

■原 著■ 2018 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ナマズ目オトシンクルスをモデルとした硬骨魚類黒色素胞の 収縮調節機構の研究

深沢優子^{1,3,†} 橋本真莉菜^{1,†} 上谷雄介¹ 天野桃香¹ 茂木和枝²

小笠原 強^{1,2} 豊泉龍児^{1,2}

Study on the Mechanisms for Melanophore Contraction in *Otocinclus*

Yuko Fukasawa^{1,3,†}, Marina Hashimoto^{1,†}, Yusuke Uetani¹, Momoka Amano¹,
Kazue Mogi², Tsuyoshi Ogasawara^{1,2} and Ryuji Toyoizumi^{1,2}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: yuko7778kngwu@gmail.com

† Both authors contributed equally to this work.

Abstract: *Otocinclus* is a very popular catfish, belonging to the order Siluriformes, family Loricariidae. *Otocinclus* has a very flat dorsal surface and the melanophores in the dorsal dermal skin are distributed in a proper density that allows us to recognize and quantitatively assess the morphology of individual ones; thus, we think that *Otocinclus* catfish is appropriate for the study of neurogenic regulation of melanophore aggregation/dispersion phenomena. Using a pharmacological approach including the hypodermic microinjection of neurotransmitters and related agonists/antagonists and the immersion of whole individuals into reagent solution, we investigated the mechanisms regulating melanophore activities. Our results are helpful to understand the adrenergic control of catfish melanophore activities. Therefore, we believe that *Otocinclus* is a good teleost model for the pigment cell research.

Keywords: catfish, melanophore, aggregation, adrenaline, muscarine, innervation

序論

魚類において皮膚の色、模様の発現やその変化は、保護色、配偶行動、威嚇、同種間コミュニケーションなど様々な局面で重要な生き残り戦略となっている。魚類は動物界のなかでも色素胞（色素細胞）の種類に富んでおり、しかも魚類の色素胞は運動性を有するものが圧倒的に多い。特に黒色素胞（melanophore）の運動性はよく研究されている^{1,2)}。

下等脊椎動物の色素細胞は5ないし6種類に分類され、黒色素胞はその一つである^{3,4)}。黒色素胞がメラノソームと呼ばれる黒色ないし褐色に着色した細胞質顆粒を凝集/拡散させることで体表面の色調が変化する。硬骨魚における黒色素胞に対する神経支配は著しく、その多くはアドレナリン作動性の交感神経に単一支配されているとされる⁴⁻⁸⁾。交感神経

節後ニューロンの末端部から黒色素胞表面に放出されるアドレナリン性神経伝達物質は norepinephrine (NE, 別名 noradrenaline) を主体とし、NE によって黒色素胞が凝集することが知られている⁹⁾。

一般に、硬骨魚類の黒色素胞は、凝集を誘起する α 受容体 ($\alpha 1$, $\alpha 2$) と、拡散を誘起する β 受容体 ($\beta 1$, $\beta 2$) を持つ¹⁰⁻¹⁴⁾。その $\alpha 1$ 受容体には $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$ の3つのサブタイプが、 $\alpha 2$ 受容体には、 $\text{adrb}1$ 、 $\text{adrb}2a$ 、 $\text{adrb}2b$ 、 $\text{adrb}3a$ 、 $\text{adrb}3b$ の5種類のサブタイプがある¹⁵⁾。一方、交感神経節後ニューロンの末端から NE と共に、副伝達物質として ATP も放出され、ATP が脱リン酸化されて色素細胞の adenosine 受容体に作用し、NE の作用とは逆の色素顆粒拡散を生じる機構も存在する¹⁶⁾。交感神経に

よる単一支配であるにもかかわらず、ATP による相反的な作用により、背地順応など環境適応に要求される迅速な体色変化が可能となっている⁹⁾。一方で、ナマズ目の黒色素胞は NE の β 受容体とともに、 α 受容体の代替としてムスカリンをリガンドとする acetylcholine 受容体 (Muscarine 受容体) を発現し、ムスカリンも黒色素胞メラノソームの収縮拡散を制御している^{17, 18)}。

ナマズ目の一魚種である南米原産の *Otocinclus* sp. は、小型観賞魚として広く流通している。本研究室では、その平坦な背面に、黒色素胞が比較的均一かつ離散的に分布することから、個々の黒色素胞の収縮の度合いを明瞭に観察できる魚種として着目している。本研究は、*O. vestitus* をアドレナリン作動性 agonist/antagonist に浸漬する形で黒色素胞に対する作用を調査した (実験 I、II、III)。しかしながら、この方法では agonist/antagonist が心拍や血圧に作用し、副次的な作用としての黒色素胞の収縮/拡散を観察している懸念があった。そこで、次に、*O. vestitus* の極めて平らな背面皮下に薬剤を極微量注射することで (実験IV)、黒色素胞の近傍に NE などの様々な神経伝達物質や受容体の阻害剤を投与し、ナマズ目の黒色素胞の収縮機構の一端を解明することを目的とした。

材料と方法

ナマズ目ロリカリア科に属する *Otocinclus vestitus* の成魚を飼育水槽から無作為に選び実験に使用した。

実験 I

実験方法

各濃度の薬剤を直径 35 mm の培養皿に注ぎ、対照群では人工淡水 (10 % Steinberg 氏液) のみを満たした。個体毎に培養皿に投入し、30, 60 分後にオリンパス実体顕微鏡 (SZX16) で撮影を行った。撮影直前には各個体を 0.4% 2-Phenoxyethanol/10% Steinberg 氏液で麻酔した。撮影倍率は 12.5 倍、32 倍、63 倍とし、*O. vestitus* の成魚の背面頭部側における黒色素胞の観察を行い、識別基準 (図 1、図 2) を設けて、黒色素胞の変化を判定表に記した。実験終了から 24 時間後の生存率を調査した。

使用薬剤

α , β 受容体の双方に結合する NE bitartrate、 $\alpha 1$ 受容体作動薬である Phenylephrine、 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 2A$ 受容体作動薬である Oxymetazoline・HCl、 $\alpha 2$ 受容体作動薬である Tizanidine・HCl、 $\beta 2$ 受容体作動薬である Terbutaline・HCl を使用した。pH は 7.3-7.5

