

## 「好適環境水下での魚の生理学的変化の解明 2」

～陸上養殖の普及を目指して～



福島県立福島高校 SS 部 好適環境水班

2 年 佐藤 葵 大浦 葉子

高橋 駿 中村 咲里

三澤 由佳 渡邊 さや

本田 瑞季 佐久間 仁徳

### 1. 研究の要旨

第3の水といわれる好適環境水は、魚を育てる人工の飼育水である。この水の成分は塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウムの3種類で構成されており、濃度が海水の4分の1程度に調整されている。そのため、海水の浸透圧の違いにより、魚病がほとんど発生しないという利点もある。これらのことから、陸上養殖を進めるにあたり非常に有望視されている技術である。また、好適環境水下で飼育したトラフグやヒラメでは人工海水で飼育した場合より成長が早くなることが分かっている。しかし、魚体に起こる様々な変化はまだ不明な点も多い。

本研究では、今までに鰓の組織観察において、好適環境水で生育するほど二次鰓弁が細くなる傾向が見られ、それを裏付ける酸素消費量も大幅に減少しており、これらのことから好適環境水には硬骨魚類の浸透圧ストレスを減少させ、それに合わせて呼吸器官にも形態的な変化を生じさせる可能性があることがわかった。今回、鰓にある塩類細胞が実際に浸透圧調節を行っていないのかを実証するため、走査電子顕微鏡によってマダイの塩類細胞の画像の撮影に成功した。その結果、浸透圧調節をする細胞の開口部が閉じていること確認された。つまり、浸透圧調節に使うエネルギーは、他の生命活動、例えば体の成長に使われている可能性があることがわかった。

## 2. 研究の動機

好適環境水は、岡山理科大学山本俊政准教授により開発された人工の魚の飼育水である。好適環境水は塩分濃度が海水の約4分の1程度に調整されていて、好適環境水下で飼育したトラフグやヒラメでは人工海水で飼育した場合より成長が早くなることが分かっている。

海水で生きるトラフグやヒラメなどの硬骨魚類は、浸透圧の差から水分の吸収と塩類の排出とを常に行っており、逆に淡水魚では体内に浸透する水の排出と体内から流出する塩類の吸収とを行っている。そのため、この調整には多くのエネルギーを使っており、それは浸透圧ストレスとなっているはずである。好適環境水で飼育された魚の成長が早くなるのは、この浸透圧調整に使用されるエネルギーが必要なくなる分、成長に回されるためではないかと考えられている。しかし、実際に生理学的観点からの研究は行われていなかった。そこで、私たちは好適環境水飼育下での魚の生理学的な変化を研究し、魚の体内で何が起きているのかを明らかにしたいと考え、研究を開始した。



## 3. 実験概要及び使用個体

- (1) 酸素消費量の比較
- (2) Hsp70 遺伝子発現量の比較
- (3) 鰓の塩類細胞の観察

実験個体として、高知県の養殖場で生まれたマダイの稚魚を用いた。まずは、人工海水(※1)で飼育し、実験を行うときに好適環境水に移して変化を見た。

## 4. 結果と考察

### 4-1. 酸素消費量の比較

#### 仮説

私達が研究を開始し、学校で人工海水と好適環境水の二種類を用いてマダイを飼育していた。そのとき、好適環境水で飼育しているマダイは人工海水で飼育しているマダイに比べて口の開閉の回数が少なくなり開閉の上下の動きも小さくなっていることに気づいた。そこで、新たにマダイを数匹、人工海水から好適環境水に移し注意深く観察したところ、

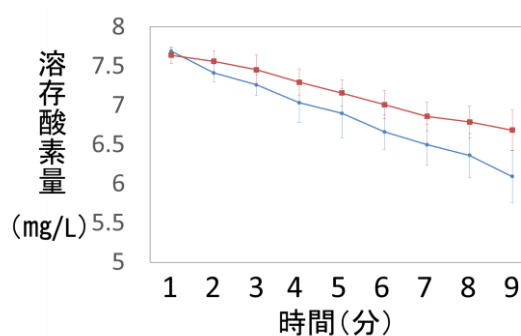
個体によっては1日目で開閉頻度に変化が現れることが分かった。マダイは常に口を開閉しているが、その理由は口の開閉と鰓蓋の開閉を組み合わせることで鰓に常に新しい海水を通し、酸素を得るためである。この事実を踏まえ、私達はマダイが好適環境水に移されたことで浸透圧調整のためのエネルギーが必要なくなり、マダイのエネルギー要求量が人工海水飼育時に比べて少なくなるのではないかと考えた。そこで、好適環境水飼育下では酸素消費量が減少しているのではないかとの仮説を立て、次の実験を行った。

