

メダカにおける黒色素胞の形成および受精卵の発育と光条件

隅田 莉央 石崎 朱 大坪 千咲 吉田 美葉子
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

メダカ, *Oryzias latipes*, は4色型色覚であり, 紫外線を含む広範囲の光の波長を認識することができる動物である。近年, モデル動物としても注目されており, 光の波長がメダカの成体に与える影響についての研究も進んでいる。しかしながら, 受精卵・稚魚を対象とした研究は無に等しく, 文献は見当たらなかった。本研究ではメダカの受精卵・稚魚を対象に光の波長および照度が与える影響に焦点を当てた。曇天時に相当する照度のもとで飼育すると, 受精卵の孵化に遅延が生じた。また, カラーフィルムを使用してメダカに照射される光の波長のうち一部を減弱させた。この際, 実験群においては黒色素胞の発現がより強く, 早くなり, さらに孵化の遅延が軽減された。実験群は共通して320-400 nm, 560-580 nmの範囲が減弱されており, これらの波長が黒色素胞の形成と受精卵の発育に関与している可能性がある。

1. はじめに

1.1. メダカの特徴

メダカは小さな体に対して大きな目を持っていることが特徴的である。成体の場合, 体長20-40 mmに対して目の直径は3-5 mmであり体長の約1割を眼が占めている。また, 高い視覚機能を有している。メダカは, 4色型色覚(赤・青・緑・紫外線)であり, ヒトが認識できない紫外線をも認識することができる^[4]。加えて, メダカは視覚優位で行動する動物である^[2]。そこで, 本研究では光条件(視覚情報)がメダカの発育に与える影響に着目した。

また, 体色変化もメダカの大きな特徴の一つである。表皮に黒色素胞, 黄色素胞, 白色素胞, 虹色素胞の4種の色素胞を持ち, 体色をある程度変化させることができる^[1]。自らの体色を背地の色に近づけることで, 捕食者から逃れる際に有利になる(生理学的体色変化)^[3]。また, 長期間同じ背地環境におかれることで, 色素胞の数や形状が変化し, 体色が半永久的に変化する(形態学的体色変化)^[3]。本研究では光条件に付随して起こる体色変化にも着目した。

1.2. 研究背景

近年, メダカはモデル動物として実験に多く利用されており, 光の波長がメダカに与える影響についても研究が進んでいる。例として, 性分化期に緑色光を当てて飼育するとメ

スからオスに変わることなどが挙げられる^[5]。しかし, 多くの先行研究が成体になってから光の波長を変化させたものであり, 受精卵・稚魚に関する文献はほとんど見当たらなかった。そこで本研究ではメダカの受精卵・稚魚を研究対象とし, 光波長の及ぼす影響を調査した。

1.3. 研究目的

光の波長がメダカの受精卵・稚魚に与える諸影響を明らかにする。メダカの可視光範囲内で発育に関与している波長について検討した。

2. 研究手法

2.1. 実験対象

実験Ⅰでは, 田口教育研究所で採卵されたミナミメダカ, *Oryzias latipes*を使用した。同種はクロメダカの南日本集団に由来する。

実験Ⅱでは, 自然科学研究機構基礎生物学研究所にて採卵のクロメダカ(K-Kaga)を使用した。同系統は石川県加賀市で採取されたメダカに由来するキタノメダカ, *Oryzias sakaizumii*でありクロメダカの北日本集団に分類される。

2.2. メダカの飼育

メダカの飼育には170 mm×170 mm×170 mmの小型水槽(容量約5 L)を使用した。水深9±2 cm, 水量2.6±0.6 Lを保った。

水温の大幅な低下が見られたため、2022年12月4日以降はサーモスタット付きの観賞魚用ヒーターを各水槽に1つずつ設置し、加温した。

また、水カビの発生を防止することを目的として、水45Lに対し、メチレンブルー水溶液(8.2 g/1 L)を2 mL添加したものを飼育水とした。

孵化3日以降はオキアミミールを主原材料とするメダカ用フードを与えた。栄養成分は右に示した。(表1)