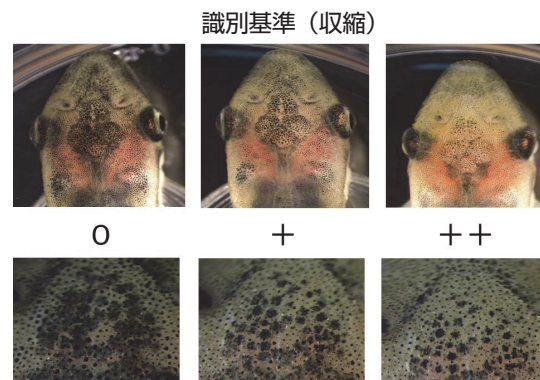


図 1. 黒色素胞の収縮の場合の識別基準を示した写真。

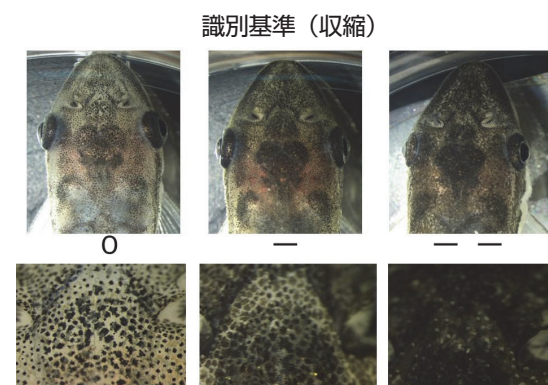


図 2. 黒色素胞の拡散の場合の識別基準を示した写真。

に調整した。

実験 II

実験方法

0.1% MS222-10% Steinberg 氏液で予め麻酔した個体を、薬剤を含む人工淡水に投入し、キーエンス社製デジタルマイクロスコープを用いて、麻酔直後から 0 分とし、10 分毎に 60 分後まで 25/50/150 倍の倍率で観察、撮影し (露光時間は 1.5 秒に固定)、頭部背側の黒色素胞の経時変化を記録した。

使用薬剤

薬剤は NE bitartrate、 $\alpha 1$ 受容体阻害剤の Prazosin、 $\alpha 2$ 受容体阻害剤の Yohimbine と Rauwolscine、 $\beta 1$ 受容体阻害剤の Atenolol を使用した。5 mM NE-10% Steinberg 氏液に最終濃度 0.001/0.1 mM Prazosin, 0.1 mM Yohimbine, 1 mM Rauwolscine, 25 mM Atenolol を溶解した処理液 (pH 7.2-7.5) を調製した。なお、5/10 mM NE, 0.1 mM Yohimbine, 1 mM Rauwolscine の単独処理実験も行った。

実験 III

使用薬剤

薬品を人工淡水である 10% Steinberg 氏液に溶かして pH 7.3-7.6 に調整した。使用した薬品と濃度

は以下のとおりである。アドレナリン α / β 受容体の作動薬である 10 mM Norepinephrine bitartrate monohydrate, アドレナリン $\alpha 1 / \alpha 2$ 受容体の作動薬である 0.5 mM Oxymetazoline, dopamine から norepinephrine を合成する酵素である dopamine β -hydroxylase を阻害する 0.1 mM Nepicastat hydrochloride, ムスカリン型コリン受容体を阻害する 1.0 mM Atropine. 撮影時には 0.1% 2-phenoxyethanol–10% Steinberg 氏液に *O. vestitus* を浸漬し全身麻酔をかけた。

実験方法

ナマズ目ロリカリア科 *Otocinclus vestitus* の成魚(体長約 3 cm) を飼育水槽から無作為に選びだして実験に用いた。各々作成した試薬を 35mm 径のペトリ皿に注いだ。次いで、*O. vestitus* をペトリ皿内に浸漬し黒色素胞の変化を追った。浸漬直後を 0 分とし、0, 30, 60 分の時に Olympus 社の実体顕微鏡 SZX16 を用いて撮影倍率 63 倍で静止画を撮影した。撮影領域は黒色素胞の重なりが少なく、平面で観察のしやすいことから左鼻孔の尾側かつ左目の上側とした(図 3)。

定量化

撮影した写真の中から 4 つの黒色素胞を選び、フ

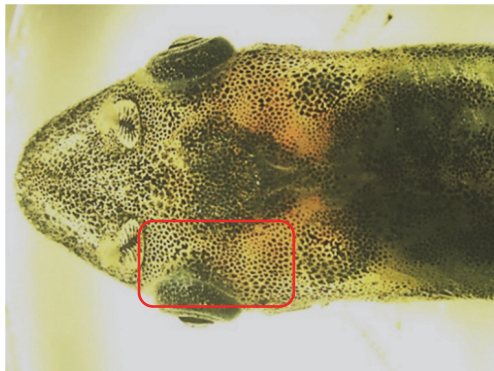


図 3. 撮影領域を表した図。撮影は赤枠で囲んだ領域を撮影した。

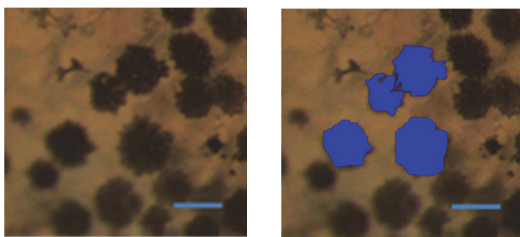


図 4. 定量化前と後の写真。定量化する際に右写真のように黒とは異なる色で塗りつぶした。この黒色素胞 4 細胞分の青色のピクセル数をデータ表現に用いた。Bars, 100 μ m.

リーウェアの GIMP (GNU Image Manipulation Program) を用いてその 4 細胞の面積の定量化をおこなった。撮影した写真の上に透明なレイヤーを追加し、そのレイヤー上に 4 つの黒色素胞の部分を青色で塗りつぶした(図 4)。その後、ヒストグラムを用いて、そのピクセル数を、あらかじめ対物マイクロメーターで同様の方法で求めておいた 100 μ m² 当たりのピクセル数で割り、黒色素胞 4 細胞分の面積のデータとした。そして、そのデータを用いてグラフを作成した。

検定

正規性の検定と関連 2 群検定を行い、浸漬 0 分後と 60 分後を比べて有意差が生じているか調べた。またグラフから黒色素胞が凝集しているか、あるいは拡散しているのかを判定した。

実験IV

実験生物

ナマズ目ロリカリア科に属する *O. vestitus* 成魚を飼育水槽から無作為に選び注射実験に使用した。実験後は、別の飼育水槽に実験日ごとに分けて飼育した。実験後から 2 週間以上飼育した個体を再び別の薬剤溶液の注射実験に用いた。

使用薬剤

神経伝達物質等を 10% Steinberg 氏液に溶解し、pH 7.2–7.5 になるよう調整した。調査した薬品と注射液の濃度は以下の通り；adrenaline 受容体伝達物質である 0.1 mM Norepinephrine bitartrate, α -adrenaline 受容体阻害剤の 0.1mM Yohimbine HCl, Muscarine 受容体の伝達物質の一つである 0.1 mM Muscarine iodide, dopamine 受容体の伝達物質 10 mM Dopamine-HCl, GABA 受容体伝達物質である 10 mM 4-aminobutyric acid (GABA), serotonin 受容体の伝達物質である 10 mM Serotonin-creatinine sulfate monohydrate. 微量注射と黒色素胞の撮影に際しては、0.1% 2-phenoxy-ethanol–10% Steinberg 氏液で全身麻酔をかけた。

