, Song SJ, Farrell E, Eblaghie MC, Kim HJ, Tickle C, Jung HS. 2006. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16788-16793.
- De Jesus, E.G., Inui, Y., Hirano, T., 1990. Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79:167-173
- De Jesus, E.G., Hirano, T., Inui, Y., 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82:369-376
- Dorsky RI, Moon RT, Raible DW. 1998. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396:370-373.
- Dorsky RI, Raible DW, Moon RT. 2000. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev* 14:158-162.
- Epperlein H-H and Löfberg J. 1990. The development of the larval pigment patterns in *Triturus alpestris* and *Ambystoma mexicanum*. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 118:1-99.
- Fukuzawa T, Samaraweera P, Mangano FT, Law JH, Bagnara JT. 1995. Evidence that mif plays a role in the development of pigmentation patterns in the frog. *Dev Biol* 167:148-158.
- Funayama N, Fagotto F, McCreia P, Gumbiner BM. 1995. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of b-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol* 128:959-968.
- Graff JM, Thies RS, Song JJ, Celeste AJ, Melton DA. 1994. Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo. *Cell* 79:169-79.

- Haga Y, Nataami K, Takeuchi T. 2005. Process of true ambicoloration in larval and juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*: An ultrastructural study. *Nippon Suisan Gakkaishi* 71:782-790.
- Hamre K, Holen E, Moren M. 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses. *Aquac Nutr* 13:65-80.
- He X, Saint-Jeannet JP, Woodgett JR, Varmus HE, Dawid IB. 1995. Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature* 374: 617 - 622.
- Hess K, Steinbeisser H, Kurth T, Epperlein HH. 2008. Bone morphogenetic protein-4 and Noggin signaling regulates pigment cell distribution in the axolotl trunk. *Differentiation* 76:206-218.
- Hirobe, T., 1996. Hydrocortisone is involved in regulating the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanoblasts in serum-free culture in the presence of keratinocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* 71:387-394
- Hotta, Y., Aritaki, M., Ohta, K., Tagawa, M., Tanaka, M., 2001. Development of the digestive system and metamorphosis relating hormones in spotted halibut larvae and early juveniles. *Nippon Suisan Gakkaishi* 67:40-48
- Inui, Y., Yamano, K., Miwa, S., 1995. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture* 135:87-98
- Ito, A., Tanaka, C., Takeuchi, T., Mishima, Y., 1991. Glucocorticoid stimulates melanogenesis and tyrosinase gene expression in B16 melanoma cells. *Pigment. Cell Res.* 4:247-251
- Jentoft, S., Held, J.A., Malison, J.A., Barry, T.P., 2002. Ontogeny of the cortisol stress response in yellow perch (*Perca flavescens*). *Fish. Physiol. Biochem.* 26:371-378
- Jin EJ, Erickson CA, Takada S, Burrus LW. 2001. Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. *Dev Biol* 233:22-37.
- Kelsh RN, Schmid B, Eisen JS. 2000. Genetic analysis of melanophore development in zebrafish embryos. *Dev Biol* 225:277-293.
- King, V., 2006. Whole body corticosteroid and plasma cortisol concentrations in larval and juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. following acute stress. *Aquacult. Res.* 37:1282-1289
- Lewis JL, Bonner J, Modrell M, Ragland JW, Moon RT, Dorsky RI, Raible DW. 2004. Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development* 131:1299-1308.
- Maeno M, Ong RC, Suzuki A, Ueno N, Kung HF. 1994. A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10260-10264.
- Matsumoto J, Seikai T. 1992. Asymmetric pigmentation and pigment disorders in pleuronectiformes (flounders). *Pigment Cell Res Suppl* 2:275-282.
- Minami T. 1982. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48:1581-1588.
- Miwa S, Yamano K. 1999. Retinoic acid stimulates development of adult-type chromatophores in the flounder. *J Exp Zool* 284: 317-324.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211-268
- Nakamura, M., Seikai, T., Aritaki, M., Masuda, R., Tanaka, M., Tagawa, M., 2010. Dual appearance of xanthophores, and ontogenetic

