

クロマグロにおける視細胞の標識方法と発達過程^a

松浦良太,¹ 大畑尚輝,² 澤田好史,¹ 石橋泰典^{3*}

(種苗生産・養殖グループ)

¹近畿大学水産研究所, ²近畿大学農学部, ³近畿大学大学院農学研究科

* isibasi@nara.kindai.ac.jp

クロマグロ *Thunnus thynnus orientalis* は、光などの視覚刺激に対して極めて過敏な反応を示し、衝突死などの様々な問題を引き起こすことが知られている。^{1,2)} しかし、視覚刺激に対する反応で重要な役割を果たす視細胞の発達過程については、これまでのところ詳しく検討されていない。そこで本研究は組織学手法を用い、クロマグロの色覚および視精度を担う錐体細胞と薄明視を担う桿体細胞の出現時期とその発達過程などを調べた。

試料および方法

試料 近畿大学水産研究所大島実験場で生産された2才魚の網膜を視細胞標識法の検索に使用した。また、同奄美実験場で自然産卵された受精卵を、同農学部にて空輸し、水温24~27°Cの1t水槽で循環ろ過飼育して、孵化直後から経時的に仔魚を採取した。サンプリングした2才魚の網膜および仔魚は、4%パラホルムアルデヒドおよびブアン溶液にそれぞれ固定した。

視細胞標識法の検索 様々な生物種に対し、視細胞、特に外節部分の特異的に標識する方法は報告されているが、クロマグロの視細胞を特異的に標識する方法は知られていない。クロマグロの視細胞を標識するために、すでに報告のあるオプシンに対するモノクローナル抗体(RET-P1)、RITC標識Concanavalin A (RITC-ConA) およびFITC標識Peanut agglutinin (FITC-PNA) の標識特異性を調べた。RET-P1はラット網膜を抗原として作成されたモノクローナル抗体であり、ラット桿体オプシ

ンを認識する。³⁾ ConA, PNAはレクチンであり、マウス⁴⁾およびヒラメ⁵⁾ではそれぞれ桿体外節、錐体外節を標識する。まず始めに、これらの抗体およびレクチンが成魚クロマグロの視細胞をどのように標識するかを調べた。

視細胞の発達過程 クロマグロ仔魚の網膜における視細胞の発達過程を調べた。孵化直後から経時的にサンプリングを行い、RET-P1を用いた免疫組織化学染色の組織像、微分干渉像およびHE染色の組織像を比較しながら錐体および桿体の出現時期とその発達過程を調べた。

免疫組織化学染色 試料は、定法に従ってパラフィン切片および凍結切片を作製した。試料切片は、パラフィンまたはOCTコンパウンドを取り除いた後にPBSで洗浄し、0.1% Triton X-100, 0.2% BSA/PBSで30分間ブロッキングした。一次抗体は1000倍に希釈した抗オプシン抗体(RET-P1, Sigma)を用い、60分間作用させた後にPBSで10分間の洗浄を3回行った。その後、0.1% Triton X-100, 0.2% BSA/PBSで再び30分間ブロッキングし、二次抗体として500倍に希釈した抗マウスIgG-Cy3 (Sigma)を60分間作用させた。染色後の試料はPBSで10分間の洗浄を3回行い、75%グリセロール、1% 没食子酸プロピル/PBS (封入剤)を用いて封入した。

化学染色 試料切片は、パラフィンまたはOCTコンパウンドを取り除いた後に、0.1% Triton X-100, 0.2% BSA/PBSで30分間ブロッキングし、RITC標識Concanavalin A (RITC-ConA)、またはFITC標識Peanut agglutinin (FITC-PNA) (Vector Laboratories)を60分間作用させた。染色後の試料は、免疫組織化学染色と同様の方法で洗浄後に

^a クロマグロの衝突死とその発生防止法 - III

封入した。

一般染色 ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色は定法に従い行った⁶⁾。切片の厚みは6 μ mとした。

観察 微分干渉顕微鏡, 蛍光顕微鏡, 共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれぞれ観察した。