注射方法と撮影方法

注射は、Drummond 社の微量注射器 NANOJECT を用いて、*O. vestitus* に対し正面から背面の皮下(図 5 赤丸)に 1 個体あたり 128.8 nl (32.2 nl \times 4 回)注射した。注射直前、10 分後、30 分後、60 分後に黒色素胞を撮影し、変化を追った。

撮影領域は、黒色素胞が凝集・拡散のどちらの反応が起こっても、黒色素胞が重なることなく、1 細

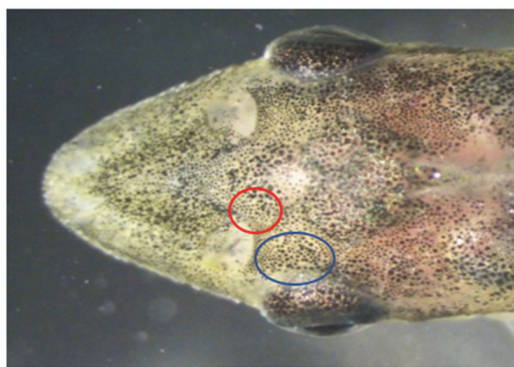


図 5. 撮影領域と注射領域を表した図. 撮影は青丸で囲んだ領域を撮影した. 注射は写真の左側から右側の方向に向かって、赤丸で囲んだ領域に注射をした.

胞が観察しやすい鼻孔の後ろ側かつ眼の上部の領域 (図 5 青丸) と定め、Olympus 社の実体顕微鏡 SZX16 を用いて 63 倍の倍率で撮影した。

定量化

実験Ⅲと同様の方法で定量化を行った。

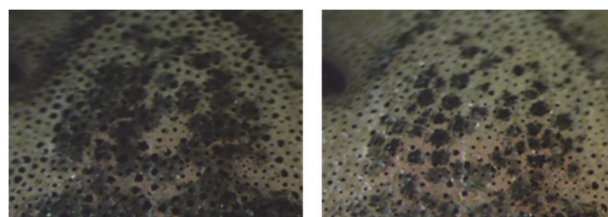
検定

正規性の検定、関連 2 群の検定、次いで多重比較の検定 (false discovery rate; FDR 法) を行い、微量注射の前後で細胞面積に有意差が生じるかを調べた。

結果

実験Ⅰ

NE 処理では、処理開始後すぐに黒色素胞が収縮をはじめ、30 分後には明白な収縮が生じた。30-60 分後には、1.0 mM 処理群 (n=15) よりも 10 mM 処理群 (n=15) の方が強く収縮し、後者では黒色素胞の大きさが処理前の 2 分の 1 程度の大きさになった (図 6)。60 分後には一部の黒色素胞が少し弛緩した個体も生じた。生存率は 100% だった。Phenylephrine 処理では 1.0 mM 処理群 (n=18)、10 mM 処理群 (n=22) 共に黒色素胞の収縮は全く生じなかった (表 1)。生存率は 100% だった。1.0-10 mM Oxymetazoline 処理では、処理開始から 30 分後には黒色素胞が拡散し始め、10 mM 処理群 (n=8) は 60 分後には背面全体が黒色素胞に覆われ黒色素胞間の境界が不明になる程、黒色素胞が極度に拡がった (図 7)。また 10 mM 処理群の個体は 30 分を過ぎると明らかに動かなくなり実験終了から 24 時間後の生存率は 25% に下がった (1.0 mM 処理群の生存率は 95% (n=22))。1.0-5.0 mM Tizanidine 処理では、Oxymetazoline 処理と同様に、黒色素胞が拡散した (生存率は 1.0 mM 処理群 (n=23)、5.0 mM 処理群 (n=2) とともに 100%; 図 8)。Terbutaline 処理では、



control	0	+	++
Time0	16 (100)	0	0
30	16 (100)	0	0
60	16 (100)	0	0

1.0 mM	0	+	++
Time0	15 (100)	0	0
30	2 (13)	13 (87)	0
60	0	11 (73)	4 (27)

10 mM	0	+	++
Time0	15 (100)	0	0
30	1 (6.7)	9 (60)	5 (33)
60	0	3 (20)	12 (80)

図 6. Norepinephrine (NE) 浸漬実験の結果. 10 mM NE で浸漬処理開始後 0 分 (左上) から 60 分 (右上) の間に、黒色素胞群ははっきりと収縮した。

表 1. Phenylephrine 浸漬実験の結果

control	0	+	++
Time 0	20 (100)	0	0
30	20 (100)	0	0
60	20 (100)	0	0

1.0 mM	0	+	++
Time 0	18 (100)	0	0
30	18 (100)	0	0
60	18 (100)	0	0

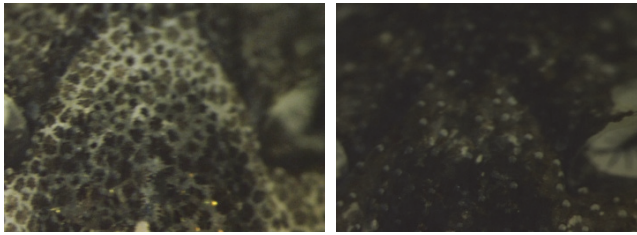
10 mM	0	+	++
Time 0	22 (100)	0	0
30	22 (100)	0	0
60	22 (100)	0	0

室温: 19 - 23°C, 湿度: 18 - 62%

NE 処理程強くないが、黒色素胞に収縮がみられた。10 mM 処理群 (n=22) においては、30 分後には過半数の個体で収縮が認められ、30 分後に収縮した個体は 60 分後にも持続的に収縮していた (表 2)。

実験Ⅱ

5 または 10 mM NE 単独処理により、10 分後には黒色素胞が凝集し、60 分後まで凝集し続けた (5 mM, n=14/15; 10 mM, n=15/15; 図 9)。一方、NE と $\alpha 2$ 受容体阻害剤の Yohimbine または Rauwolscine を競合させたところ、いずれの阻害剤の場合にも NE による黒色素胞の凝集の抑制が観察され、一部



Control	0	-	--
Time0	23 (100)	0 (0)	0 (0)
30	23 (100)	0	0
60	23 (100)	0	0

1.0 mM	0	-	--
Time0	20 (100)	0 (0)	0 (0)
30	8 (40)	11 (55)	1 (5.0)
60	0	11 (55)	9 (45)

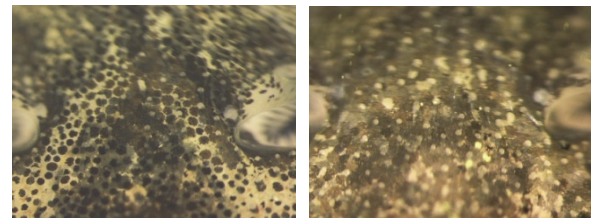
10 mM	0	-	--
Time0	8 (100)	0 (0)	0 (0)
30	1 (13)	7 (88)	0
60	0	1 (13)	7 (88)

図 7. Oxymetazoline hydrochloride 浸漬実験の結果. 処理開始 60 分後に黒色素胞は拡散した.