- changes in other pigment cells during early development of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci. 76: 243-250
- Ohsugi, K, Ide, H. 1983. Melanophore differentiation in *Xenopus laevis*, with special reference to dorsoventral pigment pattern formation. J Embryol Exp Morphol 75:141-150.
- Oskina, I.N., Prasolova, L.A., Plyusnina, I.Z., Trut, L.N., 2010. Role of glucocorticoids in coat depigmentation in animals selected for behavior. Cytol. Genet. 44:286-29
- Parichy DM. 1996a. Pigment patterns of larval salamanders (Ambystomatidae, Salamandridae): the role of the lateral line sensory system and the evolution of pattern-forming mechanisms. Dev Biol 175:265-282.
- Parichy DM. 1996b. When neural crest and placodes collide: interactions between melanophores and the lateral lines that generate stripes in the salamander *Ambystoma tigrinum tigrinum* (Ambystomatidae). Dev Biol 175:283-300.
- Parichy DM, Rawls JF, Pratt SJ, Whitfield TT, Johnson SL. 1999. Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of *c-kit* and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. Development 126:3425-3436.
- Parichy DM, Mellgren EM, Rawls JF, Lopes SS, Kelsh RN, Johnson SL. 2000a. Mutational analysis of endothelin receptor b1 (*rose*) during neural crest and pigment pattern development in the zebrafish *Danio rerio*. Dev Biol 227:294-306.
- Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. 2000b. An orthologue of the *kit*-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. Development 127:3031-3044.
- Parichy DM, Turner JM, Parker NB. 2003. Essential role for puma in development of postembryonic neural crest-derived cell lineages in zebrafish. Dev Biol 256:221-241.
- Parichy DM, Turner JM. 2003a. Temporal and cellular requirements for Fms signaling during zebrafish adult pigment pattern development. Development 130:817-833.
- Parichy DM, Turner JM. 2003b. Zebrafish puma mutant decouples pigment pattern and somatic metamorphosis. Dev Biol 256:242-257.
- Parichy, DM, Reedy, MV, Erickson, CA. 2006. Regulation of melanoblast migration and differentiation. in: Nordland JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, editors. The Pigmentary System and its Disorders. 2nd Edition. New York: Oxford University Press p.75-95.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiology and Biochemistry 7:253-258
- Prez, R., Tagawa, M., Seikai, T., Hirai, N., Takahashi, Y., Tanaka, M., 1999. Developmental changes in tissue thyroid hormones and cortisol in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* larvae and juveniles. Fish. Sci. 65:91-97
- Quigley IK, Turner JM, Nuckels RJ, Manuel JL, Budi EH, MacDonald EL, Parichy DM. 2004. Pigment pattern evolution by differential deployment of neural crest and post-embryonic melanophore lineages in *Danio* fishes. Development 131:6053-6069.
- Quigley IK, Manuel JL, Roberts RA, Nuckels RJ, Herrington ER, MacDonald EL, Parichy DM. 2005. Evolutionary diversification of pigment pattern in *Danio* fishes: differential *fms*

- dependence and stripe loss in *D. albolineatus*. *Development* 132:89-104.
- Raible DW, Ragland JW. 2005. Reiterated Wnt and BMP signals in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16:673-682.
- Rawls JF, Mellgren EM, Johnson SL. 2001. How the zebrafish gets its stripes. *Dev Biol* 240:301-314.
- Sakaguchi S, Nakatani Y, Takamatsu N, Hori H, Kawakami A, Inohaya K, Kudo A. 2006. Medaka unextended-fin mutants suggest a role for Hoxb8a in cell migration and osteoblast differentiation during appendage formation. *Dev Biol* 293:426-438.
- Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM, Hausen P. 1996. β -catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* 57:191-198.
- Seikai T, Matsumoto J, Shimosaki M, Oikawa A, Akiyama T. 1987. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Pigment Cell Res* 1:143-151.
- Seikai T. 1992. Process of pigment cell-differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis. *Ichthyological Research* 39:85-92.
- Seikai T, Hirose E, Matsumoto J. 1993. Dual appearances of pigment cells from in vitro cultured embryonic cells of Japanese flounder: an implication for a differentiation-associated clock. *Pigment Cell Res* 6:423-431.
- Seikai T, Matsumoto J. 1994. Mechanism of pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation. *J World Aquacult Soc* 25:78 - 85.
- 青海忠久. 2003. 異体類体色異常出現の防除に関する研究. *日本水産学会誌* 69(5):697-700
- Smith WC, Knecht AK, Wu M, Harland RM. 1993. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* 361: 547 - 549.
- Sokol SY. 1996. Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. *Curr Biol* 6:1456-1467.
- Sumoy L, Kiefer J, Kimelman D. 1999. Conservation of intracellular Wnt signaling components in dorsal-ventral axis formation in zebrafish. *Dev Genes Evol* 209:48-58.
- Suzuki A, Thies RS, Yamaji N, Song JJ, Wozney JM, Murakami K, Ueno N. 1994. A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10255-10255.
- Tagawa M, Aritaki M, 2005. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 141:184-189
- Venizelos, A., Benetti, D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* 176:181-188
- Venizelos A, Benetti DD. 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* 176:181-188.
- Watanabe K, Washio Y, Fujinami Y, Aritaki M, Uji S, Suzuki T. 2008. Adult-type pigment cells, which color the ocular sides of flounders at metamorphosis, localize as precursor cells at the proximal parts of the dorsal and anal fins in early larvae. *Dev Growth Differ* 50:731-741.
- Walters KB, Dodd ME, Mathias JR, Gallagher AJ, Bennin DA, Rhodes J, Kanki JP, Look AT, Grinblat Y, Huttenlocher A. 2009. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused

by mutation of zebrafish *fad24*. *Dev Dyn* 238:86-99.