結 果

視細胞標識法の検索 RET-P1はクロマグロ成魚の桿体外節, 錐体外節を特異的に強く標識した。(Fig. 1) 特に錐体に関しては, 長い外節を有する双(複)錐体, 短い外節を有する双(複)錐体の両者の外節がRET-P1によって標識された。一方, FITC-ConAは, 桿体外節を強く標識したが, 錐体外節の標識は弱かった。また, FITC-PNAは桿体外節, 錐体外節のどちらも標識しなかった。これより, RET-P1はクロマグロ視細胞の特異的な標識に有効な抗体であることがわかり, 視細胞の発達過程を検討するために利用できると考えられた。

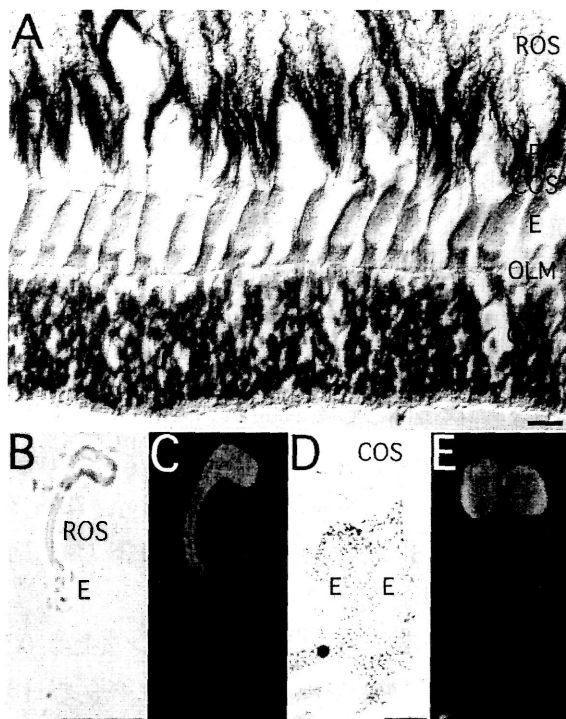


Fig. 1 クロマグロ成魚網膜におけるオプシンの発現
桿体, 錐体ともに外節のみにオプシン発現している。A. HE染色, B, C クロマグロ桿体, D, F クロマグロ錐体。ROS: 桿体外節, RPE: 網膜色素上皮, COS: 錐体外節, E: 楕円体, OLM: 外限界膜, ONL: 外核層。

視細胞の発達過程 孵化後約12時間目の仔魚では, 網膜の層構造は不完全であり, どの細胞にもRET-P1のシグナルは見られなかった。孵化後約36時間目では, 網膜の層構造が観察され, 錐体細胞の細胞体と考えられる柱状の外核層にRET-P1のシグナルが示されたが, 形態的に明確な錐体の外節は確認できなかった。孵化後約60時間目では, 主に背側でRET-P1陽性の錐体細胞の外節が観察された。また, それらの外節に接する色素上皮細胞で色素顆粒の移動を確認した。孵化後約60時間目以降では, RET-P1陽性の外節を有した錐体細胞が, 背側から腹側に向けて増加するとともに, 外核層のRET-P1シグナルが減弱し, 外節部分へと局限するのを観察した。孵化後4.5日目には, 外核層のRET-P1のシグナルが外核層から消失した。

孵化後15日目には, 再び外核層にRET-P1陽性の細胞が現れた。孵化後4.5日目にRET-P1のシグナルがすでに外節部分に局限したこと, 錐体の細胞密度は, レンズ径の拡大とともに減少すること⁷⁾, これまでに報告された海産魚は, 変態後に桿体が発現すること⁸⁾などを考慮すると, 新しく現れたRET-P1陽性の細胞は桿体の細胞体と考えられた。このシグナルは, その後, 日令を経るにつれて増強するとともに広がりを見せ, 孵化後21日目には錐体の細胞体だけで構成された外核層のレンズ側にそれらとは形態の異なるRET-P1陽性の細胞が2, 3層付け加わるのを観察した。また, 錐体の外節が存在する領域の強膜側にRET-P1陽性の桿体外節が確認された。