表1：栄養成分表

| | |
|--------|---------|
| 粗タンパク質 | 49.0%以上 |
| 粗脂肪 | 11.0%以上 |
| 粗繊維 | 3.1%以下 |
| 粗灰分 | 15.0%以下 |
| 水分 | 10.0%以下 |
| カルシウム | 1.9%以上 |
| リン | 1.4%以上 |

2.3. カラーフィルムの吸光スペクトル測定

カラーフィルムを透過し、実際にメダカに照射されている光の波長を特定することが目的であった。実験に使用したカラーフィルムの吸光スペクトルを測定した。測定には分光光度計(Thermo Scientific™ GENESYS™ 150)を用いた。セルの光透過面の一方の外壁にカラーフィルムを貼付した。(図1) 飼育水をブランク溶液に設定し、各カラーフィルムの吸光スペクトルを測定した。測定結果は以下に示した。(図2)



図1：貼付済セル

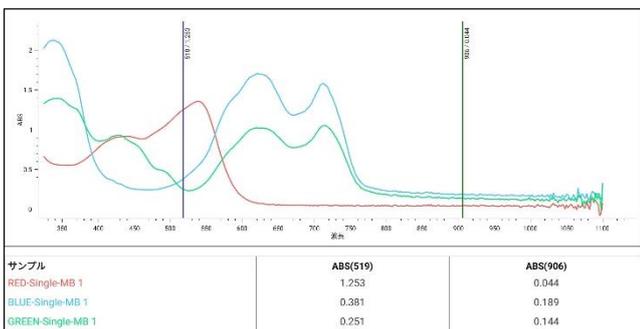


図2：カラーフィルムの吸光スペクトル測定結果

2.4. 孵化基準日

受精日からの積算温度が250に達する日である^[6]。なお、積算温度とは毎日の平均温度を合計したものである。水温25℃の場合、積算温度から算出される孵化基準日は10日である。

2.5. 実験I

明期・暗期時間は各12時間で一定とし、照射する光の色の違いで4つの群に分けた。光の色は白色光を対照群とし、

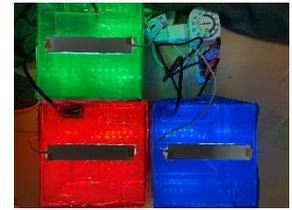


図3：飼育水槽

赤・青・緑の3種を実験群とした。実験群は

表2：実験I 飼育条件

| | Control | RED | BLUE | GREEN |
|-----------|----------|-----|------|-------|
| 水温(°C) | 22±3 | | | |
| 照度(Lux) | 2100±100 | | | |
| 明期/暗期(時間) | 12/12 | | | |
| カラーフィルム | — | 赤 | 青 | 緑 |

各色のカラーフィルムを水槽の全面に貼付した。LEDライトは各水槽の上面に設置した。

(図3) ここにおいて、受精卵を各条件下で孵化させ、飼育し、各群の死亡個体数の記録と体色の観察を行った。(表2)

表3：実験II 飼育条件

| | Control | RED | BLUE | GREEN |
|------------|----------|---------------|---------------|-------|
| 水温(°C) | 24±2 | | | |
| 照度(Lux) | 2100±100 | | | |
| 明期/暗期(時間) | 12/12 | | | |
| 弱減波長領域(nm) | — | -400, 530-760 | -490, 560-750 | -580 |

2.6. 実験II

メダカの受精卵(2022/12/22採卵)を採卵翌日から各条件下で飼育した。(表3) 特定の波長の光の減弱は、実験Iと同様に、水槽の全面にカラーフィルムを貼付することで行った。

2.7. 画像データの収集

対象のメダカを実験飼育水槽からセルプレートに移して行った。双眼実体顕微鏡とWifi顕微鏡カメラを使用しメダカの背側体表面を撮影した。撮影倍率は3.5-10倍とした。稚魚の成長に伴い、倍率10倍では全体像の撮影が不可能となったため、以降は倍率を下げ撮影した。また、実験毎に全個体の画像を撮影することは困難であったため、各実験グループから無作為に抽出した各2-3個体を撮影した。