## 実験方法

人工海水で飼育したマダイ4匹を用い、酸素濃度測定器(※2)で溶存酸素量変化を測定した。その後、好適環境水に移し3日後に同様の測定を行った。密閉した容器の中にマダイと、人工海水または好適環境水を極力空気が入らないようにいれ、溶存酸素量を測定した。溶存酸素量が7.7mg/Lから測定を開始し、溶存酸素量が生命に影響を及ぼす手前の濃度6.0mg/Lになるまで測定を行った。次の写真は実験の様子である。そのデータから単位時間あたりの酸素消費量を求めグラフ化した。

## 結果

溶存酸素量の減少量は、好適環境水群で明らかに少なくなった。好適環境水で飼育したマダイは、人工海水群に比べ酸素消費量が約35%減少していた。



### 4-2 Hsp70 遺伝子発現量の比較

私達は研究を始めた当初、好適環境水飼育下で変化する事柄についていくつか予想を立てていた。浸透圧を調節する塩類細胞は塩分を能動的に輸送するときに $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseを用いている。つまり、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseの発現量の増減を調べることができれば塩類調節機構が作動の可否を証明できると考えた。しかし、マダイの $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseの遺伝子配列は登録されていないことが分かり、real-time PCR法を行うことができなかった。そこでHsp70遺伝子の発現量を比較してはどうかと助言を受けた。Hsp70とは分子シャペロンの1つで熱などのストレスを受けたときに発現量が増加する。Hsp70遺伝子の発現量を調べることで、好適環境水下でのマダイへのストレスの変化を見ようと考えた。

## 仮説

浸透圧ストレスが少なくなることで Hsp70 の発現量も減少している。

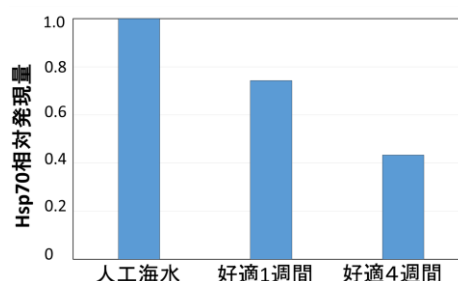
## 実験方法

人工海水で飼育したマダイ 3 匹と好適環境水で飼育したマダイ（1 週間と 4 週間それぞれ 2 匹ずつ）から RNA を抽出し、cDNA を作成して、real-time PCR 法を用い Hsp70 の発現量を比較する。どの細胞でも発現量が一定であるとされる  $\beta$  アクチン遺伝子の発現量を基準とし、Hsp70 遺伝子の発現量を個体ごとに比を求め、さらに人工海水飼育群と好適環境水飼育群を比較した。

## 結果

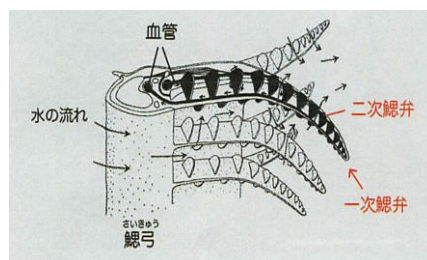
好適環境水に移してから、1 週間、一ヶ月と経つにつれ、Hsp70 の発現量が減少していた。

※上記のグラフは人工海水群の Hsp70 発現量を 1.0 とした時の相対値である。



### 4-3. 鰓の塩類細胞の観察

私達が生理学的調査をするにあたって、人工海水から好適環境水へマダイを移動したときに形態が変化すると予想できる器官が無いか調べてみたところ鰓の塩類細胞に変化が起きている可能性に気づいた。塩類細胞は主に硬骨魚類における体内の塩類の調整に重要な



役割を果たす細胞である。これは淡水魚周りの水から塩類を吸収するように働き、海水魚では体内から塩類を排出するように働いている細胞であるが、これまでウナギなどの海水でも淡水でも飼育が可能な魚類を用いて行われた実験で、ウナギでは海水から淡水へ移動したときに、塩類細胞の大きさが小さくなることが確認されていた。そこで塩類濃度が海水の約 4 分の 1 である好適環境水にマダイを移したときには塩類細胞が小さくなるような変化がマダイでも見られるのではないかと考え、次の実験を行った。