以上の観察をまとめると, クロマグロ仔魚の錐体細胞は, 孵化後60時間目前後に外節の発達を伴い, 背側から出現することがわかった。また, 桿体細胞は孵化後15~21日目の変態直前に外節の発達を伴い, 出現することがわかった。(図2)

考 察

2才魚の網膜における視細胞の標識法 本研究では視細胞を標識するためにラット桿体オプシンを認識するモノクローナル抗体のRET-P1を利

	形態変化	網膜	視細胞
0日	孵化	層構造未形成	未分化
1.5日		層構造形成	錐体細胞体
2.5日	眼球黒化 開口		錐体外節
15日			桿体細胞体
21日	変態		桿体外節

図2. 視細胞の出現時期のまとめ

用した。この抗体は魚類から哺乳類まで様々な生物種の桿体オプシンに交差することが報告されている^{3,8-9)}。我々は、当初RET-P1を桿体外節のみの標識に利用しようとした。しかし、RET-P1は桿体外節だけではなく錐体外節も標識した。この結果は、RET-P1によって認識されるエピトープが、クロマグロ桿体オプシンと錐体オプシンの両者に存在することを意味する。そこで、RET-P1が認識するエピトープについて文献により検討した。RET-P1はラット桿体オプシンにおけるN末端の4-10番残基に存在するエピトープを認識する。⁸⁾この領域のアミノ酸配列を比較すると、様々な生物種の桿体オプシンだけではなく、魚類（キンギョ、メダカ、ゼブラフィッシュ）の緑錐体オプシンにも非常に高い相同性が示された。また、色覚を持つ魚類では、外節の長さの異なる錐体はそれぞれ別の視物質を発現しているが、本実験で観察した限り、クロマグロではすべての錐体外節がRET-P1によって標識された。以上の情報および実験結果から考察すると、クロマグロの錐体外節に発現するオプシンは緑オプシン一種類である可能性が高いと考えられた。

ConAおよびPNAはレクチンの一種である。レクチンは糖および糖鎖に結合するタンパク質群である。視細胞に発現するオプシンは糖タンパク質であり、それぞれ特異的な糖鎖をもつ。例えば、ラット桿体オプシンはN末端のアスパラギン残基に

マンノースで構成される糖鎖をもつ。この糖鎖にConAが特異的に結合することで、桿体外節が標識される。そこで、我々はクロマグロ桿体外節のみの標識にConAを、錐体外節のみの標識にPNAを利用しようとした。⁴⁻⁵⁾しかし、RITC-ConAは、桿体外節だけでなく錐体外節も弱く標識し、FITC-PNAは錐体外節を標識しなかった。この結果は、クロマグロ桿体外節、錐体外節に存在するオプシンの糖鎖構造が類似することを意味している。この結果もまた、クロマグロの錐体オプシンが一種類であることを示唆させる。しかし、発現する錐体オプシンを正確に理解するにはクロマグロにおけるオプシン遺伝子のクローニングが必要である。

もし、クロマグロの錐体オプシンが緑オプシン一種類であれば、緑の波長領域の光を受容して対象物の形、大きさなどを判断すると考えられ、クロマグロの水槽壁に対する反応が緑色で低いことに関連するかもしれない。²⁾

視細胞の発達過程 脊椎動物の網膜には、視細胞（桿体、錐体）、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の5種類の神経細胞がある。網膜ではこれらの細胞が整然と配列し、層構造を形成している。視細胞によって検出された光刺激の情報は層から層へ引き継がれ、やがて視神経を通過して脳に達する。脳に達した刺激はそこで処理され、判断される。

光受容の最初の段階は視物質（オプシンとレチナルもしくはオプシンと3-デヒドロレチナルの複合体）が光を受容するところから始まる。この視物質は視細胞の外節に局在している。外節の細胞膜は細胞の内側に折れ込んで多数の円盤状のひだ（ディスク）を形成することで膜表面の面積を増加させ、多数の視物質を確保できるような構造となっている。視覚機能が十分に起こるためには、視物質が十分に発現していること、外節のおよびそのディスクの形態形成が十分に完成することが必要である。