の個体ではむしろ拡散した。5 mM NE と 0.1 mM Yohimbine を競合させたところ、15 個体中 2 個体は黒色素胞が吻側の一部の領域でのみ凝集した（10 分後から 60 分後まで持続；以下 10-60 分後と表記）。他の 7 個体は黒色素胞が拡散し、残りの 6 個体は凝集も拡散も認められなかった（10-60 分後；図 10）。また、0.1 mM Yohimbine 単独処理により、黒色素胞が拡散した（n=14/15; 10-60 分後）。5 mM NE と 1mM Rauwolscine を競合させた場合には、黒色素胞が凝集した個体は 15 個体中皆無であり、7 個体で黒色素胞が拡散し、残り 8 個体は変化がなかった（10-60 分後；図 11）。また、1 mM Rauwolscine 単独処理により、黒色素胞が拡散した（n=14/15; 10-60 分後）。

一方、 α_1 受容体阻害剤の Prazosin または β_1 受容体阻害剤の Atenolol を NE と競合させても NE による黒色素胞の凝集を抑制することはなかった。5 mM NE と 0.001 mM Prazosin を競合させた場合には、10 個体の全てで黒色素胞が凝集し（10-60 分後）、5 mM NE と 0.1 mM Prazosin を競合させると、15 個体中 12 個体で黒色素胞が凝集した（10-60 分後；図 12）。5 mM NE と 25 mM Atenolol を競合させると、15 個体の全てで黒色素胞が凝集した（10-60 分後；図 13）。

対照群として、0.1% MS222 – 10% Steinberg 氏液で同様の実験を行ったが、変化は見られなかった。



Control	0	-	--
Time0	23 (100)	0	0
30	23 (100)	0	0
60	23 (100)	0	0

1.0 mM	0	-	--
Time0	23 (100)	0	0
30	6 (26)	16 (70)	1 (4.3)
60	1 (4.3)	18 (73)	4 (17)

5.0 mM	0	-	--
Time0	2 (100)	0	0
30	0	0	2 (100)
60	0	0	2 (100)

室温: 20 – 24°C, 湿度: 23 – 33%

図 8. Tizanidine hydrochloride 浸漬実験の結果. 処理開始 30 分後（左上 1.0 mM; 右上 5.0 mM）の結果.

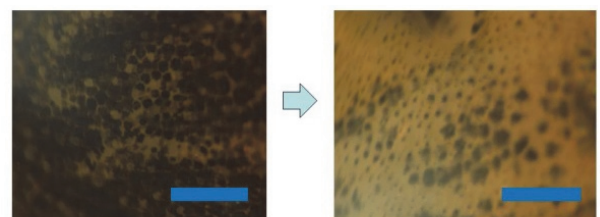
表 2. Terbutaline Sulfate 浸漬実験の結果

Control	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	22 (100)	0	0
60	22 (100)	0	0

1.0 mM	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	15 (68)	7 (32)	0
60	8 (36)	14 (64)	0

10 mM	0	+	++
Time0	22 (100)	0	0
30	10 (45)	12 (55)	0
60	4 (18)	14 (64)	4 (18)

室温: 19 – 23°C, 湿度: 50 – 62%



処理前 (5mM NE 150倍)

処理60分後 (5mM NE 150倍)

NE	例数	凝集	拡散	変化なし
5mM	15	14 (93%)	0 (0%)	1 (7%)
10mM	15	15 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

図 9. 5 mM NE への浸漬実験の結果（実験 II の対照群）. Bars, 500 μ m.

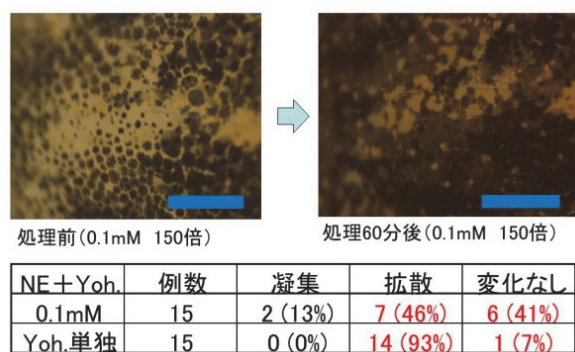


図 10. 5 mM NE, 0.1mM Yohimbine の共投与実験の結果. Bars, 500 μ m.

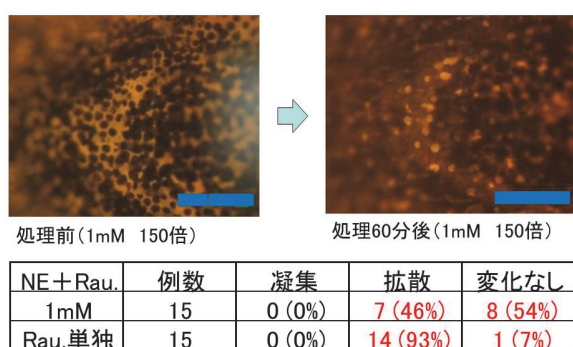


図 11. 5 mM NE, 1mM Rauwolscine の共投与実験の結果. Bars, 500 μ m.

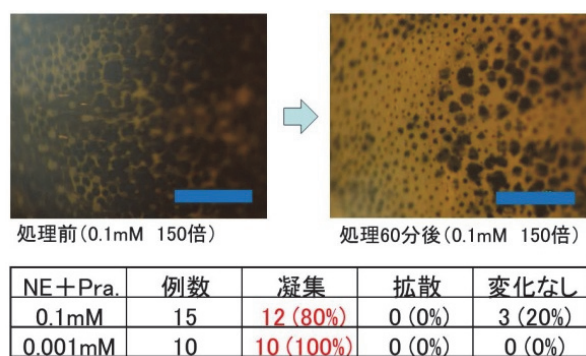


図 12. 5 mM NE, 0.1 mM または 0.001 mM Prazosin の共投与実験の結果. Bars, 500 μ m.