#### 4-3a 仮説

好適環境水で浸透圧調節を行う必要がないならば、体内の塩類濃度を調節する二次鰓弁も細くなると考えた。よって、双眼実体顕微鏡で二次鰓弁の観察を試みた。

#### 実験方法

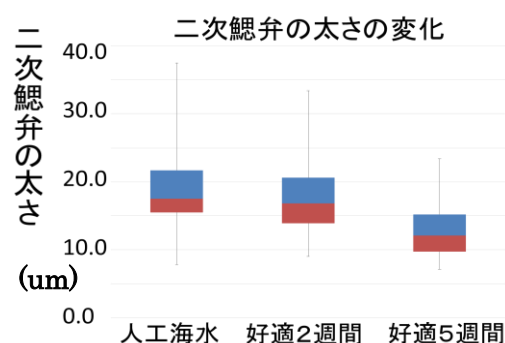
##### 観察資料の作成

人工海水で飼育したマダイ 3 匹と好適環境水で飼育したマダイ（2 週間と 5 週間それぞれ 2 匹ずつ）の鰓の組織を用い、次のことを行った。

- ①マダイを解剖し、それぞれえらを摘出する。
- ②ブアン固定液に約 12 時間つける。
- ③70%アルコール-80%アルコール-90%アルコール-95%アルコール-100%アルコール-無水アルコール-キシレン×2 の順にそれぞれ 30 分ずつ組織を浸す。
- ④パラフィンに入れ急速冷凍する。その後再びパラフィンに入れる。
- ⑤パラフィンの不要な部分を削りミクロトームを用いて 4 $\mu$ m の厚さにスライスする。
- ⑥アルブミンを少量伸ばしたプレパラートに純水を少量注ぎその上に⑤で作成したパラフィンの薄層をのせる。
- ⑦その後ヘマトキシリン・エオジンを用いて染色し、双眼実体顕微鏡で観察した。

#### 結果

好適環境水飼育下でのマダイの二次鰓弁の方が、平均して細くなっている結果が得られ、仮説が正しいと考えることができた。

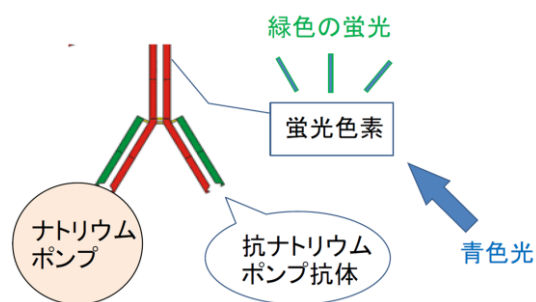


#### 4-3b 仮説

次に、二次鰓弁が細くなっているのであれば、実際に塩類の浸透圧調節を行っている鰓弁内の塩類細胞の数も減少しているのではないかと考えた。

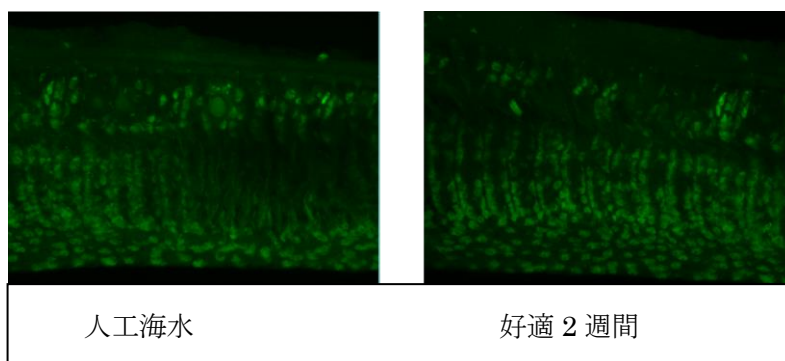
## 実験方法

塩類細胞は、えらにある、浸透圧調節をおこなう特殊な細胞で、ナトリウムポンプが多く存在する。人工海水群と好適2週間群のそれぞれのマダイ3匹の塩類細胞をマーカーとして知られるNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseに対する抗体を用いて免疫染色を行い、塩類細胞の数を比較した。



## 結果

人工海水群と好適2週間群の塩類細胞の数に違いは見られず、仮説を証明することはできなかった。



### 4-3c 仮説

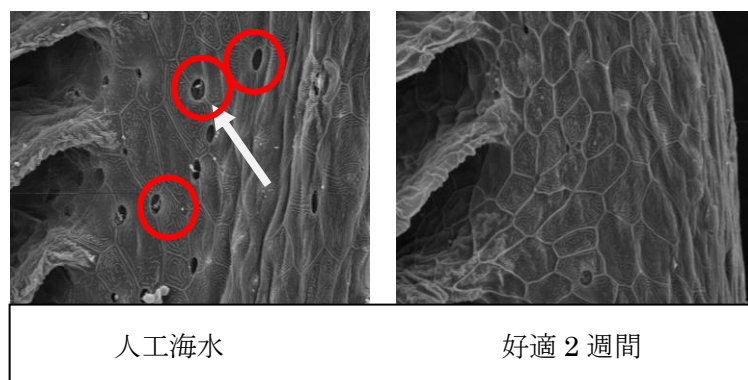
塩類細胞の数に大きな有意差が見られないのであれば、塩類を排出する開口部に変化が生じているのではと考え、走査型電子顕微鏡を用いた観察を試みた。