孵化後約12時間目では、網膜の層構造は全く形成されず、オプシンの発現も見られなかった。このステージでは光を受容できないであろう。孵化

後約 36 時間目には、網膜の層構造が観察された。層構造が存在することは、各層の神経細胞が分化を終了し、特異的な機能を担うことが可能であることと、神経細胞間のシナプスが形成過程にあるか完了したことを意味する。しかし、この時期には、錐体細胞の細胞体と考えられる柱状の外核層にオプシンが発現し、形態的に明確な錐体外節が確認できないことから、細胞体で合成されたオプシン分子がその中を拡散によって移動し、外節に到達していないことを示唆する。すなわち、このステージでも光を十分に受容できないと考えられる。孵化後約 36 時間目は、卵黄嚢が大きく開口もしていない前期仔魚期である⁴⁾ため、視覚が必要ないのかもしれない。孵化後約 60 時間目には、主に背側で RET-P1 陽性の錐体細胞の外節が観察された。このステージから光刺激を受容できる可能性が高い。クロマグロは、孵化後 60 時間目前後に開口し、72~86 時間目に摂餌を始めることが報告されている。¹⁾ 摂餌開始期には錐体細胞が利用されることを示唆する。しかし、このステージには外核層にオプシンの発現する錐体細胞が観察されることから、錐体による光受容は完全でないかもしれない。成魚ではオプシンの発現は外節に局限する。視細胞が形態的にも機能的にも完成すると、外節に形成されたディスクに、オプシン分子が能動的に輸送、収容されるからであろう。この観点から考察すると、外核層の RET-P1 のシグナルが外核層から消失した孵化後 4.5 日目前後に、錐体による光受容が機能的に完成するのではないかと考えられる。このステージはクロマグロ仔魚の浮上死、沈降死が発生する時期と一致する²⁾。クロマグロ仔魚における光受容能の増加が、浮上運動や沈降運動の始まりに関係するかもしれない。

孵化後 15 日目には、再び外核層に RET-P1 陽性の細胞が現れた。また、孵化後 21 日目には桿体の細胞体および外節が確認された。この結果から、桿体細胞は孵化後 15~21 日目の変態直前に外節の発達を伴い出現することがわかった。ヒラメでは、この時期に、桿体の形成されることが報告されている。⁵⁾ クロマグロも他の海産魚と同様に変

態直前に桿体が発現することがわかった。桿体外節が形成される孵化後 21 日目前後から薄明時の視力が飛躍的に向上し始めるであろう。

謝 辞

本研究の実施にあたり、クロマグロ受精卵を採集し、ご送付頂きました近畿大学水産研究所奄美実験場の方々に心より感謝致します。

文 献

- 1) 宮下 盛. クロマグロの種苗生産に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 2002; 8: 1-171
- 2) 石橋泰典, 宮下 盛, 澤田好史, 岡田貴彦, 倉田道雄. クロマグロにおける衝突死の発生機構について. 同書, 2005.
- 3) Barnstable CJ. Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature*. 1980; 286: 231-235.
- 4) Blanks JC, Johnson LV. Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 1983; 221: 31-41.
- 5) Omura Y, Shiozawa S, Tabata K. Proliferation of rod cells in the mature retina of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 2004; 70: 80-86.
- 6) 渡辺恒彦. 「病理標本の作り方」(病理技術研究会編) 光文堂, 東京. 40-42.
- 7) Johns PR. Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J. Neuroscience*. 1982; 2: 178-198.
- 8) Hargrave PA, Adamus G, Arendt A, McDowell JH, Wang J, Szaby A, Curtis D, Jackson RW. Rhodopsin's amino terminus is a principal antigenic site. *Exp. Eye Res.* 1986; 4: 363-373
- 9) Silver R, Witkovsky P, Horvath P, Alones V, Barnstable CJ, Lehman MN. Coexpression of opsin- and VIP-like-immunoreactivity in CSF-contacting neurons of the avian brain. *Cell. Tissue. Res.* 1988; 253: 189-198.