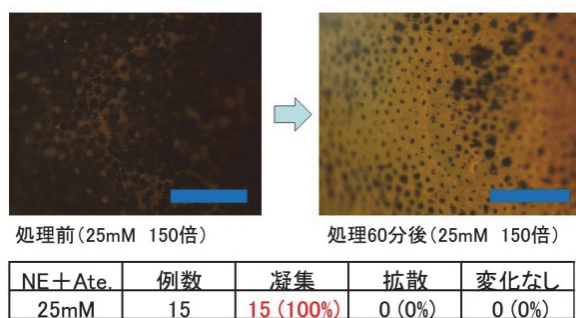


図 13. 5 mM NE, 25 mM Atenolol の共投与実験結果. Bars, 500 μ m.

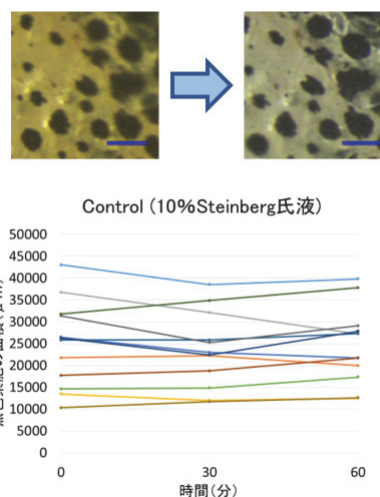


図 14. 無処理群 (10% Steinberg 氏液) の浸漬実験結果 (実験 III の対照群). 浸漬直後 0 分 (左上) と浸漬 60 分後 (右上) の写真と定量化したグラフ (下) である. 写真では変化がなく, グラフでもあまり大きな変化は見られない. Bars, 100 μ m.

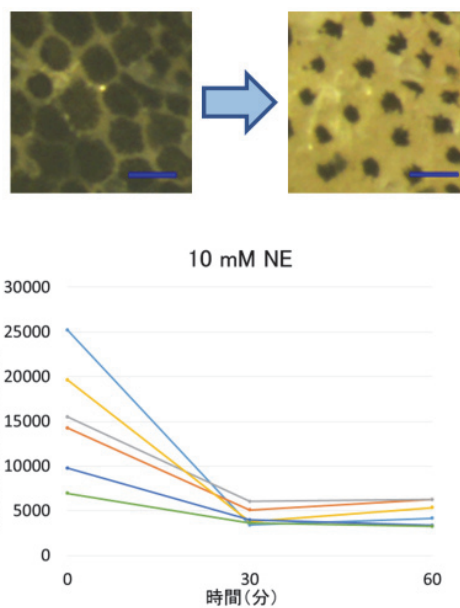


図 15. Norepinephrine (NE) の浸漬実験結果. 浸漬直後 0 分 (左上) と浸漬 60 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積が減少していることがわかる. 定量化した結果のグラフ (下) から同様の結果が読み取れる. Bars, 100 μ m.

実験 III -a

溶媒の 10% Steinberg 氏液のみに浸漬した対照実験では, あまり大きな変化はみられなかった ($n = 12$, $P > 0.1$, 図 14). Norepinephrine (NE) に浸漬した結果, 30 分後には黒色素胞が凝集した ($n = 6$, $P < 0.01$, 図 15). Oxymetazoline への浸漬では, 60 分かけて次第に黒色素胞が拡散した ($n=15$, $P < 0.01$, 図 16). Nepicastat への浸漬では, 黒色素胞が凝集する個体と拡散する個体の双方が生じ

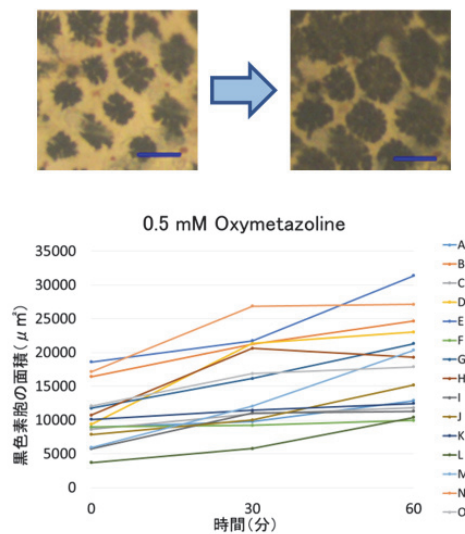


図 16. Oxymetazoline 浸漬実験結果. 浸漬直後 0 分(左上)と浸漬 60 分後(右上)の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化したところ, グラフからも増加傾向にあることが分かる. Bars, 100 μm .

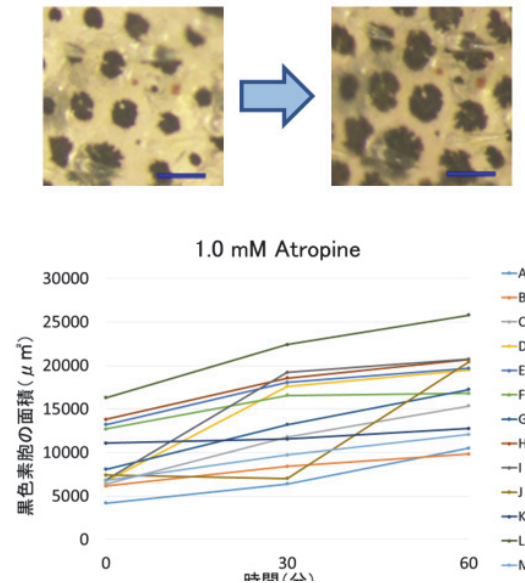


図 18. Atropine 浸漬実験結果. 浸漬直後 0 分(左上)と浸漬 60 分後(右上)の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化したグラフからも増加傾向にあることが分かる. Bars, 100 μm .

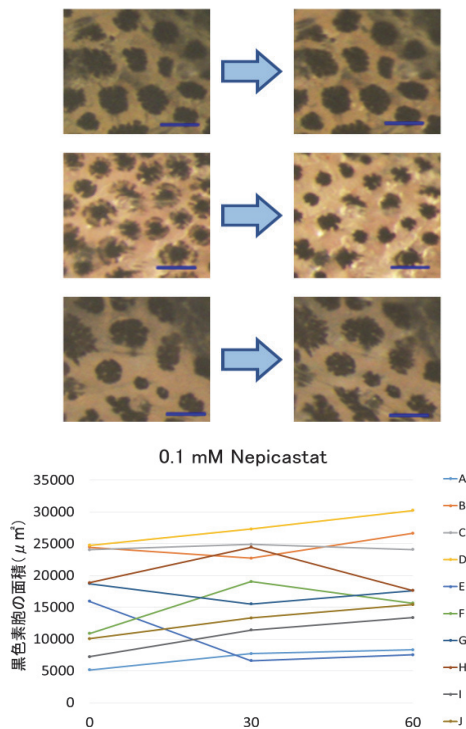


図 17. Nepicastat の浸漬実験結果. 浸漬直後 0 分(左上)と浸漬 60 分後(右上)をみると, 黒色素胞の面積が変化していない個体, 増加した個体, 減少した個体がいて, 個体ごとにまちまちな反応が見られた. 黒色素胞の面積を定量化したところ, 個体によって様々な変化を示し, 統一した変化は得られなかったことがグラフ(下)からも読み取れる. Bars, 100 μm .