2.8. 形態学的体色変化の画像データの定量化

形態学的体色変化は長期的な色の変化である。肉眼での観察によるデータはあまりにも

定性的・主観的であり、比較や評価には不適である。そのため、撮影した画像を基に黒色素胞の被度を算出しデータの定量化を図った。(1) 撮影した画像 (図 4) のデータの形式を Lab Stack に変換し、Threshold (二値化) 処理を行った。(図 5) (2) 黒色素胞に相当する領域を認識領域に指定し、面積を算出した。(図 6) 指定領域を拡大し、メダカ全身の面積も同様に算出した。(図 7) この際、適宜背景のノイズ部分の除去を行った。(3) 算出した値を基に (式 1) で黒色素胞の被度を算出した。

[黒色素胞の被度 (%)] = [黒色素胞の面積] / [背側体表全体の面積] × 100…… (式 1)



図 4: 処理前

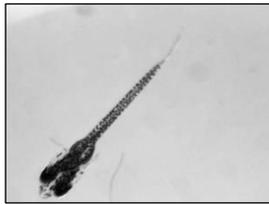


図 5: Threshold (二値化) 処理後

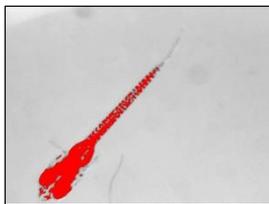


図 6: 黒色素胞の領域指定



図 7: 体表全体の領域指定

黒色素胞の被度は比の値であるため、撮影倍率や各個体の背側体表面積が一致しなくても比較が可能という利点がある。

3. 結果・考察

3.1. 実験 I : 光の色と生存率

照射した光と生存率は以下のグラフのようになった。(図 8)

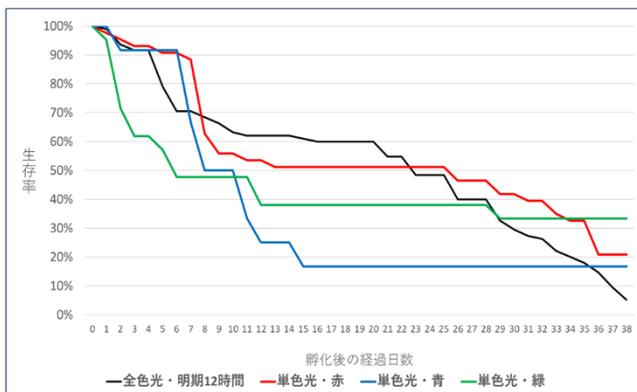


図 8: 各群における孵化後経過日数と生存率

実験群 (赤・青・緑) は生存率が高くなった。実験群の中でも生存率に差が見られ、そのうち緑の生存率が最も高くなった。3色のうち緑の光は最も水に対する透過率が高いため、メダカへの実際の光刺激が多かった可能性がある。

3.2. 実験 I : 光の色と体色変化

実験群赤の個体のみ、体色が赤く変化した。(図 9, 10) 赤色の光が黄色素胞の形成を促進する可能性がある。



図 9: 対照群
全色光



図 10: 実験群赤
▲明らかに体色が赤く変化している

3.3. 実験 II : 光の波長と黒色素胞の発達

黒色素胞の被度と日齢は次のような関係になった。(図 11)

日齢 20-22 日以降、黒色素胞の被度は全群共通して増加速度が大きくなった。黒色素胞の形成は日齢 20-22 日以降に本格化すると考えられる。

特定の波長領域の光を減弱した実験群 (RED, BLUE, GREEN) では黒色素胞の被度の増加速度が大きくなった。特定の波長を減弱することで黒色素胞の形成が促進されたと考えられる。