- Yamada T, Okauchi M, Araki K, 2010. Origin of adult-type pigment cells forming the asymmetric pigment pattern, in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dev. Dyn.* 239:3147-3162
- Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, Hara T, Tohyama C, Katayama I, Miki T, Hearing VJ. 2008. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/ β -catenin signaling in keratinocytes. *FASEB Journal* 22:1009-1020.
- Yamano K, Tagawa M, Jesus E G, Hirano T, Miwa S, Inui Y, 1991. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *J. Comp. Physiol. B* 161:371-375
- Yoo J H, Takeuchi T, Tagawa M, Seikai T, 2000. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Zoolog. Sci.* 17:1101-1106

謝 辞

本研究をおこなうにあたり、終始あたたかくご指導いただきました三重大学連携大学院連携教授 兼独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所養殖技術部育種グループ荒木和男博士に心より深く感謝の意を表します。また、本研究論文を審査および査読してくださいました三重大学生物資源学研究科教授 古丸明博士、同 神原淳博士に深謝いたします。

研究の遂行に当たり種々のご助言ご協力をいただきとともに終始温かく見守ってくださいました独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所養殖技術部 主幹研究員 岡内正典博士に心より深く感謝いたします。また、研究遂行に当たって様々な有益なご助言、ご協力をいただいた京都大学農学部准教授 田川正朋博士、元水産総合研究センター養殖研究所生産技術部長 横山雅仁博士、増養殖研究所養殖技術部育種グループ主任研究員 尾崎照遵博士、同岡本裕之博士、同正岡哲治博士、同グループ長 名古屋裕之博士、同チーム長 原素之博士に感謝いたします。また、色素前駆細胞の DiI 標識技術について有益なご助言をいただいた御茶ノ水女子大学助教 中谷友紀博士に感謝いたします。

また、digoxigenin-labeled RNA probe の効率的な作成技術について貴重なご助言をいただいた独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所病害防除部主任研究員 吉浦康寿博士に感謝いたします。また、ヒラメ仔魚の飼育や実験の補助をしていただいた黒部ゆかり氏、久保貴志子氏にも深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は、科学研究助成基金助成金 (B-23380119) と (C-20580202) でまかなわれました。ここに関係者各位に感謝を申し上げます。

その他にもここに名前を載せることができなかった方々にも様々な形でご助言ご協力いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

[学会誌等への発表論文]

傷のあるスルメイカをねり製品に利用するための技術開発

桑原 浩一

傷のあるスルメイカ肉をねり製品の原料として有効利用するため、有機酸塩がイカ肉の加熱ゲル形成能に及ぼす影響を調べた。ここで用いたすべての有機酸塩は、NaClと同様にイカ肉の筋原線維タンパク質を溶解した。すべての有機酸塩は、イカ肉ミオシンの分解を抑制し、中でも、クエン酸Naの抑制効果が最も高かった。NaClによるイカ肉筋原線維の溶解は、自己消化を促進するが、クエン酸Naの場合、溶解しても自己消化を促進しなかった。有機酸塩はイカ肉加熱ゲルの破断応力を増大し、クエン酸Naが最も優れた効果を示した。従って、イカ肉から加熱ゲルを調製するために、クエン酸Naは最も適した有機酸塩であると判断した。

冷凍 87 (1022) , 817-820 (2012)

活アオリイカ輸送にむけた取り組み

岡本昭・山本純弘（長崎水試）・大脇博樹（長崎工技セ）

活アオリイカを効率的に輸送する技術開発に取り組んだ。輸送中の活イカの主な斃死原因はイカが排泄するアンモニアであった。このため、海水の電気分解を利用したアンモニアを分解する海水浄化装置を作製した。本装置を備えた200L及び500L水槽を用いて長崎県から東京都築地市場へ向けて活イカの大量輸送を試みた。市場到着時の水槽中のアンモニア量は7.4ppm以下に抑制され、供試イカ全数が活力の高い状態で生残した。本装置を備えた輸送システムは、海水の浄化効果が認められ、活イカ輸送に活用できることを確認した。

高圧ガス vol.50(5)335-339 (2013)