た ($n=10$, $P > 0.1$, 図 17)。実験後翌日までに死亡した個体は Oxymetazoline 処理した 15 個体中 2 個体と Nepicastat 処理した 10 個体中 3 個体で、10%

Steinberg 氏液処理処理した個体と Norepinephrine 処理した個体と Atropine 処理した個体はすべて翌日まで生存していた。

実験Ⅲ -b

Atropine への浸漬では、黒色素胞は 60 分かけて次第に黒色素胞が拡散した ($n = 13$, $P < 0.01$, 図 18)。

実験Ⅳ -a

溶媒の 10% Steinberg 氏液のみを注射した対照実験では、あまり大きな変化はみられなかった ($n = 15$, $P > 0.1$, 図 19)。

Norepinephrine (NE) を注射した結果、10 分後には黒色素胞が凝集した ($n = 15$, $P < 0.01$, 図 20)。Yohimbine 注射では、30 分かけて次第に黒色素胞が拡散した ($n = 15$, $P < 0.01$, 図 21)。

実験Ⅳ -b

Muscarine 注射では、黒色素胞は 10 分後には拡散した ($n = 15$, $P < 0.01$, 図 22)。また、Dopamine 注射では、10 分後には凝集反応を示した ($n = 15$, $P < 0.01$, 図 23)。Serotonin 注射では、黒色素胞が凝集する個体と拡散する個体の双方が生じた ($n = 15$, $P > 0.1$, 図 24)。GABA 注射では、大きな変化は見られなかった ($n = 15$, $P > 0.1$, 図 25)。注射後に死亡した個体は、実験 3 時間後に死亡した 1 個体のみで、他の個体は実験後数日経っても生存していた。

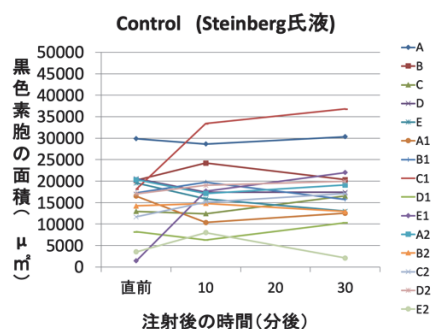
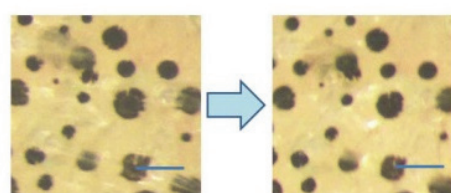


図 19. 対照群 (10% Steinberg 氏液) の注射実験の結果. 注射前 (左上) と注射 30 分後 (右上) の写真と, 定量化したグラフ (下) である. 写真では変化がなく, グラフでもあまり大きな変化は見られない. Bars, 100 μm .

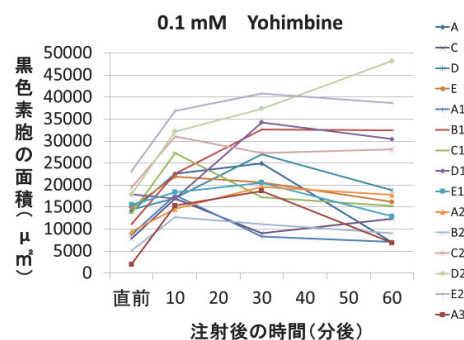
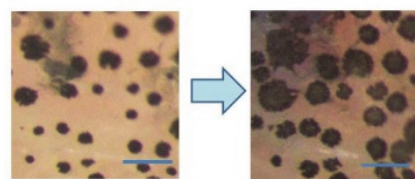


図 21. Yohimbine 注射実験の結果. 0.1 mM 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化すると, グラフからも黒色素胞の面積が増加傾向にあり, やがて概ね元の大きさに戻ることが分かる. Bars, 100 μm .

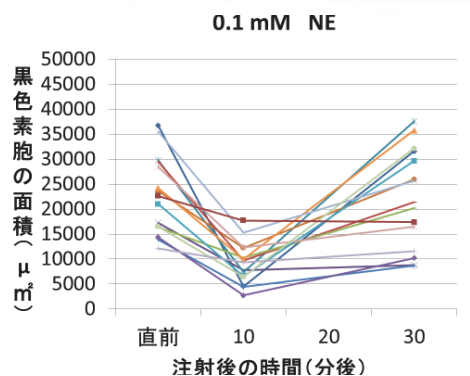
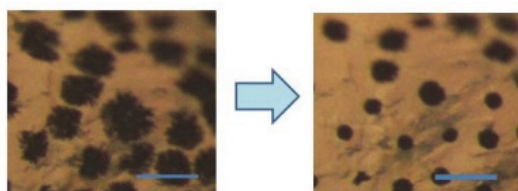


図 20. Norepinephrine (NE) の注射実験の結果. 0.1 mM NE 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積は減少していることがわかる. 定量化した結果のグラフ (下) からわかる. 一旦収縮した黒色素胞はやがて概ね元の大きさに戻った. Bars, 100 μm .

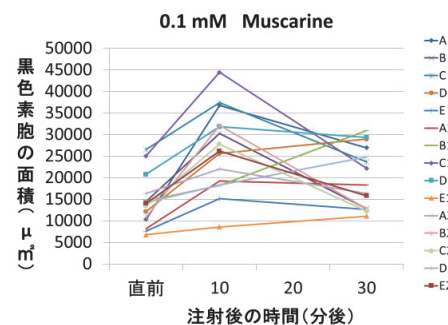
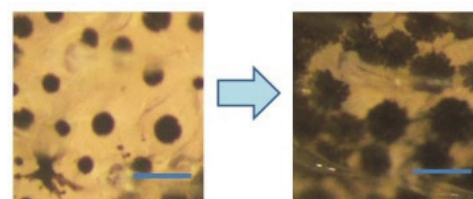


図 22. Muscarine の注射実験の結果. 0.1 mM Muscarine 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を比べると, 黒色素胞の面積が増加していることがわかる. この結果を定量化すると, グラフでも増加傾向にあることがわかる. Bars, 100 μm .