なお、RED は体表面の画像が不鮮明であったことから 38 日以降の被度をグラフ中に記していない。

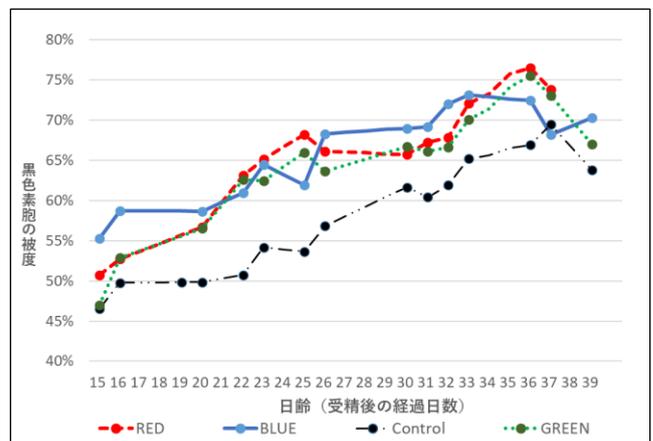


図 11: 黒色素胞の被度と日齢

3.4. 光の照度と孵化日数

照度 2100±100 Lux・白色光の条件下では受精から孵化まで 13-18 日を要した。孵化基準日 10 日から 3-8 日の遅延が起きた。一方実験群が孵化に要したのは 10-14 日であり、孵化基準日からの遅延は 0-4 日であった。特定波長の減弱により孵化の遅延が軽減されたと考えられる。

表 4：孵化開始・完了日

| | 孵化開始 | 孵化完了 |
|---------|------|------|
| Control | 13日 | 18日 |
| RED | 10日 | 13日 |
| BLUE | 12日 | 14日 |
| GREEN | 10日 | 14日 |

※日齢（受精後経過日数）で記した。
※各群において最初の孵化個体が確認された日を孵化開始、全個体の孵化が確認された日を孵化完了とした。

4. 結論・展望

3.5. 結論

実験群 (RED, BLUE, GREEN) には共通する減弱波長 (320-400 nm, 560-580 nm) が存在する。これらがクロメダカの受精卵の発育スピードの調節と黒色素胞の形成に与える可能性が示唆された。

3.6. 展望

受精卵・稚魚は成体よりも飼育が難しいため、日数経過ごとに死亡個体数が増加してしまった。実験個体数が小さく、データの量は不十分であるのが現状である。そのため、現段階では得られた結果からの断定は困難を極める。よって、光の波長以外の飼育環境を最適化し生存個体数を保ち、十分なデータが得られる状態を確立させることが第一の課題である。

黒色素胞の被度を引き続き追跡することで、その形成の全体の傾向を明らかにすることができると考えている。

320-400 nm, 560-580 nm の波長を (1) 双方完全遮断, (2) いずれか一方を完全遮断する実験を行う。これらの実験により、この 2 つの波長の受精卵の発育スピード調節への関与の有無を断定したい。また、黒色素胞の形成との関係もさらに探りたい。

5. 謝辞

本研究をご支援・ご指導いただいた神戸高校課題研究担当の先生方、自然科学研究機構基礎生物学研究所の成瀬清さん、田口教育研究所の田口正

敏さんならびに神戸高等学校関係者の皆様に感謝する。

6. 参考文献

- [1]岡村直道, メダカの色素胞と体色変化, 筑波医療科学 On-Line Journal, 2004, 1 (3), 63-66
- [2]石川裕二, メダカを用いた脳発生の研究, 比較生理生化学会誌, 2000, 126-136
- [3]深町昌司, 魚類の色覚～水中の多彩な光環境への適応～, 日本色彩学会誌, 2019, 第 43 巻第 4 号, 219-222
- [4] Tsuyoshi Shimmura, Tomoya Nakayama, Ai Shinomiya, Shoji Fukamachi, Masaki Yasugi, Eiji Watanabe, Takayuki Shimo, Takumi Senga, Toshiya Nishimura, Minoru Tanaka, Yasuhiro Kamei, Kiyoshi Naruse, Takashi Yoshimura, Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception, Nature Communications, 2017
- [5]大学共同利用法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所, <https://www.nibb.ac.jp/>, (2023/1/30 現在)
- [6]図鑑 (生物・植物図鑑), 大阪府環境農林水産総合研究所, 2023, https://www.knsk-osaka.jp/zukan/zukan_database/tansui/8450b2c298b2683/9950b6e7394c5f6.html, (2023/1/30 現在)