## 実験方法

走査型電子顕微鏡を用いて鰓表面に存在する塩類細胞の開口部を観察した。

### 結果 塩類が出入りする穴が閉じた

塩類細胞の数には有意差が見られなかったが、塩類が出入りする開口部が閉じていることにより浸透圧調節を行っていないことが証明された。



## 5. 考察

### 4-1 好適環境水飼育下では酸素消費量が減少する。

酸素消費量は好適環境水飼育下で予想以上に減少していた。仮説どおりエネルギー消費量も少なくなっていると考えられる。岡山理科大学の研究では、好適環境水飼育下では成長が早く、1ヶ月で体重が海水飼育下に比べて10%も重くなることが分かっている。そのこともふまえると、好適環境水飼育下では、成長に対してのエネルギー消費を非常に効率的に行われていると考えられる。このことから、好適環境水は養殖に用いる水としてとても優れていると言える。

### 4-2 好適環境水飼育下ではストレス因子である Hsp70 の発現量が減少する。

Hsp70 の発現量が時間とともに減少することから、「好適環境水飼育下では魚のストレスが減少していると考えられる。Hsp70 はストレスホルモンであるコルチゾールとかかわっており、細胞分裂にも影響を与えることが分かっている。このことと成長が早いこととの関連を、細胞増殖因子 IGH や MAP キナーゼなども調べることで明らかにしていきたい。

### 4-3a 4-3b 4-3c 好適環境水飼育下では浸透圧調節を行う塩類細胞の開口部が閉じている

抗体染色法では、塩類細胞の数に有意差が見られなかったが、走査型電子顕微鏡により塩類細胞の開口部が閉じていることが証明された。このことは、塩類の出入り調節を好適環境水では人工海水下より行っていないことがいえる。私たちの研究では、体内の浸透圧調節のために使うエネルギー消費が成長の方に使われているという大きな仮説に対しての1つの証明が実証されたと考える。

## 6. 結論と今後の計画

好適環境水飼育下では浸透圧調節に対してのエネルギー消費量が大きく減少し、魚の受けるストレスも減少している。浸透圧調節を行う塩類細胞の開口部も閉じており、調節を行っていないことも証明できた。

今後の展望としては酸素消費量の調査において仮説どおりの結果が得られたことから  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性や成長にかかわるホルモン分泌量の調査を検討している。しかし、現時点でマダイの  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase や IGF の遺伝子配列は登録されていないため、近縁種の配列から

プライマーを設定して実験を行いたい。また、ウナギやトラフグでも同様な調査を行い、地元土湯温泉の地熱を利用した養殖事業の計画を考えている。これらの研究が地域の活性化につながるようこれからも努力していきたい。

## 7. 使用機器

- ※1 テトラ マリンソルトプロ
- ※2 東亜 DKK HQ30d (溶存酸素計)

## 8. 共同研究・研究協力・参考資料

岡山理科大学、東北大学、東京大学

魚の環境適応、海青社 大畔トシ子 著

キンギョはなぜ海がきれいなのか？ 恒星社厚生閣 金子豊二 著

養殖・蓄養システムと水管理 恒星社厚生閣 矢田 貞美 著

これから研究を始める高校生と指導教員のために 共立出版 酒井聡樹 著

## 謝辞

本研究を行うにあたり、岡山理科大学工学部 バイオ・応用化学科山本俊政先生、東北大学院農学研究科 中島正道先生、東京大学大学院農学生命科学研究科 金子 豊二先生、東北大学大学院生命科学科 酒井聡樹先生には、実験調査やポスター作成にご協力をいただきました。この場をお借りして御礼申し上げます。

福島県立福島高等学校 SS 部 好適環境水班 共同研究者名

佐藤 葵 大浦 葉子 高橋 駿 中村 咲里 三澤 由佳 渡邊 さや

本田 瑞季 佐久間 仁徳 加藤 雅貴 佐藤 荘志 鈴木 智也 八巻 慶汰

室井 智博 高橋 明子 渡部 佑佳 菊池 薫乃 宍戸 愛理 岩田 紗也加

結城 栞 佐藤 捺南子

指導者：教諭 細谷弘樹

教諭 遠藤直哉