討論

実験 I、実験 II、実験 III -a、実験 IV -a より、オトシンクルスの黒色素胞は、多くの硬骨魚類と同じく NE 依存性経路の刺激で凝集した (図 6、図 9、図 15、図 20)。哺乳類の $\alpha 2$ 受容体は神経系のシナプス前膜に存在し Norepinephrine の放出を抑制する負の feedback 経路で働くことが知られているが、本研究の Yohimbine 関連の結果からは、ナマズ目魚種で

も $\alpha 2$ 受容体がシナプス前膜に局在し、同様のメカニズムを担うかについては、今後の慎重な検討が必要そうである (図 10、図 21)。Terbutaline 処理で黒色素胞が収縮したことから、*O. vestitus* の $\beta 2$ 受容体が黒色素胞の収縮に関与することが示唆された (表 2)。また、NE に $\alpha 1$ 受容体阻害剤の Prazosin、 $\beta 1$ 受容体阻害剤の Atenolol を競合させても黒色素胞の凝集は阻害されず (図 12、図 13)、一方、 α

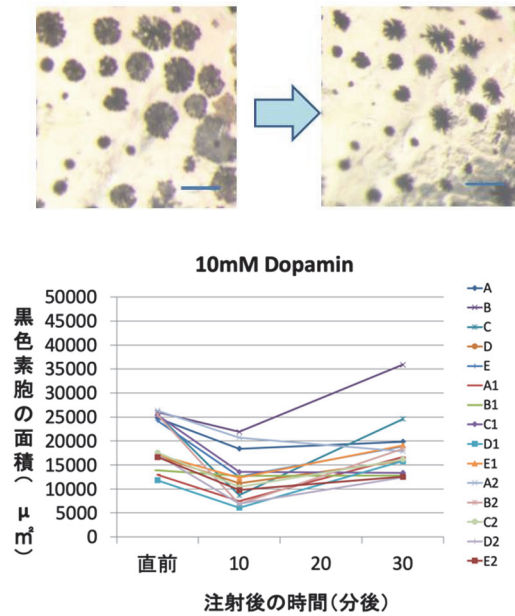


図 23. Dopamine 注射実験の結果. 10 mM Dopamine 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) の写真を見比べると、黒色素胞の面積が減少している. 定量化したデータのグラフからも、面積の減少が読み取れる. Bars, 100 μm.

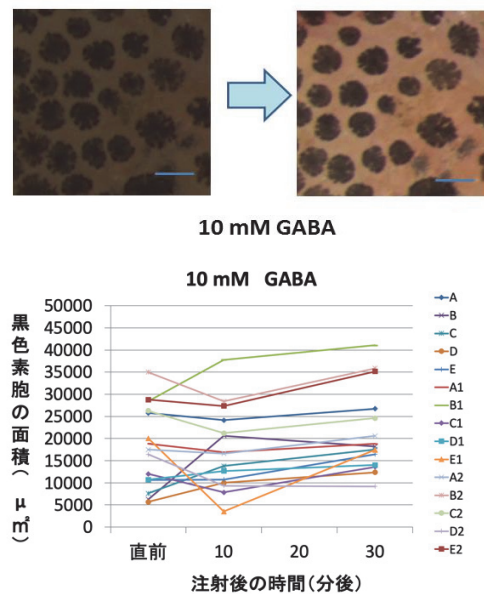


図 25. GABA の注射実験の結果. 10 mM GABA 注射の注射前 (左上) と注射 10 分後 (右上) をみると、黒色素胞の面積は変化していない. この個体以外においても、黒色素胞の面積は、GABA の注射によって、増加・減少とどちらの反応も見られた. 定量化したところ、個体によって様々な変化を示し、統一的な傾向性はなかったことがグラフ (下) からわかる. Bars, 100 μm.

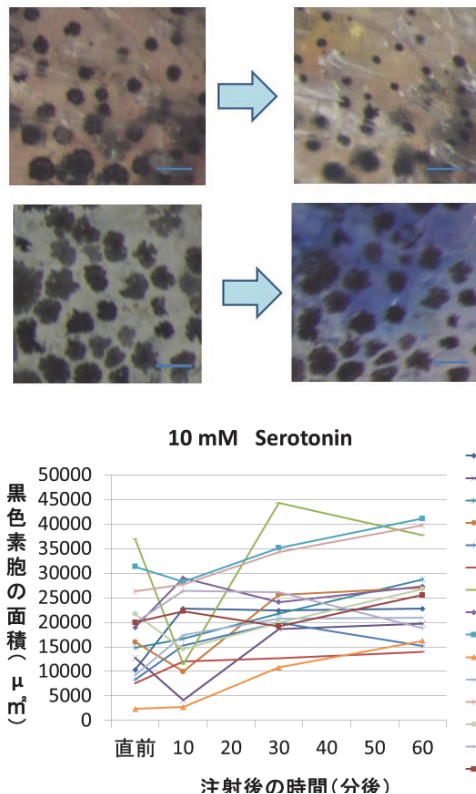


図 24. Serotonin の注射実験の結果. 写真 (10 mM 注射) のように、黒色素胞の面積が減少した個体もいれば、変化しない個体もいた. グラフでも、黒色素胞の収縮の有無については一定の傾向性は生じていない. Bars, 100 μm.

2 受容体阻害剤である Yohimbine, Rauwolscine を競合させると黒色素胞の凝集が阻害された (図 10、図

11). 従って、オトシンクルスにおける黒色素胞の凝集 / 拡散には、黒色素胞の $\alpha 2$ 受容体を介した情報伝達系 (細胞内 cAMP の減少) が働いていると考えられる. $\alpha 2$ 受容体は主に神経細胞のシナプス前膜に分布し、伝達物質遊離に対して抑制的に作用し、そこに $\alpha 2$ 受容体阻害剤を投与し負のフィードバック制御を抑制すると伝達物質遊離は増加する. 本研究において、NE と $\alpha 2$ 受容体阻害剤との共投与、更には $\alpha 2$ 受容体阻害剤の単独投与でも黒色素胞が拡散した個体すら生じた結果については、やや予想外であった. *Otocinclus* 黒色素胞の α / β 受容体に対する NE 結合の親和性の問題とともに、今後の研究を待ちたい.