クエ種苗生産時の飼育水面油膜除去による鰾の開腔率 および前彎症出現率の改善

○中田久（長崎水試）・宇治督（水研セ増養殖研）・濱崎将臣・築山陽介・
宮木廉夫（長崎水試）・阪倉良孝（長大院水環）

【目的】クエの人工種苗においては、たびたび形態異常（前彎症）が高率に出現することから、全国の種苗生産機関では大きな問題となっている。本研究では、クエ種苗生産における飼育水面の油膜除去と仔魚の鰾の開腔（以下開鰾）率および前彎症出現率との関係を調査し、発生原因の究明を行った。

【方法】試験区は、種苗生産時に飼育水面の油膜を除去する油膜除去区と油膜形成区とした。油膜除去区（100kl 水槽 4 面、1kl 水槽 8 面）では、オーバーフロー方式により油膜の除去を徹底した。一方、油膜形成区（100kl 水槽 1 面、1kl 水槽 4 面）では、油膜を除去しない飼育とした。調査内容は次の①～③とした。①開鰾時期：5～30 日齢では、5 日毎に仔魚を光学顕微鏡下で押しつぶし、鰾内の空気の有無により開鰾を確認した。35～60 日齢では、軟 X 線写真により開鰾を確認した。また、鰾の形成過程の組織学的な観察も行った。②油膜除去と開鰾との関係：15 および 30 日齢において、各試験区の開鰾率を調査した。③開鰾と前彎症との関係：90 および 170 日齢において、軟 X 線写真により開鰾個体、未開鰾個体における前彎症の出現率を調査した。

【結果】①開鰾時期：開鰾は 10 日齢より見られ、開鰾率は 10～15 日齢に上昇し、20 日齢には 70%以上となった。②油膜除去と開鰾との関係：15 日齢での開鰾率は、油膜除去区で 40～50%、油膜形成区で 0%、また、30 日齢では 80%と 5～10%であった。③開鰾と前彎症との関係：90 日齢での前彎症出現率は、開鰾個体で 2%、未開鰾個体で 60%、また、170 日齢では 10%と 68%であった。以上の結果から、種苗生産時に飼育水面の油膜除去を徹底することでクエ仔魚の開鰾率は向上し、前彎症の出現を低減できることが明らかとなった。

2012 年度日本水産学会春季大会 講演要旨集

低・無魚粉飼料によるマダイの飼育と 麴菌発酵物の添加効果

○松倉一樹（長崎水試）・飯野翔太・芳賀穰（東京海洋大）・
Serge Corneillie・船木緑（ALLTECH JAPAN）・
中尾貴尋（中部飼料）・佐藤秀一（東京海洋大）

【目的】近年、魚粉の需給動向が逼迫し、低魚粉飼料の開発が望まれている。飼料中の魚粉量を大幅に削減した場合、飼育成績が劣る事例も報告されており、低魚粉飼料の高性能化が求められている。そこで本研究では、低魚粉飼料の高性能化に向けた知見を得ることを目的として、低・無魚粉飼料が魚の飼育成績や魚体成分に及ぼす影響および麴菌発酵物（以下麴とする）の添加効果について、マダイを対象に検討した。

【方法】魚粉 0%、魚粉 0%+麴、魚粉 20%、魚粉 20%+麴、魚粉 50%の計 5 区を設定し、試験用 EP 飼料を作製した。魚粉 0%および魚粉 20%の飼料には、魚粉代替原料としてコーングルテンミール、大豆油粕、濃縮大豆タンパク質、オキアミミールを配合し、合成タウリン等も適宜添加した。この試験用 EP 飼料を、マダイ 1 才魚（329 g）に 16 週間飽食量給餌した。飼育期間中、4 週毎に全個体の体重を測定した。試験終了後、各区から 5 尾ずつ採取し、魚体の一般成分および血液性状の分析に供した。

【結果】各区の終了時体重は、魚粉 0%+麴区：687 g、魚粉 20%区：681 g、魚粉 20%+麴区：666 g、魚 50%区：652 g、魚粉 0%区：651 g の順となり、魚粉 0%+麴区が魚粉 0%区に比べて有意に重かった。日間給餌率は、魚粉 50%~20%飼料区：1.1%、魚粉 0%+麴区：1.0%、魚粉 0%区：0.9%を示した。魚体の一般成分および血液性状は、各区间で顕著な差が見られなかった。

以上の結果から、今回の試験では飼料中の魚粉を 0%まで削減しても、魚粉 50%飼料に比べて飼育成績の低下や魚体成分の異常は見られなかった。また、魚粉 0%飼料については、麴を添加すると摂餌性が良くなり、その結果として成長も促進されることが示唆された。

2013 年度日本水産学会春季大会 講演要旨集

長崎県水産試験場研究報告 第39号

平成25年10月31日発行

発行所 長崎県総合水産試験場
〒852-2213 長崎市多以良町1551-4
TEL 095-850-6293

発行者 藤井明彦

印刷所 (有)ハマデ印刷
TEL 095-848-1028