NE の微量注射によって、注射領域近傍の黒色素胞は 10 分程度のタイムスケールで鋭敏に反応し、凝集した. 一方で、注射した NE 溶液の皮下での拡散に起因すると思われるが、注射 30 分後には NE の凝集効果は薄れ、黒色素胞は元の大きさに回復した (図 20). 一方、NE 浸漬実験による黒色素胞の凝集は 30 分後には最も凝集していた (図 15). 皮下への NE の浸透に時間がかかったためであろう. そして、少なくとも続く 30 分間凝集効果が持続したのは、浸漬によって大量の NE を投与したこと起因すると思われる. 浸漬実験は、未知の全身性の効果が黒色素胞の収縮 / 拡散に関する結果の解釈の妨げになる懸念があるので、注射実験を中心にして、なおかつ

浸漬実験を補完的に用いるのが妥当な手法と云えるかもしれない。本研究の実施範囲内においては、同一の薬剤は、黒色素胞の収縮/拡散に関して、タイムコースは異なれど、注射実験でも浸漬実験でも同様の効果をもたらした。そのような結果からは、ストレス反応等を介した浸漬実験の解釈の誤りからは今回は逃れていると読み取れる。

実験Ⅳ・bより、黒色素胞における acetylcholine 受容体 (Muscarine 受容体) の存在も強く示唆されたが (図 22)、実験Ⅲ・b の副交感神経遮断薬である Atropin の浸漬実験の結果は解釈が難しい (図 18)。また、Dopamine 投与で著しい黒色素胞の収縮が誘起されたことから、黒色素胞において Dopamine 受容体の発現が期待される (図 23)。しかし他方で、この収縮は、Dopamine が NE の前駆体であることに起因する可能性も考えられる。Nepicastat による浸漬実験では、統一的な反応が見られなかったことから dopamine β -hydroxylase は黒色素胞の収縮に直接関与しないのかも知れない (図 17)。

また Serotonin, GABA の注射では黒色素胞の面積に著しい変化がみられなかったことから、黒色素胞の収縮/拡散にはこれらの伝達物質は直接関与しないと予想される (図 24、図 25)。

今後の課題としては、*O. vestitus* の $\alpha 2$ 受容体やムスカリン型受容体をクローニングしてその黒色素胞における発現と局在を実証し、今回の実験で使用した薬剤とは異なる agonist/antagonist を注射し、これらの機能をより明確にする必要がある。また今回は平面での観察であったが、黒色素胞の収縮を 3 次元的に評価する系を構築する必要がある。

本研究の実施によって、本邦でも入手しやすいマズ目の小型魚類であるオトシナギが黒色素胞の収縮の研究に有用なモデル魚種となることが示されたと筆者らは考えている。

謝辞

実験Ⅳの検定については、神奈川大学 (現 明治学院大学教養教育センター) の安部淳博士にご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。本研究は神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201809) を受けて実施されました。総合理学研究所所長並びに所員各位に御礼申し上げます。

文献

- Ikeda K, Semenova I, Zhapparova O and Rodionov V (2010) Melanophores for microtubule dynamics and motility assays. *Methods Cell Biol.* **97**: 401-14.
- Ligon RA and McCartney KL (2016) Biochemical regulation of pigment motility in vertebrate chromatophores: a review of physiological color change mechanisms. *Curr. Zool.* **62**: 237-252.
- 大島 範子 (2003) 硬骨魚類における色素胞とその運動制御の仕組み *比較生理生化学* **20**: 131-139.
- Salim S and Ali SA (2011) Vertebrate melanophores as potential model for drug discovery and development: a review. *Cell Mol. Biol. Lett.* **16**: 162-200.
- Miyashita Y, Kumazawa T and Fujii R (1984) Receptor mechanisms in fish chromatophores--VI. Adenosine receptors mediate pigment dispersion in guppy and catfish melanophores. *Comp. Biochem. Physiol. C* **77**: 205-10.
- Andersson RG, Karlsson JO and Grundström N (1984) Adrenergic nerves and the alpha 2-adrenoceptor system regulating melanosome aggregation within fish melanophores. *Acta. Physiol. Scand.* **121**: 173-9.
- Morishita F, Katayama H and Yamada K (1985) Subtypes of beta adrenergic receptors mediating pigment dispersion in chromatophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **81**: 279-85.
- Burton D and Vokey JE (2000) Alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptor mediation in melanosome aggregation in cryptic patterning of *Pleuronectes americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **125**: 359-65.
- Yasuoka A, Abe K, Arai S and Emori Y (1996) Molecular cloning and functional expression of the alpha1A-adrenoceptor of Medaka fish, *Oryzias latipes*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 501-7.
- Ruuskanen JO, Laurila J, Xhaard H, Rantanen VV et al. (2005) Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish alpha 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 165-77.
- Ruuskanen JO, Peitsaro N, Kaslin JV, Panula P and Scheinin M (2005) Expression and function of alpha-adrenoceptors in zebrafish: drug effects, mRNA and receptor distributions. *J. Neurochem.* **94**: 1559-69.
- Ruuskanen JO, Xhaard H, Marjamäki A, Salaneck E et al. (2004) Identification of duplicated fourth alpha2-adrenergic receptor subtype by cloning and mapping of five receptor genes in zebrafish. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 14-28.
- Xu J and Xie FK (2011) α - and β -adrenoceptors of zebrafish in melanosome movement: a comparative study between embryo and adult melanophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**: 250-5.
- Wang Zl, Nishimura Y, Shimada Y, Umemoto N, Hirano M, Zang L, Oka T, Sakamoto C, Kuroyanagi J and Tanaka T (2009) Zebrafish beta-adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. *Gene* **446**: 18-27.
- Kumazawa T, Oshima N, Fujii R and Miyashita Y (1984) Release of ATP from adrenergic nerves controlling pigment aggregation in tilapia melanophores. *Comp. Biochem. Physiol. C* **78**: 1-4.
- Ovais M (1994) Control of melanosome movements in isolated skin melanophores of a catfish *Clarias batrachus* (Linn.). *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **38**: 185-8.

- 17) Hayashi H and Fujii R (1994) Pharmacological profiles of the subtypes of muscarinic cholinceptors that mediate aggregation of pigment in the melanophores of two species of catfish. *Pigment Cell Res.* **7**: 175-83.
- 18) Parker GH1, Rosenblueth A (1941) The Electric Stimulation of the Concentrating (Adrenergic) and the Dispersing (Cholinergic) Nerve-Fibres of the Melanophores in the Catfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **27**: 198-204.
- 19) Kasukawa H, Oshima N and Fujii R (1986) A comparative survey of the type of sympathetic neuro-melanophore transmission in catfishes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **85**: 115-20.
- 20) Fujii R, Miyashita Y and Fujii Y (1982) Muscarinic cholinceptors mediate neurally evoked pigment aggregation in glass catfish melanophores. *J. Neural. Transm.* **54**: 29-39.